

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

TESE DE DOUTORADO

**PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO, MARCADORES
INFLAMATÓRIOS E COMPORTAMENTAIS EM ANIMAIS TRATADOS COM
ANTI-INFLAMATÓRIOS NO MODELO ANIMAL DE CRISES EPILÉPTICAS
INDUZIDAS PELO PENTILENOTETRAZOL**

EDSON FERNANDO MÜLLER GUZZO

PORTO ALEGRE

2023

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

TESE DE DOUTORADO

**PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO, MARCADORES
INFLAMATÓRIOS E COMPORTAMENTAIS EM ANIMAIS TRATADOS COM
ANTI-INFLAMATÓRIOS NO MODELO ANIMAL DE CRISES EPILÉPTICAS
INDUZIDAS PELO PENTILENOTETRAZOL**

EDSON FERNANDO MÜLLER GUZZO

Tese 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 doutor em Fisiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Simon
Coitinho

PORTO ALEGRE

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Muller Guzzo, Edson Fernando
PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO, MARCADORES
INFLAMATÓRIOS E COMPORTAMENTAIS EM ANIMAIS TRATADOS
COM ANTI-INFLAMATÓRIOS NO MODELO ANIMAL DE CRISES
EPILEPTICAS INDUZIDAS PELO PENTILENOTETRAZOL / Edson
Fernando Muller Guzzo. -- 2023.
113 f.
Orientador: Adriana Simon Coitinho.

Tese (Doutorado) -- 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, 2023.

1. Epilepsia. 2. Inflamação. 3. Estresse oxidativo.
4. Modelo animal . I. Simon Coitinho, Adriana, orient.
II. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Weber Cláudio Francisco Nunes Da Silva
Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO)
Departamento de Fisiologia

Profa. Dra. Renata Padilha Guedes
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)
Departamento de Fisiologia

Profa. Dra. Patrícia Pereira
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)
Departamento de Farmacologia

AGRADECIMENTOS

Agradeço pela educação 100% pública que tive durante toda minha formação enquanto cidadão e profissional. Em especial, agradeço à UFRGS, pelo ensino de excelência que tive nos últimos 11 anos;

Agradeço a professora Adriana pela orientação, dedicação e comprometimento desde a iniciação científica;

Agradeço a Amanda, Gabriel e Rafael pela parceria nestes seis últimos anos;

Agradeço a Manoela, Karin, Arildo, Julia, Zélia, Alice, Jessica, Katia, José, Ângela, Simone e Leticia pelo incentivo e amor de vocês;

Agradeço a Maxuel, Priscila, Eva, Mirian, Carla e Susi pelas trocas de plantão e pelo auxílio sempre que precisei.

RESUMO

A estreita relação entre processos inflamatórios e crises epiléticas já é conhecida, embora o mecanismo fisiopatológico exato não seja claro. Neste estudo, foi avaliada a capacidade anticonvulsivante de três fármacos anti-inflamatórios: dexametasona, betametasona e piroxicam no modelo animal de crises epiléticas *kindling* induzidas pelo pentilenotetrazol, um antagonista gabaérgico. Cada fármaco anti-inflamatório foi avaliado de forma isolada gerando três trabalhos independentes.

Ratos Wistar machos, com 8-9 semanas de idade, foram tratados, intraperitonealmente (i.p.), com dexametasona (1, 2 ou 4 mg/Kg) ou betametasona (0,125 e 0,250 mg/Kg) ou piroxicam (0,15 e 0,30 mg/Kg) por 14 dias. Dois grupos controle receberam diazepam (2 mg/Kg) ou solução salina (NaCl 0,9 %) pelo mesmo período. Além disso, também receberam pentilenotetrazol (PTZ), em dias alternados. Em todos os tratamentos, realizou-se o teste de campo aberto para avaliação da atividade locomotora e exploratória dos animais.

O primeiro estudo investigou o efeito da dexametasona sobre parâmetros de estresse oxidativo e comportamentais. Verificou-se que o tratamento com dexametasona não alterou a capacidade locomotora e exploratória dos animais e não prejudicou a consolidação da memória de curta duração (STM). O tempo de latência para a primeira crise epilética foi maior nos grupos que receberam dexametasona, em todas as doses, comparado ao grupo que recebeu solução salina. Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo avaliados no hipocampo, constatou-se redução de atividade da enzima catalase (CAT), aumento de atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e aumento dos grupamentos sulfidrilas nos animais que receberam PTZ. Além disso, ocorreu redução nos níveis de glutathiona peroxidase nos animais que receberam dexametasona 1 mg/Kg comparado aos grupos que receberam solução salina e diazepam.

O segundo estudo investigou o efeito da betametasona sobre parâmetros inflamatórios e comportamentais. A betametasona não alterou a capacidade locomotora e exploratória dos animais. Além disso, reduziu a intensidade das crises epiléticas, de acordo com a escala adaptada de Racine. Em relação às citocinas inflamatórias, o tratamento com betametasona reduziu os níveis de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e Interleucina-1 β (IL-1 β) no córtex. Já no hipocampo e no soro, os níveis permaneceram semelhantes entre os grupos testados.

O terceiro estudo investigou o efeito do piroxicam sobre parâmetros inflamatórios e comportamentais. Verificou-se que o tratamento com piroxicam não alterou a

capacidade locomotora e exploratória dos animais e não prejudicou a consolidação da memória de longa duração (LTM). Também, reduziu a intensidade das crises epiléticas, de acordo com a escala adaptada de Racine. Quanto aos parâmetros inflamatórios, os níveis de IL-6 permaneceram semelhantes entre os grupos, ocorreu aumento do TNF- α no córtex dos animais tratados com piroxicam, em ambas as concentrações, e redução de Interleucina-10 (IL-10) no córtex e no hipocampo.

Estes resultados demonstram o efeito anticonvulsivante dos fármacos anti-inflamatórios avaliados, no modelo animal de crises epiléticas *kindling* induzidas pelo pentilenotetrazol. Não houve prejuízo na capacidade locomotora e exploratória nem na consolidação da memória. Alterações de citocinas ao nível central pode ser a chave do efeito observado, embora novos estudos sejam necessários.

Palavras chave: Epilepsia; Inflamação; Estresse oxidativo.

ABSTRACT

The close relationship between inflammatory processes and epileptic seizures is already known, although the exact pathophysiological mechanism is not clear. In this study, the anticonvulsant capacity of three anti-inflammatory drugs was evaluated: dexamethasone, betamethasone and piroxicam in an animal model of kindling epileptic seizures caused by pentylentetrazol, a GABAergic antagonist. Each anti-inflammatory medication was evaluated separately, generating three independent studies.

Male Wistar rats, 8-9 weeks old, were treated intraperitoneally (i.p.) with dexamethasone (1, 2 or 4 mg/kg) or betamethasone (0.125 and 0.250 mg/kg) or piroxicam (0.15 and 0.30 mg/kg) for 14 days. Two control groups received diazepam (2 mg/kg) or saline solution (NaCl 0.9%) for the same period. In addition, he also received pentylentetrazole (PTZ) every other day. In all treatments, the open field test was performed to evaluate the locomotor and exploratory activity of the animals.

The first study investigated the effect of dexamethasone on oxidative stress and behavioral parameters. It was found that treatment with dexamethasone did not alter the locomotor and exploratory capacity of the animals and did not impair the consolidation of short-term memory (STM). The latency time for the first epileptic seizure was longer in the groups that received dexamethasone, at all doses, compared to the group that received saline solution. Regarding the oxidative stress parameters evaluated in the hippocampus, there was a reduction in the activity of the catalase enzyme (CAT), an increase in the activity of the enzyme superoxide dismutase (SOD) and an increase in sulfhydryl groups in animals that received PTZ. Furthermore, there was a reduction in glutathione peroxidase levels in animals that received dexamethasone 1 mg/kg compared to groups that received saline and diazepam.

The second study investigated the effect of betamethasone on inflammatory and behavioral parameters. Betamethasone did not change the locomotor and exploratory capacity of the animals. Furthermore, it prevents the intensity of epileptic seizures, according to the adapted Racine scale. Regarding inflammatory cytokines, treatment with betamethasone varies the levels of Tumor Necrosis Factor alpha (TNF- α) and Interleukin-1 β (IL-1 β) in the cortex. In the hippocampus and serum, the varying levels are similar between the tested groups.

The third study investigated the effect of piroxicam on inflammatory and behavioral disruptions. It was found that treatment with piroxicam did not alter the locomotor and exploratory capacity of the animals and did not impair the consolidation of

long-term memory (LTM). It also prevents the intensity of epileptic seizures, according to the adapted Racine scale. Regarding inflammatory interventions, IL-6 levels were found to be similar between the groups, there was an increase in TNF- α in the cortex of animals treated with piroxicam, in both concentrations, and a reduction in Interleukin-10 (IL-10) in the cortex and no hippocampus.

These results demonstrate the anticonvulsant effect of the evaluated anti-inflammatory drugs in the animal model of kindling epileptic seizures caused by pentylentetrazole. There was no impairment in locomotor and exploratory capacity or memory consolidation. Cytokine changes at the central level should be the key to the distributed effect, although further studies are needed.

Key words: Epilepsy; Inflammation; Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação das crises epiléticas	13
Figura 2 – Estudo populacional com pacientes diagnosticados com epilepsia demonstrando a etiologia da doença	14
Figura 3 – Cascata fisiopatológica de eventos inflamatórios na epilepsia	17
Figura 4 – Esquema da defesa antioxidante de primeira linha contra espécies reativas de oxigênio	22
Figura 5 – Neuroinflamação e Estresse Oxidativo na Epileptogênese	25
Figura 6 – Mecanismos de resistência à terapia com fármacos anticonvulsivantes	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – AEDs e sua disponibilização pela indústria farmacêutica	30
Tabela 2 - Escala de Racine original e uma de suas adaptações	36
Tabela 3 – Latência para primeira crise epiléptica comparada ao grupo controle Salina	98
Tabela 4 – Severidade das crises epilépticas comparadas ao grupo controle salina	98
Tabela 5 – Citocinas avaliadas no córtex de animais submetidos ao modelo animal de <i>Kindling</i> por PTZ.....	100
Tabela 6 – Citocinas avaliadas no hipocampo de animais submetidos ao modelo animal <i>Kindling</i> por PTZ.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FDA - Food and Drug Administration (agência americana)
AINEs - Anti-inflamatórios não esteroidais
Beta - Betametasona
BHE - Barreira hematoencefálica
CAT - Catalase
COX - Ciclo-oxigenase
CTCG - Crises tônico-clônicas generalizadas
AED - Medicamento antiepilético
DAMPS - Padrões moleculares associados a danos
DC - Dieta cetogênica
Dexa - Dexametasona
DNA - Ácido desoxirribonucléico
EEG - Eletroencefalograma
EO - Estresse oxidativo
ER - Encefalite de Rasmussen
ERO - Espécies reativas de oxigênio
FIRES - Síndrome Epilética Relacionada à Infecção Febril
GABA - Ácido gama-aminobutírico
GAT-1 - Transportador GABA 1
GAT-3 - Transportador GABA 3
GEFS+ - Epilepsia genética com crises epiléticas febris plus
GPx - Glutathione peroxidase
GSH - Glutathione
H₂O - Molécula da água
H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
Ig - imunoglobulina
IL-1 - Interleucina-1
IL-10 - Interleucina 10
IL-1 β - Interleucina-1 β
IL-6 - Interleucina-6
ILAE - International League Against Epilepsy
ip.- Intraperitonealmente
KBs - Corpos cetônicos

kDa - kilodaltons
LCR - Líquido cefalorraquidiano
LPO - Lipoperoxidação
LTM - Memória de longa duração
MDA - Malondialdeído
MEEP - via de produção de energia mitocondrial
NF-KB - Fator de transcrição nuclear kappa B
O₂ - Oxigênio molecular
OH⁻ - Ânion superóxido
PAMPS - Padrões moleculares associados a patógenos
PCDH19 - Gene PCDH19
PIRO - Piroxicam
PTZ - Pentilenotetrazol
RNA - Ácido ribonucléico
ROS - Espécies reativas de oxigênio
SCN1A - Subunidade alfa do tipo 1 da proteína do canal de sódio
SH - Grupos sulfidrilas
SNC - Sistema Nervoso Central
SNP - Sistema Nervoso Periférico
SOD - Superóxido dismutase
STM - Memória de curta duração
TBARS - Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCE - Lesão cerebral traumática
TIR - receptor Toll/interleucina-1
TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 EPILEPSIA.....	16
1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS	16
1.3 ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DAS CRISES EPILÉPTICAS	18
1.4 INFLUÊNCIA DA INFLAMAÇÃO NO PROCESSO EPILEPTOGÊNICO	20
1.5 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	21
1.5.1 Interleucina 1 beta	22
1.5.2 Fator de necrose tumoral alfa	22
1.5.3 Interleucina 6	23
1.5.4 Interleucina 10 (IL-10)	24
1.6 INFLUÊNCIA DO ESTRESSE OXIDATIVO NA EPILEPTOGÊNESE	24
1.6.1 Superóxido dismutase.....	26
1.6.2 Catalase.....	27
1.6.3 Glutadiona Peroxidase (GPx).....	27
1.6.4 ESPÉCIES REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)	27
1.6.5 Sulfidrilas	28
1.7 NEUROINFLAMAÇÃO E EO NA EPILEPSIA.....	29
1.8 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS	30
1.9 REFRATARIEDADE AO TRATAMENTO	31
1.10 ANTI-INFLAMATÓRIOS NOS CASOS DE EPILEPSIAS REFRATÁRIAS ...	32
1.11 MODELOS ANIMAIS DE EPILEPSIA E EPILEPTOGÊNESE.....	34
1.11.1 Modelo animal de <i>kindling</i> por pentilenotetrazol.....	34
1.12 - Escala de Racine	35
2. HIPÓTESE E OBJETIVOS	37
2.1 HIPÓTESE	37

2.2 OBJETIVO GERAL.....	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
2.2.1 Experimento I:	37
2.2.2 Experimento II:.....	37
2.2.3 Experimento III:	38
3. MÉTODOS E RESULTADOS	39
3.1 MÉTODOS E RESULTADOS: ARTIGO I.....	39
3.2 MÉTODOS E RESULTADOS: ARTIGO 2	47
3.3 MÉTODOS E RESULTADOS: ARTIGO 3	75
4. DISCUSSÃO GERAL.....	96
5. CONCLUSÕES.....	104
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	106
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPILEPSIA

A epilepsia é uma doença neurológica que afeta aproximadamente 50 milhões de pessoas em todo o mundo. Apesar de ser uma das doenças neurológicas mais comuns, a vida das pessoas com epilepsia é frequentemente afetada pelo estigma, discriminação e pelas violações dos direitos humanos básicos (ORGANIZATION, 2019). A prevalência desta doença tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, pelo aumento da sobrevida a traumatismos cranianos graves, acidentes vasculares cerebrais, infecções intracranianas e tumores cerebrais. Globamente, a incidência de epilepsia é de 50,4 a 81,7 por 100.000 pessoas ao ano (FALCO-WALTER, 2020).

A ocorrência de crise epiléptica é mais comum nos extremos de idade (na infância, antes dos dois anos de idade e na fase adulta após os 60 anos de idade) afetando aproximadamente 8 a 10% dos indivíduos nestas faixas etárias (WIRRELL, 2022). A ocorrência de uma única crise epiléptica não gera, necessariamente, o diagnóstico de epilepsia, sendo necessária a distinção entre crises únicas não provocadas e eventos não epilépticos, dos casos de epilepsia de início recente (GAVVALA; SCHUELE, 2016).

