

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA

Gabriel de Lima Rosa

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE PREDNISOLONA EM PARÂMETROS  
EPILEPTOGÊNICOS, COMPORTAMENTAIS E INFLAMATÓRIOS EM MODELO  
ANIMAL CRÔNICO DE CRISE EPILÉPTICA INDUZIDA PELO  
PENTILENOTETRAZOL**

Porto Alegre

2021

Gabriel de Lima Rosa

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE PREDNISOLONA EM PARÂMETROS  
EPILEPTOGÊNICOS, COMPORTAMENTAIS E INFLAMATÓRIOS EM MODELO  
ANIMAL CRÔNICO DE CRISE EPILÉPTICA INDUZIDA PELO  
PENTILENOTETRAZOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Fisiologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Simon Coitinho

Porto Alegre

2021

### CIP - Catalogação na Publicação

de Lima Rosa, Gabriel  
EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE PREDNISOLONA EM  
PARÂMETROS EPILEPTOGÊNICOS, COMPORTAMENTAIS E  
INFLAMATÓRIOS EM MODELO ANIMAL CRÔNICO DE CRISE  
EPILEPTICA INDUZIDA PELO PENTILENOTETRAZOL / Gabriel  
de Lima Rosa. -- 2021.  
73 f.  
Orientadora: Adriana Simon Coitinho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da  
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Biológicas: Fisiologia, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Epilepsia. 2. Inflamação. 3. Modelo Animal. I.  
Simon Coitinho, Adriana, orient. II. Título.

Gabriel de Lima Rosa

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE PREDNISOLONA EM PARÂMETROS  
EPILEPTOGÊNICOS, COMPORTAMENTAIS E INFLAMATÓRIOS EM MODELO  
ANIMAL CRÔNICO DE CRISE EPILÉPTICA INDUZIDA PELO  
PENTILENOTETRAZOL**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas: Fisiologia como requisito parcial para a obtenção do título de  
Mestre em Fisiologia

Aprovado em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Luciano Stürmer de Fraga, Doutor, UFRGS.

---

Patrícia Pereira, Doutora, UFRGS.

---

Patrícia Grolli Ardenghi, Doutora, LACEN-RS.

---

Adriana Simon Coitinho, Doutora, UFRGS (Orientadora).

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus familiares Marinêz, Jorge, Guilherme e Ana Paula, por todo o suporte e auxílio em mais essa conquista.

Aos membros da banca avaliadora, professores Luciano Stürmer de Fraga, Patrícia Pereira e Patrícia Ardenghi, pela contribuição valiosíssima ao serem os avaliadores desta dissertação.

Ao pessoal do laboratório: Professora Adriana Simon Coitinho, a qual tenho a honra de ser orientado desde a graduação e que tem importância ímpar, não só pela orientação formal mas também pelos próprios exemplos, em toda minha formação acadêmica e de futuro professor da área das ciências da saúde; Edson, fiel escudeiro nos experimentos e que, ainda na graduação, foi essencial para minha inserção no laboratório; Amanda, pessoa extremamente solícita, atenciosa e dona de um conhecimento técnico sem igual; Rafael, IC mais longínquo da história e sempre a postos para o que precisarmos; Vitória, IC que já entrou direto nos experimentos e que virou parceira de rolês e de piadas intermináveis de madrugada.

Aos colegas de pós-graduação, que compartilharam problemas e soluções, dificuldades e alegrias, em diferentes situações ao longo desses dois anos. A lista é longa, mas posso citar nomes como Marjoe, Nath, Sérgio, Iasmin, Diane, Vanessa, Maria e vários outros colegas importantes.

Aos amigos como Débora, pelos mil livros emprestados para a seleção e muitas outras companheirices; Rudá, pela amizade e aprendizado de outras habilidades cruciais para o contexto profissional como docente (e não docente também).

Aos órgãos de fomento, como o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Sem esses órgãos, nenhuma pesquisa seria viável.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela construção e manutenção

de uma estrutura ímpar de apoio à pesquisa e ensino, mesmo diante de tantas dificuldades.

E por fim, mas não menos importante, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, pelo contínuo esforço em manter um padrão de qualidade na formação de nossos pesquisadores e docentes e a todos os membros da nossa comunidade que lutam diariamente pela evolução de nosso PPG.

**Resumo:** A epilepsia é uma condição neurológica crônica caracterizada por crises epiléticas espontâneas e recorrentes. O alto grau de refratariedade aos tratamentos farmacológicos atuais – cerca de 30% a 40% dos pacientes não respondem adequadamente – evidencia a necessidade de melhor elucidação dos seus aspectos etiológicos com vistas ao desenvolvimento de uma terapêutica mais eficaz. Nesse contexto, os processos inflamatórios surgem como um importante componente tanto etiológico quanto prognóstico, e os estudos em humanos e em modelos animais vêm demonstrando cada vez mais evidências desse envolvimento. O presente trabalho discorre sobre o uso de um anti-inflamatório esteroidal, a prednisolona, em modelo animal crônico de crises epiléticas, cujo objetivo é avaliar os efeitos da administração do fármaco sobre parâmetros epileptogênicos, comportamentais e inflamatórios. Os resultados obtidos demonstraram ação protetora da prednisolona, sugerindo efeito benéfico na progressão do quadro epileptogênico. De forma geral, ocorreu melhora nos parâmetros epileptogênicos (como severidade das crises epiléticas e tempo de latência para primeira manifestação epilética), diminuição de citocinas pró-inflamatórias em estruturas encefálicas, mas não no soro, e a não ocorrência de alterações comportamentais que poderiam sugerir efeitos deletérios da administração do anti-inflamatório. Assim, mais uma evidência se soma ao conjunto de trabalhos que relacionam a inflamação com a epilepsia e as crises epiléticas.

**Abstract:** Epilepsy is a chronic neurological condition characterized by spontaneous and recurrent seizures. The high degree of refractoriness to current pharmacological treatments - about 30% to 40% do not respond properly - highlights the need for better elucidation of their etiological aspects in order to develop more effective therapy. In this context, inflammatory processes appear as an important component, both etiologic and prognostic, and studies in humans and animal models increasingly prove evidence of this involvement. The present work discusses the use of a steroidal anti-inflammatory, prednisolone, in a chronic animal model of epileptic seizures, which objective is to evaluate the effects of drug administration on epileptogenic, behavioral and inflammatory parameters. The results obtained demonstrate a protective action of prednisolone, suggesting a beneficial effect on the progression of the epileptogenic condition. In general, there is an improvement in epileptogenic parameters (such as severity of epileptic seizures and latency time for the first epileptic manifestation), a decrease in pro-inflammatory cytokines in brain structures, but not in the serum, and the non-occurrence of behavioral changes that could suggest harmful effects of the administration of the anti-inflammatory. Thus, more evidence is added to the set of studies that relate inflammation to epilepsy and epileptic seizures.

## LISTA DE ABREVIATURAS

CBG – Globulina de Ligação de Glicocorticoides

CD20 – Cluster of Differentiation 20 (marcador de diferenciação  
20)

COX – Ciclooxygenase

HER-2 – Receptor do fator de crescimento epidermal humano do tipo 2

ILAE – International League Against Epilepsy (Liga Internacional Contra  
Epilepsia)

IL-1 $\beta$  – Interleucina 1 Beta

IL-6 – Interleucina 6

LOX – Lipooxygenase

PTZ – Pentilenotetrazol

TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral alfa

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. EPILEPSIA.....	11
1.2. INFLAMAÇÃO.....	17
1.3. O PAPEL DA INFLAMAÇÃO NO CONTEXTO EPILEPTOGÊNICO.....	21
1.4. O MODELO DE <i>KINDLING</i> .....	23
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. OBJETIVO GERAL.....	23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS PUBLICADOS.....	24
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS NÃO PUBLICADOS.....	25
3.2.1. <i>Animais</i> .....	25
3.2.2. <i>Tratamentos</i> .....	25
3.2.3. <i>Teste de Memória (Reconhecimento de Objeto)</i> .....	26
3.2.4. <i>Tempo de Latência para Primeira Manifestação Epiléptica</i> .....	28
3.2.5. <i>Análise Estatística</i> .....	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1. RESULTADOS PUBLICADOS.....	29
4.2. RESULTADOS NÃO PUBLICADOS.....	57
4.2.1. <i>Teste de Memória (Reconhecimento de objetos)</i> .....	57
4.2.2. <i>Tempo de Latência para Primeira Manifestação Epiléptica</i> .....	58
5. DISCUSSÃO FINAL.....	59
6. CONCLUSÕES.....	65
7. PERSPECTIVAS.....	65
REFERÊNCIAS.....	66

## 1. INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma condição neurológica crônica caracterizada por crises epiléticas recorrentes e espontâneas. Com dados epidemiológicos variados conforme diferentes países (Beghi, 2020), suas causas ainda não estão totalmente elucidadas, o que contribui para um alto nível de refratariedade aos tratamentos farmacológicos atuais, com cerca de 30% a 40% dos pacientes não apresentando boa resposta (Engel, 2014).

Evidências experimentais e clínicas trazem a inflamação como um possível mecanismo envolvido tanto na origem quanto na progressão do quadro (Vezzani *et al.*, 2011; Walker & Sills, 2012; Rana & Musto, 2018). Assim, nosso grupo de pesquisa objetiva, por meio de diferentes protocolos e testando diferentes tipos de anti-inflamatórios, investigar a influência da imunomodulação sobre parâmetros comportamentais, epileptogênicos e imunológicos em modelo animal de crises epiléticas induzidas quimicamente.

Nessa dissertação serão apresentados trabalhos que envolveram o uso da prednisolona, anti-inflamatório esteroide, sobre modelo animal crônico de crises epiléticas, contextualizando com outros estudos realizados pelo mesmo grupo de pesquisa (Vieira *et al.*, 2016; Guzzo *et al.*, 2018) e de achados na literatura.

### 1.1. EPILEPSIA

O correto funcionamento das funções encefálicas depende, necessariamente, de uma adequada condição metabólica, imunológica e circulatória. Quaisquer desequilíbrios nessas condições, como a presença de síndromes metabólicas, podem levar a prejuízos na função do sistema nervoso central, levando desde pequenas alterações até a ameaça de falência de todo o organismo.

Localmente, diversos aspectos também devem estar finamente regulados. Alterações estruturais de populações neuronais específicas estão ligadas a patologias bastante conhecidas, como Mal de Parkinson e Doença de Alzheimer, por exemplo. Doenças priônicas, como a de Creutzfeldt-Jakob, também demonstram como alterações de função cerebral podem trazer consequências catastróficas para o indivíduo (Brandner, 2003).

A função cerebral depende, em última análise, da função neuronal, e esta, do seu estado elétrico. A liberação de neurotransmissores, um dos aspectos centrais do funcionamento neuronal, está intimamente ligada ao processo de despolarização da membrana celular, a qual é função da movimentação resultante de cargas positivas ou negativas pelos diferentes canais iônicos presentes na membrana (Grider & Glaubenskleee, 2019).

Como resumido na Figura 1, nas alterações do potencial de membrana, quando cargas positivas entram ou cargas negativas saem da célula neuronal, o potencial de membrana ultrapassa o seu limiar de disparo e ocorre o processo de despolarização celular. O processo de despolarização faz com que canais de cálcio voltagem-dependentes se abram, permitindo o influxo desse íon e levando à mobilização das vesículas contendo neurotransmissores, os quais são finalmente liberados na fenda sináptica para se ligar nos receptores neuronais pós-sinápticos e assim realizar o seu efeito (Grider & Glaubenskleee, 2019). Por outro lado, quando cargas positivas saem ou cargas negativas entram na célula, ocorre o processo de hiperpolarização, dificultando ainda mais a abertura dos mesmos canais de cálcio dependentes de voltagem. Assim, os neurotransmissores não são liberados na fenda sináptica e seus efeitos pós-sinápticos não ocorrem.

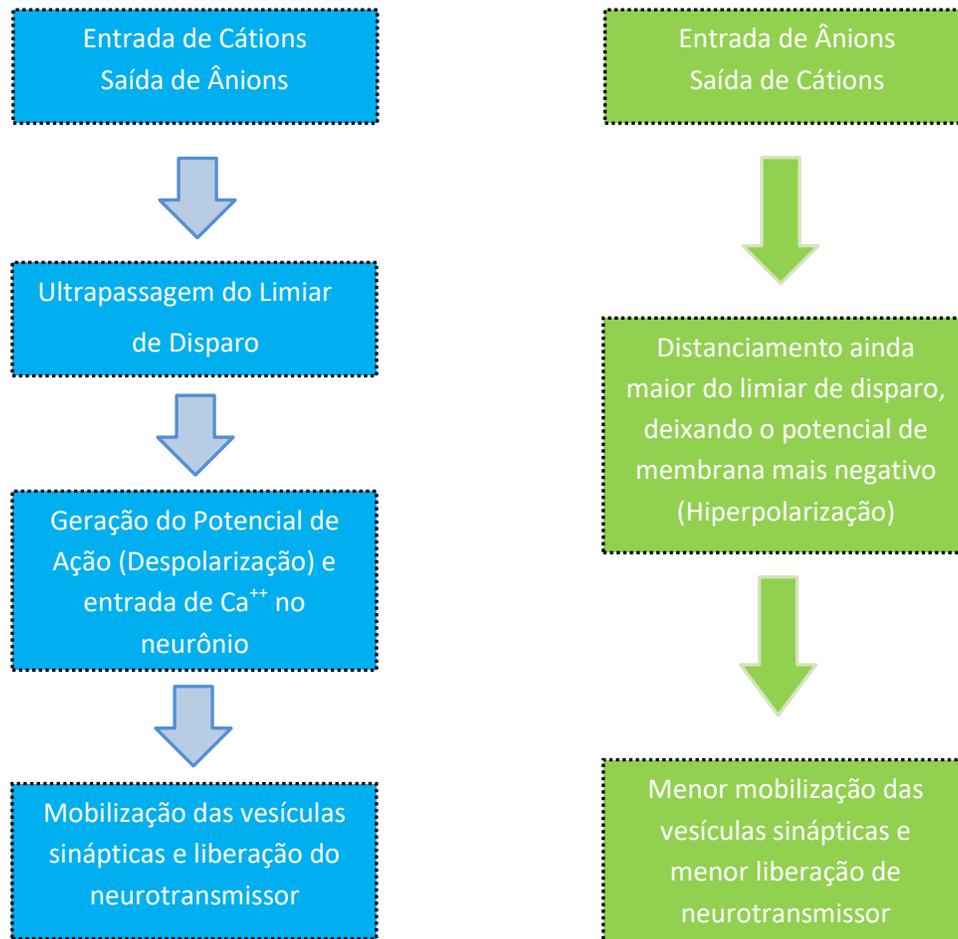


Figura 1: Esquema simplificado dos processos decorrentes da despolarização e hiperpolarização da membrana neuronal. Figura elaborada pelo autor.

Em um encéfalo saudável, os processos de excitação neuronal (ocasionados pela despolarização) e inibição neuronal (ocasionados pela hiperpolarização) são controlados de acordo com a necessidade do indivíduo. Quando ocorrem desequilíbrios nessa relação, manifestações clínicas como coma e crises epilépticas podem ocorrer. É justamente um estado de hiperexcitabilidade e de sincronismo neuronal que geram as crises epilépticas, sejam elas parciais, quando apenas algumas populações neuronais são afetadas, ou generalizadas, quando todo o encéfalo é afetado (Bromfield, Cavazos & Sirven, 2006).

A epilepsia é a condição definida quando o indivíduo apresenta pré-

disposição para as crises epilépticas, que ocorrem de forma espontânea e recorrente, diferenciando-se, portanto, de crises epilépticas pontuais ocasionadas por motivos como traumas encefálicos e intoxicações (Epilepsy Foundation, 2020). Isso significa, portanto, que em uma situação de trauma encefálico (um choque de cabeça em um esporte, por exemplo), uma eventual crise epiléptica não significa que aquele indivíduo tenha epilepsia. Por outro lado, traumas encefálicos são causa importante de posterior desenvolvimento de epilepsia, com o indivíduo apresentando crises espontâneas e recorrentes pelo menos 1 semana após o trauma (Verellen & Cavazos, 2010), tendo nos seus mecanismos neuroinflamatórios um alvo importante de estudos (Mukherjee *et al.*, 2020).

Como ilustrado na Tabela 1, há uma série de subtipos definidos pela nova classificação da Liga Internacional Contra Epilepsia (ILAE) (Fisher *et al.*, 2017), a classificação básica de crises epilépticas é definida como de início focal, que engloba as crises de manifestação motora (como crises tônicas, atônicas e mioclônicas) e não motora (que apresentam alteração comportamental, cognitiva e/ou sensorial, por exemplo), podendo ocorrer a manifestação de mais de uma forma ao mesmo tempo, bem como a bilateralização tônico-clônica de uma crise inicialmente focal, e generalizada, que também engloba manifestações motoras, entre elas a mais conhecida popularmente, a crise tônico-clônica, e manifestações não motoras, como a chamada “crise de ausência”. É possível também que haja a ocorrência de crises sem a determinação de tipo de início, como quando o indivíduo estava dormindo ou sem um observador que pudesse determinar. Na nova classificação, os termos “simples” e “complexo” foram descontinuados, assim como “parcial” foi substituído por “focal”. Importante salientar também que o termo “convulsão”, popularmente usado para designar as crises generalizadas tônico-clônicas, não é considerado termo técnico e não deve ser utilizado em meios científicos, embora persista no vocabulário popular (Fisher *et al.*, 2017).

Também destacado na Tabela 1, as epilepsias são classificadas (Scheffer et al., 2017), de acordo com os tipos de crises epiléticas, em epilepsia focal, generalizada, focal e generalizada e desconhecida, situação que pode ocorrer quando o médico tem dificuldades de avaliação ambulatorial, de acesso ou de realização dos exames de eletroencefalografia. Outros tipos comuns são as síndromes epiléticas, em que o indivíduo apresenta uma série de características incluindo tipos de crises, como a síndrome de West, uma forma grave de síndrome epilética infantil (Scheffer et al., 2017).

Tabela 1: Resumo simplificado das classificações de crises epiléticas e epilepsia segundo a nova classificação da ILAE.

<b>Tipos de Crises Epiléticas</b>		
Início Focal	Generalizada	Outros
<b>Motoras:</b> Tônicas, atônicas, mioclônicas.	<b>Motoras: Tônico-clônica</b>	<b>Não-determinadas</b>
<b>Não Motoras:</b> Comportamental, sensorial e/ou cognitiva.	<b>Não Motoras:</b> Ausência	
<b>Tipos de Epilepsia</b>		
Focal		
Generalizada		
Focal e Generalizada		
Desconhecida		
<b>Síndromes Epiléticas</b>		

Tabela elaborada pelo autor com base na classificação da ILAE (Fisher *et al.*, 2017; Scheffer *et al.*, 2017)

Os dados acerca da epidemiologia da epilepsia são bastante variados, mas um recente estudo de revisão (Beghi, 2020) sugere que a prevalência geral da epilepsia seja de 7,60 a cada 1000 indivíduos. Tanto a incidência quanto a prevalência da epilepsia são maiores em países de baixa e média renda em comparação aos países de alta renda, por motivos

que podem incluir desde piores condições sanitárias a menor acesso a tratamentos médicos. A incidência da condição também é notavelmente maior nas faixas etárias extremas, com indivíduos de até 1 ano e a partir de 85 anos apresentando índices bastante elevados (Beghi, 2020).

Uma vez que os tipos de crises epiléticas e suas causas são bastante variadas, também o são as formas de tratamento. Ainda que de forma geral sua ação consista em diminuir a excitabilidade neuronal, as formas pelas quais os fármacos realizam essa ação diferem conforme o tipo de molécula (Bromfield, Cavazos & Sirven, 2006). Um dos mecanismos mais comuns é o bloqueio de canais de sódio, podendo-se citar a carbamazepina, lamotrigina, fenitoína, topiramato e valproato. O aumento do influxo de íons cloreto pelos canais GABAérgicos também é outra abordagem realizada, podendo-se citar os benzodiazepínicos, como o clonazepam e o diazepam. Ainda, pode-se realizar o bloqueio de canais de cálcio dependentes de voltagem, com a utilização, por exemplo, de etossuximida. Outras abordagens farmacológicas também são possíveis, como bloqueio de receptores de glutamato, que é um mecanismo proposto para fármacos como lamotrigina e topiramato. Em casos de epilepsia refratária aos tratamentos e cujo foco epilético é bem definido, pode-se avaliar a possibilidade de intervenção cirúrgica (Miller & Hakimian, 2013).

Apesar da ampla gama de tratamentos farmacológicos disponíveis, cerca de 30% a 40% dos pacientes apresentaram refratariedade a essa abordagem (Engel, 2014). A cirurgia pode ser realizada em alguns casos, mas cabe destacar que sempre há riscos inerentes a essa técnica. Embora se saiba que as alterações elétricas sejam a causa básica das crises epiléticas, ainda muito se discute o que causa essas alterações. A elucidação da questão é primordial para o desenvolvimento de uma terapêutica mais eficaz. Alguns fatores podem estar implicados na condição, como canalopatias que afetem o fluxo iônico, morte de populações neuronais GABAérgicas ou falha na produção de

neurotransmissores de efeito inibitório, perda de homeostasia da regulação do glutamato, alterações estruturais no tecido encefálico e outros variados fatores (Dudek & Shao, 2003; George, 2004; Coulter & Eid, 2012). Outro possível componente que vem ganhando um robusto corpo de evidências é a inflamação, a qual pode ser tanto causa como consequência das crises epiléticas, bem como importante fator prognóstico (Vezzani *et al.*, 2011; Walker & Sills, 2012; Rana & Musto, 2018).

## 1.2. INFLAMAÇÃO

Os processos inflamatórios são uma resposta do sistema imune frente a agressões ao organismo. Eles são uma causa e uma consequência dos processos de ativação leucocitária, apresentando um papel fundamental no combate a agentes infecciosos e na resolução de danos teciduais decorrentes de diversos tipos de estímulos nocivos ao organismo. Sem a inflamação, a resposta imune seria severamente comprometida, pondo em risco todo o funcionamento do organismo (Ashley, Weil & Nelson, 2012).

Por vezes, no entanto, a exagerada atividade do sistema imune leva a quadros de inflamação que se tornam danosos. Um exemplo clássico ocorre nas doenças autoimunes, em que linfócitos desenvolvem autoimunidade contra estruturas próprias do indivíduo, levando à produção de anticorpos contra antígenos normais do organismo. Tanto a própria ativação leucocitária quanto o dano no tecido atingido culminam na produção de uma série de marcadores inflamatórios, que por sua vez aumentam ainda mais a ativação, multiplicação e migração leucocitárias, levando a um sistema de *feedback* positivo gerador de uma inflamação sistêmica que agrava o quadro do paciente (Theofilopoulos, Kono & Baccala, 2017). Lúpus Eritematoso Sistêmico, Artrite Reumatóide e Esclerose Múltipla são exemplos de doenças autoimunes nas quais esses processos de ativação inadequada do sistema imune acontecem (Amaya-

Amaya *et al.*, 2013; Coral-Alvarado, Patarroyo & López, 2013; García-Carrasco *et al.*, 2013).

As alternativas farmacológicas mais comumente utilizadas para tratar de condições inflamatórias são os imunomoduladores esteroidais, os inibidores das ciclooxigenases (COX) e, recentemente, os anticorpos monoclonais (Kotsovilis & Andreakos, 2014).

Conforme demonstrado na Figura 2, os fármacos anti-inflamatórios esteroidais, como a dexametasona e a betametasona, apresentam grande hidrofobicidade, e por isso, são capazes de atravessar as membranas celulares e se acoplar a receptores nucleares e/ou citosólicos. O complexo fármaco-receptor interage com os elementos de resposta a fármacos esteroidais, os quais irão regular a maquinaria transcricional de genes específicos, diminuindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas ligadas aos processos de ativação, migração e multiplicação leucocitárias. Ainda, aumentam a expressão de lipocortina, a qual inibe a fosfolipase A2, diminuindo a produção de ácido araquidônico e, conseqüentemente, de toda a cascata inflamatória. Estudos recentes também sugerem a possibilidade da ocorrência de efeitos não clássicos, ou seja, não dependentes de modulação direta da expressão gênica (Schwartz *et al.*, 2016; Barabás *et al.*, 2018).

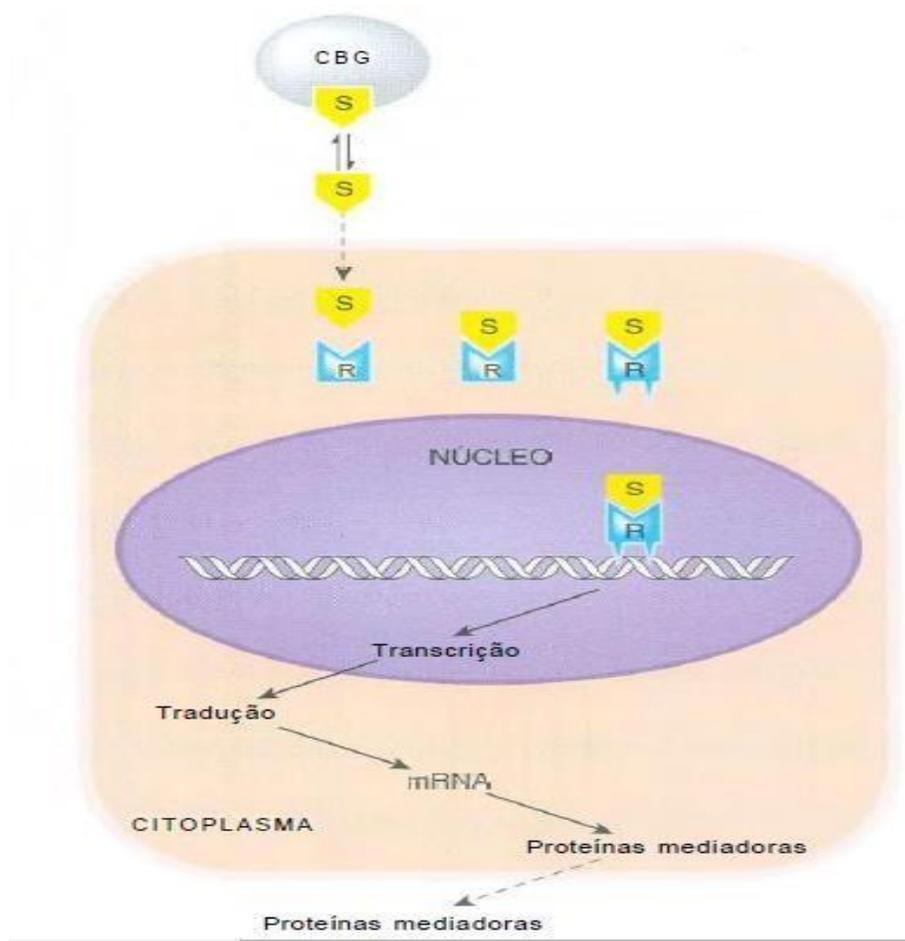


Figura 2: Esquema simplificado do mecanismo de ação de fármacos anti-inflamatórios esteroidais. CBG = Globulina de Ligação dos Glicocorticóides. Fonte da imagem: Farmacologia. H. P. Rang, M. M. Dale, J. M. Ritter, P. K. Moore. 5ª edição. Capítulo 27. Figura 27.6.

Os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais são os inibidores da COX, a qual é responsável pela conversão de ácido araquidônico em prostaglandina, que levam às manifestações da inflamação como edema, vasodilatação e dor (Osafó *et al.*, 2017). Uma representação gráfica do mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não esteroidais é apresentada na Figura 3.

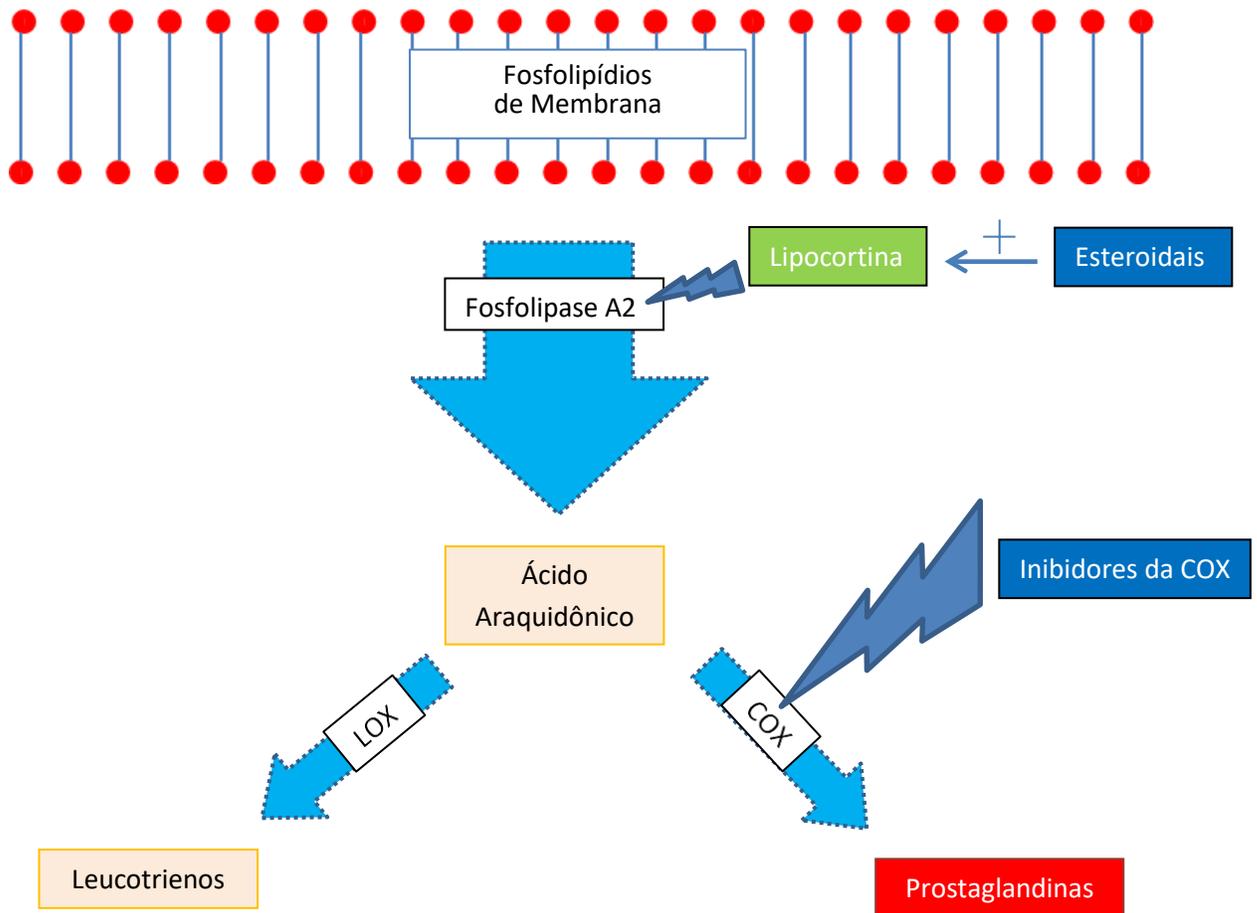


Figura 3: Esquema simplificado do mecanismo de ação dos anti-inflamatórios não esteroidais. Destaca-se também a ação sobre a Lipocortina, cuja expressão é aumentada pelos fármacos esteroidais. Figura elaborada pelo autor.

Há, ainda, a possibilidade de utilização de anticorpos monoclonais, como nos medicamentos Stelara (ustequinumabe - inibidor seletivo de IL-12 e IL-23), Herceptin ou Kadcykla (trastuzumabe – bloqueio de HER-2) e Riximyo (Rituximabe – Liga-se a CD20), que já são utilizados em terapias contra neoplasias, alergias, doenças autoimunes e outras condições, apresentando resultados promissores em todas essas áreas, com a vantagem de serem desenvolvidos contra alvos específicos, em contraste com as classes de anti-inflamatórios mais comuns (Weber & Keam, 2009; Boekhout, Beijnen & Schellens, 2011; Randall, 2016). No entanto, seus

custos ainda são proibitivos para a maior parte da população, o que também dificulta o seu emprego nos sistemas públicos de saúde.

Uma das formas de avaliação do perfil inflamatório é por meio do estudo das citocinas, moléculas envolvidas na sinalização do sistema imune. As citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), o TNF-alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-6 (IL-6) são mantidas em níveis basais em tecidos cerebrais saudáveis, mas podem sofrer alterações em quadros neuropatológicos, como em infecções no sistema nervoso central, doenças autoimunes e doenças neurodegenerativas. Uma maior expressão dessas citocinas pode estar ligada aos processos epileptogênicos, seja como consequência das crises epiléticas ou como fator prognóstico da condição, se caracterizando também como possível alvo terapêutico (Li *et al.*, 2011; Youn, Sung & Lee, 2013).

### **1.3. O PAPEL DA INFLAMAÇÃO NO CONTEXTO EPILEPTOGÊNICO**

Contextualizando os achados na literatura relacionando inflamação e crises epiléticas, os efeitos nocivos de processos inflamatórios intensos e a possibilidade de modular essa resposta, a inflamação surge como um novo alvo de investigação e, possivelmente, também novo alvo terapêutico (Vezzani *et al.*, 2011; Walker & Sills, 2012; Rana & Musto, 2018).

Assim, embora os mecanismos que fazem com que a inflamação leve aos desequilíbrios elétricos ainda não estejam totalmente esclarecidos, são realizados estudos envolvendo inflamação, imunomoduladores e crises epiléticas, com alguns resultados bastante promissores (Vezzani & Granata, 2005; Beheshti Nasr *et al.*, 2013; Borham *et al.*, 2016).

Estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa já demonstraram efeitos protetores dos fármacos diclofenaco sódico (Vieira *et al.*, 2016) e dexametasona (Guzzo *et al.*, 2018) sobre parâmetros comportamentais e

inflamatórios em modelo animal de crises epiléticas.

No trabalho envolvendo diclofenaco sódico, o anti-inflamatório foi administrado nas doses de 5mg/kg e 10mg/kg e, em ambos, houve efeito protetor antiepilético quando comparado ao grupo salina. Ainda, houve diminuição dos níveis de IL-6 no hipocampo dos animais tratados com a dose inferior de diclofenaco sódico, embora a dose de 10mg/kg tenha levado a níveis aumentados de TNF- $\alpha$  no soro dos animais (Vieira *et al.*, 2016).

A dexametasona, utilizando o mesmo modelo experimental, foi administrada nas doses de 1mg/kg, 2mg/kg e 4mg/kg, e os resultados novamente foram de ação antiepilética em todas as dosagens, além de diminuição, no hipocampo dos animais tratados, dos níveis de IL-1 na menor e na maior dose de dexametasona, diminuição dos níveis de TNF- $\alpha$  no soro e hipocampo dos animais tratados com a dose de 4mg/kg, mas aumento de TNF- $\alpha$  hipocampal nos animais tratados com a dose de 1mg/kg (Guzzo *et al.*, 2018).

Ambos os estudos avaliaram citocinas pró-inflamatórias em regiões hipocampais e corticais, as quais apresentam relevância na epilepsia. O hipocampo é uma estrutura na qual frequentemente ocorre o desencadeamento das alterações eletroencefálicas e que está envolvida em quadros de epilepsia refratária, como muitas vezes ocorre na epilepsia do lobo temporal (Blair, 2012; Téllez-Zenteno & Hernández-Ronquillo, 2012). Áreas corticais estão envolvidas na epilepsia não apenas em quadros de má-formação cortical (Schwartzkroin & Walsh, 2000), mas também como alvo de propagação das crises epiléticas e possível geração de um ambiente propício ao seu agravamento (Kramer *et al.*, 2017).