O primeiro passo no estabelecimento do diagnóstico de epilepsia consiste na obtenção da história clínica dos pacientes. Esta avaliação clínica do evento conduzirá à indicação de testes de diagnóstico adicionais, incluindo, por exemplo, Eletroencefalograma (EEG) e ressonância magnética (LEIBETSEDER; EISERMANN; LAFRANCE; NOBILI *et al.*, 2020). Segundo a ILAE (International League Against Epilepsy), a epilepsia é uma doença definida por qualquer uma das seguintes condições: (1) Pelo menos duas crises epilépticas não provocadas (ou reflexas) ocorrendo com um intervalo superior a 24 horas; (2) Uma crise epiléptica não provocada (ou reflexa) e a probabilidade de ocorrência de outras crises similares ao risco geral de recorrência (de pelo menos 60%) após duas crises epilépticas não provocadas, ocorrendo nos próximos 10 anos ou (3) Diagnóstico de uma síndrome epiléptica (FISHER; ACEVEDO; ARZIMANOGLU; BOGACZ *et al.*, 2014)

1.2 CLASSIFICAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS

Segundo a ILEA, de forma resumida, as crises epilépticas podem ser classificadas como de início focal (divididas em crises com consciência preservada ou prejudicada), início generalizado ou início desconhecido. As crises focais incluem crises que progridem

para crises tônico-clônicas bilaterais (Figura 1). Se faz necessário a distinção entre crises bilaterais (que se propagam para ambos os hemisférios) e crises generalizadas (que se originam simultaneamente em ambos os hemisférios). Nestas três classificações podem-se incluir as formas motoras e não motoras. A classificação expandida das crises epiléticas é semelhante à classificação resumida, entretanto, categorias motoras e não motoras são divididas de acordo com características que podem estar presentes durante as crises, como automatismos e mioclonias (FISHER; CROSS; D'SOUZA; FRENCH *et al.*, 2017).

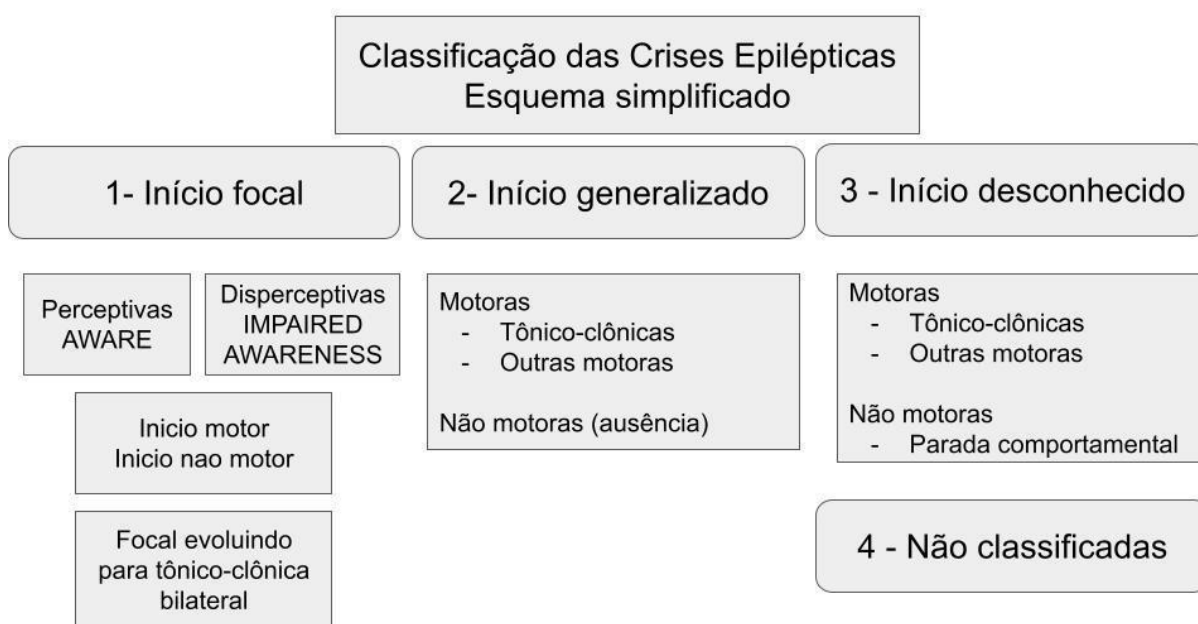


Figura 1 - Classificação das crises epiléticas. Adaptado de FISHER; CROSS; D'SOUZA; FRENCH *et al.*, 2017

- 1) As crises focais ou parciais surgem de um local específico no cérebro, afetando um membro ou um lado do corpo e/ou rosto. As manifestações clínicas são uma consequência da perturbação na(s) função(ões) normalmente atribuída(s) a essa área. Neste tipo de crise a consciência geralmente é preservada. Estas crises podem se generalizar secundariamente para todo o córtex, através de propagação adjacente ou através de vias comissurais (HUSSEIN, O., 2019; RHO; BOISON, 2022)
- 2) As crises generalizadas acometem ambos os hemisférios cerebrais. Convulsões tônico-clônicas são a apresentação mais comum de convulsões generalizadas em adultos. Elas começam com uma fase tônica na qual os membros parecem se

contrair espasticamente em direção ao corpo, seguida por sua extensão e espasmos rítmicos (HUSSEIN, OMAR, 2019; RHO; BOISON, 2022).

1.3 ETIOLOGIA E FISIOPATOLOGIA DAS CRISES EPILÉPTICAS

As crises epiléticas e a epilepsia são consequência de um desequilíbrio entre a excitação e a inibição de regiões do Sistema Nervoso Central (SNC) (VERA-GONZÁLEZ, 2022). Existem diversas formas de causar esse desequilíbrio. A ILAE definiu seis categorias etiológicas para a epilepsia: genética, estrutural, metabólica, infecciosa, imunológica e desconhecida (Figura 2). Um mesmo paciente pode ter mais de uma característica etiológica e estas não são hierárquicas (SCHEFFER; BERKOVIC; CAPOVILLA; CONNOLLY *et al.*, 2017). A etiologia da epilepsia muda consideravelmente ao comparar países desenvolvidos e países em desenvolvimento. Infecções como causa etiológica são mais frequentes em países em desenvolvimento (e os estudos populacionais são escassos) comparado a países desenvolvidos (VEZZANI; FUJINAMI; WHITE; PREUX *et al.*, 2016).

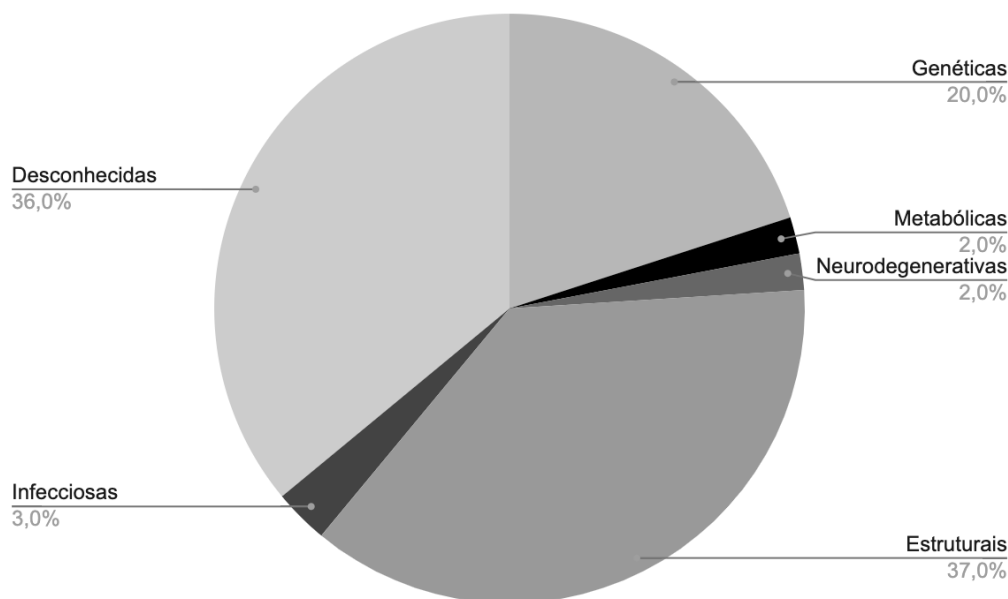


Figura 2 - Estudo populacional com pacientes diagnosticados com epilepsia demonstrando a etiologia da doença. Estudo realizado em país desenvolvido do norte europeu. Adaptado de SYVERTSEN; NAKKEN; EDLAND; HANSEN *et al.*, 2015.

O sequenciamento do ácido ribonucleico (RNA) do tecido cerebral de pessoas com epilepsia está auxiliando na elucidação dos processos patogênicos, mostrando relações regulatórias distintas e linhagens celulares anormais (MYERS, 2022;

PERUCCA; BAHLO; BERKOVIC, 2020). A epilepsia genética com crises epilépticas febris plus (GEFS+) é um distúrbio autossômico dominante complexo geralmente causado por mutações no canal SCN1A (um canal de sódio dependente de voltagem) na qual os indivíduos afetados apresentam uma variedade de fenótipos de epilepsia, variando de crises epilépticas febris simples até encefalopatias epilépticas graves (CAMFIELD; CAMFIELD, 2015; MYERS; SCHEFFER; BERKOVIC, 2018).

Qualquer lesão estrutural que afete o córtex pode resultar em crises epilépticas e epilepsia. A semiologia das crises dependerá da localização da lesão e não do tipo de lesão. Destacam-se a esclerose hipocampal, tumores cerebrais, malformações corticais e malformações vasculares (BALESTRINI; ARZIMANOGLU; BLÜMCKE; SCHEFFER *et al.*, 2021; BLÜMCKE; THOM; ARONICA; ARMSTRONG *et al.*, 2013).

As infecções cerebrais causadas por bactérias, vírus, fungos e parasitas estão entre as causas mais comuns de crises epilépticas e epilepsia em todo o mundo e são particularmente prevalentes nos países em desenvolvimento. Efeitos diretos da infecção e danos ao tecido cerebral, a produção de toxinas pelo organismo e a indução de inflamação são os mecanismos geradores das crises epilépticas (VEZZANI; FUJINAMI; WHITE; PREUX *et al.*, 2016). As causas metabólicas das crises podem ocorrer através da falência de um órgão (por exemplo, o fígado), deficiências nutricionais, causas autoimunes (por exemplo, diabetes mellitus tipo I) ou medicamentos e toxinas exógenas (por exemplo, álcool). Resultam em crises epilépticas agudas em vez de epilepsia, a menos que causem danos permanentes ao cérebro (o que pode ocorrer, por exemplo, com a hipoglicemia) (ANGEL; YOUNG, 2011).

A encefalite de Rasmussen (ER) é o principal exemplo de epilepsia causada por mecanismo imunológico. É uma epilepsia pediátrica rara, caracterizada por lesão inflamatória uni-hemisférica e consequente atrofia ipsilateral, declínio progressivo das funções motora e cognitiva que, normalmente, se torna refratária ao tratamento médico e gera declínio cognitivo (CAY-MARTINEZ; HICKMAN; MCKHANN II; PROVENZANO *et al.*, 2020). Apesar da patogênese incerta, acredita-se na existência de uma encefalite desencadeada pela resposta de células T citotóxicas a um ou mais epítomos, com a contribuição adicional de um processo autoimune (VILLENEUVE; LÉPINE; GIRARD; GUEDJ *et al.*, 2022).

1.4 INFLUÊNCIA DA INFLAMAÇÃO NO PROCESSO EPILEPTOGÊNICO

Qualquer insulto, tanto a nível central quanto a nível periférico, é capaz de gerar inflamação. O processo inflamatório está presente em todas as categorias etiológicas para a epilepsia. Insultos neurológicos, como lesão cerebral traumática, hipóxia ou convulsões febris, estão associados à morte neuronal, modificação sináptica disfuncional e à geração de uma rede hiperexcitável, que pode predispor a crises epiléticas recorrentes espontâneas (RANA, A.; MUSTO, A. E., 2018). As citocinas (moléculas-chave para a ativação de respostas imunes inatas e adaptativas) compreendem uma família de proteínas solúveis liberadas por células imunocompetentes. O aumento do conhecimento do seu papel no SNC e no Sistema Nervoso Periférico (SNP) revelou que estas moléculas e os seus efetores têm funções neuromoduladoras específicas como a modulação de canais iônicos dependentes de voltagem e de seus receptores, a plasticidade neuronal e a regulação da própria transmissão sináptica (VEZZANI; VIVIANI, 2015; VILLASANA-SALAZAR; VEZZANI, 2023).

Uma cascata fisiopatológica de eventos inflamatórios na epilepsia pode ser iniciada com um insulto a nível central (por exemplo, um traumatismo, infecção) ou a nível periférico (por exemplo, infecção ou autoimunidade) e podem levar à ativação de células cerebrais ou leucócitos, respectivamente (COSTAGLIOLA; DEPIETRI; MICHEV; RIVA *et al.*, 2022). Estas células liberam mediadores inflamatórios. Os efeitos da inflamação cerebral contribuem para a geração de crises epiléticas e morte celular, o que, por sua vez, gera mais inflamação, estabelecendo assim um círculo vicioso de eventos que contribui para o desenvolvimento da epilepsia. A inflamação periférica leva a ruptura da barreira hematoencefálica (BHE), ativação de astrócitos e aumento da excitabilidade do SNC, predispondo a novas crises convulsivas (VEZZANI; FRENCH; BARTFAI; BARAM, 2011). Células da glia ao terem suas funções homeostáticas interrompidas levam a efeitos inflamatórios e excitatórios, podendo exacerbar o início, o desenvolvimento e o estabelecimento da epileptogênese (DEVINSKY; VEZZANI; NAJJAR; DE LANEROLLE *et al.*, 2013). Um desenho esquemático deste mecanismo pode ser visualizado na Figura 3.

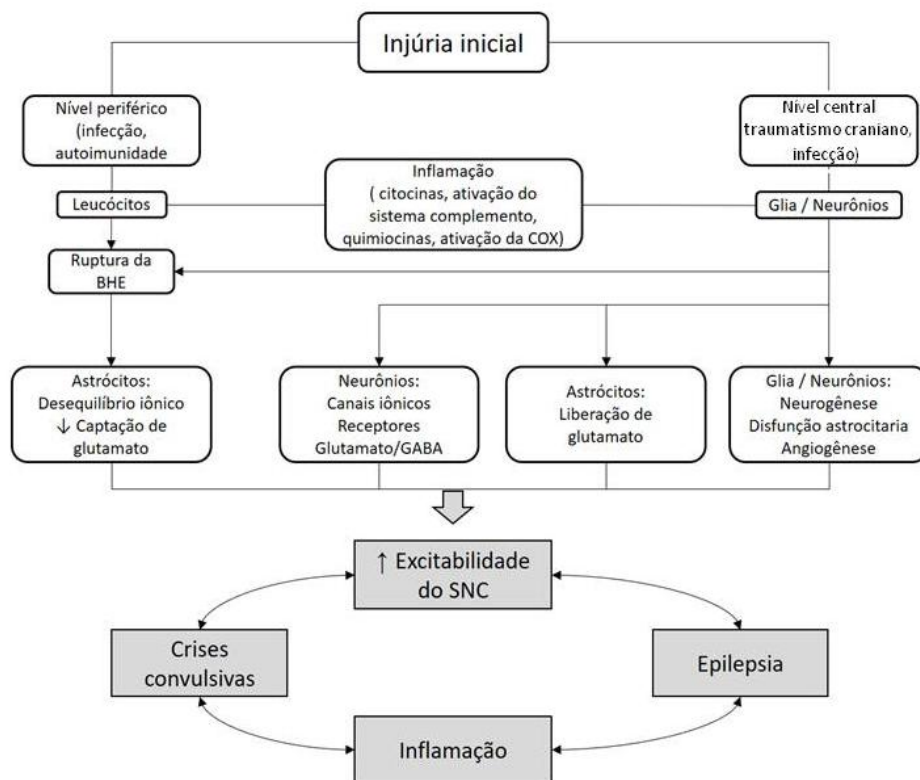


Figura 3 - Cascata fisiopatológica de eventos inflamatórios na epilepsia. Adaptado de (VEZZANI; FRENCH; BARTFAI; BARAM, 2011).