Esses dados demonstram o grande potencial da linha de pesquisa. Outros estudos, com outros protocolos e outros fármacos anti-inflamatórios,

tanto esteroidais quanto não-esteroidais, estão em andamento em nosso laboratório, com alguns resultados bastante promissores (dados não publicados).

#### **1.4. O MODELO DE *KINDLING***

Foi utilizado um modelo de *kindling* (Ergul Erkec, 2015), que será descrito em detalhes nas seções seguintes. No processo de *kindling*, os animais são submetidos a doses subconvulsivantes de um fármaco pró-convulsivante. Essas doses não geram crises severas nos primeiros dias, mas a intensidade das crises se eleva consistentemente ao longo do protocolo, alcançando índices bastante elevados ao seu final. Assim, é possível realizar diferentes tipos de intervenção, em diferentes momentos do protocolo, para verificar possíveis efeitos benéficos dessa intervenção em parâmetros como severidade e tempo de latência para as crises epiléticas.

O modelo de *kindling* já foi utilizado em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa, que demonstraram efeito protetor de fármacos anti-inflamatórios no contexto epileptogênico (Vieira *et al.*, 2016; Guzzo *et al.*, 2018).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Investigar o efeito da prednisolona em modelo animal crônico de crises epiléticas induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ), avaliando parâmetros epileptogênicos, comportamentais e inflamatórios.

## 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da prednisolona sobre os parâmetros de severidade das crises epiléticas e o tempo de latência para a primeira crise no modelo animal crônico de crises epiléticas (*kindling*) induzidas pelo PTZ.
- Investigar o efeito da prednisolona sobre parâmetros comportamentais no modelo animal crônico de crises epiléticas (*kindling*) induzidas pelo PTZ.
- Investigar o efeito do fármaco prednisolona sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 em soro, córtex pré-frontal e hipocampo de animais submetidos ao modelo animal crônico de crises epiléticas (*kindling*) induzidas pelo PTZ.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1. MATERIAIS E MÉTODOS PUBLICADOS

A maior parte dos resultados dos experimentos realizados foi publicada na revista *Neuroscience Letters*, sob o título “*Effects of Prednisolone on Behavioral and Inflammatory Profile in Animal Model of PTZ-induced Seizure*”. Todos os aspectos relacionados a materiais e métodos desses resultados estão contemplados no artigo, o qual está presente na sessão “4. Resultados”.

## **3.2. MATERIAIS E MÉTODOS NÃO PUBLICADOS**

### **3.2.1. Animais**

Para esse estudo, foram utilizados ratos Wistar machos, de 2 meses de idade, pesando aproximadamente 300g, os quais foram obtidos no Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e mantidos em biotério setorial do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da mesma Universidade. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno, com no máximo 4 animais em cada caixa, e submetidos a condições padrão de biotério, com água e comida à vontade e respeitando o ciclo claro-escuro de 12h. Procedimentos para o cuidado e uso dos animais foram adotados de acordo com as regulamentações publicadas pela Sociedade Brasileira para Neurociências e Comportamento (SBNec). Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob o número 23554. Foram utilizados 40 animais (n = 10 em cada grupo).

### **3.2.2. Tratamentos**

Além da prednisolona, foram utilizados os mesmos fármacos (controle e indutor de crises) empregados anteriormente em estudos do nosso grupo de pesquisa (Vieira *et al.*, 2016; Guzzo *et al.*, 2018). Como fármaco indutor de crises epiléticas, utilizou-se o PTZ, antagonista GABAérgico com função pró-convulsivante e que também é utilizado por outros grupos de pesquisa com o mesmo objetivo (Ergul Erkeç, 2015). Como controle negativo, salina, e como controle positivo, diazepam, fármaco de ação agonista GABAérgica e utilizado tanto em modelos experimentais quanto clinicamente para controle de crises epiléticas e epilepsia, também já utilizado em nossos protocolos.

No protocolo (também descrito no artigo), os animais (n=10 em cada grupo) receberam, diariamente, diazepam (2 mg/kg) ou solução de cloreto de sódio (0,9 g%)

ou diferentes doses de prednisolona (1 mg/kg e 5 mg/kg), via intraperitoneal, durante 14 dias, de acordo com seus próprios grupos, como demonstrado na Figura 4.

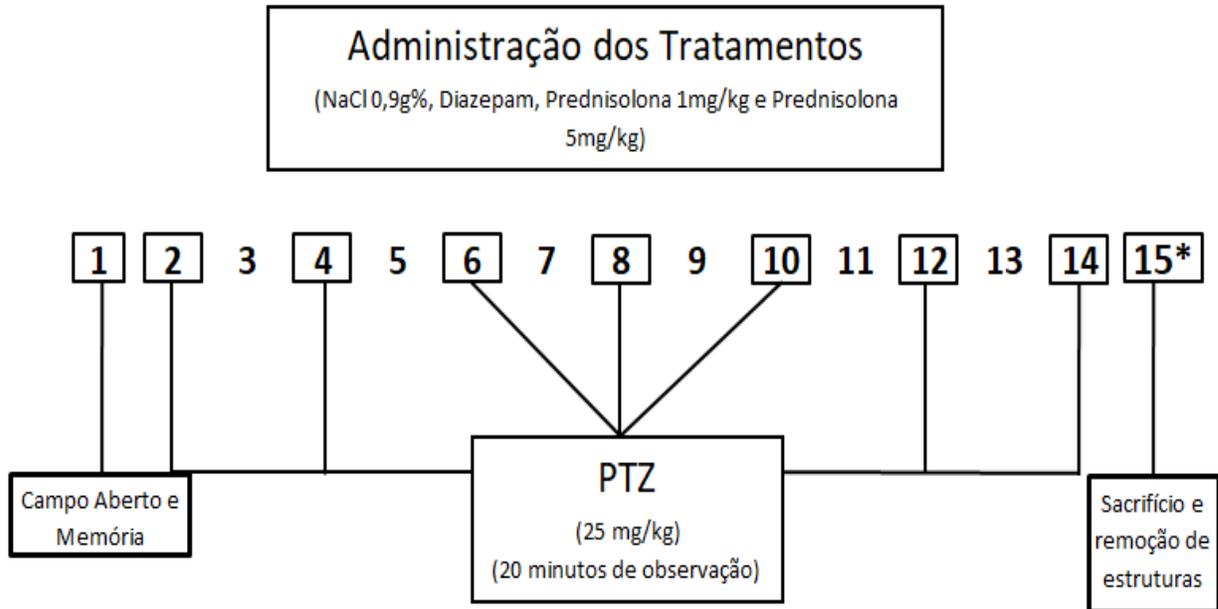


Figura 4: Desenho experimental. Os números representam os dias de experimento. PTZ = Pentilenotetrazol. \* Animais não recebem tratamento no 15º dia. Figura elaborada pelo autor.

### 3.2.3. Teste de Memória (Reconhecimento de Objetos)

Os animais foram submetidos ao teste de memória, conhecido como teste de reconhecimento de objetos. No primeiro dia (Dia 1 do protocolo)(sessão treino), antes da administração dos tratamentos, os animais foram expostos, como demonstrado na Figura 5, durante 5 minutos, a dois diferentes objetos (objetos A e B), colocados em caixa de acrílico similar à utilizada para os testes de campo aberto (descrito no artigo). Durante esses 5 minutos, foram registrados os tempos totais nos quais os animais exploraram cada um dos objetos (Maurmann *et al.*, 2011).

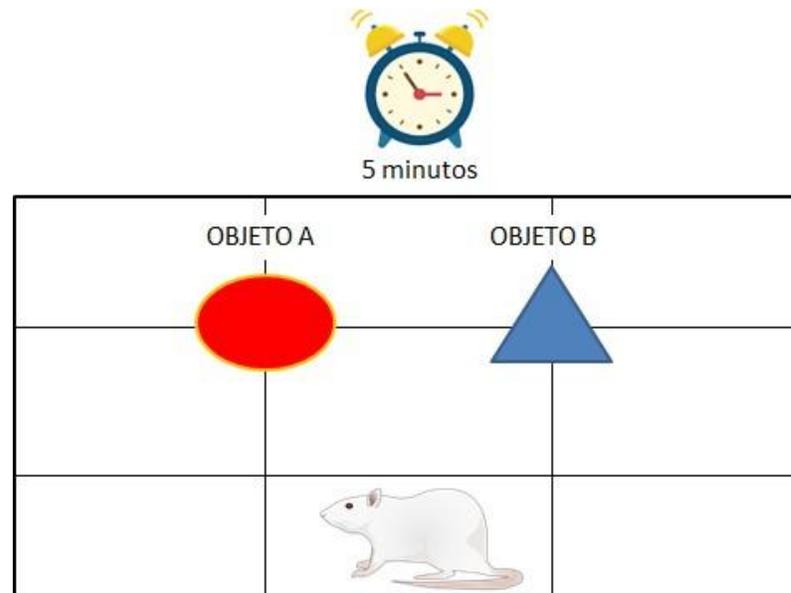


Figura 5: Imagem representativa da Sessão Treino (Visão bidimensional). Imagem meramente ilustrativa. Não representa a real proporção entre os objetos. Figura elaborada pelo autor.

Imediatamente após a sessão de treino, os animais receberam os respectivos tratamentos, intraperitonealmente, de acordo com os grupos: salina, diazepam, prednisolona 1mg/kg ou prednisolona 5 mg/kg. Nesta tarefa, os animais não receberam o PTZ.

Vinte e quatro horas depois (Dia 2 do protocolo)(sessão teste memória de longa duração), os animais foram novamente expostos à tarefa por 5 minutos. Como exposto na Figura 6, nesta sessão um dos objetos é trocado (objeto B trocado por objeto C), e espera-se que esse novo objeto seja mais explorado que o objeto conhecido. Assim, tem-se uma medida indireta de possíveis alterações nos processos de memória devido aos tratamentos com os fármacos (Maurmann *et al.*, 2011). Cuidados de higiene foram adotados a cada animal que passou pela caixa, evitando vieses comportamentais como a presença de fezes e urina de outros animais.

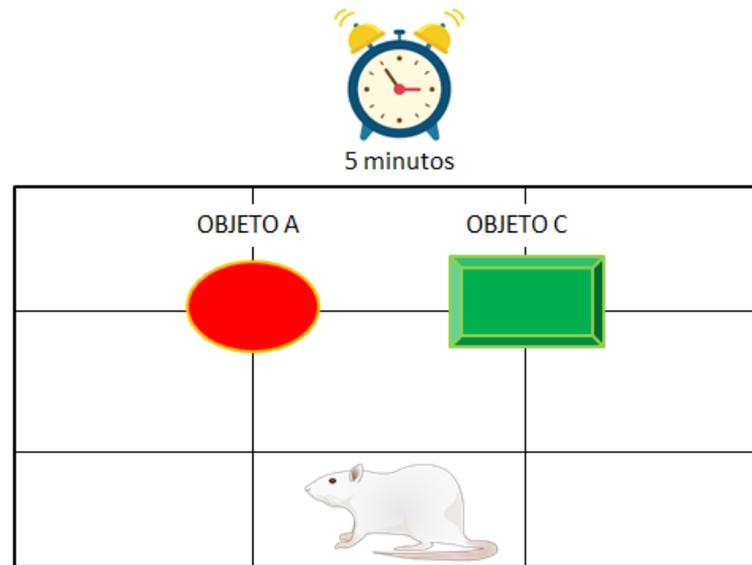


Figura 6: Imagem representativa da Sessão Teste. Imagem meramente ilustrativa. Não representa a real proporção entre os objetos. Figura elaborada pelo autor.

#### 3.2.4. Tempo de Latência para Primeira Manifestação Epiléptica

O tempo de latência para a primeira manifestação epiléptica foi registrado. Considerou-se como a primeira crise qualquer manifestação epiléptica, independentemente do seu grau de severidade, como em outros trabalhos do grupo de pesquisa (Vieira *et al.*, 2016; Guzzo *et al.*, 2018). Foram utilizados cronômetros e os tempos foram registrados em minutos e segundos.

#### 3.2.5. Análise Estatística

Os resultados não publicados foram apresentados como média e erro-padrão. Após a definição dos grupos e variáveis, foi realizado teste de análise de variância (ANOVA) de uma via para variáveis independentes, seguido de testes de post hoc de Tukey. Os resultados que demonstraram  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. Todos os testes

foram realizados a partir da criação de um banco de dados e foi utilizado o programa SPSS versão 18.0.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. RESULTADOS PUBLICADOS

A maior parte dos resultados dos experimentos realizados foi publicada na revista *Neuroscience Letters*, sob o título “*Effects of Prednisolone on Behavioral and Inflammatory Profile in Animal Model of PTZ-induced Seizure*”. Segue artigo para apreciação.

\* A versão presente no texto disponibilizado no LUME não é a versão publicada final. A versão final pode ser vista na revista *Neuroscience Letters*. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135560>

\*\* Pequenas modificações foram realizadas para a versão publicada final.

\*\*\* “Brazilian Committee for the Continuing Education of Postgraduate Personnel” foi modificado para “Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel”.

# Neuroscience Letters

## Effects of Prednisolone on Behavioral and Inflammatory Profile in Animal Model of PTZ-induced Seizure --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	NSL-201545R2
<b>Article Type:</b>	Research paper
<b>Keywords:</b>	Epilepsy. Inflammation. Prednisolone
<b>Corresponding Author:</b>	Adriana Simon Coitinho, PhD Federal University of Rio Grande do Sul Porto Alegre, BRAZIL
<b>First Author:</b>	Gabriel de Lima Rosa
<b>Order of Authors:</b>	Gabriel de Lima Rosa Edson Muller Guzzo Amanda Muliterno Domingues Rafael Bremm Padilha Vitoria Dias de Oliveira Amaral Adriana Simon Coitinho, PhD
<b>Abstract:</b>	<p>Epilepsy is a chronic neurological condition that affects 1% to 2% of the world population. Although research about the disease is advancing and a wide variety of drugs is available, about 30% of patients have refractory epilepsy which cannot be controlled with the most common drugs. This highlights the need for a better understanding of the disorder and new types of treatment for it. Against this backdrop, a growing body of evidence has reported that inflammation may play a role both in the origin and in the progression of seizures. It has shown a tendency to be both the root and the result of epilepsy. This investigation aimed to assess the impact of prednisolone, a steroidal anti-inflammatory drug, in an animal model of pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizures, at 1 mg/kg and 5 mg/kg doses. We also examined the degree of seizure severity and the modulation of pro-inflammatory cytokines in the treated animals. Four treatment groups were used (saline, diazepam, prednisolone 1 mg/kg, and prednisolone 5 mg/kg) and, in addition to their own daily treatments, subconvulsant doses of pentylenetetrazole (25 mg/kg) were administered every other day during a test protocol that lasted 14 days. After treatment, the cytokines interleukin 1 beta (IL-1<math>\beta</math>), interleukin 6 (IL-6), and tumor necrosis factor alpha (TNF-<math>\alpha</math>) were measured in the animals' sera, hippocampi, and prefrontal cortices. Animals treated with prednisolone presented less severe seizures than the animals in the saline group, and there was a decrease in pro-inflammatory cytokine levels in central structures, but not peripheral ones. In short, an animal model of chemically-induced epileptic seizures was used, in which the animals were treated with doses of prednisolone, and these animals presented less severe seizures than the negative control group (saline), in addition to showing decreased levels of pro-inflammatory cytokines IL-6, IL-1<math>\beta</math> and TNF-<math>\alpha</math>, in the hippocampi and prefrontal cortices, but not the sera.</p>

- Epilepsy may have an inflammatory process in its etiology
- Studies have shown protective effect of anti-inflammatory drugs on animal models
- Prednisolone was used in animal model of epileptic seizure
- The treatment with prednisolone was able to decrease the severity of seizures
- The treatment decreased expression of inflammatory cytokines in brain structures

## Effects of Prednisolone on Behavioral and Inflammatory Profile in Animal Model of PTZ-induced Seizure

Gabriel de Lima Rosa<sup>a</sup>, Edson Muller Guzzo<sup>a</sup>, Amanda Muliterno Domingues<sup>d</sup>, Rafael Bremm Padilha<sup>c</sup>, Vitória Dias de Oliveira Amaral<sup>c</sup>, Adriana Simon Coitinho<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup> Postgraduate Program in Biological Sciences – Physiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Postgraduate Program in Pharmacology and Therapeutics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>c</sup> Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil.

<sup>d</sup> Postgraduate Program in Agricultural and Environmental Microbiology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Dr. Adriana Simon Coitinho. Address: Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil, Tel.: 55 51 3308 3320, Fax: 55 51 3308 3166, E-mail address: [adriana.simon@ufrgs.br](mailto:adriana.simon@ufrgs.br) (A.S. Coitinho).

Abstract: Epilepsy is a chronic neurological condition that affects 1% to 2% of the world population. Although research about the disease is advancing and a wide variety of drugs is available, about 30% of patients have refractory epilepsy which cannot be controlled with the most common drugs. This highlights the need for a better understanding of the disorder and new types of treatment for it. Against this backdrop, a growing body of evidence has reported that inflammation may play a role both in the origin and in the progression of seizures. It has shown a tendency to be both the root and the result of epilepsy. This investigation aimed to assess the impact of prednisolone, a steroidal anti-inflammatory drug, in an animal model of pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizures, at 1 mg/kg and 5 mg/kg doses. We also examined the degree of seizure severity and the modulation of pro-inflammatory cytokines in the treated animals. Four treatment groups were used (saline, diazepam, prednisolone 1 mg/kg, and prednisolone 5 mg/kg) and, in addition to their own daily treatments, subconvulsant doses of pentylenetetrazole (25 mg/kg) were administered every other day during a test protocol that lasted 14 days. After treatment, the cytokines interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleukin 6 (IL-6), and tumor necrosis factor alpha

1 (TNF- $\alpha$ ) were measured in the animals' sera, hippocampi, and prefrontal cortices.  
2 Animals treated with prednisolone presented less severe seizures than the animals in  
3 the saline group, and there was a decrease in pro-inflammatory cytokine levels in  
4 central structures, but not peripheral ones. In short, an animal model of chemically-  
5 induced epileptic seizures was used, in which the animals were treated with doses of  
6 prednisolone, and these animals presented less severe seizures than the negative  
7 control group (saline), in addition to showing decreased levels of pro-inflammatory  
8 cytokines IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , in the hippocampi and prefrontal cortices, but not the  
9 sera.

10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Keywords: Epilepsy. Inflammation. Prednisolone.

## 1. Introduction

Epilepsy is a chronic neurological condition characterized by recurrent and spontaneous seizures. Globally prevalent, it affects about 65 million people, with a higher prevalence in developing countries [1]. Although there are several therapeutic alternatives, ranging from pharmacological approaches to surgical interventions, it is estimated that about 30% of cases are refractory to current treatments [2]. This brief outline highlights the need for a clearer understanding of the etiological aspects of epilepsy and the development of more effective forms of treatment. In both of these pursuits, one must consider that many factors may play a role in the epileptogenic process. These include not only the imminent excitatory-inhibitory imbalance of seizures, but also what causes them, such as changes in redox balance and brain morphology and function, channelopathies, traumas, and infections [3].

There is a growing body of evidence that points to the importance of inflammation in the epileptogenic process, and the possibility of it causing or worsening seizures. [4,5]. Pro-inflammatory cytokines, including interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6), are maintained at baseline levels in healthy brain tissue, but these may change under neuropathological conditions such as infections in the nervous system, and autoimmune and neurodegenerative diseases. Greater expression of these cytokines may be similarly linked to epileptogenic processes, either as a consequence of epileptic seizures or as a prognostic factor of the condition, making them a possible therapeutic target [6,7].

Previous studies by our research group in the kindling model have demonstrated the effect of the anti-inflammatory drugs Diclofenac sodium [8] and Dexamethasone [9] in decreasing the severity of seizures and pro-inflammatory cytokines levels. Besides this,

1 other research groups have reported a protective action of anti-inflammatory drugs  
2 against seizures in different animal models [10,11].  
3

4 This study aimed to test the effect of another anti-inflammatory drug, prednisolone, on  
5 the behavioral and inflammatory parameters in an animal model of chemically induced  
6 epileptic seizures. For this purpose, maximum seizure severity was assessed during  
7  
8 the chemical induction protocols, as well as the levels of pro-inflammatory cytokines IL-  
9 1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$ .  
10  
11

## 12 **2. Material and methods**

### 13 **2.1. Animals**

14 For this study, 2-month-old male Wistar rats (approximately 300 g body weight) were  
15 used. These were obtained from the central vivarium of the Federal University of Rio  
16 Grande do Sul, and kept in a department vivarium of the Basic Health Sciences  
17 Institute, at the same university. The animals were housed in polypropylene boxes, with  
18 a maximum of 4 animals per box. The rats were maintained under standard conditions  
19 and a 12h dark-light cycle, with ad lib access to water and food. Experiments were  
20 approved by the ethical committee of the Federal University of Rio Grande do Sul and  
21 performed following the "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHEW,  
22 publication n° (NIH) 80-23, 1985".  
23  
24

### 25 **2.2. Experimental Groups**

26 The animals were divided into 4 experimental groups, with n = 8-10 per group. The  
27 positive control group received diazepam (a drug with a known anticonvulsant effect),  
28 at a dose of 2 mg/kg. The negative control group received sodium chloride (NaCl 0.9 g  
29 %) and the treated groups received prednisolone at doses of 1 mg/kg, while another  
30 group received a dose of 5 mg/kg. The animals were given daily intraperitoneal (i.p.)  
31 doses of diazepam, sodium chloride (0.9 g %), or prednisolone for 14 days.  
32  
33

### 34 **2.3. Kindling Model**

35 A kindling model, which is considered a chronic model of seizures, was used [12].  
36 According to Figure 1, animals from each group received the drug doses described in  
37 the experimental groups (diazepam 2 mg/kg, sodium chloride (0.9 g %), prednisolone 1  
38 mg/kg, or prednisolone 5 mg/kg), for 14 days. Every other day they also received  
39 intraperitoneal injections of subconvulsant doses of PTZ (25 mg/kg of body weight).  
40  
41 PTZ was administered 30 min after other treatments and the animals were observed  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 for 20 min to assess seizure severity using the Racine Scale [13], as described by  
2 Guzzo et al [9].  
3

#### 4 2.4. Behavior test

5  
6 To examine animal behavior patterns, open field tests were performed on all the  
7 animals on Day 1, immediately after the administration of the treatments. In the test,  
8 the measures of grooming, rearing, crossings, fecal boli deposits, and latency before  
9 locomotion were studied in the open field apparatus. This enclosure consisted of a  
10 transparent acrylic box measuring 40 cm (length) x 60 cm (width) and 60 cm (height),  
11 with the floor divided into 9 equal quadrants. Each animal was always initially placed in  
12 the same quadrant and observed for 5 minutes. After each test, the floor of the box was  
13 cleaned with water and Ethanol to avoid behavioral bias due to clues left by urine,  
14 feces, or other forms of waste.  
15

16  
17 The findings of each test may show changes in the animal's behavioral state [14]. The  
18 number of crossings and latency before locomotion could serve as measures to  
19 determine the animal's capacity to move and explore. Rearing responses indicate  
20 exploratory and orientating activity while the number of grooming acts and fecal boli  
21 deposits can indicate anxiety-like behavior.  
22

#### 23 2.5. Brain microdissection and tissue preparation

24  
25 On the 15th day, the animals were sacrificed by decapitation and the brain tissue was  
26 immediately removed. The prefrontal and hippocampal areas, from both hemispheres,  
27 were dissected and homogenized with 1:10 (mass/volume) PBS buffer. The  
28 homogenate was centrifuged at 800 g for 10 minutes and the supernatant was  
29 collected for biochemical and immunological assays. For serum, blood from the  
30 brainstem was collected and centrifuged at 1000 g for 5 minutes. All samples were  
31 stored at -80 °C. Both sides of each structure were used for analysis.  
32

#### 33 2.6. Biochemical assays

34  
35 The Lowry method was used to determine protein concentrations, with the aid of  
36 commercial total protein quantification kits (Biotechnica - Advanced Biotechnology).  
37

#### 38 2.7. Immunological assays

39  
40 An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to analyze cytokines TNF-  
41 alpha, IL-1 $\beta$ , and IL-6 levels, with the aid of commercial kits (Invitrogen). Cytokine  
42 concentrations in the hippocampus, prefrontal cortex, and serum were tested through  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 the previously mentioned process. An ELISA assay is performed in wells with pre-  
2 incubated monoclonal antibodies, to which the sample is added. The cytokine, when  
3 captured by its specific, pre-incubated monoclonal antibody, is detected by adding  
4 another biotinylated monoclonal antibody and a peroxidase enzyme that binds to the  
5 antibody-antigen-antibody complex. The TMB substrate is added and the generated  
6 color is observed. The color is proportional to the number of cytokines in the sample,  
7 which is quantified by a plate reader device (Biochrom Anthos Zenyth 200rt) at 450 nm.  
8 All samples were performed in duplicate. To compare absorbance values, a standard  
9 curve was conducted with reagents from the same kit. This standard curve was also  
10 used at least in duplicate. The results were expressed in pg/mL for serum and pg/mg  
11 protein for brain tissues.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

## 19 2.8. Statistical Analysis

20  
21 Data were presented as mean and standard error or deviation. After defining the  
22 groups and variables, a One-Way Analysis of Variance (ANOVA) was performed for  
23 independent variables, followed by the Tukey or Bonferroni post hoc test. Results with  
24  $p < 0.05$  were considered statistically significant. All statistical analyses were  
25 conducted using a database that was set based on the SPSS statistical package,  
26 version 18.0.  
27  
28  
29  
30  
31

## 32 3. Results

33  
34  
35  
36 The results obtained in the open field tests revealed differences in the number of  
37 rearing responses between the diazepam and prednisolone 5 mg/kg groups ( $p = 0.041$ ,  
38 ANOVA and Bonferroni post hoc test) (Figure 2). For the other parameters, there was  
39 no significant difference between study groups ( $p > 0.05$ , ANOVA test) (Figure 2).  
40 Results were expressed as means of 8 to 10 animals per group.  
41  
42  
43

44  
45 Regarding the degrees of seizure severity, both doses of prednisolone had a protective  
46 effect at different times (Figure 3). After administering PTZ, the animals that received  
47 saline developed more complex seizures. The use of diazepam led to lower intensities  
48 of epileptic seizures when compared to the saline group on Day 1 ( $p = 0.017$ , ANOVA  
49 and Tukey post hoc test), Day 2 ( $p = 0.024$ , ANOVA and Tukey post hoc test) Day 6 ( $p$   
50  $< 0.01$ , ANOVA and Tukey post hoc test) and Day 7 ( $p = 0.011$ , ANOVA and Tukey post  
51 hoc test). This corroborated its value as a positive control. The lower dose of  
52 prednisolone also showed protective properties, for three consecutive days. This  
53 demonstrates its protective effect within the kindling model context. On Days 4, 5, and  
54 6, the animals treated with the lower dose of prednisolone presented less severe  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 seizures than the animals treated with saline ( $p = 0.030$ ;  $p = 0.019$ ;  $p < 0.01$   
2 respectively; ANOVA and Tukey post hoc test). The higher dose of 5 mg/kg showed a  
3 protective effect on Day 1 ( $p < 0.01$ , ANOVA and Tukey post hoc test), and on Days 6  
4 and 7 ( $p < 0.01$  and  $p = 0.016$ , respectively; ANOVA and Tukey post hoc test), thus  
5 demonstrating a protective effect for 2 days in a row and once again showing protective  
6 properties in a kindling model. Results were expressed as means for 8-10 animals.  
7  
8  
9

10  
11 In terms of quantification of pro-inflammatory cytokines, in the prefrontal cortex (Figure  
12 4) all treatments presented lower expressions of IL-6 when compared to the saline  
13 group ( $p < 0.01$ , ANOVA and Bonferroni post hoc test), and the lower dose of  
14 prednisolone contained lower cytokine levels than the diazepam group ( $p < 0.01$ ,  
15 ANOVA and Bonferroni post hoc test). Regarding the IL-1 $\beta$  cytokine, once again  
16 prednisolone 1 mg/kg demonstrated a protective effect when compared to the saline  
17 group ( $p < 0.01$ , ANOVA and Bonferroni post hoc test). However, the levels of IL-1 $\beta$  in  
18 the diazepam group were higher than the saline group ( $p < 0.01$ , ANOVA and  
19 Bonferroni post hoc test). Both doses of prednisolone revealed lower levels of cytokine  
20 when compared to the diazepam group ( $p < 0.01$ , ANOVA and Bonferroni post hoc  
21 test). Regarding TNF- $\alpha$ , the lower dose of prednisolone also had a protective effect  
22 when compared to the saline group ( $p = 0.013$ , ANOVA and Bonferroni post hoc test).  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

33 In the hippocampus (Figure 5), the anti-inflammatory effects of the prednisolone  
34 treatments persisted. All treatment groups indicated lower levels of IL-6 than the saline  
35 group ( $p < 0.01$ , ANOVA and Bonferroni post hoc test). The levels of protection in  
36 animals treated with both doses of prednisolone were higher than the diazepam group  
37 ( $p < 0.01$ , ANOVA and Bonferroni post hoc test). Finally, the higher dose of  
38 prednisolone was able to decrease hippocampal levels of IL-6 more effectively than the  
39 lower dose ( $p = 0.048$ , ANOVA and Bonferroni post hoc test). Regarding IL-1 $\beta$ , rats  
40 treated with either dose of prednisolone repeatedly showed lower levels than the  
41 animals from the saline group ( $p < 0.01$ , ANOVA and Bonferroni post hoc test). The  
42 diazepam group was also presented a protective effect, demonstrating lower IL-1 $\beta$   
43 levels than the saline group ( $p < 0.01$ , ANOVA and Bonferroni post hoc test).  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51 Prednisolone 5 mg/kg and diazepam conclusively presented protective properties  
52 against TNF- $\alpha$  levels, different from the saline group ( $p < 0.01$ , ANOVA and Bonferroni  
53 post hoc test). Similarly, prednisolone 1 mg/kg also led to lower levels of TNF- $\alpha$  when  
54 compared to the saline group ( $p = 0.039$ , ANOVA and Bonferroni post hoc test),  
55 although factor levels remained higher than in animals treated with the prednisolone 5  
56 mg/kg dose ( $p = 0.039$ , ANOVA and Bonferroni post hoc test).  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 In the serum tests (Figure 6), changes in some cytokines levels led to unexpected  
2 results, indicating higher levels in animals treated with prednisolone. Regarding IL-6,  
3 both doses of prednisolone presented higher levels than the saline group ( $p < 0.01$ ,  
4 ANOVA and Bonferroni post hoc test) and the diazepam group ( $p < 0.01$ , ANOVA and  
5 Bonferroni post hoc test). Concerning IL-1 $\beta$ , there were no differences between groups.  
6  
7  
8  
9  
10 The treatment with prednisolone 5 mg/kg resulted in higher TNF- $\alpha$  levels than in  
11 animals from the saline group ( $p = 0.018$ , ANOVA and Bonferroni post hoc test), the  
12 diazepam group ( $p = 0.018$ , ANOVA and Bonferroni post hoc test), and the  
13  
14 prednisolone 1 mg/kg group ( $p = 0.047$ , ANOVA and Bonferroni post hoc test). All  
15 cytokine results, in all structures, were expressed as the means of 5 animals per group.  
16  
17  
18  
19

#### 20 **4. Discussion**

21  
22 Despite advances in therapy, diagnoses, and the pathophysiological understanding of  
23 epilepsy and seizures, a significant portion of patients remain refractory to conventional  
24 treatments, highlighting the need for further progress in research on the condition. With  
25 an increasing global prevalence, epilepsy is one of the main and the most debilitating  
26 diseases of the central nervous system. Antiepileptic drugs provide, as their main  
27 mechanisms of action, regulation of ion channel activity, and modulation of neuronal  
28 excitability. These properties consequently alter the pattern of neuron action potential  
29 triggers and lead to seizure control. Although most patients present improvement with  
30 this approach, about 30% still experience therapeutic failure and this has precipitated  
31 further investigations into other mechanisms that may assist in treatment. It is against  
32 this backdrop that research on the impact of anti-inflammatory drugs on seizures in  
33 animal models has emerged, with some reports of promising results [8,9,11]. In our  
34 study, we administered prednisolone, a steroidal anti-inflammatory, and assessed its  
35 effect on a severe level of seizures and the modulation of pro-inflammatory cytokines.  
36  
37 Additionally, we ran behavioral tests that demonstrated its pharmacological safety in  
38 this model.  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48

49  
50  
51 Many patients with epilepsy have other neurological and behavioral comorbidities,  
52 either due to common pathophysiology with these other processes or because of the  
53 chronically impaired quality of life the condition causes [15]. Conditions such as  
54  
55 obsessive-compulsive disorder, depression, bipolar depression, and anxiety are  
56 commonly associated with epilepsy [16,17]. Aware of this, our first step in the  
57 experiments (Day 1 of the experimental design) was to conduct acute behavioral  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 testing. The animals were organized and treated in experimental groups and placed in  
2 an open field apparatus. There was a significant difference in the rearing behavior of  
3 the group of animals treated with diazepam, which can be explained by the anxiolytic  
4 and sedative action of benzodiazepine. Treatment with prednisolone did not modify  
5 exploratory, motor, or anxious behavior [14]. Moreover, since these are drugs routinely  
6 used in medical practice, information regarding tolerance and biosafety has already  
7 been well described.  
8  
9

10  
11  
12 The kindling protocol we followed is characterized as a chronic insult model involving  
13 the administration of subconvulsant doses of PTZ on alternate days. PTZ acts as an  
14 antagonist of GABAergic receptors, blocking the influx of chloride ions through these  
15 channels and increasing neuronal excitability and seizures. While both doses of  
16 prednisolone presented a protective action, only the lower dose did so for 3  
17 consecutive days. Besides showing protective action on Day 1, the 5 mg/kg dose of  
18 prednisolone demonstrated mitigation of epileptic seizures for 2 consecutive days and  
19 again at the end of the testing protocol, when the kindling process was well  
20 established.  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

30 Although the exact mechanisms by which inflammation may play a role in the control of  
31 seizures are not known, experimental evidence indicates that changes in the  
32 inflammatory profile may influence epileptogenesis [8,9,18]. TNF-alpha, IL-1 $\beta$ , and IL-6  
33 cytokines are related to leukocyte multiplication and migration processes, the increased  
34 signaling of inflammatory cascades, edema, and increased vascular permeability  
35 [19,20]. These effects, which can occur both systemically and centrally, can also result  
36 in defects in the blood-brain barrier, another process that may similarly be related to  
37 inflammation [21]. IL-1 $\beta$  can be linked to convulsive processes not only by its direct  
38 action on neuronal death but also by the activation of NMDA-type glutamate receptors  
39 that can increase neuronal excitability [22]. TNF- $\alpha$  also appears to be linked to  
40 neuronal death processes [23]. IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  additionally activate transcriptional  
41 factors that increase the expression of IL-6, which, like the other cytokines we  
42 mentioned, has a pro-inflammatory function and may be associated with degenerative  
43 conditions [24]. These cytokines, present at baseline, may increase in the serum and  
44 brain tissues of patients with epilepsy and in animals submitted to protocols for  
45 inducing seizures [25]. Other studies have already reported a decrease in seizures and  
46 a decrease in the levels of pro-inflammatory cytokines [8,9].  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 As expected, in this study the administration of prednisolone had a protective effect  
2 against the levels of the inflammatory cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  in structures of  
3 the central nervous system. Regarding the prefrontal cortex, both doses were effective,  
4 with a notable performance by the lower dose of prednisolone. From a pharmacological  
5 perspective, this is a very favorable result since it would also imply fewer or milder side  
6 effects because of the lower dose. Concerning IL-1 $\beta$ , curiously, the group of animals  
7 treated with diazepam revealed higher levels than the animals in the saline group. In  
8 the hippocampus, diazepam and both doses of prednisolone presented a protective  
9 effect and, although diazepam does not have anti-inflammatory properties, its  
10 anticonvulsant effect may also assist with decreasing inflammation. As previously  
11 discussed, inflammation can either be the cause of seizures or occur as a complication.  
12 Therefore, decreases in the severity of the seizures may explain reductions in pro-  
13 inflammatory cytokine levels in brain structures, and this decrease may also be  
14 involved in the abatement of seizure severity. Despite protecting the central nervous  
15 system, the drugs were not effective in reducing peripheral inflammation. Intriguingly,  
16 both doses of prednisolone led to even higher levels of pro-inflammatory cytokines than  
17 the saline group in serum. This increase may suggest that specific neuroinflammatory  
18 pathways are activated in a dose and time-dependent manner, in relation to structures  
19 with distinct roles in epileptogenesis [8]. A limitation in our investigation was the  
20 quantification of only pro-inflammatory cytokines. Nevertheless, in future studies, we  
21 intend to assess anti-inflammatory cytokines as well.