1.5 MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

A resposta inflamatória é um aspecto crucial dos tecidos corporais quando expostos a componentes deletérios. Em resposta ao processo inflamatório, ocorre liberação de substâncias que medeiam o processo inflamatório, que medeiam o processo inflamatório, prevenindo maiores danos aos tecidos e, em última análise, resultando na cura e restauração da função tecidual (ABDULKHALEQ; ASSI; ABDULLAH; ZAMRI-SAAD *et al.*, 2018). Modelos animais e evidências clínicas enfatizaram o envolvimento de mediadores inflamatórios na suscetibilidade a crises epilépticas e na epileptogênese. (SOLTANI KHAPOUSHAN; YAZDANPANA; REZAEI, 2022). Respostas inflamatórias robustas e generalizadas no cérebro diminuem o limiar convulsivo, aumentam a excitabilidade neuronal, aumentam a permeabilidade da BHE e promovem a epileptogênese (SHIMADA; TAKEMIYA; SUGIURA; YAMAGATA, 2014). As crises epilépticas estão associadas a níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, particularmente interleucina-1 β (IL-1 β), Interleucina-6 (IL-6) e Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α), o que ressalta o impacto da neuroinflamação e destes marcadores

pró-inflamatórios na hiperexcitabilidade cerebral e epileptogênese (SOLTANI KHABOUSHAN; YAZDANPANAHAH; REZAEI, 2022).

1.5.1 Interleucina 1 beta

O sistema imunológico inato detecta padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS) ou a danos (DAMPS). Uma vez ativado, orchestra a resposta inflamatória secretando citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1), em particular IL-1 β . A IL-1 β é um membro da família IL-1, que contém outras dez citocinas. Os receptores da família IL-1 (IL-1Rs) consistem em dez membros, denominados IL-1R1 a IL-1R10. IL-1R1, o receptor primário para IL-1 β , apresenta duas partes, incluindo três regiões semelhantes à imunoglobulina (Ig) e o receptor Toll/IL-1 (TIR), que medeia à sinalização intracelular (SOLTANI KHABOUSHAN; YAZDANPANAHAH; REZAEI, 2022; WEBER; WASILIEW; KRACHT, 2010).

A IL-1 β pode desregular a neurotransmissão gabaérgica e glutamatérgica. Uma alta concentração de IL-1 β poderia diminuir a neurotransmissão GABAérgica e potencializar a liberação de glutamato, aumentando a suscetibilidade cerebral a crises epiléticas (ROSETI; VAN VLIET; CIFELLI; RUFFOLO *et al.*, 2015; SOLTANI KHABOUSHAN; YAZDANPANAHAH; REZAEI, 2022). Além disso, esta citocina aumenta ainda mais a permeabilidade da BHE, o que resulta na entrada de mais leucócitos e mediadores inflamatórios no cérebro, perpetuando o estado inflamatório cerebral e diminuindo, assim, o limiar convulsivo (CASTAÑEDA-CABRAL; UREÑA-GUERRERO; BEAS-ZÁRATE; COLUNGA-DURÁN *et al.*, 2020)

O aumento dos níveis de IL-1 β foi encontrado no soro de pacientes que estavam em crise epilética ativa (YOUN; SUNG; LEE, 2013), no líquido cefalorraquídiano (LCR) de pacientes com crises epiléticas tônico-clônicas generalizadas e em amostras *post-mortem* de pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial (VIVIANI; BARTESAGHI; GARDONI; VEZZANI *et al.*, 2003). Estes achados suportam a ideia que a IL-1 β e seus receptores sejam sugeridos como alvos potenciais para fármacos antiepiléticos (SOLTANI KHABOUSHAN; YAZDANPANAHAH; REZAEI, 2022).

1.5.2 Fator de necrose tumoral alfa

O TNF- α é uma citocina inflamatória produzida por macrófagos/monócitos durante a inflamação aguda e é responsável por uma ampla gama de eventos de sinalização dentro das células, levando à necrose ou apoptose. Esta citocina exerce

muitos dos seus efeitos ligando-se, como um trímero, a um receptor de membrana celular de 55 kDa denominado TNFR-1 ou a um receptor de membrana celular de 75 kDa denominado TNFR-2. Ambos os receptores pertencem à chamada superfamília de receptores de TNF (IDRISS; NAISMITH, 2000). Baixos níveis de TNF- α auxiliam o cérebro a manter o seu estado saudável, enquanto níveis excessivos deste têm sido observados em distúrbios neurológicos (CLARK; VISSEL, 2016). O TNF- α é liberado principalmente pela microglia no cérebro e pode estimular os astrócitos a liberar glutamato. Um aumento extracelular na concentração de glutamato pode estimular os neurônios glutamatérgicos, levando a um aumento do potencial de membrana e consequente despolarização da célula (SHIMADA; TAKEMIYA; SUGIURA; YAMAGATA, 2014).

Em pacientes com epilepsia, os níveis de TNF- α no soro e no LCR são elevados quando comparados a controles saudáveis. A concentração do TNFR1 é maior em pacientes com epilepsia do lobo temporal mesial (CASTAÑEDA-CABRAL; UREÑA-GUERRERO; BEAS-ZÁRATE; COLUNGA-DURÁN *et al.*, 2020). Já nos casos de epilepsia refratária ao tratamento farmacológico convencional ocorre aumento do TNF- α sérico comparado a pacientes com epilepsia leve, indicando a associação entre gravidade da epilepsia e nível sérico desta citocina. Além disso, o aumento desta citocina foi associado a uma maior susceptibilidade para desenvolver crises epilépticas futuras (SOLTANI KHABOUSHAN; YAZDANPANA; REZAEI, 2022). Este marcador também contribui para a disfunção dos astrócitos e crises epilépticas agudas na epilepsia do lobo temporal, sendo que a microglia reativa é a principal fonte do fator de necrose tumoral alfa (HENNING; ANTONY; BREUER; MÜLLER *et al.*, 2023).

1.5.3 Interleucina 6

A IL-6 é uma citocina pró-inflamatória primária envolvida na resposta imune, contribuindo para a defesa do hospedeiro através da estimulação de respostas de fase aguda, hematopoiese e reações imunológicas (TANAKA; NARAZAKI; KISHIMOTO, 2014). É liberada de astrócitos e micróglia após crises epilépticas. Ativa a sinalização IL-1R tipo I que regula a excitabilidade neuronal, incluindo a alteração da transmissão sináptica, a redução na produção de GABA e a inibição da corrente de saída dos canais de Ca^{2+} (SHIMADA; TAKEMIYA; SUGIURA; YAMAGATA, 2014).

As crises epilépticas promovem alterações nos níveis de IL-6 tanto no LCR quanto no sangue periférico. A magnitude dessas alterações está relacionada à gravidade

destas crises. Os níveis de IL-6 aumentam intensamente após crises tônico-clônicas generalizadas (CTCG) recorrente, enquanto após crises tônico-clônicas únicas ou parciais prolongadas, este aumento ocorre em menor grau (KOBYLAREK; IWANOWSKI; LEWANDOWSKA; LIMPHAIBOOL *et al.*, 2019). A IL-6 pode desregular a neurotransmissão ao desencadear a superexpressão do GAT-1 e GAT-3 (transportadores de alta afinidade para o GABA), diminuindo os efeitos inibitórios do GABA (SOLTANI KHABOUSHAN; YAZDANPANA; REZAEI, 2022). Além disso, esta citocina também é responsável por causar aumento dos níveis de glutamato, redução dos níveis de GABA e aumento da permeabilidade da BHE, tornando o ambiente neuronal vulnerável à epileptogênese (RANA, AMNA; MUSTO, ALBERTO E, 2018).

1.5.4 Interleucina 10 (IL-10)

A IL-10 desempenha um importante papel regulador e anti-inflamatório, neutralizando vários processos pró-inflamatórios durante a infecção, bem como em doenças autoimunes. Os efeitos anti-inflamatórios desta citocina são mediados pela desativação de macrófagos, o que por sua vez diminui a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células T (KOBYLAREK; IWANOWSKI; LEWANDOWSKA; LIMPHAIBOOL *et al.*, 2019).

Estudos demonstram circulação desta citocina em pacientes epiléticos, tanto a nível central (YOUN; SUNG; LEE, 2013) como a nível periférico (BASNYAT; PESU; SÖDERQVIST; GRÖNHOLM *et al.*, 2020). A produção de IL-10 pode ser afetada pela frequência das crises e diminuir concomitantemente com o aumento da duração das mesmas. Portanto, a determinação da IL-10 plasmática pode ter valor diagnóstico como um tipo de biomarcador cronológico da doença (BASNYAT; PESU; SÖDERQVIST; GRÖNHOLM *et al.*, 2020).

1.6 INFLUÊNCIA DO ESTRESSE OXIDATIVO NA EPILEPTOGÊNESE

A instalação do estresse oxidativo (EO) se dá pelo desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção da sinalização e controle redox e/ou dano molecular. O sistema de defesa antioxidante tem o objetivo primordial de manter o processo oxidativo dentro dos limites fisiológicos e passíveis de regulação, impedindo que os danos oxidativos se amplifiquem, culminando em danos sistêmicos irreparáveis (SIES, 2015). Os mecanismos de geração de radicais livres ocorrem, sobretudo, nas mitocôndrias, membranas celulares e no citoplasma. Já o

sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicais (BARBOSA; COSTA; ALFENAS; DE PAULA *et al.*, 2010).

O estresse oxidativo é considerado um possível mecanismo na patogênese da epilepsia. Ocorre dano oxidativo a alvos suscetíveis (proteínas, lipídios e DNA) devido a crises epiléticas persistentes (*status epilepticus*) e subsequente dano celular após estes eventos (AGUIAR; ALMEIDA; ARAÚJO; DE ABREU *et al.*, 2012). Devido a sua baixa capacidade antioxidante, o cérebro é particularmente sensível aos danos dos radicais livres, que podem afetar os lipídios, os ácidos nucleicos e as proteínas. Evidências disponíveis apontam claramente um papel do estresse oxidativo na morte neuronal e na fisiopatologia da epileptogênese e da epilepsia (ŁUKAWSKI; CZUCZWAR, 2023).

Os efeitos do EO no organismo dependem do tipo de oxidante, da localização e intensidade de sua produção, da composição e da capacidade dos mecanismos de reparo (ŁUKAWSKI; CZUCZWAR, 2023). As mitocôndrias são os principais produtores de espécies reativas de oxigênio (ERO) nas células, e as enzimas na cadeia de transporte de elétrons, em particular, desempenham um papel significativo neste processo (HERNANSANZ-AGUSTÍN; ENRÍQUEZ, 2021)

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicais. Esse sistema, usualmente, é dividido em enzimático (superóxido dismutase, catalase e glutaciona peroxidase) e não-enzimático. No último caso, é constituído por grande variedade de substâncias antioxidantes, que podem ter origem endógena ou dietética (BARBOSA; COSTA; ALFENAS; DE PAULA *et al.*, 2010).

As moléculas antioxidantes que constituem a rede de defesa antioxidante nos sistemas vivos atuam em diferentes níveis (Figura 4). Esses níveis podem ser a prevenção da formação de radicais livres (primeiro nível), eliminação de radicais livres (segundo nível) e reparação de danos induzidos por radicais (terceiro nível). O nível de defesa antioxidante primário é constituído por três enzimas principais: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPX) (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

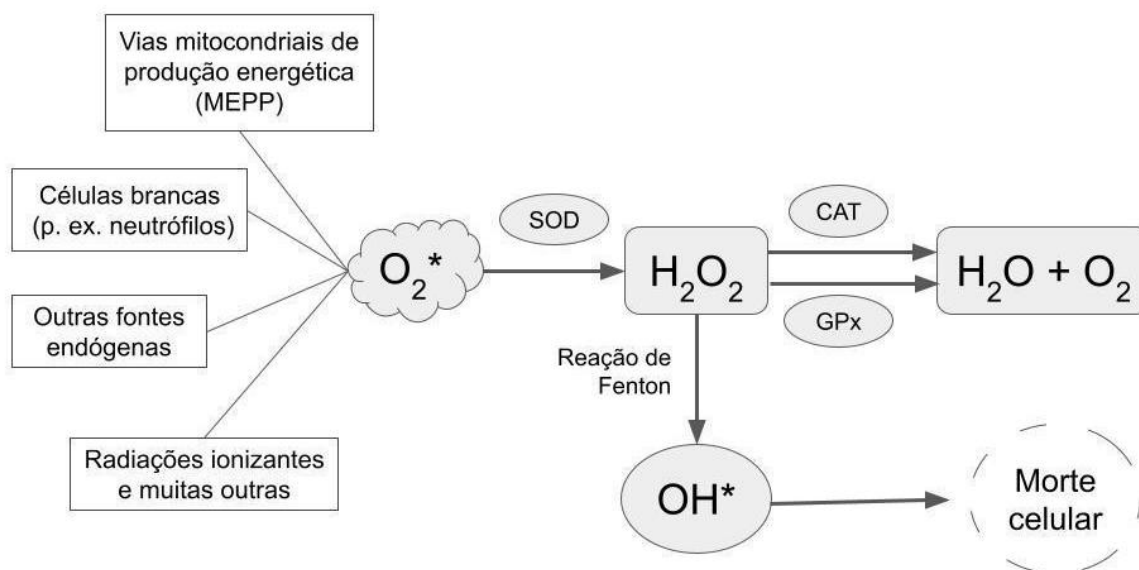


Figura 4 - Esquema da defesa antioxidante de primeira linha contra espécies reativas de oxigênio. Adaptado de IGHODARO; AKINLOYE, 2018

1.6.1 Superóxido dismutase

A SOD é a primeira enzima de desintoxicação e o antioxidante mais poderoso da célula. É uma importante enzima antioxidante endógena que atua como um componente do sistema de defesa de primeira linha contra espécies reativas de oxigênio (ROS). Ele catalisa a dismutação de duas moléculas de ânion superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2), tornando-o menos danoso. SOD é uma metaloenzima e, portanto, requer um cofator metálico para sua atividade. Com base no tipo de íon metálico exigido como cofator pela SOD existem várias formas da enzima (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Uma metanálise recente demonstrou redução do nível de SOD nos eritrócitos de pacientes com epilepsia quando comparados a controles saudáveis. Esta mesma redução foi encontrada no soro e no plasma dos pacientes com epilepsia comparado ao grupo controle, o que pode ser um indicador de dano oxidativo na epilepsia (WANG; ZHANG; JIA; ZHANG *et al.*, 2021). Em estudo utilizando o modelo animal de crises epiléticas induzidas por pilocarpina encontrou-se redução dos níveis desta enzima após o estado de mal epilético que se manteve diminuída após este evento (BELLISSIMO; AMADO; ABDALLA; FERREIRA *et al.*, 2001). Por outro lado, outro estudo com este mesmo modelo animal demonstrou elevação dos níveis de SOD no hipocampo dos animais durante a fase crônica das crises epiléticas induzidas (FREITAS, 2009)

1.6.2 Catalase

A CAT é uma enzima antioxidante comum presente na maioria dos tecidos vivos que utilizam oxigênio. Utiliza ferro ou manganês como cofator e catalisa a degradação ou redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio molecular (O_2), completando, conseqüentemente, o processo de desintoxicação da SOD. Localiza-se principalmente nos peroxissomos, mas está ausente nas mitocôndrias das células de mamíferos (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

Níveis elevados de CAT foram encontrados em pacientes com epilepsia farmacorresistente submetidos à cirurgia (LOPEZ; GONZÁLEZ; LORIGADOS; MORALES *et al.*, 2007; RUMIÀ; MARMOL; SANCHEZ; GIMÉNEZ-CROUSEILLES *et al.*, 2013) de epilepsia. Em outro estudo, o soro de pacientes com epilepsias mioclônicas progressivas (um tipo de epilepsia com difícil manejo terapêutico e refratariedade à maioria dos medicamentos antiepilépticos) apresentou elevação do nível de CAT, comparado a controles saudáveis (CARDENAS-RODRIGUEZ; HUERTA-GERTRUDIS; RIVERA-ESPINOSA; MONTESINOS-CORREA *et al.*, 2013).