22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36 A relevant concern about the use of anti-inflammatory drugs in the treatment of  
37 epilepsy is the side effects of chronic use. In fact, the continued use of these  
38 immunosuppressants may lead to a wide range of unwanted effects [26]. When  
39 considering immunomodulators, the cost-benefit ratio should be taken into account.  
40 Our tests on the effects of these immunosuppressants were justified by the especially  
41 high rate of treatment-refractory epilepsy to conventional approaches. For patients with  
42 frequent and intractable seizures, the possible side effects of anti-inflammatory drugs  
43 may be less harmful than the symptoms of epilepsy, which can be extremely  
44 debilitating. Furthermore, studies on the influence of inflammation on epileptogenic  
45 processes may not necessarily recommend the isolated use of steroidal drugs or  
46 cyclooxygenase inhibitors, but rather the associated use with other drugs. As research  
47 advances, it may be possible to demonstrate the use of specific antagonists with  
48 certain cytokines (or other particular agonists) in additional targeted treatment, with  
49 greater chances of therapeutic success and fewer side effects.

## 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 **5. Conclusion**

61  
62  
63  
64  
65

1 The administration of both doses of prednisolone mitigated the epileptic seizures  
2 induced by PTZ, and promoted a decrease in pro-inflammatory cytokine levels in the  
3 central nervous system, but not peripherally.  
4

5 This study contributes towards providing more experimental evidence about the role of  
6 inflammation in the epileptogenic process. Further studies are necessary to expand on  
7 this understanding and consider variations in drugs, doses, and induction models.  
8

### 9 **Conflict of Interest**

10 None.  
11

### 12 **Funding and Acknowledgments**

13 This study was supported in part by grants from the Brazilian National Council of  
14 Scientific and Technological Development (*Conselho Nacional de Desenvolvimento*  
15 *Científico e Tecnológico - CNPq*), the Brazilian Committee for the Continuing Education  
16 of Postgraduate Personnel (*Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível*  
17 *Superior - CAPES*) and the Vice-Rector of Research at UFRGS (*Pró-Reitoria de*  
18 *Pesquisa –PROPESQ/UFRGS*).  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28

### 29 **References**

- 30  
31  
32  
33  
34  
35 [1] A.K. Ngugi, C. Bottomley, I. Kleinschmidt, J.W. Sander, C.R. Newton, Estimation  
36 of the burden of active and life-time epilepsy: A meta-analytic approach,  
37 *Epilepsia*. 51 (2010) 883–890. [https://doi.org/10.1111/j.1528-](https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02481.x)  
38 [1167.2009.02481.x](https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02481.x).  
39  
40  
41  
42 [2] J. Engel, Approaches to refractory epilepsy, *Ann. Indian Acad. Neurol.* 17 (2014)  
43 S12–S17. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.128644>.  
44  
45  
46 [3] C.E. Stafstrom, L. Carmant, Seizures and Epilepsy: An Overview for  
47 Neuroscientists, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5 (2015).  
48 <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022426>.  
49  
50  
51 [4] A. Vezzani, B. Lang, E. Aronica, Immunity and Inflammation in Epilepsy, *Cold*  
52 *Spring Harb. Perspect. Med.* 6 (2016).  
53 <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022699>.  
54  
55  
56  
57 [5] Y.N. Paudel, M.F. Shaikh, S. Shah, Y. Kumari, I. Othman, Role of inflammation  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 in epilepsy and neurobehavioral comorbidities: Implication for therapy, *Eur. J. Pharmacol.* 837 (2018) 145–155. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.08.020>.

- 2  
3  
4 [6] G. Li, S. Bauer, M. Nowak, B. Norwood, B. Tackenberg, F. Rosenow, S. Knake, W.H. Oertel, H.M. Hamer, Cytokines and epilepsy, *Seizure*. 20 (2011) 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2010.12.005>.
- 5  
6  
7  
8  
9  
10 [7] Y. Youn, I.K. Sung, I.G. Lee, The role of cytokines in seizures: interleukin (IL)-  
11  $1\beta$ , IL-1Ra, IL-8, and IL-10, *Korean J. Pediatr.* 56 (2013) 271–274.  
12 <https://doi.org/10.3345/kjp.2013.56.7.271>.
- 13  
14  
15 [8] V. Vieira, D. Glassmann, P. Marafon, P. Pereira, R. Gomez, A.S. Coitinho, Effect  
16 of diclofenac sodium on seizures and inflammatory profile induced by kindling  
17 seizure model, *Epilepsy Res.* 127 (2016) 107–113.  
18 <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2016.08.020>.
- 19  
20  
21 [9] E.F.M. Guzzo, K.R. Lima, C.R. Vargas, A.S. Coitinho, Effect of dexamethasone  
22 on seizures and inflammatory profile induced by Kindling Seizure Model, *J.*  
23 *Neuroimmunol.* 325 (2018) 92–98.  
24 <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.10.005>.
- 25  
26  
27 [10] S.M. Beheshti Nasr, A. Moghimi, M. Mohammad-Zadeh, A. Shamsizadeh, S.M.  
28 Noorbakhsh, The effect of minocycline on seizures induced by amygdala  
29 kindling in rats, *Seizure*. 22 (2013) 670–674.  
30 <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2013.05.005>.
- 31  
32  
33 [11] L.E. Borham, A.M. Mahfoz, I.A.A. Ibrahim, N. Shahzad, A.A. ALrefai, A.A. Labib,  
34 B. Bin Sef, A. Alshareef, M. Khan, A. Milibary, S. Al Ghamdi, The effect of some  
35 immunomodulatory and anti-inflammatory drugs on Li-pilocarpine-induced  
36 epileptic disorders in Wistar rats, *Brain Res.* 1648 (2016) 418–424.  
37 <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.07.046>.
- 38  
39  
40 [12] O. Ergul Erkec, Pentylene tetrazol Kindling Epilepsy Model, *J. Turkish Epilepsi*  
41 *Soc.* (2015). <https://doi.org/10.5505/epilepsi.2015.08108>.
- 42  
43  
44  
45 [13] R.J. Racine, Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor  
46 seizure, *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32 (1972) 281–294.  
47 [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0).
- 48  
49  
50  
51 [14] I. Izquierdo, Different forms of post-training memory processing, *Behav. Neural*  
52 *Biol.* 51 (1989) 171–202. [https://doi.org/10.1016/s0163-1047\(89\)90812-1](https://doi.org/10.1016/s0163-1047(89)90812-1).
- 53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- [15] M. Seidenberg, D.T. Pulsipher, B. Hermann, Association of epilepsy and comorbid conditions, *Future Neurol.* 4 (2009) 663–668.  
<https://doi.org/10.2217/fnl.09.32>.
- [16] S. Gnanavel, Epilepsy and Depression: A Bidirectional Relationship, *J. Neurosci. Rural Pract.* 8 (2017) S5–S6. [https://doi.org/10.4103/jnrp.jnrp\\_203\\_17](https://doi.org/10.4103/jnrp.jnrp_203_17).
- [17] A.M. Kanner, Anxiety Disorders in Epilepsy: The Forgotten Psychiatric Comorbidity, *Epilepsy Curr.* 11 (2011) 90–91. <https://doi.org/10.5698/1535-7511-11.3.90>.
- [18] A. Vezzani, Inflammation and Epilepsy, *Epilepsy Curr.* 5 (2005) 1–6.  
<https://doi.org/10.1111/j.1535-7597.2005.05101.x>.
- [19] C. Gabay, Interleukin-6 and chronic inflammation, *Arthritis Res. Ther.* 8 (2006) S3. <https://doi.org/10.1186/ar1917>.
- [20] J.R. Lukens, J.M. Gross, T.-D. Kanneganti, IL-1 family cytokines trigger sterile inflammatory disease, *Front. Immunol.* 3 (2012).  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00315>.
- [21] A.J. Sorby-Adams, A.M. Marcoionni, E.R. Dempsey, J.A. Woenig, R.J. Turner, The Role of Neurogenic Inflammation in Blood-Brain Barrier Disruption and Development of Cerebral Oedema Following Acute Central Nervous System (CNS) Injury, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017). <https://doi.org/10.3390/ijms18081788>.
- [22] B. Viviani, S. Bartesaghi, F. Gardoni, A. Vezzani, M.M. Behrens, T. Bartfai, M. Binaglia, E. Corsini, M. Di Luca, C.L. Galli, M. Marinovich, Interleukin-1 $\beta$  Enhances NMDA Receptor-Mediated Intracellular Calcium Increase through Activation of the Src Family of Kinases, *J. Neurosci.* 23 (2003) 8692–8700.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-25-08692.2003>.
- [23] L. Probert, TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects, *Neuroscience.* 302 (2015) 2–22.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.038>.
- [24] T. Tanaka, M. Narazaki, T. Kishimoto, IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6 (2014).  
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>.
- [25] A. Vezzani, T. Granata, Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and

Clinical Evidence, *Epilepsia*. 46 (2005) 1724–1743.  
<https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00298.x>.

[26] A.L. Buchman, Side effects of corticosteroid therapy, *J. Clin. Gastroenterol.* 33 (2001) 289–294. <https://doi.org/10.1097/00004836-200110000-00006>.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Figure1

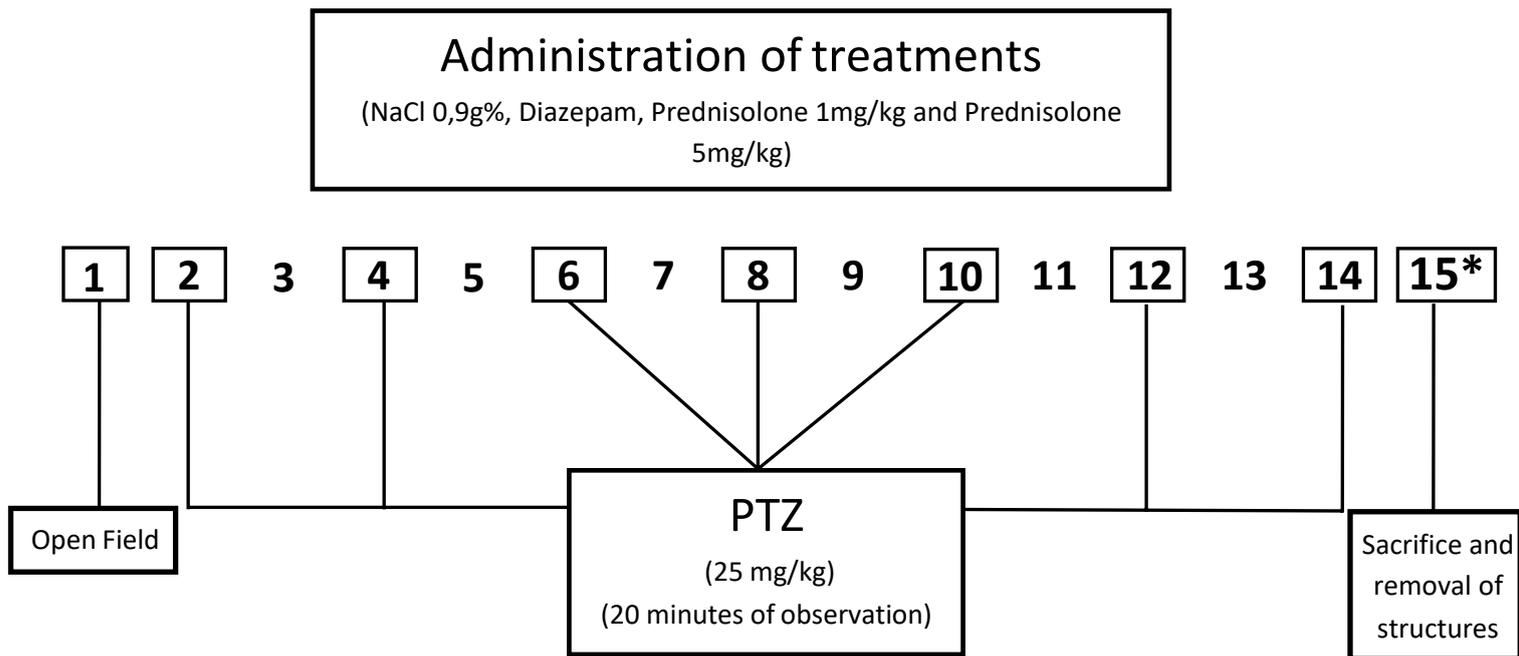
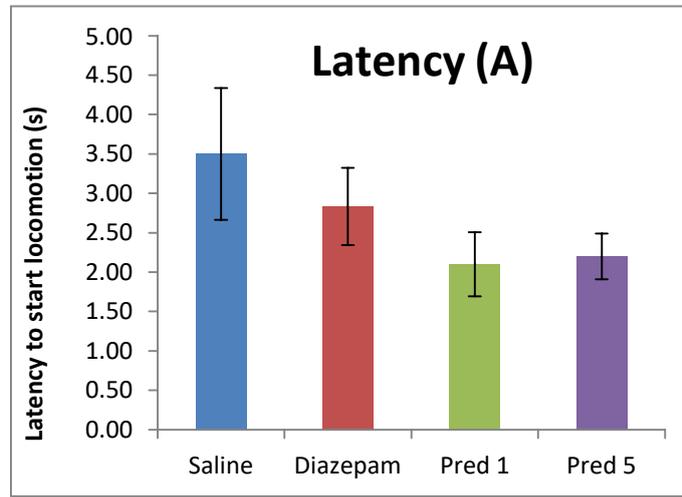
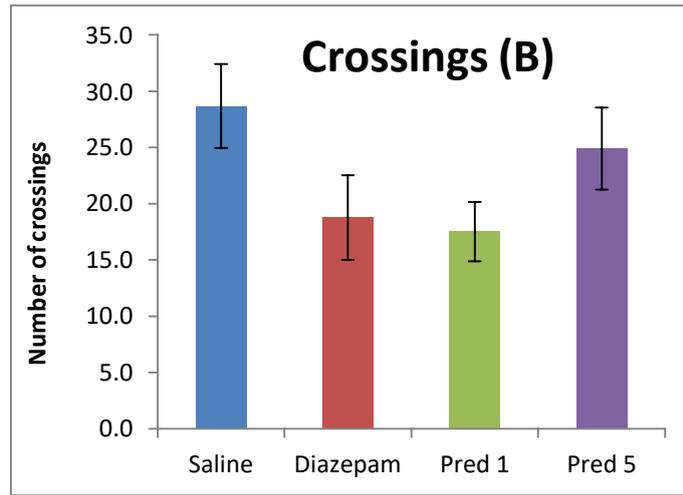
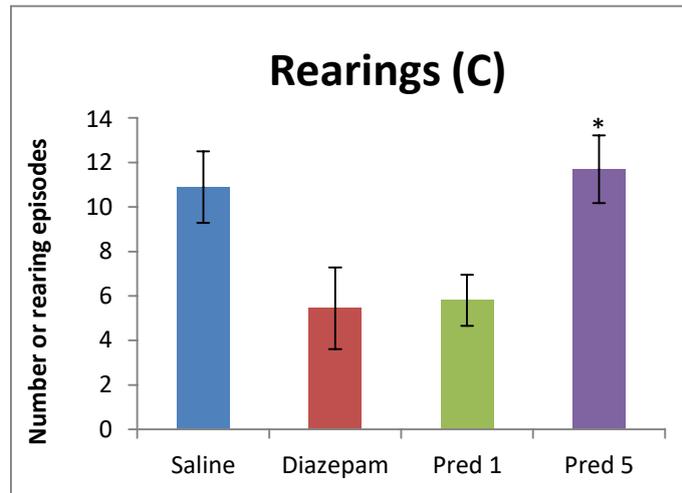


Figure2A







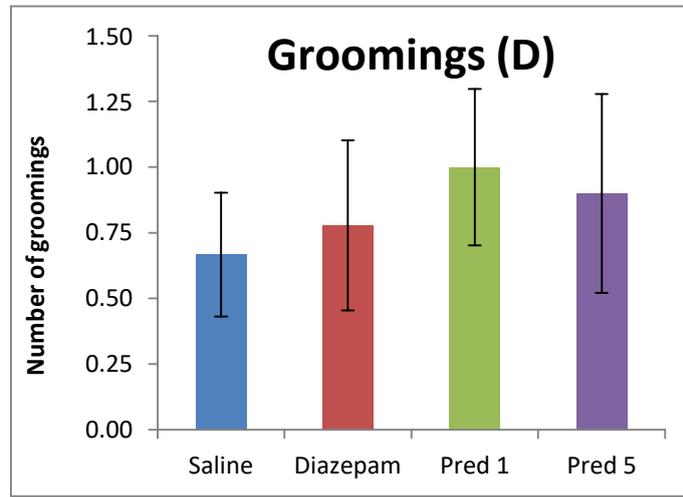


Figure 2 E

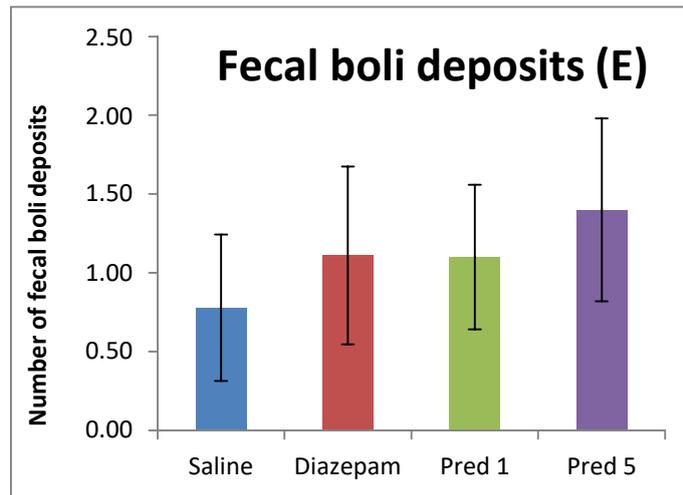


Figure 3

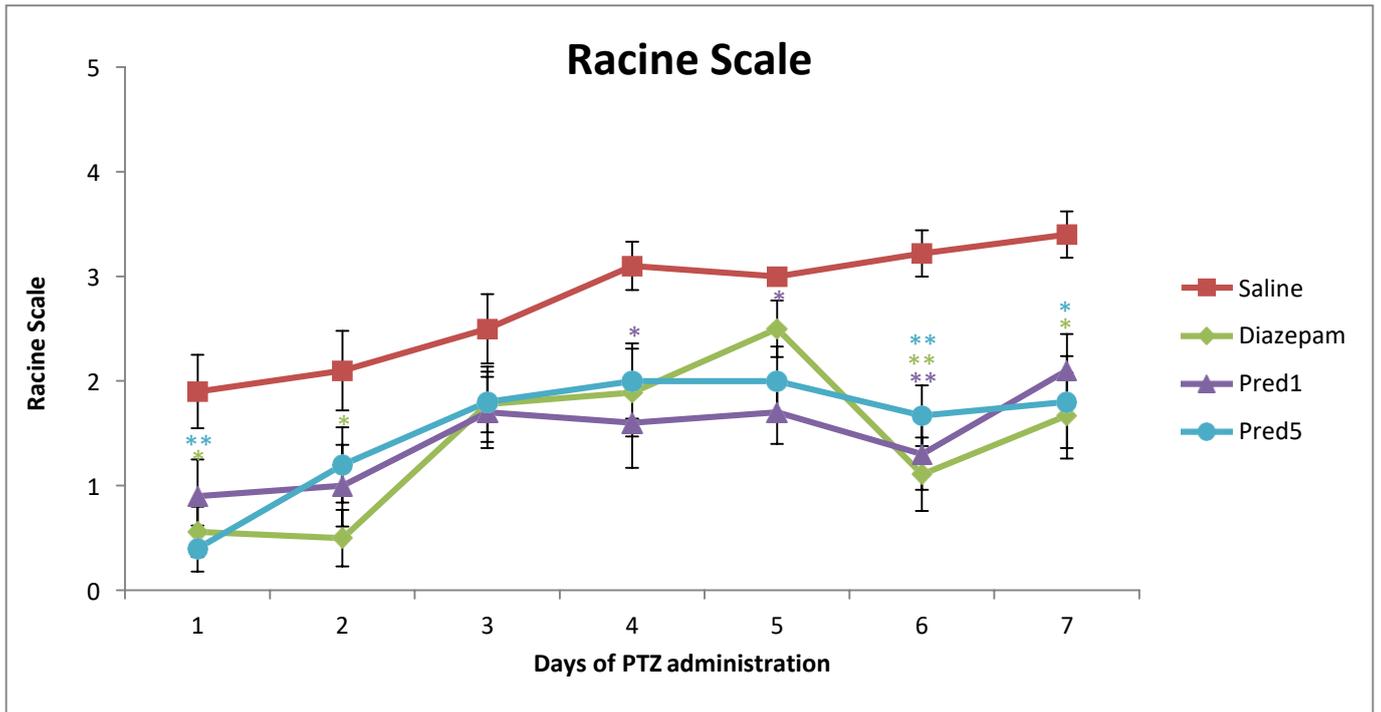


Figure 4

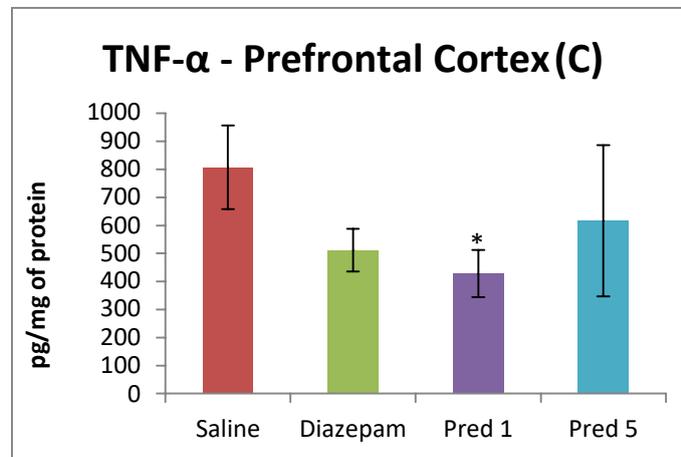
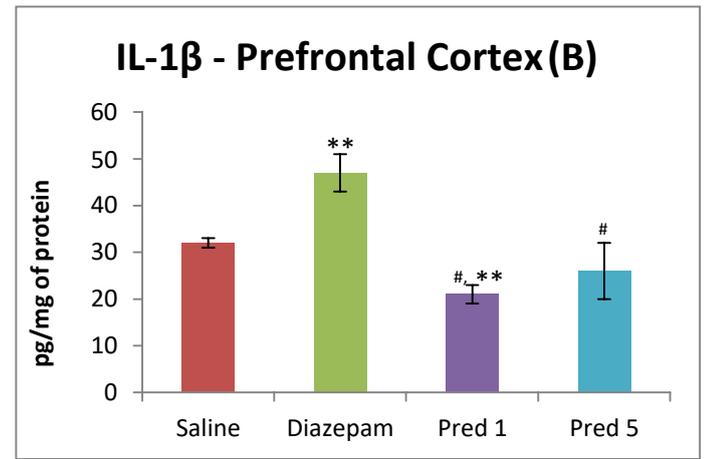
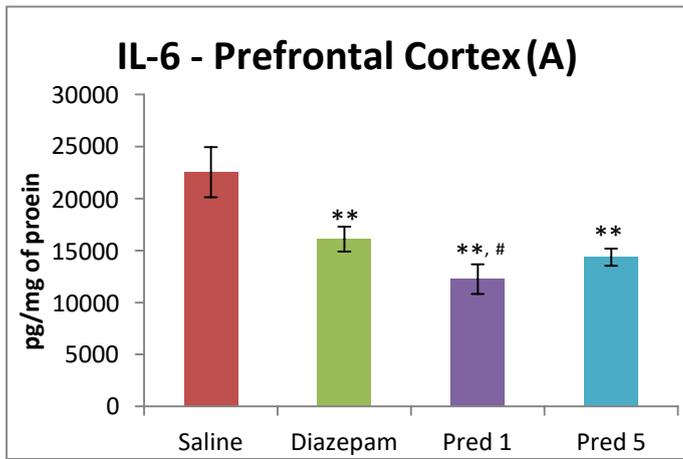


Figure 5

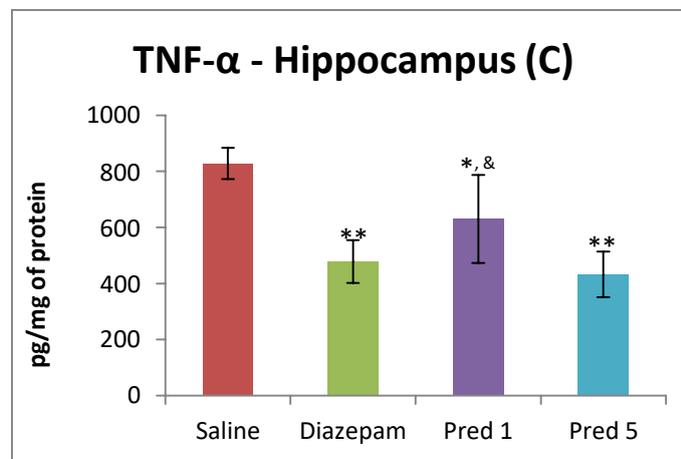
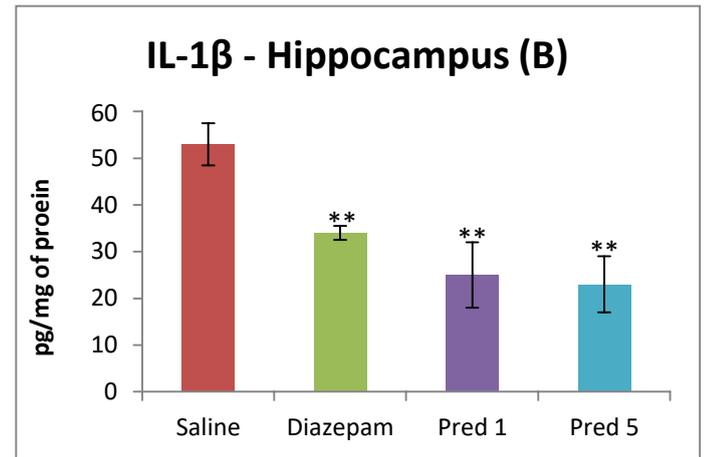
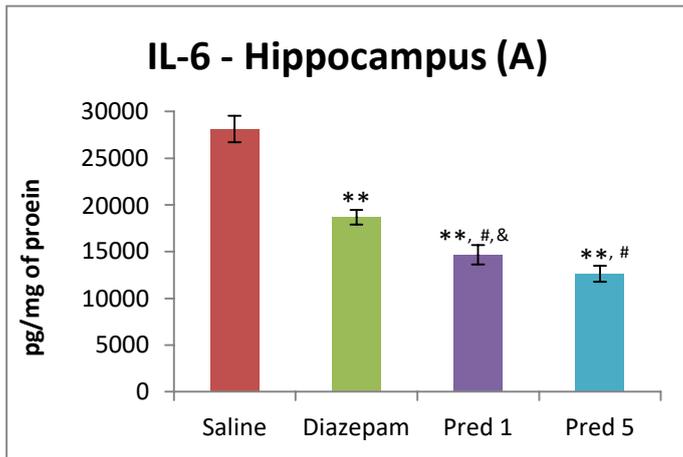


Figure 6

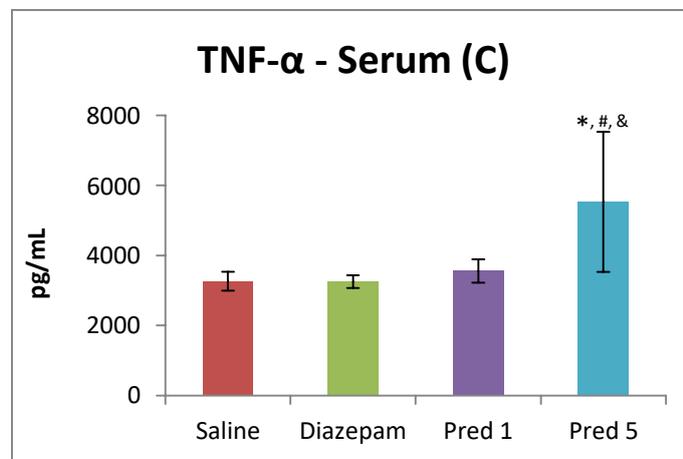
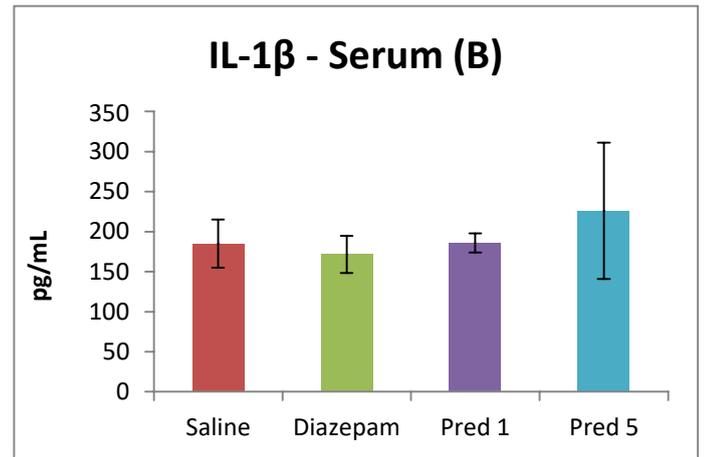
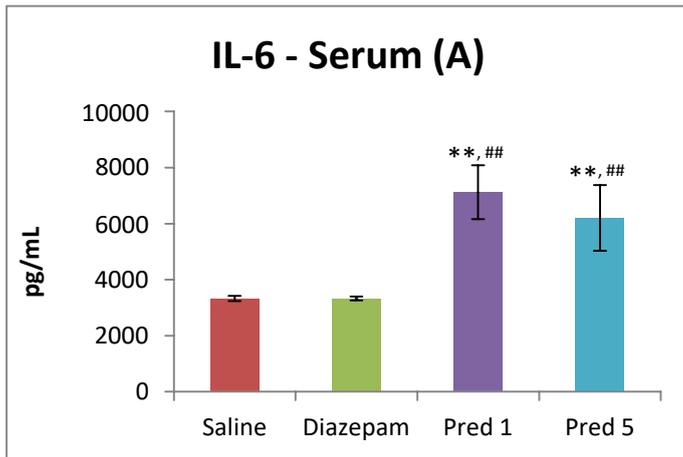


Figure 1: Experimental design. The numbers represent the days of treatment. PTZ = pentylenetetrazole. \* Animals did not receive treatment on the 15th day.

Figure. 2. Analysis of the treatment effect on latency before starting locomotion (A), number of crossings (B), rearing (C), grooming (D), and fecal boli deposits (E). Results are expressed as means and standard error. \*different from the diazepam group ( $p < 0.05$ ) (One-Way Analysis of Variance and Bonferroni post hoc test).  $n = 8-10$  animals per group.

Figure 3: Effect of prednisolone on the severity of PTZ-induced seizures. Results are expressed as mean and standard error. \*indicates a statistically significant difference compared to the saline group on the same day ( $p < 0.05$ ). \*\*indicates a statistically significant difference compared to the saline group on the same day ( $p < 0.01$ ) (One-Way Analysis of Variance and Tukey post hoc test).  $n = 8-10$  animals per group.

Figure 4: Effect of prednisolone on the levels of IL-6 (Figure A), IL-1 $\beta$  (Figure B), and TNF- $\alpha$  (Figure C) in the prefrontal cortex. The results are expressed as mean and standard deviation. \*different from the saline group ( $p < 0.05$ ). \*\*different from the saline group ( $p < 0.01$ ). # different from the diazepam group ( $p < 0.01$ ) (One-Way Analysis of Variance and Bonferroni post hoc test).  $n = 5$  animals per group.

Figure 5: Effect of prednisolone on the levels of IL-6 (Figure A), IL-1 $\beta$  (Figure B), and TNF- $\alpha$  (Figure C) in the hippocampus. The results are expressed as mean and standard deviation. \*different from the saline group ( $p < 0.05$ ). \*\*different from the saline group ( $p < 0.01$ ). # different from the diazepam group ( $p < 0.01$ ). & different from the prednisolone 5mg/kg group ( $p < 0.05$ ) (One-Way Analysis of Variance and Bonferroni post hoc test).  $n = 5$  animals per group.

Figure 6: Effect of prednisolone on serum levels of IL-6 (Figure A), IL-1 $\beta$  (Figure B), and TNF- $\alpha$  (Figure C). The results are expressed as mean and standard deviation. \*different from the saline group ( $p < 0.05$ ). \*\*different from the saline group ( $p < 0.01$ ). # different from the diazepam group ( $p < 0.05$ ). ## different from the diazepam group ( $p < 0.01$ ). & different from the prednisolone 1mg/kg group ( $p < 0.05$ ) (One-Way Analysis of Variance and Bonferroni post hoc test).  $n = 5$  animals per group.

Credit Author Statement

Gabriel de Lima Rosa: Investigation, Conceptualization, Methodology, Data curation, Writing- Original draft preparation, Writing- Reviewing and Editing, Formal analysis

Edson Muller Guzzo: Investigation, Conceptualization, Methodology

Amanda Muliterno Domingues: Conceptualization, Methodology

Rafael Bremm Padilha: Investigation, Conceptualization, Methodology

Vitória Dias de Oliveira Amaral: Methodology, Visualization

Adriana Simon Coitinho: Project administration, Investigation, Writing - Original Draft, Writing- Reviewing and Editing, Resources, Formal analysis, Supervision

## 4.2. RESULTADOS NÃO PUBLICADOS

### 4.2.1. Teste de Memória (Reconhecimento de objetos)

Para análises dos resultados de memória, que testaram a capacidade de reconhecimento dos animais, foram realizados os seguintes índices demonstrados na tabela 2:

Tabela 2: índice utilizado para avaliação da capacidade de reconhecimento de objetos.

Índice	Fórmula	Significado
IA	$A/(A+B)$	Função do tempo que o animal explorou o objeto A na sessão de treino
IC	$C/(C+A')$	Função do tempo que o animal explorou o objeto C na sessão de teste

IA: índice do objeto A. IC: índice do objeto C. A: tempo gasto no objeto A na sessão de treino. B: tempo gasto no objeto B na sessão de treino. C: tempo gasto no objeto C na sessão de teste. A': tempo gasto no objeto A na sessão de teste. N = 9-10 animais por grupo.

Os resultados obtidos estão demonstrados na figura 7. Assim, comparando os treinos entre os diferentes grupos e os testes entre os diferentes grupos, não houve diferenças estatisticamente significativas (ANOVA de 1 via).