1.6.3 Glutadiona Peroxidase (GPx)

A GPx é uma importante enzima intracelular que decompõe os peróxidos de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e peróxidos lipídicos aos seus álcoois correspondentes, principalmente nas mitocôndrias e, em algumas situações, no citosol. Sua atividade depende, geralmente, do cofator selênio. A enzima desempenha um papel crucial na inibição do processo de peroxidação lipídica e, portanto, protege as células do estresse oxidativo. Existem pelo menos oito enzimas GPx em humanos, GPx1 – GPx8 (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

A mesma meta análise que constatou elevação nos níveis de SOD em pacientes com epilepsia comparados a controles saudáveis demonstrou níveis semelhantes de GPx nestes grupos (apesar de constatar tendência a diminuição da GPx nos pacientes com epilepsia) (WANG; ZHANG; JIA; ZHANG *et al.*, 2021). Crise epilépticas febris em crianças também não alteraram os níveis séricos GPx (MAHYAR; AYAZI; DALIRANI; HOSEINI *et al.*, 2017).

1.6.4 ESPÉCIES REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

A lipoperoxidação (LPO) consiste na degradação oxidativa dos lipídios. O processo de peroxidação lipídica é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido

graxo insaturado. Como resultado, ocorre a formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos, tais como o malondialdeído (MDA), 4-hidroxinonenal e isoprostanos, que podem ser detectados em amostras biológicas e utilizados para avaliação do estresse oxidativo (WANG; ZHANG; JIA; ZHANG *et al.*, 2021). Estes compostos podem ser detectados e analisados em amostras biológicas, sendo utilizados para medir a LPO, um indicativo de estresse oxidativo. O TBARS, sigla do inglês *thiobarbituric acid reactive species* (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico), consiste em uma técnica que detecta principalmente os níveis de malondialdeído (MDA) (LIMA; ABDALLA, 2001), sendo a técnica mais utilizada nos estudos clínicos (SUN; LI; MAIMAITI; LIU *et al.*, 2022).

Estudo recente demonstrou que os níveis de MDA são elevados em pacientes com epilepsia, quando comparados a controles saudáveis. Desta forma, o MDA pode ser um marcador confiável de EO em pacientes com epilepsia (SUN; LI; MAIMAITI; LIU *et al.*, 2022). Em modelos animais, a elevação do MDA ocorre tanto a nível periférico como a nível central após a ocorrência de crises convulsivas tônico-clônicas (DOS SANTOS; ASSREUY; OLIVEIRA; DE ALENCAR *et al.*, 2021). Utilizando o modelo de crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) pesquisadores observaram aumento dos níveis de MDA no lobo temporal cerebral. Este aumento foi revertido com o tratamento com o óleo essencial de uma planta medicinal, a *Ducrosia anethifolia* (ZAMYAD; ABBASNEJAD; ESMAEILI-MAHANI; MOSTAFAVI *et al.*, 2019).

1.6.5 Sulfidrilas

Os grupos sulfidrilas (SH) são considerados os maiores e mais frequentes antioxidantes no plasma (KOLAGAL; KARANAM; DHARMAVARAPU; D'SOUZA *et al.*, 2009). Possuem grande importância no sistema antioxidante por oferecerem suas ligações (-SH) à glutathiona (GSH), auxiliando na atenuação das respostas de estresse oxidativo ao induzir a eliminação de radicais livres (BARBOSA; COSTA; ALFENAS; DE PAULA *et al.*, 2010). Um estudo clínico com pacientes diagnosticados com epilepsia encontrou redução dos grupamentos sulfidrilas no soro de pacientes, comparado a controles saudáveis (KÖSEM; YÜCEL; TITIZ; SEZER *et al.*, 2021). Níveis diminuídos de grupamentos SH no soro de pacientes com epilepsia também são correlacionados com o maior número de crises epiléticas (GÜMÜŞYAYLA; VURAL; BEKTAŞ; NEŞELIOĞLU *et al.*, 2016)

1.7 NEUROINFLAMAÇÃO E EO NA EPILEPSIA

A neuroinflamação e as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são rapidamente induzidas no cérebro após lesões cerebrais agudas que estão associadas a um risco aumentado de epilepsia. Esses fenômenos reforçam-se mutuamente e persistem durante a epileptogênese, bem como durante crises epiléticas espontâneas crônicas. Os medicamentos anti-inflamatórios e antioxidantes administrados transitoriamente antes ou logo após o início clínico da epilepsia sintomática, bloqueiam de forma semelhante a progressão das crises espontâneas e podem atrasar o seu início (TERRONE; BALOSSO; PAULETTI; RAVIZZA *et al.*, 2020).

Insultos iniciais, como infecção sistêmica, lesão cerebral traumática (TCE), estado de mal epilético e mutações genéticas iniciam cascatas de sinalização inflamatória e oxidativa. A ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-KB) leva à produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , TNF- α e IL-6, que demonstraram induzir gliose, disfunção mitocondrial e depleção de glutathiona (GSH). A depleção de GSH prejudica as defesas antioxidantes celulares e mitocondriais gerando danos oxidativos (FABISIAK; PATEL, 2022). O EO é rapidamente desencadeado após a ocorrência de estado de mal epilético (emergência neurológica caracterizada por crises epiléticas prolongadas ou contínuas e está associada a morbidade e mortalidade significativas). Em geral, a produção excessiva de ERO após o estado de mal epilético resulta em LPO, danos ao DNA, inibição enzimática e dano mitocondrial, culminando em morte neuronal (ŁUKAWSKI; CZUCZWAR, 2023). Esquema resumido sobre a relação entre estes dois eventos (neuroinflamação e EO) pode ser visto na Figura 5.

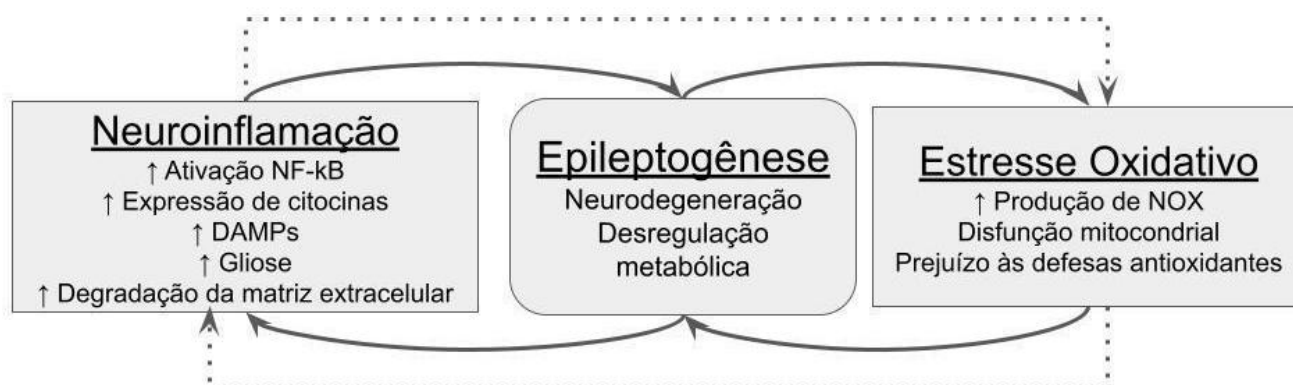


Figura 5 - Neuroinflamação e Estresse Oxidativo na Epileptogênese. Adaptado de (FABISIAK; PATEL, 2022)

1.8 ABORDAGENS TERAPÊUTICAS

O uso de Medicamento antiepiléptico (AEDs) é a abordagem terapêutica mais utilizada na epilepsia. Podem-se dividir os AEDs em três gerações distintas (Tabela 1).

Tabela 1 – EADs e sua disponibilização pela indústria farmacêutica.

	Disponibilização pela indústria farmacêutica	Exemplos
1ª Geração	A Partir de 1857	Brometo de potássio, fenobarbital, fenitoína, primidona, trimetadona e etossuximida
2ª Geração	A Partir de 1960	Carbamazepina, valproato e benzodiazepínicos
3ª Geração	A Partir de 1980	Progabida, vigabatrina e tiagabina

Adaptado de LÖSCHER; POTSCHKA; SISODIYA; VEZZANI, 2020.

Os AEDs atuam basicamente inibindo a despolarização neuronal anormal ou a sua propagação. Não têm ação sobre os mecanismos de epileptogênese. Os principais mecanismos de ação dos AEDs são: potencialização da ação do ácido gama-aminobutírico (GABA); bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem; bloqueio dos canais de cálcio do tipo T; Interferência na atividade da proteína vesicular sináptica SV2A e mecanismos múltiplos (GOMEZ; DA SILVA TORRES, 2017). Os AEDs de nova geração (terceira geração) podem oferecer melhor tolerabilidade, efeitos adversos mais leves, menos interações medicamentosas e melhores características farmacocinéticas em comparação com os AEDs convencionais (IMDAD; ABUALAIT; KANWAL; ALGHANNAM *et al.*, 2022).

O tipo de epilepsia, idade, gênero, comorbidades, interações medicamentosas e custo do tratamento são fatores importantes na escolha do AEDs (JOHNSON, 2019). Além disso, o potencial teratogênico de alguns AEDs, o ganho de peso e os problemas relacionados aos hormônios menstruais são considerações importantes nas mulheres. O impacto dos AEDs na saúde óssea é crítico em todas as faixas etárias, especialmente nos idosos. Também problemas psiquiátricos, principalmente depressão e ansiedade, podem ter um grande impacto no controle das crises e na qualidade de vida geral (ALI, 2018).

Além do uso de AEDs, outras abordagens terapêuticas são utilizadas, principalmente pelos pacientes que não respondem adequadamente à terapia medicamentosa disponível:

- A Dieta Cetogênicas (DC) é definida como uma dieta rica em gordura, pobre em carboidratos e com conteúdo adequado de proteínas. A cetogênese é um processo metabólico que fornece ao corpo uma forma alternativa de energia através da produção de corpos cetônicos (KBs), estes KBs têm amplos efeitos neuroprotetores (IMDAD; ABUALAIT; KANWAL; ALGHANNAM *et al.*, 2022)

- A cirurgia da epilepsia oferece a chance de remissão das crises para 30 a 40% dos pacientes com epilepsia focal cujas crises continuam apesar dos medicamentos antiepilépticos. Abrange procedimentos ressectivos curativos, técnicas paliativas e implantação de dispositivos de estimulação (RUGG-GUNN; MISEROCCHI; MCEVOY, 2020).

1.9 REFRATARIEDADE AO TRATAMENTO

Apesar da disponibilidade de mais de 20 AEDs para o tratamento sintomático de crises epiléticas, cerca de um terço dos pacientes com epilepsia apresentam crises epiléticas refratárias à farmacoterapia. Estes pacientes apresentam riscos aumentados de morte prematura, lesões, disfunção psicossocial e qualidade de vida reduzida (LÖSCHER; POTSCSKA; SISODIYA; VEZZANI, 2020)

Cerca de 47% dos pacientes com epilepsia de início recente podem alcançar completa ausência de crises com o primeiro AED prescrito, 13% dos 53% restantes podem ficar livres de crises usando um segundo agente, e apenas 4% com um terceiro agente e/ou politerapia. Assim, identificar a resistência à terapia farmacológica é essencial para a melhora do prognóstico da epilepsia (ANYANWU; MOTAMEDI, 2018).

Vários mecanismos potenciais de resistência aos DAEs ou fatores que predizem resultados desfavoráveis têm sido implicados em pacientes com epilepsia e modelos animais de crises epiléticas resistentes aos fármacos, indicando que a resistência intrínseca ou adquirida é um fenômeno multifatorial. As hipóteses de resistência sugeridas incluem hipóteses de alvo, transportador, rede, gravidade intrínseca e variante genética. Além disso, múltiplos mecanismos (Figura 6) de resistência podem estar presentes em um mesmo indivíduo, dificultando, assim, qualquer estratégia para neutralizar ou reverter a farmacoresistência (LÖSCHER; POTSCSKA; SISODIYA; VEZZANI, 2020). Sabe-se que moléculas inflamatórias e seus receptores são induzidos em focos epileptogênicos de pacientes com epilepsias farmacoresistentes de etiologias estruturais ou com estado de mal epilético refratário (VILLASANA-SALAZAR; VEZZANI, 2023).

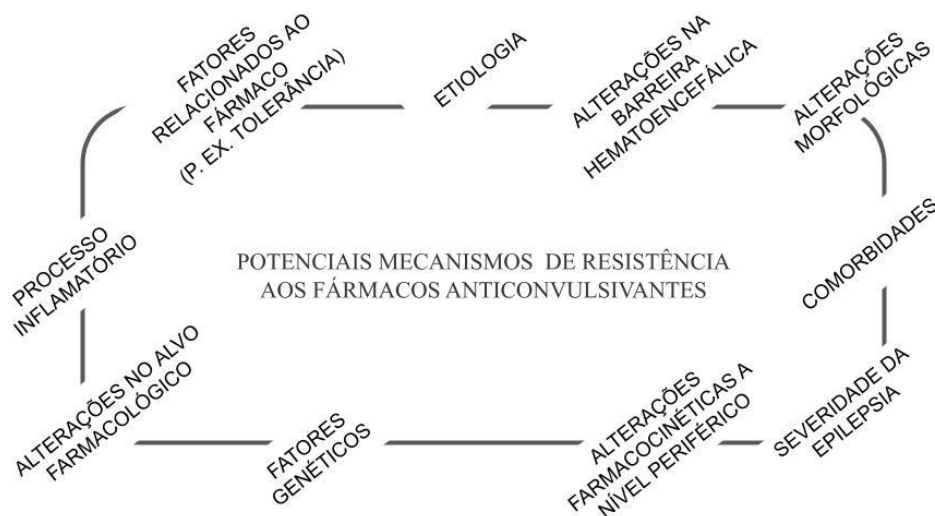


FIGURA 6 - Mecanismos de resistência à terapia com fármacos anticonvulsivantes. Adaptado de LÖSCHER; POTSCHKA; SISODIYA; VEZZANI, 2020.

1.10 ANTI-INFLAMATÓRIOS NOS CASOS DE EPILEPSIAS REFRAATÁRIAS

Medicamentos anti-inflamatórios administrados transitoriamente antes ou logo após o início clínico da epilepsia sintomática bloqueiam de forma semelhante a progressão das crises epilépticas espontâneas e podem atrasar o seu início (TERRONE; BALOSSO; PAULETTI; RAVIZZA *et al.*, 2020). Além disso, neuroproteção e o resgate de déficits cognitivos também são observados nos modelos animais da doença tratados com estes fármacos (TERRONE; FRIGERIO; BALOSSO; RAVIZZA *et al.*, 2019). Até o momento, nenhum dos medicamentos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA, como anticonvulsivantes, demonstrou propriedades modificadoras da doença na epilepsia. Por outro lado, a terapia anti-inflamatória pode ser promissora a este respeito (RADU; EPUREANU; RADU; FABENE *et al.*, 2017).

O uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) em modelos animais de epilepsia tem sido promissor. Sua administração após o início do *status epilepticus* teve resultados positivos, incluindo neuroproteção hipocampal e no córtex piriforme, redução de neurogênese aberrante, diminuição na frequência de crises espontâneas ou atrasos no início da atividade epileptiforme (RADU; EPUREANU; RADU; FABENE *et al.*, 2017). O tratamento com diclofenaco sódico, por exemplo, no modelo animal de *kindling*

induzido por PTZ, diminuiu a gravidade das crises epilépticas nos animais tratados com doses de 5 e 10 mg/kg (VIEIRA; GLASSMANN; MARAFON; PEREIRA *et al.*, 2016).

Assim, os AINEs são capazes de interferir em mecanismos implicados no desenvolvimento da doença e podem representar tratamentos modificadores da doença (VEZZANI, 2015). A enzima COX (isoformas COX-1 e COX-2) é expressa no SNC e está envolvida na fisiopatologia de vários distúrbios cerebrais, incluindo a epilepsia. Devido a isso, inibidores da COX são promissores terapêuticos. Investigações pré-clínicas demonstraram a prevenção ou redução da gravidade dos episódios convulsivos, além de prevenir a farmacoresistência. No entanto, efeitos pró convulsivantes e nenhum efeito anti-epileptogênico também foram observados (DHIR, 2019). Somando-se ao fato de que inúmeros efeitos adversos do uso dos inibidores da COX a longo prazo são conhecidos, a utilização destes medicamentos no tratamento de epilepsias farmacoresistentes ainda é questionada (VANE; BOTTING, 1998).

Além dos AINEs, os fármacos glicocorticóides também são promissores no tratamento da epilepsia. Utilizando o modelo animal de epilepsia *kindling* por PTZ o tratamento com prednisolona foi capaz de diminuir a gravidade das crises epilépticas, além de reduzir a expressão de citocinas inflamatórias no córtex e hipocampo (DE LIMA ROSA; GUZZO; DOMINGUES; PADILHA *et al.*, 2021). O tratamento com dexametasona, neste mesmo modelo animal, também atenuou a severidade das crises convulsivas e reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo dos animais (GUZZO; LIMA; VARGAS; COITINHO, 2018)

O uso de medicamentos antagonistas de citocinas e agentes direcionados aos linfócitos têm sido propostos por alguns estudos. O uso de agentes anti-IL-1, anti-IL-6 e anti-CD20 em pacientes com epilepsia resistente a medicamentos e estado de mal epiléptico refratário tem mostrado resultados promissores e um bom perfil de segurança (COSTAGLIOLA; DEPIETRI; MICHEV; RIVA *et al.*, 2022). Este tipo de terapia farmacológica tem bons resultados em casos de difícil manejo clínico com os medicamentos anticonvulsivantes habituais. A utilização de Anakinra (um antagonista do receptor de IL-1 β humano) e Tocilizumabe (um anticorpo monoclonal humanizado anti-receptor de IL-6 humana), ambos agentes antagonistas de citocinas, em casos de Síndrome Epiléptica Relacionada à Infecção Febril (FIRES), uma condição grave e com péssimo prognóstico, foi capaz de suprimir crises epilépticas em pacientes que não respondiam à terapia convencional (SAKUMA; HORINO; KUKI, 2020).

O uso de anti-inflamatórios como coadjuvantes nos casos de epilepsias refratárias parece ser muito promissor. No entanto, a compreensão do mecanismo de ação destes fármacos na epilepsia e na epileptogênese ainda é necessária.

1.11 MODELOS ANIMAIS DE EPILEPSIA E EPILEPTOGÊNESE

A identificação de potenciais agentes terapêuticos para o tratamento da epilepsia requer a utilização de modelos animais de crises epiléticas. Exceto por alguns tratamentos iniciais, a atividade anticonvulsivante de todos os medicamentos utilizados clinicamente foi, em sua maior parte, definida por modelos de crise epilética aguda em roedores (BARKER-HALISKI; STEVE WHITE, 2020). Os modelos animais, quando cuidadosamente selecionados, projetados e conduzidos, são partes importantes de qualquer estratégia translacional de desenvolvimento de medicamentos. O valor translacional dos modelos animais pode ser ainda melhorado quando combinado com outras ferramentas translacionais, como farmacologia de sistemas quantitativos, biomarcadores ou ensaios clínicos experimentais (LÖSCHER, 2017).

1.11.1 Modelo animal de *kindling* por pentilenotetrazol

Kindling é um modelo animal crônico de epilepsia que tem sido extensivamente estudado para compreender o processo de epileptogênese e descobrir novos compostos antiepiléticos. É um fenômeno em que um estímulo subconvulsivante (químico ou elétrico), se aplicado repetida e intermitentemente, desencadeará crises epiléticas completas. O *kindling* pode ser induzido por estimulação elétrica de diferentes regiões do cérebro (*kindling* elétrico) ou utilizando agentes químicos (*kindling* químico) (DHIR, 2012). A crise epilética induzida por PTZ é um dos modelos de *kindling* padrão-ouro para avaliação rápida de novos anticonvulsivantes e também é considerado um modelo bem aceito de epilepsia crônica (SINGH; MISHRA; GOEL, 2021).

O PTZ é um antagonista do receptor GABA-A. É caracterizado por alta biodisponibilidade devido à fácil penetração através de membranas biológicas, rápida distribuição aos órgãos após injeção intraperitoneal (ip), latência de ação muito curta, distribuição uniforme no cérebro e capacidade de estimular a atividade epileptogênica pelo bloqueio do receptor GABA-A (SAMOKHINA; SAMOKHIN, 2018). Uma administração intraperitoneal de PTZ em um animal induz uma crise epilética aguda e grave em altas doses, enquanto administrações sequenciais de uma dose subconvulsivante é usada para o desenvolvimento de *kindling* químico, um modelo de epilepsia.

Administrações repetitivas de PTZ em baixas doses diminuem o limiar convulsivo e induzem crises epiléticas tônico-clônica graves. Este método é simples e amplamente aplicável para investigar a fisiopatologia da epilepsia (SHIMADA; YAMAGATA, 2018)

O *kindling* induzido por PTZ pode ser realizado por protocolos curtos ou longos, administrações diárias ou em dias alternados durante 15 a 38 dias. A dose de PTZ para o desenvolvimento de crises epiléticas tônico-clônicas após a administração intraperitoneal, de acordo com o protocolo *kindling*, varia de 20 a 50 mg por Kg. Para a avaliação da intensidade das crises, os principais estudos utilizam a escala de classificação de crises epiléticas de Racine (SAMOKHINA; SAMOKHIN, 2018). A escala de Racine, desenvolvida em 1972, é uma das ferramentas mais utilizadas para categorizar a intensidade de crises epiléticas em modelos animais de epilepsia. Essa escala é graduada de 1 a 5 e quanto maior o grau alcançado, maior a severidade da crise (RACINE, 1972).

1.12 - Escala de Racine

A escala de Racine, desenvolvida em 1972, é um método frequentemente utilizado para avaliar a gravidade das crises epiléticas em modelos experimentais. Esta é uma escala graduada, de um a cinco, sendo que quanto maior o grau alcançado, maior a severidade da crise epilética. Originalmente foi desenvolvida para descrever a progressão de crises límbicas com generalização secundária no modelo de estimulação elétrica da amígdala (RACINE, 1972). Entretanto, outros métodos de indução de crises epiléticas são utilizados na pesquisa em epilepsia, como os modelos genéticos e a estimulação química (por exemplo com PTZ ou pilocarpina) (VAN ERUM, et al.; 2019).

O primeiro estágio da escala de Racine consiste em movimentos orofaciais, sendo o estágio de maior dificuldade de visualização pelos pesquisadores. A contração (ou aceno) da cabeça do animal representa o segundo estágio desta escala. Clônias de membros anteriores e extensão dorsal (levantamento) são classificadas como estágios três e quatro, respectivamente. Por fim, no último estágio, ocorre a perda do equilíbrio e a queda do animal, sendo classificado como estágio cinco (RACINE, 1972).

Com a utilização de outros modelos animais para o estudo das crises epiléticas e pela necessidade dos pesquisadores, surge a necessidade de modificação da Escala de Racine original (VAN ERUM, et al.; 2019). Uma destas adaptações, publicada em 2016, trouxe adaptações sutis à escala original, alterando apenas o escore quatro: ao invés de considerar a extensão dorsal do animal, considerou a clonia das patas posteriores, sem a

obrigatoriedade de ocorrer o levantamento (VIEIRA et al.; 2016). A Tabela 1 demonstra a escala de Racine original e uma de suas adaptações.

Tabela 1 - Escala de Racine original e uma de suas adaptações.

Estágios	Escala de Racine original (RACINE, 1972)	Escala de Racine adaptada (VIEIRA, et al., 2016)
1	Movimentos orofaciais	Automatismos faciais
2	Aceno de cabeça	Mioclonias de cabeça e pescoço
3	Clonia de membros anteriores	Clonias de patas anteriores
4	Extensão dorsal (levantamento)	Clonias de patas posteriores
5	Perda de equilíbrio e queda	Elevação e queda

Tabela 1- Escala de Racine original e uma de suas adaptações. Fonte: RACINE, 1972; VIEIRA, et al., 2016)

2. HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESE

Os diferentes achados que demonstram o papel do processo inflamatório na atividade epileptogênica sugerem que novas estratégias terapêuticas que modulem a resposta inflamatória poderão ser utilizadas para o tratamento da epilepsia. A possível aplicação de medicamentos já amplamente utilizados, como a dexametasona, betametasona e piroxicam, mas com novo enfoque terapêutico, pode ser útil para o controle das crises epiléticas e a melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

2.2 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito dos fármacos anti-inflamatórios dexametasona, betametasona e piroxicam sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias, parâmetros comportamentais e/ou de estresse oxidativo no modelo animal de crises epiléticas crônicas (*kindling*) induzidas pelo PTZ.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Experimento I:

- Avaliar o efeito do fármaco dexametasona na latência para a primeira crise epilética no modelo animal de *Kindling* induzido por PTZ;
- Avaliar o efeito do fármaco dexametasona sobre a consolidação da memória de curta duração (STM) através do teste de esQUIVA inibitória;
- Avaliar o efeito do fármaco dexametasona sobre parâmetros de EO no hipocampo através das dosagens de CAT, SOD, GPx, Sulfidrilas e TBARS.

2.2.2 Experimento II:

- Avaliar o efeito anti-epileptogênico da betametasona no modelo animal de *Kindling* induzido por PTZ;
- Avaliar o efeito da betametasona sobre a capacidade locomotora e exploratória dos animais através do teste de campo aberto;
- Avaliar o efeito da betametasona sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias no soro, córtex e hipocampo dos animais através da quantificação de TNF- α , IL-6 e IL-1 β ;

2.2.3 Experimento III:

- Avaliar o efeito antiepileptogênico do piroxicam no modelo animal de *Kindling* induzido por PTZ;
- Avaliar o efeito do piroxicam sobre capacidade locomotora e exploratória dos animais através do teste de campo aberto;
- Avaliar o efeito do piroxicam sobre a consolidação da memória no teste de reconhecimento de objetos;
- Avaliar o efeito do piroxicam sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias no soro, córtex e hipocampo dos animais através da quantificação de TNF- α , IL-6 e IL-10.

3. MÉTODOS E RESULTADOS

3.1 MÉTODOS E RESULTADOS: ARTIGO I

Título do artigo: Parameters of Oxidative Stress and Behavior in Animals Treated with Dexamethasone and Submitted to Pentylentetrazol Kindling

Periódico: Journal of Epilepsy Research (Print ISSN 2233-6249 – Online ISSN 2233-6257)

DOI: [10.14581/jer.21017](https://doi.org/10.14581/jer.21017)

Autores: Edson Fernando Muller Guzzo, Gabriel de Lima Rosa, Rafael Padilha Bremm, Caroline Paula Meska, Carmen Regla Vargas, Adriana Simon Coitinho.

Data de publicação: 20/10/2021

Parameters of Oxidative Stress and Behavior in Animals Treated with Dexametasone and Submitted to Pentylentetrazol Kindling

Edson Fernando Muller Guzzo, MD¹, Gabriel de Lima Rosa, MD¹, Rafael Padilha Bremm, MD², Caroline Paula Meska, MD, PhD^{3,4}, Carmen Regla Vargas, MD, PhD^{4,5}, Adriana Simon Coitinho, MD, PhD^{1,6}

¹Graduate Program in Biological Sciences: Physiology, Institute of Basic Health Sciences University, ²Faculty of Veterinary, ³Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, ⁴Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, ⁵Graduate Program in Biological Sciences, Biochemistry, ⁶Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, University Federal of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Original Article

Journal of Epilepsy Research
pISSN 2233-6249 / eISSN 2233-6257

Background and Purpose: Oxidative stress (OS) is defined as an excessive production of reactive oxygen species that cannot be neutralized by the action of antioxidants, but also as an alteration of the cellular redox balance. The relationship between OS and epilepsy is not yet fully understood. The objective of this study was to evaluate the effect of dexamethasone on OS levels and memory in the kindling model induced by pentylentetrazole.

Methods: The animals were divided in six groups: control group that received no treatment, vehicle group treated with vehicle, diazepam group, and groups treated with dexamethasone (1, 2 and 4 mg/kg). Treated animals received pentylentetrazole in alternated days for 15 days. Inhibitory avoidance test was conducted in 2 hours and OS was evaluated after animal sacrifice.

Results: Regarding the treatment with dexamethasone, there was no significant difference when compared to the control groups in relation to the inhibitory avoidance test. On OS levels, there was a decrease in catalase activity levels in the hippocampus and an increase in thiobarbituric acid reactive substances and glutathione peroxidase levels in the hippocampus.

Conclusions: The anticonvulsant effect of dexametasone remains uncertain. Immunological mechanisms, with the release of cytokines and inflammatory mediators, seem to be the key to this process. The mechanisms that generate OS are probably related to the anticonvulsant effects found.

(2021;11:113-119)

Key words: Oxidative stress, Pentylentetrazole, Dexamethasone

Received April 27, 2021
Revised June 29, 2021
Accepted October 20, 2021

Corresponding author:
Adriana Simon Coitinho, MD, PhD
Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Institute of Basic Health Sciences, University Federal of Rio Grande do Sul, 500 Rua Sarmento Leite, CEP 90050-170, Porto Alegre, Brazil
Tel. +55-51-3308-3320
Fax. +55-51-3308-3166
E-mail: adriana.simon@ufrgs.br

Introduction

Oxidative stress (OS) is defined as an excessive production of reactive oxygen species that cannot be neutralized by the action of antioxidants, but also as an alteration of the cellular redox balance. The main reactive species (oxidants) associated with OS are: the superoxide anion radical (O₂⁻), hydroxyl radical (OH), hydrogen peroxide (H₂O₂), nitric oxide (NO) and peroxynitrite (ONOO⁻).¹ Among the various neurological diseases, those of long duration, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease and Huntington's disease and multiple sclerosis, are associated

with significant oxidative components. An emerging target in the regulation of OS and neuroinflammation in neurodegenerative diseases are given by the Nrf2/Keap1 pathway (the main metabolic pathway that regulates cytoprotective responses to oxidative and electrophilic stress).² The relationship between OS and epilepsy is not yet fully understood. Experimental models of epilepsy show an increase in OS biomarkers, demonstrating a correlation between OS and epileptogenesis.³

OS and cerebral inflammation are two phenomena that are closely associated since they are interconnected and reinforce each other.

Like brain inflammation, OS occurs quickly after epileptogenic brain damage and persists for some time. OS markers are increased in blood and brain tissues in human epilepsy. OS contributes to neuropathology and behavioral deficits associated with epilepsy and plays a determining role in the seizure threshold in animal models.⁴ The hippocampus is a brain structure that has been widely studied for understanding the processes of epileptogenesis because it is a region involved in the onset of many epileptic seizures and it was the brain structure studied in this work. Despite the known influence of OS in epilepsy and epileptogenesis, the understanding of the mechanisms involved in this process is still not completely clear. Treatment with anti-inflammatory drugs, already used in some cases of refractory epilepsy, is still done empirically, so further studies are needed to understand the pathophysiological mechanisms involved.