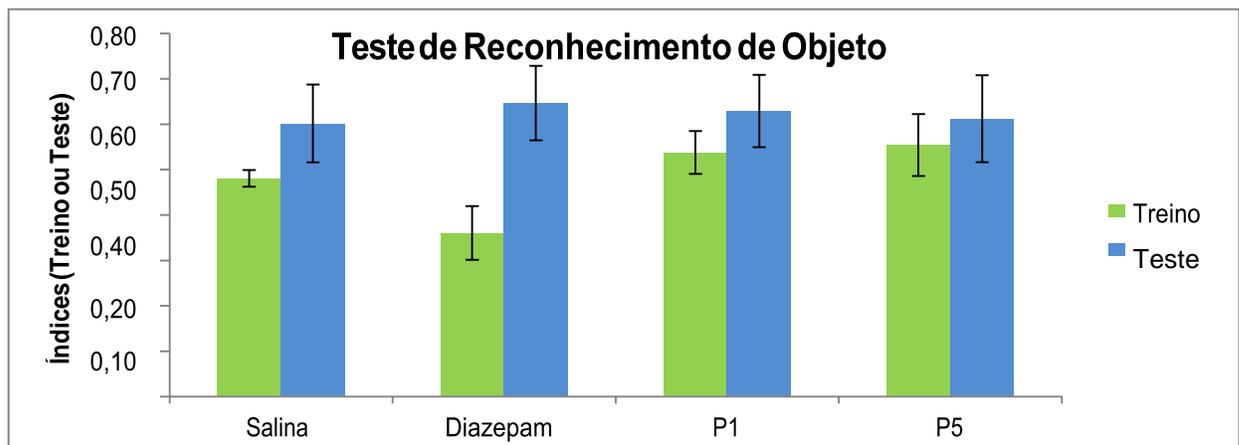


Figura 7: teste de reconhecimento de objeto. P1: Prednisolona 1mg/kg. P5: Prednisolona 5mg/kg. Os resultados são expressos como média e erro padrão. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes ( $p > 0,05$ ; ANOVA de 1 via). N = 9-10 animais por grupo.

#### 4.2.2. Tempo de Latência para Primeira Manifestação Epiléptica

Os animais que não apresentaram crises foram classificados com tempo de latência máximo (ou seja, 1200 segundos). Houve efeito protetor sobre o parâmetro de latência, em diferentes momentos (Figura 8).

No primeiro dia de administração de PTZ, os grupos nos quais foram administradas as doses de 1mg/kg e 5mg/kg de prednisolona apresentaram tempos de latência superiores aos animais do grupo salina (em ambos,  $p < 0,01$ , ANOVA de uma via com post hoc de Tukey). No segundo dia, novamente os tempos de latência dos animais tratados com ambas as doses de prednisolona foram maiores que os animais do grupo salina (em ambos,  $p < 0,01$ , ANOVA de uma via com post hoc de Tukey), assim como os animais do grupo diazepam também apresentaram tempo de latência superior em relação ao grupo salina ( $p = 0,15$ , ANOVA de uma via com post hoc de Tukey). No quarto dia, o grupo dos animais tratados com 1mg/kg de prednisolona apresentou latência maior que o grupo dos animais tratados com salina ( $p = 0,023$ , ANOVA de uma via com post hoc de Tukey). No quinto dia, diazepam mostrou efeito protetor no parâmetro de latência ( $p < 0,01$ , ANOVA de uma via com post hoc de Tukey), com seu grupo apresentando diferenças também para os grupos prednisolona 1mg/kg e 5 mg/kg (respectivamente,  $p < 0,01$  e  $p = 0,43$ , ANOVA de uma via com post hoc de Tukey). Já no sexto dia, ocorreu ação protetora da menor dose de prednisolona, em comparação ao grupo salina ( $p < 0,01$ , ANOVA de uma via com post hoc de Tukey). Por fim, no último dia, os animais tratados com a dose mais alta de prednisolona apresentaram tempo de latência superior aos animais do grupo salina ( $p = 0,038$ , ANOVA de uma via com post hoc de Tukey).

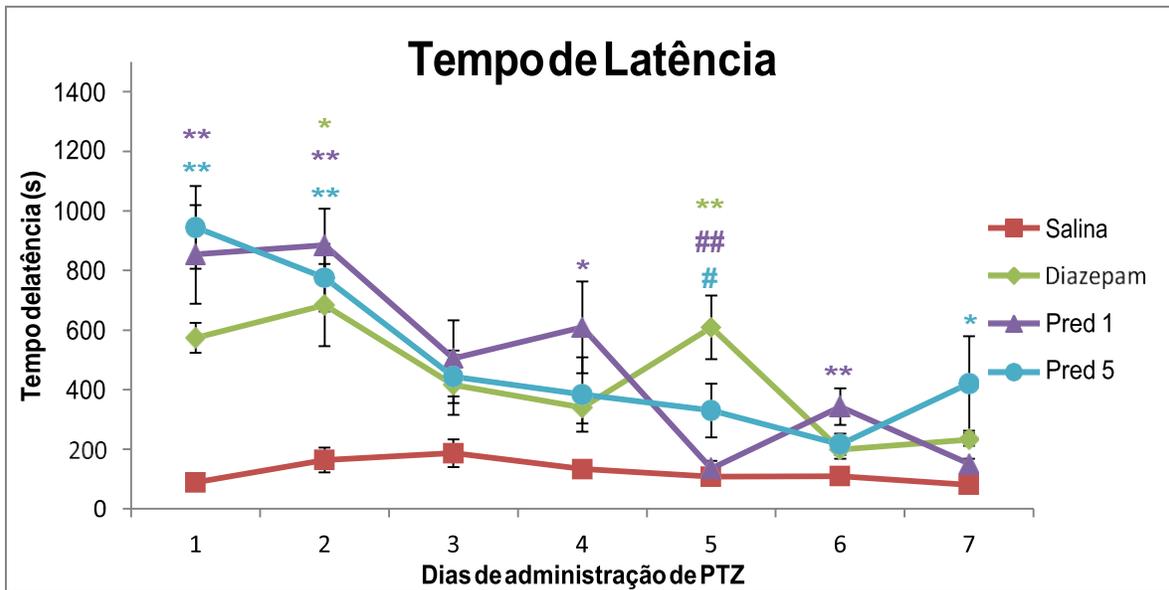


Figura 8: Efeito da prednisolona sobre o tempo de latência das crises epiléticas induzidas por PTZ. Os resultados são expressos como média e erro padrão. As cores dos símbolos são em função do grupo ao qual se referem. Assim, símbolos verdes se referem, como se observa na legenda à direita, ao grupo diazepam. A mesma lógica se aplica aos demais grupos. \* indica diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo salina no mesmo dia ( $p < 0,05$ ). \*\* indica diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo salina no mesmo dia ( $p < 0,01$ ). # indica diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo diazepam no mesmo dia ( $p < 0,05$ ). ## indica diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo diazepam no mesmo dia ( $p < 0,01$ ). ANOVA de 1 via seguido por post hoc de Tukey. N = 8-10 animais por grupo.

## 5. DISCUSSÃO FINAL

A despeito da evolução terapêutica obtida graças ao grande número de fármacos antiepiléticos desenvolvidos, ainda grande parte dos pacientes acometidos pela condição apresenta refratariedade ao tratamento farmacológico (Engel, 2014). Após o desenvolvimento dos primeiros fármacos antiepiléticos, três gerações de medicamentos foram criadas. A 1ª geração, desenvolvida na primeira metade do século XX, engloba medicamentos menos utilizados atualmente, como o brometo de potássio e o fenobarbital. A seguir, e até aproximadamente 1970, foram desenvolvidos os fármacos de 2ª geração, que contam com medicamentos ainda hoje bastante utilizados, como diazepam, carbamazepina e valproato. Por fim, o desenvolvimento contemporâneo de fármacos antiepiléticos representa a 3ª geração, apresentando medicamentos

como vigabatrina e lamotrigina (Rho & White, 2018). Mesmo com mais de 40 fármacos desenvolvidos e utilizados para tratamento das crises epiléticas, ainda assim uma parcela significativa dos pacientes apresenta refratariedade (Engel, 2014).

Destacada a persistência da resistência ao tratamento farmacológico mesmo com o desenvolvimento de dezenas de medicamentos antiepiléticos, fica evidente a necessidade da elaboração de terapias mais eficazes. Para tanto, o entendimento dos aspectos etiológicos se faz necessário. Embora se saiba que as crises epiléticas são desencadeadas por excitação neuronal excessiva, os mecanismos básicos geradores dessa hiperexcitabilidade ainda não estão totalmente elucidados. Nesse contexto, a inflamação surge como mais um possível agente envolvido.

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa utilizando modelo animal já demonstraram efeito protetor da administração de anti-inflamatórios sobre modelo crônico de crises epiléticas (Vieira *et al.*, 2016; Guzzo *et al.*, 2018). Outros estudos, com outros fármacos anti-inflamatórios e com diferentes protocolos também demonstraram efeito protetor dos imunomoduladores sobre parâmetros epileptogênicos (Beheshti Nasr *et al.*, 2013; Borham *et al.*, 2016). Evidências clínicas também estão disponíveis, por meio da utilização, em determinadas síndromes ou em outras condições patológicas, de moléculas com propriedades anti-inflamatórias, como antagonistas de IL-1 (Jyonouchi & Geng, 2016; Kenney-Jung *et al.*, 2016; DeSena, Do & Schulert, 2018), antagonistas de TNF- $\alpha$  (Lagarde *et al.*, 2016) e inibidor de ativação microglial (Nowak *et al.*, 2012).

Comorbidades psiquiátricas e comportamentais são comuns no contexto da epilepsia (Berg, Altalib & Devinsky, 2017; Bird, Shah & Shotbolt, 2018). Portanto, no início do protocolo crônico foram avaliados aspectos comportamentais dos animais, observando especificamente o desempenho motor e exploratório e a ocorrência de manifestações de comportamento do tipo ansioso. Nos testes de campo aberto, ocorreu apenas uma alteração no parâmetro de *rearing* (atividade de levantar as duas patas dianteiras) no grupo tratado com diazepam, o que pode

ser explicado pela ação sedativa no fármaco (Chaytor, 2007). Por ser a única alteração, e não ocorrendo nos grupos tratados com prednisolona, consideramos que não houve alterações relevantes nos testes, indicando a segurança do fármaco, pelo menos nesse modelo experimental.

Houve diminuição, em ambas as dosagens e em dias diferentes, da severidade das crises epiléticas, de acordo com a escala adaptada de Racine (Racine, 1972), assim como aumento no tempo de latência entre a indução química por PTZ e a manifestação da primeira crise epilética. Os índices de severidade do grupo salina foram superiores do início ao fim do protocolo, embora nem sempre com significância estatística. Observou-se, como esperado, aumento gradual da severidade das crises epiléticas ao longo do protocolo, evidenciando o êxito na construção do processo de *kindling*. Os grupos tratados também apresentaram um lento aumento dos níveis de severidade, mas se mantiveram inferiores ao grupo salina. Nas duas doses, o aumento da severidade do dia 1 ao dia 3 é marcante, mas a partir do 4º dia de indução o crescimento da severidade parece se lentificar, enquanto que para os animais do grupo salina o acréscimo nos níveis da escala de Racine continua subindo rápida e progressivamente. Em relação aos tempos de latência para a primeira manifestação epilética, nos dias iniciais ocorreu forte efeito protetor tanto do diazepam quanto de ambas as doses de prednisolona. Esse efeito parece decair ao longo do tempo, mas os grupos tratados ainda apresentaram proteção no parâmetro da latência, em pelo menos 1 das doses, até o final do protocolo.

Os dados acerca das citocinas mostraram efeito protetor ao nível do sistema nervoso central, com notável diminuição das citocinas pró-inflamatórias tanto no córtex cerebral quanto no hipocampo, mas não no soro. Na periferia, curiosamente os grupos tratados com prednisolona, especialmente na dose superior, apresentaram maiores concentrações das citocinas pró-inflamatórias. Ainda não sabemos explicar o motivo pelo qual isso ocorreu, mas uma das hipóteses é que, ao nível central, o tempo e dose de tratamento podem ter sido suficientes para a ação do anti-inflamatório, porém ao nível sistêmico um tempo

maior ou uma dose diferente de tratamento poderia ser necessário (Vieira *et al.*, 2016). Isso ainda não explica, no entanto, o motivo de dosagens superiores nos grupos tratados. Mais estudos podem ser realizados para melhor entendimento da questão, mas, por enquanto, esse resultado permanece sem uma explicação mais adequada.

Os mecanismos pelos quais a inflamação pode estar ligada ao processo epileptogênico ainda não estão totalmente elucidados, mas algumas vias são citadas como tendo possível relevância, como as que envolvem as citocinas estudadas neste trabalho.

A interleucina IL-1 $\beta$  pode aumentar a liberação de glutamato pelos astrócitos e diminuir sua recaptação, aumentando assim sua disponibilidade na fenda sináptica e favorecendo o desenvolvimento de quadros de hiperexcitabilidade (Alyu & Dikmen, 2017). Outra possível ação da citocina é o aumento da expressão de receptores N-metil-D-Aspartato (NDMA) nas células pós-sinápticas via ativação da subunidade GluN2B do receptor (Viviani *et al.*, 2003), aumento o qual também parece ocorrer após as crises epiléticas (Postnikova *et al.*, 2017). Ainda, estudo em pacientes com epilepsia do lobo temporal demonstrou uma possível diminuição das correntes de GABA induzida pela citocina IL-1 $\beta$  (Roseti *et al.*, 2015).

A citocina TNF- $\alpha$  também pode apresentar efeitos que aumentam a excitação neuronal. Uma das vias pode ser o aumento da liberação de glutamato pelas células gliais, possivelmente por *feedback* positivo sobre a glutaminase, enzima que converte glutamina em glutamato (Takeuchi *et al.*, 2006). Além disso, a citocina pode aumentar a expressão de receptores do tipo alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) (Galic, Riazzi & Pittman, 2012), além de levar a endocitose de receptores GABA<sub>A</sub> (Stellwagen *et al.*, 2005), podendo ocasionar um desequilíbrio excitatório-inibitório pelos efeitos combinados sobre esses receptores.

Embora ainda não conte com um corpo de evidências tão robusto, há

estudos que demonstram efeitos da IL-6 sobre parâmetros de excitação neuronal e epilepsia. No trabalho de Samuelsson e colaboradores (2006), foi demonstrada que a exposição pré-natal a IL-6 resultou em neurodegeneração inflamatória hipocampal e efeitos deletérios sobre regulação de receptores NMDA e GABA<sub>A</sub> em modelo animal (Samuelsson *et al.*, 2006). O aumento dos níveis de IL-6 também está ligado à diminuição da neurogênese hipocampal e aumento de gliose, possivelmente criando condições que contribuem para o estado epileptogênico (Erta, Quintana & Hidalgo, 2012). Cabe ainda destacar que a IL-6 pode ser regulada (*feedback* positivo) por, entre outras moléculas, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Erta, Quintana & Hidalgo, 2012).

Além dessas citocinas, muitos outros elementos dos processos imunes podem estar presentes no contexto epileptogênico e de alteração na excitabilidade neural. Conforme estudo de revisão de Rana e Musto (2018), moléculas como prostaglandinas, fator de ativação plaquetária, CD-44, metaloproteinases, receptores do tipo *Toll-like* e quimiocinas também tem papéis relevantes sobre o funcionamento neuronal e podem estar implicadas na etiologia das crises epilépticas. Aspectos como disfunções na barreira hematoencefálica, doenças inflamatórias sistêmicas e reatividade glial também aparecem como possíveis fatores envolvidos (Rana & Musto, 2018).

É importante também destacar as limitações do estudo. Durante os protocolos, avaliamos apenas a expressão de citocinas pró-inflamatórias, sendo que o verdadeiro equilíbrio do perfil inflamatório é a relação entre as citocinas pró e anti-inflamatórias. Evidentemente, limitações orçamentárias e de material biológico impedem a realização de quadros avaliativos completos de inflamação. O uso de apenas ratos machos é outro limitante e ocorre devido a um possível efeito do estrogênio sobre os parâmetros epileptogênicos e inflamatórios (Straub, 2007; Thomas, 2015; Joshi *et al.*, 2018), o que ainda não está totalmente elucidado e poderia ser um viés importante, uma vez que não dispomos de condições de padronizar ou mesmo avaliar o efeito de diferentes fases do ciclo reprodutivo de ratas fêmeas. Por fim, o próprio experimento pré-clínico apresenta

dificuldade da translacionalidade, além das evidentes diferenças fisiológicas e fisiopatológicas entre os modelos animais e a clínica médica humana. Destaca-se que todos esses vieses, no entanto, são aplicados a todos os grupos.

Uma importante preocupação acerca do uso continuado de anti-inflamatórios em pacientes com epilepsia são seus potenciais efeitos colaterais, que ocorrem especialmente no uso crônico. Porém, os tratamentos comumente utilizados para o controle das crises epiléticas já contam com uma longa lista de possíveis efeitos colaterais, os quais englobam diversos sistemas, como o hematológico, ósseo, gastrointestinal e neurológico, além de problemas de pele e de manifestações gerais como cansaço (St. Louis, 2009). A teratogenicidade também é um grave efeito colateral, destacando-se aqui o valproato (Kluger & Meador, 2008).