Methods

Animals and treatment

Male Wistar rats were selected from the central vivarium at Universidade Federal do Rio Grande do Sul at 8-9 weeks of age (250-300 g). The animals were handled under standard laboratory conditions consisting of 12 hours light and 12 hours dark cycle and fixed temperature (22-24°C), with free access to food and water. They were divided into six experimental groups (n=9-10 animals per group) that were treated for a period of 14 days on alternate days with group 1, 2 and 3 being the controls, where group 1 is the control group that received no treatment, group 2 that received saline (vehicle of the tested drugs) and group 3 that received diazepam (2 mg/kg), an anticonvulsant drug that is usually one of the first to be used in patients with epilepsy. Group 4, 5 and 6 were treated with the drug dexamethasone, steroidal anti-inflammatory drug, in different concentrations (1, 2 and 4 mg/kg, respectively). The animals in group 1 did not receive treatments and were considered the baseline group for the analysis of OS. Fig. 1 is a schematic figure explaining experimental protocol.

Evaluation of anticonvulsant activity

The kindling model, considered a chronic model of epilepsy, was used.⁵ In this model, the animals received the same doses as described for the treatments for 14 days and, on alternate days, also received subconvulsant doses of pentylenetetrazole (PTZ) intraperitoneally (30 mg/kg). PTZ is a pro-convulsant agent, used to mimic experimental

models of seizure *in vivo*, which acts through the inhibition of gabaergic receptors, thus promoting neural hyperexcitation by blocking the influx of Cl⁻ and K⁺ efflux. PTZ was injected 30 minutes after the treatments were administered. In these groups, the latency time for the onset of the epileptic seizure (of any kind or intensity) and animal mortality was observed. In a previous study, we have already published the scores presented by the animals according to the Racine scale.⁷

Assessment of memory

In order to assess the work memory (short term memory, STM), the inhibitory avoidance test was used. The animals are placed on a platform (2.5 cm high by 8.0 cm wide) in an acrylic box with dimensions of 50×25×25 cm. The floor of this box consists of a box of parallel steel bars, with a distance of 0.2 cm between these bars. The time it takes for the animal to descend the platform and place the four legs on the floor of this box was counted. At this point, the animal received a shock in its 0.5 mA paws for 2 seconds. This first moment is called the training section.⁸ The time it takes the animal to descend from the platform the first time was not used for any analysis or any kind of segregation. Immediately after the training session, the animals received the pharmacological treatments evaluated via i.p. Two hours after the training session, the animals were placed on the platform again and the time it takes the animal to make the new descent to the ground was counted. At this time the animal did not receive a new electrical discharge. With this test it was possible to check the STM.⁸

Evaluation of antioxidant activity

After the end of the anticonvulsant evaluation, the animals were sacrificed by decapitation and the hippocampus was removed to assess the antioxidant activity in the control and treated groups. The samples were stored in a freezer -80°C until the tests were performed. The evaluation of antioxidant activity was carried out through the tests of lipid peroxidation, sulfhydryl groups, activity of the enzymes superoxide dismutase (SOD), catalase and glutathione peroxidase. In these evaluations, 5 to 8 animals were used per group.

Oxidative damage

Lipid damage was determined by the method based on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), which is widely used as a sensitive method for measuring lipid peroxidation, described by Wills.⁹ The results are expressed in nmol TBARS/mg protein. The content of sulfhydryl groups, a measure of non-enzymatic cell defense,

was determined through its reduction with 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (Ellman's reagent) producing a colored compound, read spectrophotometrically at 412 nm.⁹

Total proteins

The determination of total proteins was carried out by the method of Lowry¹⁰ and the values were expressed in mg/mL. This method has the advantage of its high sensitivity, being used for the determination of proteins in different tissues.¹⁰

Superoxide dismutase activity

The activity of the SOD enzyme was measured spectrophotometrically in all samples as described by Bannister and Calabrese.¹¹ SOD can be measured indirectly, following the decrease in absorbance of oxidized adrenaline at 480 nm. The results were expressed in U SOD/mg protein. One unit is defined as the amount of enzyme that inhibits the speed of adenochrome formation by 50%.¹¹

Catalase activity

The measurement method for catalase activity (CAT) was that described by AEBI,¹² in which the enzyme catalyzes the decomposition of hydrogen peroxide into H₂O and O₂. The decomposition speed of H₂O₂ was measured spectrophotometrically at 230 nm for 180 seconds. The results were expressed in mmol H₂O₂/mg protein/minute.¹²

Glutathione peroxidase activity

The activity of glutathione peroxidase (GPX) was described by Paglia,¹² in which the measurement occurred through changes in the absorbance of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) at 340 nm. The results were expressed in nmol NADPH/mg pro-

tein/minute.

Statistical analysis

The data were presented as mean and standard error. After defining the subgroups, statistical analysis was performed using analysis of variance followed by the Tukey *post-hoc* test. Results with $p < 0.05$ were considered statistically significant (F-values are presented only if $p < 0.05$). All statistical analyzes were performed using a database that was assembled in the SPSS version 17 statistical package (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Ethical considerations

In compliance with Law No. 11,794/2008, chapter IV, art.14, §4, the number of animals to be used for the execution of a project and the duration of each experiment were the minimum necessary to produce the conclusive result, saving to the maximum, the suffering animal. Ethical procedures for the care and use of animals were adopted according to the regulations published by the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior. The present study is part of a larger project called "influence of inflammation on the epileptogenic process" that was approved by the Health Sciences Research Committee and the Ethics Committee on the use of animals at UFRGS on 12/18/2012.

Results

Behavioral data

Memory

In the animals treated with dexamethasone in all dosages, there

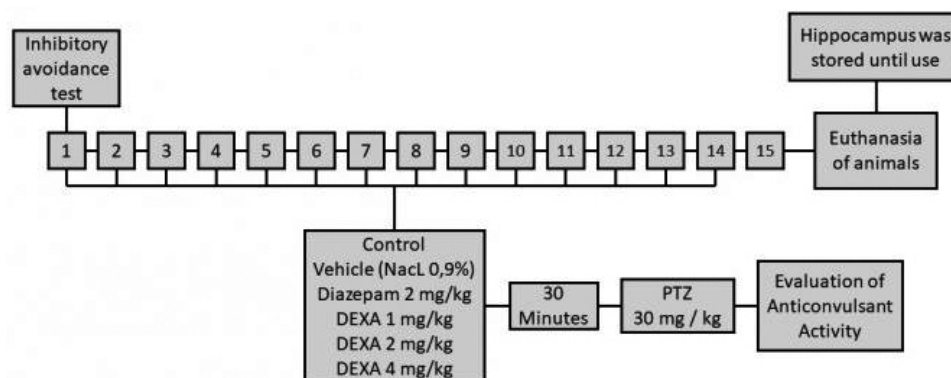


Figure 1. Schematic figure explaining experimental protocol. DEXA, dexamethasone; PTZ, pentylenetetrazole.

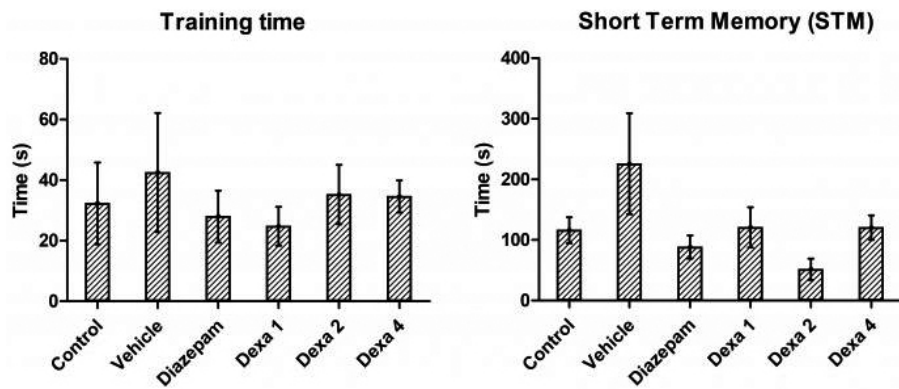


Figure 2. Effect of treatment with dexamethasone in short term memory. The data are represented as mean±standard error (n=5-8 per group). There were no significant differences between groups ($p=0.55$, Kruskal-Wallis test). DEXA, dexamethasone.

was no significant difference when compared to the vehicle group and the diazepam group in relation to STM. Thus, the proposed treatment did not alter the STM (Fig. 2).

Latency

As for the latency time, that is, the time the animal took for the first seizure, there was a reduction in the diazepam, DEXA 1, DEXA 2 and DEXA 4 groups when compared to the vehicle group. There was no significant difference between the DEXA groups and the diazepam group, indicating that DEXA, in all dosages, was able to increase the latency for the first crisis in a similar way to diazepam (Fig. 3). It is noteworthy that the control group did not receive PTZ, so there were no seizures in it.

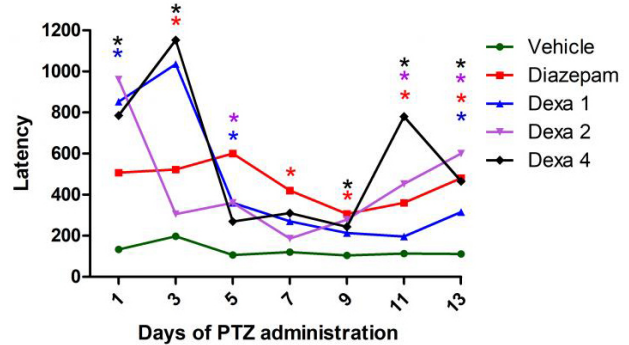


Figure 3. Effect of dexamethasone treatment on latency, for the onset of seizure. The data are represented as mean±standard error (n=5-8 per group) (* $p<0.05$ compared to the vehicle group; Friedman's test followed by Bonferroni's *Post hoc*). PTZ, pentylenetetrazole.

Antioxidant activity

Regarding the evaluation of the antioxidant activity in the hippocampus of the animals (performed through the lipid peroxidation tests, sulfhydryl groups, SOD, CAT and GPX) and the lipid damage (determined by the TBARS method), the following results were observed.

TBARS

It was observed that the levels of lipid peroxidation, in the hippocampus, of the animals treated with dexamethasone 4 mg/kg were significantly elevated compared to the animals treated with dexamethasone 2 mg/kg (Fig. 4).

Sulfhydryl

As for sulfhydryl levels, an increase was observed in the groups

treated with vehicle, diazepam and dexamethasone (in all dosages) compared to the baseline group. However, a reduction was also observed in the group treated with diazepam, DEXA 2 mg/kg and 4 mg/kg, compared to the vehicle group (Fig. 4).

SOD

An increase in superoxide dismutase activity was observed in all treated groups (vehicle, diazepam, DEXA 1 mg/kg, 2 mg/kg and 4 mg/kg) when compared to the baseline group. There was a decrease in the diazepam, DEXA 1 mg/kg and DEXA 2 mg/kg, compared to the DEXA 4 mg/kg group and a decrease in the DEXA 1 mg/kg group compared to the vehicle group. It was possible to observe a tendency to increase SOD activity in relation to the increase in the concentration of dexamethasone (Fig. 4).

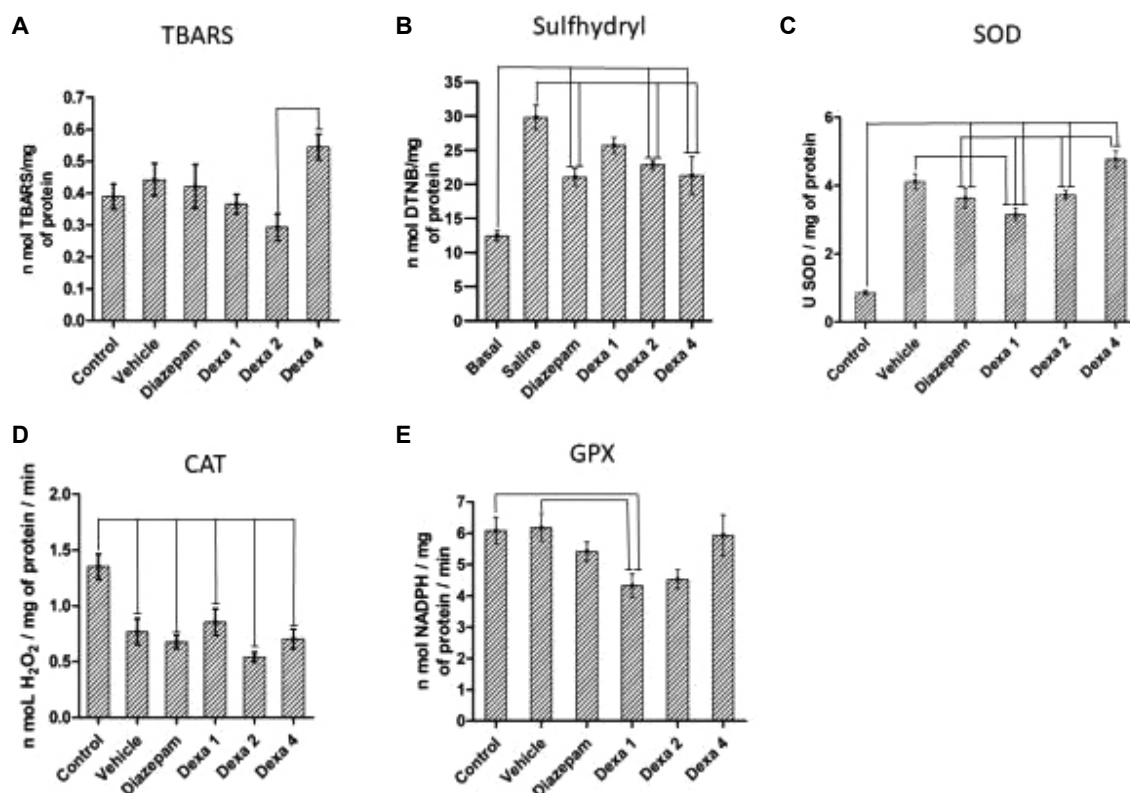


Figure 4. Anti-oxidative activity of dexamethasone in the hippocampus. The data are represented as mean±standard error (n=5-8 per group). (A) Lipid peroxidation (F4, 30=4.849, * $p\leq 0.05$); (B) levels of sulfhydryl (F4, 30=4.541, $p\leq 0.001$); (C) activity of the superoxide dismutase enzyme (F4, 30=31.630, $p\leq 0.05$); (D) enzyme catalase (F4, 30=2.082, $p\leq 0.001$); (E) enzyme glutathione peroxidase (F4, 30=31.723, $p\leq 0.05$). Analysis of variance followed by *post-hoc* Tukey. TBARS, thiobarbituric acid reactive substances; DEXA, dexamethasone; DTNB, 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (Ellman's reagent); SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase activity; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; GPX, glutathione peroxidase.

CAT

A decrease in the CAT enzyme was observed in the groups treated with vehicle, diazepam and dexamethasone (in all dosages) compared to the baseline group (Fig. 4).

GPX

In the hippocampus, a significant decrease in the GPX enzyme was observed in animals treated with dexamethasone 1 mg/kg compared to the control group and the vehicle group. There was a slight, not statistically significant, increase in GPX activity in relation to increased dexamethasone concentration (Fig. 4).