A relação custo-benefício do uso de fármacos anti-inflamatórios, sejam eles corticoides ou inibidores da COX, deve ser levada em consideração, motivo pelo qual a motivação desses estudos deve-se ao alto nível de refratariedade aos tratamentos atualmente disponíveis (Engel, 2014). Pacientes com crises epiléticas frequentes e intratáveis apresentam uma dramática piora na qualidade de vida e aumento notável no quadro de comorbidades. Sendo assim, os possíveis efeitos colaterais dos anti-inflamatórios podem ser menos prejudiciais do que sua própria condição refratária, que é extremamente debilitante. Ainda, os estudos com imunomoduladores podem servir não necessariamente para indicar o uso de um ou outro fármaco anti-inflamatório, mas sim para elucidar a questão etiológica inflamatória. Além disso, pode-se sugerir a utilização de anticorpos monoclonais cujos alvos sejam citocinas pró-inflamatórias ou outras moléculas-chave na promoção do processo epileptogênico, desenvolvendo, dessa forma, um tratamento mais direcionado, com maiores chances de sucesso terapêutico e possivelmente menor quadro de efeitos colaterais. Em resumo, a análise conjunta dos dados obtidos, mesmo contextualizando com a importante questão dos possíveis efeitos colaterais, demonstra um grande potencial de utilização, pelo menos de forma coadjuvante, de moléculas de ação anti-inflamatória, além de destacar, mais uma vez, a possibilidade de estudo de aspectos inflamatórios

sobre a epilepsia e as crises epilépticas.

## 6. CONCLUSÕES

- O tratamento com prednisolona foi seguro em relação aos parâmetros comportamentais e de memória.
- Ambas as doses de prednisolona foram efetivas no aumento da latência para a primeira manifestação epiléptica e para diminuição de seus graus máximos de severidade.
- Ambas as doses investigadas foram efetivas na diminuição das citocinas pró-inflamatórias em hipocampo e córtex, mas não no soro.

## 7. PERSPECTIVAS

Como perspectivas, além da ampliação do quadro de experimentos envolvendo a inflamação, se objetiva a administração e avaliação da prednisolona em outros protocolos de indução de crises epilépticas e/ou epilepsia, com uso de ratas fêmeas e possivelmente doses ainda não testadas, além de variações dentro do próprio modelo de kindling por PTZ, uso de outros fármacos como a pilocarpina e de desenvolvimento e aplicação de modelos não químicos de indução, como epilepsia pós-traumática.

O estresse oxidativo também se relaciona com os processos inflamatórios. Há vasta literatura apontando essa relação que, aparentemente, é de reforço mútuo (Hajjar & Gotto, 2013; Lugin *et al.*, 2014). Os mecanismos para essa relação são extensos, mas entre eles pode-se citar que células que participam de quadros inflamatórios secretam citocinas que atuarão nas cascatas de sinalização de formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em células fagocíticas

e não fagocíticas (Sánchez, Calpena & Clares, 2015). E, por outro lado, o próprio estresse oxidativo pode levar à ativação de uma série de fatores transcricionais que levarão à maior expressão de citocinas pró-inflamatórias (Reuter *et al.*, 2010). Desse modo, tem-se a perspectiva de realização de testes envolvendo marcadores de estresse oxidativo a partir dos tecidos obtidos dos animais submetidos aos protocolos de indução de crises epiléticas. Esses experimentos já estavam programados e já contamos com parcerias para sua realização, não sendo possível sua execução até então por conta dos adventos ocasionados pela pandemia da COVID-19.

## REFERÊNCIAS

'A Revised Definition of Epilepsy' (2020) *Epilepsy Foundation*. Available at: <https://www.epilepsy.com/article/2014/4/revised-definition-epilepsy>.

Alyu, F. & Dikmen, M. (2017) 'Inflammatory aspects of epileptogenesis: contribution of molecular inflammatory mechanisms', *Acta Neuropsychiatrica*, 29(1), pp. 1–16. doi: 10.1017/neu.2016.47.

Amaya-Amaya, J. *et al.* (2013) *Rheumatoid arthritis*. El Rosario University Press. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459454/>.

Ashley, N. T., Weil, Z. M. & Nelson, R. J. (2012) 'Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation', *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43(1), pp. 385–406. doi: 10.1146/annurev-ecolsys-040212-092530.

Barabás, K. *et al.* (2018) 'Rapid non-classical effects of steroids on the membrane receptor dynamics and downstream signaling in neurons', *Hormones and Behavior*. Academic Press Inc., pp. 183–191. doi: 10.1016/j.yhbeh.2018.05.008.

Beghi, E. (2020) 'The Epidemiology of Epilepsy', *Neuroepidemiology*, 54(2), pp. 185–191. doi: 10.1159/000503831.

Beheshti Nasr, S. M. *et al.* (2013) 'The effect of minocycline on seizures induced by amygdala kindling in rats', *Seizure*, 22(8), pp. 670–674. doi: 10.1016/j.seizure.2013.05.005.

Berg, A. T., Altalib, H. H. & Devinsky, O. (2017) 'Psychiatric and Behavioral Comorbidities in Epilepsy: A Critical Reappraisal', *Epilepsia*, 58(7), pp. 1123–1130. doi: 10.1111/epi.13766.

Bird, J. S., Shah, E. and Shotbolt, P. (2018) 'Epilepsy and concomitant obsessive–compulsive disorder', *Epilepsy & Behavior Case Reports*, 10, pp. 106–110. doi: 10.1016/j.ebcr.2018.07.001.

Blair, R. D. G. (2012) 'Temporal Lobe Epilepsy Semiology', *Epilepsy Research and Treatment*, 2012, pp. 1–10. doi: 10.1155/2012/751510.

Boekhout, A. H., Beijnen, J. H. & Schellens, J. H. M. (2011) 'Trastuzumab', *The Oncologist*, 16(6), pp. 800–810. doi: 10.1634/theoncologist.2010-0035.

Borham, L. E. *et al.* (2016) 'The effect of some immunomodulatory and anti-inflammatory drugs on Li-pilocarpine-induced epileptic disorders in Wistar rats', *Brain Research*, 1648, pp. 418–424. doi: 10.1016/j.brainres.2016.07.046.

Brandner, S. (2003) 'CNS pathogenesis of prion diseases', *British Medical Bulletin*, 66(1), pp. 131–139. doi: 10.1093/bmb/66.1.131.

Bromfield, E. B., Cavazos, J. E. & Sirven, J. I. (2006) *Neuropharmacology of Antiepileptic Drugs*. American Epilepsy Society. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2513/>.

Chaytor, A. (2007) 'Diazepam', in *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*. Elsevier Inc., pp. 1–7. doi: 10.1016/B978-008055232-3.61585-5.

Coral-Alvarado, P. X., Patarroyo, P. A. M. & López, G. Q. (2013) *Systemic sclerosis*. El Rosario University Press. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459435/>.

Coulter, D. A. & Eid, T. (2012) 'Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy', *Glia*, 60(8), pp. 1215–1226. doi: 10.1002/glia.22341.

DeSena, A. D., Do, T. & Schulert, G. S. (2018) 'Systemic autoinflammation with intractable epilepsy managed with interleukin-1 blockade', *Journal of Neuroinflammation*, 15. doi: 10.1186/s12974-018-1063-2.

Dudek, F. E. & Shao, L.-R. (2003) 'Loss of GABAergic Interneurons in Seizure-induced Epileptogenesis', *Epilepsy Currents*, 3(5), pp. 159–161. doi: 10.1046/j.1535-7597.2003.03503.x.

Engel, J. (2014) 'Approaches to refractory epilepsy', *Annals of Indian Academy of Neurology*, 17(Suppl 1), pp. S12–S17. doi: 10.4103/0972-2327.128644.

Ergul Erkeç, O., 2015. Pentylene-tetrazol Kindling Epilepsy Model. J. Turk. Epilepsi Soc. <https://doi.org/10.5505/epilepsi.2015.08108>

Erta, M., Quintana, A. & Hidalgo, J. (2012) 'Interleukin-6, a Major Cytokine in the Central Nervous System', *International Journal of Biological Sciences*, 8(9), pp.1254–1266. doi: 10.7150/ijbs.4679.

Fisher, R. S. *et al.* (2017) 'Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology', *Epilepsia*, 58(4), pp. 522–530. doi: 10.1111/epi.13670.

Galic, M. A., Riazi, K. & Pittman, Q. J. (2012) 'Cytokines and brain excitability', *Frontiers in neuroendocrinology*, 33(1), pp. 116–125. doi: 10.1016/j.yfrne.2011.12.002.

García-Carrasco, M. *et al.* (2013) *Systemic lupus erythematosus*. El Rosario University Press. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459474/>.

George, A. L. (2004) 'Inherited Channelopathies Associated with Epilepsy', *Epilepsy Currents*, 4(2), pp. 65–70. doi: 10.1111/j.1535-7597.2004.42010.x.

Grider, M. H. & Glaubenskleee, C. S. (2019) *Physiology, Action Potential, StatPearls*. StatPearls Publishing. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30844170> (Accessed: 12 February 2021).

Guzzo, E. F. M. *et al.* (2018) 'Effect of dexamethasone on seizures and inflammatory profile induced by Kindling Seizure Model', *Journal of Neuroimmunology*, 325, pp. 92–98. doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.10.005.

Hajjar, D. P. & Gotto, A. M. (2013) 'Biological Relevance of Inflammation and Oxidative Stress in the Pathogenesis of Arterial Diseases', *The American Journal of Pathology*, 182(5), pp. 1474–1481. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.01.010.

Joshi, S. *et al.* (2018) 'A novel therapeutic approach for treatment of catamenial epilepsy', *Neurobiology of Disease*, 111, pp. 127–137. doi: 10.1016/j.nbd.2017.12.009.

Jyonouchi, H. & Geng, L. (2016) 'Intractable Epilepsy (IE) and Responses to Anakinra, a Human Recombinant IL-1 Receptor Agonist (IL-1ra): Case Reports', *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 7. doi: 10.4172/2155-9899.1000456.

Kenney-Jung, D. L. *et al.* (2016) 'Super-refractory status epilepticus and febrile infection-related epilepsy syndrome treated with anakinra', *Annals of neurology*, 80(6), pp. 939–945. doi: 10.1002/ana.24806.

Kluger, B. M. & Meador, K. J. (2008) 'Teratogenicity of Antiepileptic Medications', *Seminars in neurology*, 28(3), pp. 328–335. doi: 10.1055/s-2008-1079337.

Kotsovilis, S. & Andreakos, E. (2014) 'Therapeutic human monoclonal antibodies in inflammatory diseases', *Methods in Molecular Biology*. Humana Press Inc., pp. 37–59. doi: 10.1007/978-1-62703-586-6\_3.

Kramer, D. R. *et al.* (2017) 'Interplay between Cortical Spreading Depolarization and Seizures', *Stereotactic and Functional Neurosurgery*. S. Karger AG, pp. 1–5. doi: 10.1159/000452841.

Lagarde, S. *et al.* (2016) 'Anti-tumor necrosis factor alpha therapy (adalimumab) in Rasmussen's encephalitis: An open pilot study', *Epilepsia*, 57(6), pp. 956–966. doi: 10.1111/epi.13387.

Li, G. *et al.* (2011) 'Cytokines and epilepsy', *Seizure*, 20(3), pp. 249–256. doi: 10.1016/j.seizure.2010.12.005.

St. Louis, E. K. (2009) 'Minimizing AED Adverse Effects: Improving Quality of Life in the Interictal State in Epilepsy Care', *Current Neuropharmacology*, 7(2), pp. 106–114. doi: 10.2174/157015909788848857.

Lugrin, J. *et al.* (2014) 'The role of oxidative stress during inflammatory processes', *Biological Chemistry*, 395(2), pp. 203–230. doi: 10.1515/hsz-2013-0241.

Maurmann, N. *et al.* (2011) 'A Valepotriate Fraction of Valeriana glechomifolia Shows Sedative and Anxiolytic Properties and Impairs Recognition But Not Aversive Memory in Mice', *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Available at: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2011/720853/>.

Miller, J. W. & Hakimian, S. (2013) 'Surgical Treatment of Epilepsy', *Continuum: Lifelong Learning in Neurology*, 19(3 Epilepsy), pp. 730–742. doi: 10.1212/01.CON.0000431398.69594.97.

Mukherjee, S. *et al.* (2020) 'Neuroinflammatory mechanisms of post-traumatic epilepsy', *Journal of Neuroinflammation*. BioMed Central, pp. 1–11. doi: 10.1186/s12974-020-01854-w.

Nowak, M. *et al.* (2012) 'Minocycline as potent anticonvulsant in a patient with astrocytoma and drug resistant epilepsy', *Seizure - European Journal of Epilepsy*, 21(3), pp. 227–228. doi: 10.1016/j.seizure.2011.12.009.

Osafo, N. *et al.* (2017) 'Mechanism of Action of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs', *Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs*. doi: 10.5772/68090.

Postnikova, T. Y. *et al.* (2017) 'Status epilepticus impairs synaptic plasticity in rat hippocampus and is followed by changes in expression of NMDA receptors', *Biochemistry (Moscow)*, 82(3), pp. 282–290. doi:

10.1134/S0006297917030063.

R.J. Racine, Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure, *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32 (1972) 281-294, [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0).

Rana, A. & Musto, A. E. (2018) 'The role of inflammation in the development of epilepsy', *Journal of Neuroinflammation*, 15. doi: 10.1186/s12974-018-1192-7.

Randall, K. L. (2016) 'Rituximab in autoimmune diseases', *Australian Prescriber*, 39(4), pp. 131–134. doi: 10.18773/austprescr.2016.053.

Reuter, S. *et al.* (2010) 'Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?', *Free radical biology & medicine*, 49(11), pp. 1603–1616. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006.

Rho, J. M. & White, H. S. (2018) 'Brief history of anti-seizure drug development', *Epilepsia Open*, 3(Suppl Suppl 2), pp. 114–119. doi: 10.1002/epi4.12268.

Roseti, C. *et al.* (2015) 'GABAA currents are decreased by IL-1 $\beta$  in epileptogenic tissue of patients with temporal lobe epilepsy: implications for ictogenesis', *Neurobiology of Disease*, 82, pp. 311–320. doi: 10.1016/j.nbd.2015.07.003.

Samuelsson, A.-M. *et al.* (2006) 'Prenatal exposure to interleukin-6 results in inflammatory neurodegeneration in hippocampus with NMDA/GABAA dysregulation and impaired spatial learning', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 290(5), pp. R1345–R1356. doi: 10.1152/ajpregu.00268.2005.

Sánchez, A., Calpena, A. C. & Clares, B. (2015) 'Evaluating the Oxidative Stress in Inflammation: Role of Melatonin', *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), pp. 16981–17004. doi: 10.3390/ijms160816981.

Scheffer, I. E. *et al.* (2017) 'ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology', *Epilepsia*, 58(4), pp. 512–521. doi: 10.1111/epi.13709.

Schwartz, N. *et al.* (2016) 'Rapid steroid hormone actions via membrane receptors', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(9), pp. 2289–2298. doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.06.004.

Schwartzkroin, P. A. & Walsh, C. A. (2000) 'Cortical malformations and epilepsy', *Mental Retardation and Developmental Disabilities Research Reviews*, 6(4), pp. 268–280. doi: 10.1002/1098-2779(2000)6:4<268::AID-MRDD6>3.0.CO;2-B.

Stellwagen, D. *et al.* (2005) 'Differential Regulation of AMPA Receptor and GABA Receptor Trafficking by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ', *The Journal of Neuroscience*, 25(12), pp. 3219–3228. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4486-04.2005.

Straub, R. H. (2007) 'The complex role of estrogens in inflammation', *Endocrine Reviews*. Oxford Academic, pp. 521–574. doi: 10.1210/er.2007-0001.

Takeuchi, H. *et al.* (2006) 'Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Induces Neurotoxicity via Glutamate Release from Hemichannels of Activated Microglia in an Autocrine Manner', *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), pp. 21362–21368. doi: 10.1074/jbc.M600504200.

Theofilopoulos, A. N., Kono, D. H. & Baccala, R. (2017) 'The Multiple Pathways to Autoimmunity', *Nature immunology*, 18(7), pp. 716–724. doi: 10.1038/ni.3731.

Thomas, S. V. (2015) 'Controversies in contraception for women with epilepsy', *Annals of Indian Academy of Neurology*. Medknow Publications, pp. 278–283. doi: 10.4103/0972-2327.162261.

Télez-Zenteno, J. F. & Hernández-Ronquillo, L. (2012) 'A Review of the Epidemiology of Temporal Lobe Epilepsy', *Epilepsy Research and Treatment*, 2012, pp. 1–5. doi: 10.1155/2012/630853.

Verellen, R. M. & Cavazos, J. E. (2010) 'Post-traumatic epilepsy: An overview', *Therapy*. NIH Public Access, pp. 527–531. doi: 10.2217/thy.10.57.

Vezzani, A. *et al.* (2011) 'The role of inflammation in epilepsy', *Nature*

*Reviews. Neurology*, 7(1), pp. 31–40. doi: 10.1038/nrneurol.2010.178.

Vezzani, A. & Granata, T. (2005) 'Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and Clinical Evidence', *Epilepsia*, 46(11), pp. 1724–1743. doi: 10.1111/j.1528-1167.2005.00298.x.

Vieira, V. *et al.* (2016) 'Effect of diclofenac sodium on seizures and inflammatory profile induced by kindling seizure model', *Epilepsy Research*, 127, pp. 107–113. doi: 10.1016/j.eplepsyres.2016.08.020.

Viviani, B. *et al.* (2003) 'Interleukin-1 $\beta$  Enhances NMDA Receptor-Mediated Intracellular Calcium Increase through Activation of the Src Family of Kinases', *The Journal of Neuroscience*, 23(25), pp. 8692–8700. doi: 10.1523/JNEUROSCI.23-25-08692.2003.

Walker, L. & Sills, G. J. (2012) 'Inflammation and Epilepsy: The Foundations for a New Therapeutic Approach in Epilepsy?', *Epilepsy Currents*, 12(1), pp. 8–12. doi: 10.5698/1535-7511-12.1.8.

Weber, J. & Keam, S. J. (2009) 'Ustekinumab', *BioDrugs*. BioDrugs, pp. 53–61. doi: 10.2165/00063030-200923010-00006.

Youn, Y., Sung, I. K. & Lee, I. G. (2013) 'The role of cytokines in seizures: interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-8, and IL-10', *Korean Journal of Pediatrics*, 56(7), pp. 271–274. doi: 10.3345/kjp.2013.56.7.271.