Discussion

The excess of positive charges promotes depolarization of the neuronal membrane, which causes voltage-dependent calcium channels to open; calcium, in turn, is able to activate intracellular enzymes re-

sponsible for triggering harmful processes, in addition to activating the enzyme phospholipase A2 (responsible for the metabolism of membrane lipids, which will trigger an inflammatory response) and mobilizing synaptic vesicles, thus triggering the synaptic processes that will generate neuronal hyperexcitability. This fine line between OS and neuroinflammation, predisposing to seizures, has already been well established. With the understanding of this mechanism, there is the possibility of using anti-inflammatory drugs as an alternative therapy for the treatment and in certain refractory epilepsies. It is strongly believed that OS has a great influence on the occurrence of seizures.¹³⁻¹⁵ The animals' ability to memorize was tested in one moment. Steroid-specific receptors are known to be largely concentrated in the hippocampus, septal area and amygdala parts of the brain intimately involved in behavior, mood, learning and memory. Despite this, dexamethasone, a steroidal anti-inflammatory drug, acting on steroid receptors, has no deleterious effect on working memory in doses tested.¹⁶

Continuing the behavioral analysis, the latency time for the first seizure was compared in the groups that received PTZ. It can be seen that the vehicle group, which did not receive any pharmacological treatment, had the shortest latency times as compared to the Diazepam control group and to all DEXA groups. Among the groups tested, there were no statistical differences between the mean latency times, allowing to state that DEXA, in all dosages, had an effect similar to diazepam in increasing latency for the first seizure. It has been seen in a model similar to this study that turmeric¹⁶ was able to increase the latency time for the first seizure due to its anti-inflammatory and antioxidant effects. On the other hand, neuroprotective compounds such as yerba mate¹⁷ and grape juice¹⁸ were not able to produce this effect. In another animal model of epilepsy, the pilocarpine model, a similar result was found. The dose of DEXA used was 10 mg/kg and no one anticonvulsive drug was used as a control. There was a reduction in the latency time for the beginning of seizure demonstrating the possible anticonvulsant effect of DEXA on the animal model of pilocarpine.¹⁹

As already mentioned, in a previous study we have already published the scores presented by the animals according to the Racine scale; however, the analysis of the latency for the onset of conclusive crises is of utmost importance for understanding the mechanism of action of this drug. It was possible to verify that DEXA acts in reducing not only the intensity of seizures, but also the onset time for seizures, reinforcing the possible anticonvulsant and neuroprotective role of this drug.⁷ As for OS, no group differed from the control groups (vehicle and diazepam) in relation to TBARS levels; however, an increase in lipid peroxidation was found in the DEXA group 4 mg/kg compared to the DEXA 2 mg/kg group. The SOD enzyme catalyzes the dismutation of superoxide into oxygen and hydrogen peroxide and because of this, it is an important antioxidant defense. The increase in this enzyme in all groups treated with PTZ compared to the baseline group, found in this study, is an unexpected result. The use of PTZ generated an increase in SOD. This increase was seen in all groups that received PTZ. Neither the use of diazepam nor DEXA at any concentration was able to reverse this increase and return levels to baseline values. A trend towards a reduction in SOD levels was seen with the use of DEXA at the lowest concentration, whereas at the highest dose, the levels remained as high as in the saline group. Unlike the result found in this study, Qi et al.²⁰ (2018) found decreased levels of SOD related to PTZ treatment in the brain of rats. This difference can be explained by the difference in the experimental design since in the mentioned study there was only one admin-

istration of PTZ and in the present study the animals received PTZ for 2 weeks. This increase is probably generated by the chronic use of PTZ. It is noteworthy that the mentioned study evaluated the total brain tissue, and the present study the hippocampus. The increase found in the groups that received DEXA can be explained by the OS-inducing effect of this drug.²¹

As for sulfhydryl levels, an increase was found in all treated groups when compared to the baseline group. This increase, caused by PTZ, was attenuated in the groups that received diazepam and DEXA at the two highest doses; however, there was no return to baseline values. In the DEXA 1 group, there was an increase compared to baseline, but it remained similar to the vehicle group, demonstrating that DEXA at this dose did not attenuate the OS caused by PTZ administration. There was a decrease in the CAT enzyme caused by the administration of PTZ. This decrease was not reversed by the use of DEXA or diazepam. Other studies demonstrate an increase in CAT related to PTZ administration both in the hippocampus²² and in all brain tissue.^{21,22} Reversal of this effect was found by other drugs such as metformin (first-line therapy for patients with type 2 diabetes since it has antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective properties)²⁰ and by compounds such as pycnogenol (Pinus pinaster bark extract, which contains flavonoids and has antioxidant, anti-inflammatory, neuroprotective and cardio protective properties),²¹ the peony extract (extracted from the root barks, which has antioxidant and anti-inflammatory effects)²² and the yerba mate (*Ilex paraguariensis*, anti-inflammatory effects).¹⁷ Regarding the activity of the GPX enzyme, there was a tendency to decrease the activity with the use of DEXA, and the dose of 1 mg generated a significant reduction compared to the vehicle and control groups. In the other DEXA concentrations and diazepam-treated group, there were no significant differences compared to the baseline and control groups.

Compensatory mechanisms can explain the results obtained, comparing the groups in which PTZ doses were administered in relation to the baseline group. As the enzyme activity of SOD increases, H₂O₂ can accumulate in the tissue. This accumulation could be metabolized by the enzymatic action of GPX and CAT, but there was little difference in the levels of GPX and decreased activity of CAT. In this situation, there would be a notable increase in H₂O₂ levels, which could (for example by the Fenton reaction) generate a high degree of hydroxyl ion concentration. However, the OS marker used (TBARS) showed no difference between the groups. Sulfhydryl groups were high compared to baseline. This may mean a non-enzymatic compensatory mechanism on redox signaling since the enzyme system was

flawed, but there was no increase in TBARS levels among all groups. The anticonvulsant effect of DEXA remains uncertain. Immunological mechanisms, with the release of cytokines and inflammatory mediators, seem to be the key to this process. Mechanisms that generate OS may also be related to the observed effect. New studies are needed to investigate a new therapeutic approach in the treatment of epilepsy with this drug.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported in part by grants from Pró-Reitoria de Pesquisa UFRGS. The authors of the manuscript declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur J Med Chem* 2015;97:55-74.
2. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative stress. *Annu Rev Biochem* 2017;86:715-48.
3. Geronzi U, Lotti F, Grosso S. Oxidative stress in epilepsy. *Expert Rev Neurother* 2018;18:427-34.
4. Ravizza T, Vezzani A. Pharmacological targeting of brain inflammation in epilepsy: Therapeutic perspectives from experimental and clinical studies. *Epilepsia Open* 2018;3(Suppl 2):133-42.
5. Guzzo EFM, Lima KR, Vargas CR, Coitinho AS. Effect of dexamethasone on seizures and inflammatory profile induced by kindling seizure model. *J Neuroimmunol* 2018;325:92-8.
6. Funchal C, Dani C. Neurosciences: experimental models in animals. Porto Alegre: IPA, 2014.
7. Mohamed HK, Eltony SA. Effect of acute pentyleneetetrazol injection induced epileptic seizures on rat dentate gyrus at different postnatal ages. *Anat Cell Biol* 2020;53:84-94.
8. Izquierdo LA, Barros DM, da Costa JC, et al. A link between role of two prefrontal areas in immediate memory and in long-term memory consolidation. *Neurobiol Learn Mem* 2007;88:160-6.
9. Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2001;302:141-5.
10. Nwachukwu ID, Aluko RE. A systematic evaluation of various methods for quantifying food protein hydrolysate peptides. *Food Chem* 2019;270:25-31.
11. Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Methods Biochem Anal* 1987;32:279-312.
12. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984;105:121-6.
13. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 2009;7:65-74.
14. Schiavone S, Jaquet V, Trabace L, Krause KH. Severe life stress and oxidative stress in the brain: from animal models to human pathology. *Antioxid Redox Signal* 2013;18:1475-90.
15. Biswas SK. Does the interdependence between oxidative stress and inflammation explain the antioxidant paradox? *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016:5698931.
16. Kelemen E, Bahrendt M, Born J, Inostroza M. Hippocampal corticosterone impairs memory consolidation during sleep but improves consolidation in the wake state. *Hippocampus* 2014;24:510-5.
17. Branco Cdos S, Scola G, Rodrigues AD, et al. Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentyleneetetrazol-induced seizures in Wistar rats. *Brain Res Bull* 2013;92:60-8.
18. Rodrigues AD, Scheffel TB, Scola G, et al. Neuroprotective and anti-convulsant effects of organic and conventional purple grape juices on seizures in Wistar rats induced by pentyleneetetrazole. *Neurochem Int* 2012;60:799-805.
19. Yang N, Zhang Y, Wang JT, et al. Effects of dexamethasone on remodeling of the hippocampal synaptic filamentous actin cytoskeleton in a model of pilocarpine-induced status epilepticus. *Int J Med Sci* 2020;17:1683-91.
20. Qi Z, Yu X, Xu P, Hao Y, Pan X, Zhang C. l-Homocarnosine, l-carnosine, and anserine attenuate brain oxidative damage in a pentyleneetetrazole-induced epilepsy model of ovariectomized rats. *J Biotech* 2018;8:363.
21. Hussein AM, Eldosoky M, El-Shafey M, et al. Effects of metformin on apoptosis and α -synuclein in a rat model of pentyleneetetrazole-induced epilepsy. *Can J Physiol Pharmacol* 2019;97:37-46.
22. Goel R, Saxena P. Pycnogenol protects against pentyleneetetrazole-induced oxidative stress and seizures in mice. *Curr Clin Pharmacol* 2019;14:68-75.

3.2 MÉTODOS E RESULTADOS: ARTIGO 2

Versão pré-print submetida à revista Steroids

Título do artigo: Reduction of seizures and inflammatory markers by betamethasone in a kindling seizure model

Versão pré-print submetida ao periódico Steroids (Online ISSN: 1878-5867 - Print ISSN: 0039-128X)

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2023.109202>

Autores: Edson Fernando Muller Guzzo, Gabriel de Lima Rosa, Amanda Muliterno Domingues, Rafael Bremm Padilha, Adriana Simon Coitinho.

Data de publicação: 23/02/2023

**REDUCTION OF SEIZURES AND INFLAMMATORY MARKERS BY
BETAMETHASONE IN A KINDLING SEIZURE MODEL**

Edson Fernando Muller Guzzo^a, Gabriel de Lima Rosa^a, Amanda Muliterno
Domingues^b, Rafael Bremm Padilha^b, Adriana Simon Coitinho^{a,b,c}

^a*Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Fisiologia, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil*

^b*Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências
Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS,
Brazil*

^c*Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Farmacologia e Terapêutica,
Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, RS, Brazil*

Corresponding author: Adriana Simon Coitinho

Departamento de Microbiologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Rua Sarmiento Leite, 500, CEP 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail address: adriana.simon@ufrgs.br

Work originated from Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite,
500, CEP 90050-170 Porto Alegre, RS, Brazil.

Declarations of interest: none

Abstract

Epilepsy is a chronic disease characterized by an ongoing predisposition to seizures. Although inflammation has emerged as a crucial factor in the etiology of epilepsy, no approaches to anti-inflammatory treatment have been clinically proven to date. Betamethasone (a corticosteroid drug used in the clinic for its anti-inflammatory and immunosuppressive effects) has never been evaluated in attenuating the intensity of seizures in a kindling animal model of seizures. Using a kindling model in male wistar rats, this study evaluated the effect of betamethasone on the severity of seizures and levels of pro-inflammatory interleukins. Seizures were induced by pentylenetetrazole (30 mg/kg) on alternate days for 15 days. The animals were divided into four groups: a control group treated with saline, another control group treated with diazepam (2 mg/kg), and two groups treated with betamethasone (0.125 and 0.250 mg/kg, respectively). Open field test was conducted. Betamethasone treatments were effective in reducing the intensity of epileptic seizures. There were lower levels of Tumor Necrosis Factor- α and interleukin-1 β in the cortex, compared to the saline group, on the other hand, levels in the hippocampus remained similar to the control groups. There was no change in the levels of interleukin-6 in the evaluated structures. Serum inflammatory mediators remained similar. Lower quantities of inflammatory mediators in the central nervous system may have been the key to the reduced severity of seizures on the Racine scale.

Highlights

Epilepsy; Inflammation; Betamethasone;

1. Introduction

Epilepsy is a chronic disease of the brain characterized by an ongoing predisposition to seizures - unprovoked by any immediate central nervous system (CNS) insults - and the neurobiological, cognitive, psychological, and social consequences of recurring seizures. Epilepsy affects both sexes and all ages worldwide. The prevalence and incidence of epilepsy are slightly higher in men than women and tend to peak in the elderly, resulting in higher frequencies of stroke, neurodegenerative diseases, and tumors in this age group (Beghi, 2020).

Despite many advances in epilepsy research, nearly a third of patients with epilepsy have refractory or pharmacoresistant epilepsy. The antiepileptic drugs currently on the market advanced through clinical evaluations based on their ability to block evoked seizures in one or more preclinical animal models of epilepsy. Generally, antiepileptic drugs block evoked seizures by either suppressing abnormal excitatory activity or by upregulating inhibitory signals in the brain (Younus and Reddy, 2018).

The main way the immune system deals with infections and tissue damage is by presenting an acute inflammatory response, in which leukocytes, plasma proteins, and blood-derived fluid accumulate in the extravascular tissue at the site of the infection or injury (Abbas, Lichtman and Pillai, 2019).

Inflammation has emerged as a crucial factor in the etiology of epilepsy, as a consequence of seizures and a cause of epilepsy. Several inflammatory mediators have been detected in resected brain tissue from patients with temporal lobe epilepsy, cortical dysplasia, and other causes of refractory epilepsies (Rana and Musto, 2018). Brain insults such as neurotrauma, stroke, infection, perinatal injury, febrile seizures, and status epilepticus induce neuroinflammation and are risk factors for the development of epilepsy. Evidence suggests that epileptogenesis may trigger a cascade of chronic inflammatory processes in the CNS that contributes to the onset of epilepsy (Mukhtar,

2020; Vezzani, 2014). Central and peripheral inflammation is common in patients with epilepsy. Increased serum levels of pro-inflammatory cytokines in patients with epilepsy have been well documented. Higher levels of blood serum and cerebrospinal fluid levels of cytokines have been reported in patients with epilepsy in postictal and interictal states (Suleymanova, 2021).

Cytokines, the proteins that modulate inflammatory processes, are primarily produced by glial cells and neurons during neuroinflammation. Pro-inflammatory cytokines, typically found in low concentrations in the brain, increase after seizures. Clinical evidence suggests that inflammation is also an important factor in the onset and perpetuation of epilepsy (Vezzani, et al. 2011)

Febrile seizures increased the levels of cytokines interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and Tumor Necrosis Factor- α (TNF-alpha) in cerebrospinal fluid (Rana and Musto, 2018). The pathologic features of Rasmussen encephalitis include reactive astrocytosis, activated microglial cells, and proinflammatory mediators, as well as lymphocyte infiltration. In the hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy, pro-inflammatory molecules, proinflammatory molecules, reactive astrocytosis, activated microglia, and other indicators of inflammation were found (Vezzani, et al. 2011)

Inflammatory cytokines have also been associated with epilepsy in preclinical studies. Induced status epilepticus increased levels of IL-1 β in the hippocampus (which are barely detectable in a healthy brain). This cytokine is produced by activated microglia and astrocytes. Experimental epileptogenic insults such as status epilepticus, stroke, neurotrauma, CNS infection, and seizures increase the expression of IL-1R and TLR4 in brain-resident cells (Vliet, et al. 2018).

Although the role of brain inflammation in epilepsy has been repeatedly reported in recent years, no approaches to anti-inflammatory treatment have been clinically

proven to date (Therajaran et al., 2020). However, the potential of anti-inflammatory drugs should be explored in-depth, as they may provide new therapeutic solutions for preventing or reducing epileptogenesis (Radu et al., 2017).

Currently, research has focused on certain brain structures, in particular the hippocampus and cortex. The hippocampus is where most unresponsive episodes are triggered, and is the object of a series of clinical and animal model studies (Andrade-Valença, et al. 2006). Malformations of the cerebral cortex (MCC) or of cortical development are often associated with severe, childhood-onset epilepsy, and developmental delay. However, the prevalence and severity of epilepsy vary widely across the range of malformations. About 50% of pediatric epilepsy surgeries are carried out on children with MCCs (Guerrini, Sicca, Parmeggiani, 2003).

In this study, betamethasone, a corticosteroid, was used. It is used for a number of diseases including rheumatic disorders, skin diseases, allergic conditions, preterm labor (to speed up fetal lung development), Crohn's disease, and cancers such as leukemia. It can be combined with other corticosteroids, like fludrocortisone, to treat conditions such as adrenocortical insufficiency. It can be taken by mouth, injected or applied to the skin. Betamethasone was patented in 1958, and approved for medical use in the United States in 1961 (Yuen et al. 2021; Katzung, Vanderah, 2022). This drug was chosen for its wide use in clinical medicine and its potent anti-inflammatory effect.

This study aimed to evaluate the anticonvulsant potential of betamethasone (BETA) in a pentylentetrazole-induced kindling animal model. In addition to the anticonvulsant capacity, IL-1 β , IL-6 and TNF-alpha levels were measured to evaluate the inflammatory profile. An open-field test was used to assess the locomotor and exploratory capacity of the animals.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Through the university central vivarium at Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 8 to 9 week-old male Wistar rats (250-300 g) were obtained for study. The animals were immediately housed in polypropylene boxes measuring 41x34x16 cm - at a maximum capacity of 4 per cage - and kept to a 12-h light-dark schedule at 23 ± 1 °C. The animals had *ad libitum* access to pelleted chow and water. The experiments were performed following The ARRIVE guidelines 2.0 (2020), and were approved by the university ethics committee at UFRGS (Approval Number 287142).

2.2. Experimental groups and compounds

Animals were divided into four experimental groups (with 9-10 animals in each group): a positive control group and a negative control group (that received diazepam 2 mg/kg and sodium chloride 0.9 g%, respectively), a BETA 1 group (that received doses of BETA: 0.125 mg/kg), and a BETA 2 group (that received doses of BETA: 0.250 mg/kg). The animals received daily doses of treatments for 14 days. We used the minimum human-equivalent dose, which varied from 0.017mg to 0.25mg per kg of body weight, per day) (Yuen et al. 2021; Katzung, Vanderah, 2022)

BETA was purchased from Legrand Pharma Indústria Farmacêutica LTDA (Cambuí, SP, Brazil), diazepam was purchased from Teuto Brasileiro S.A (Anápolis, Goiás, Brazil) and Pentylenetetrazole (PTZ) was purchased from Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, MO, USA) . The PTZ, BETA, and diazepam were dissolved in saline. All drugs were administered intraperitoneally (i.p.).

2.3. The kindling model

Considering a chronic model of epileptic seizures, the kindling model was used. For 14 days, each group received the drug dosages described for the experimental groups (diazepam 2 mg/kg, sodium chloride 0.9 g%, BETA 0.125 mg/kg, and BETA 0.250 mg/kg). Every other day, they also received sub convulsive doses of PTZ (30 mg/kg body weight). The onset of kindling induction occurred on day 2 of the study (the first dose of PTZ) thus allowing us to evaluate the antiepileptogenic activity of the drugs being tested. PTZ was administered 30 min after the other treatments and the animals were observed for 20 min to assess for seizure severity using Racine's adapted scale (Guzzo et al., 2018), (Fig. 1).

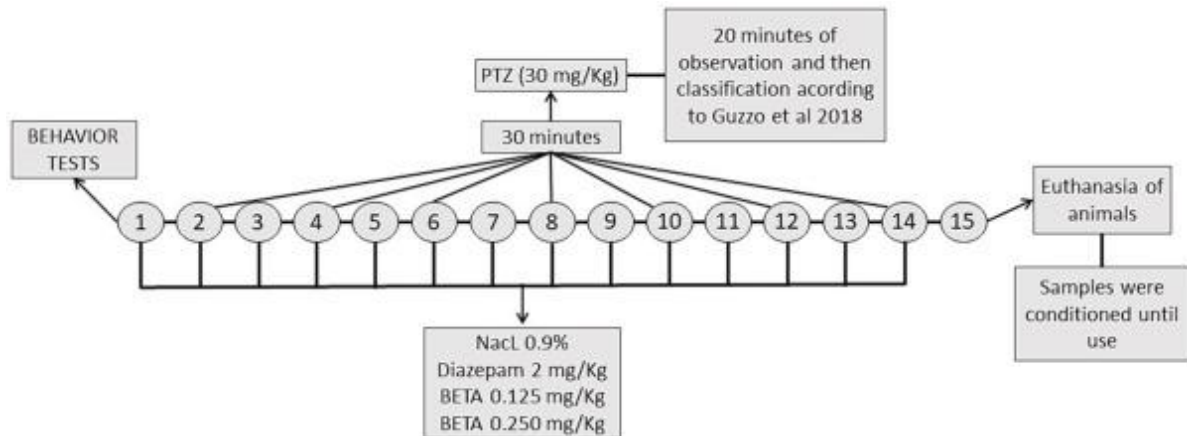


Fig. 1 Study timeline.

On day 15, the animals were sacrificed and the structures were collected. The use of anesthetics could influence the subsequent analysis, therefore, the chosen sacrifice method was decapitation. The sacrifice was done 24 hours after the last administration of PTZ, thus, the acute effect of the treatment was disregarded. Among the advantages of the analysis using the RACINE scale, the possibility of carrying out

the study without the administration of any anesthetic or surgical procedure, which could influence the results obtained, stands out. Animals were kept in appropriate housing during sacrifice. Each animal was taken individually to the laboratory. After sacrifice, the room was completely clean and the environment ventilated, so that the animals did not show apprehensive behavior at any time, minimizing suffering.

2.4. The Open Field Test

Animal behavior patterns were assessed on the first day, after treatment with the drug doses. However, this was done before administering the PTZ injection to avoid interference. The aim of the open field test was to guarantee that the treatment with the administered dose did not interfere with the locomotor and exploratory capacity of the animals, thus verifying drug safety.

For the Open Field test, the rats were placed in an acrylic box whose lower part was divided into 12 equal quadrants. The rats were always placed facing the box wall in the same quadrant and were left to explore the box freely for five minutes. The open field apparatus was a 40 cm × 60 cm linoleum floor surrounded on three sides by a 60 cm-high plywood wall and, in the front, by a 60 cm-high glass wall. A dim, red light (25 W) illuminated the testing room. The animals' behavior, such as crossing squares on all four paws (ambulation) - whether in the center or at the side of the box - latency before locomotion, grooming, and fecal boli deposits were video-recorded and counted. After each test, the floor was cleaned with water and ethanol (70%) to avoid a potential excitatory effect on locomotion due to residual urine or feces.

The number of square crossings and latency before locomotion can serve as measures of each animal's capacity to move and explore the apparatus. The number of grooming acts and fecal boli deposits can indicate anxiety-linked behavior while rearing responses can signal exploration and orientation.

2.5. Brain microdissection and tissue preparation

On the last day of the kindling model (one day after the last injection), the animals were euthanized via decapitation, and the brain tissue was immediately harvested and placed on ice plates. The cortex and hippocampus were dissected and kept chilled until homogenization.

The brain tissue was homogenized in 1:5 (w/v) saline solution (0.9% NaCl). The homogenate was centrifuged at $800 \times g$ for 10 min at 4 °C, and the supernatant was used in the assays.

2.6. Determination of cytokine and protein levels

The cytokines were measured by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. The ELISA kits used were purchased from Abcam (Cambridge, USA) and used to measure TNF-alpha (Sensitivity 25 pg/ml - ab100785), IL-1 β (Sensitivity 80 pg/m - ab100768), and IL-6 (Sensitivity 43 pg/ml - ab234570).

The ELISA technique detects antigen-antibody reaction enzymes. The enzymes used in these tests were peroxidases, which catalyze the unfolding reaction of hydrogen peroxide. During the assay a 96-well plate was coated with an antibody specific to rat TNF-alpha. Standards and samples were pipetted into the wells where the TNF-alpha was bound to the wells by the immobilized antibody. The antigen-antibody reaction produced a change in color, and the intensity was directly proportional to the concentration of cytokine in the sample. The concentration was quantified by comparing it with a serial dilution of recombinant Cytokine Standard that was analyzed in parallel. All samples were run in duplicate. Spectrophotometry was performed using an ELISA reader (Biochrom Anthos Zenyth 200rt) at 450 nm. To calculate cytokine concentrations, standard curves were developed using the different concentrations of the

recombinant cytokines, per the manufacturer's specifications. The results were expressed as pg/mL for serum and pg/mg of protein for brain tissue (from the hippocampus and cerebral cortex). Protein concentrations were measured using the supernatant obtained from the cerebral cortices and hippocampus using bovine serum albumin as the standard (Lowry, 1951).

2.7. Statistical analysis

Data were presented as standard mean and error or median. After defining the subgroups, the statistical analysis was conducted using the Analysis of Variance (ANOVA) for repeated measures, or ANOVA followed by the Tukey test for parametric data. Results of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The outcome of the ANOVA (F- and p-values, degrees of freedom) were reported. All statistical analyses were conducted using a database that was set by the SPSS statistical package, version 25.0.

3. Results

The Open Field Test showed that there was no difference in the evaluated parameters (crossing, rearing, grooming, and the number of fecal boli) in the BETA 0.125 and 0.250 groups compared to the Saline and Diazepam group ($p > 0,05$; one-way analysis of variance) (Fig 2).

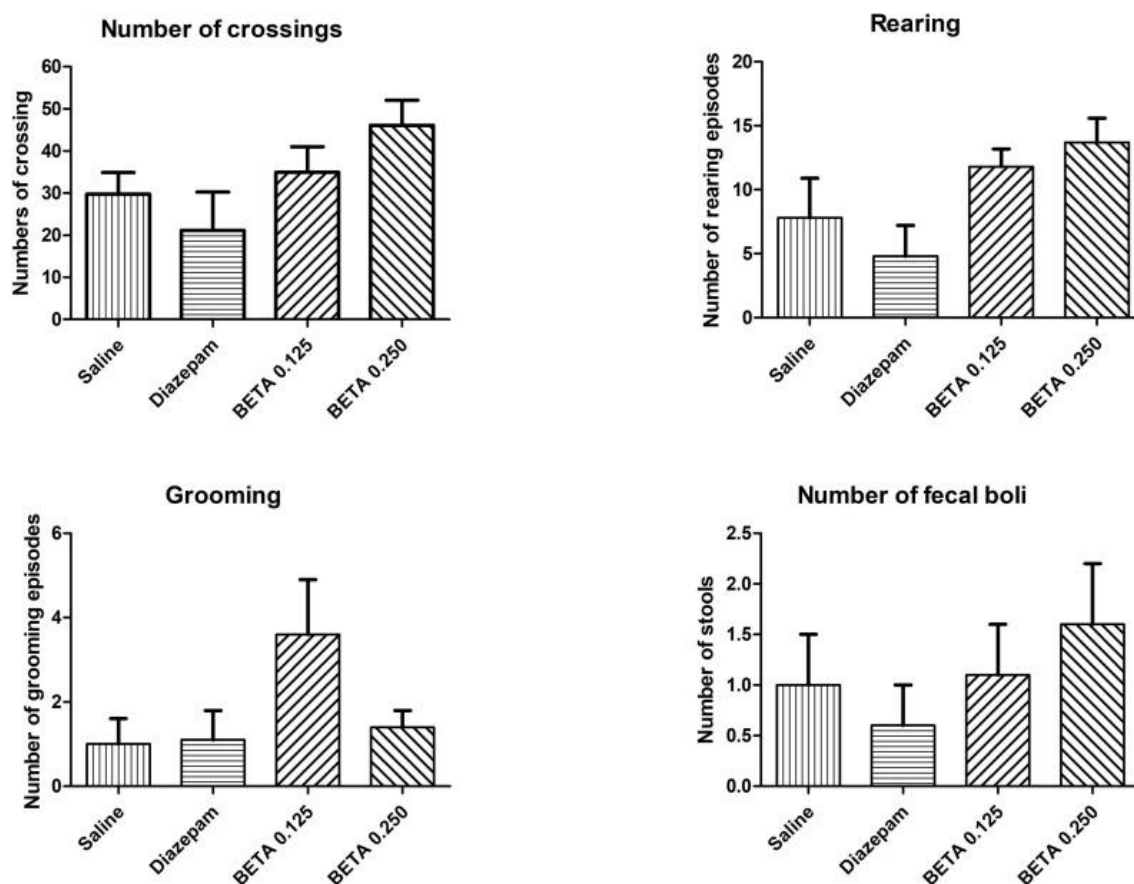


Fig. 2 Analysis of the effect of treatments on crossing, rearing, grooming, and number of fecal boli in the open field test. Results are expressed as mean \pm SD for ten animals per group; $p > 0.05$ (One-way Analysis of Variance).

Figure 3 shows a reduction in the intensity of seizures after the first day of administering injections of BETA 0.250 [$F(3,34) = 4.977$, $p = 0.005$] and BETA 0.125 [$F(3,34) = 4.977$, $p = 0.034$] to the respective groups. The saline group did not show a decrease in seizure intensity (one-way analysis of variance, post hoc Tukey test). The first day of diazepam injections did not lower seizure intensity. Racine scale scores [$F(3,34) = 4.977$, $p = 0.174$; one-way analysis of variance] for both doses of BETA showed effectiveness. By the second and third day of injections, there was no difference between groups [$F(3,34) = 4.977$, $p = 0.168$; one-way analysis of variance].

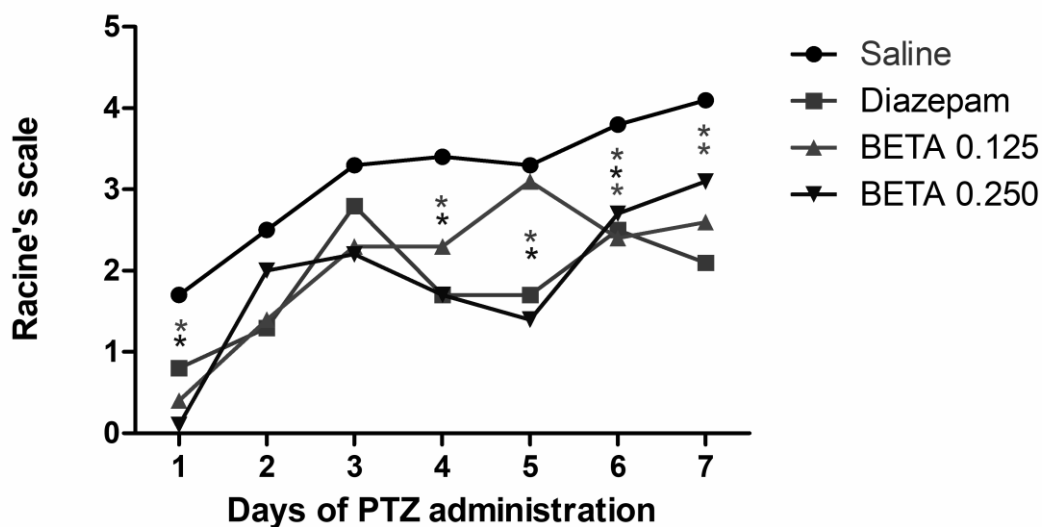


Fig. 3 Effect of BETA on the severity of seizures after administered doses of PTZ in rats. Results are expressed as the mean for ten animals per group. # Diazepam group different from SAL; \$ BETA 0.125 group different from SAL; % BETA 0.250 group different from SAL. $p < 0.05$ (One-way Analysis of Variance, post hoc Tukey).

On the fourth day of injections, there were lower Racine scale scores for the BETA 0.250 group [$F(3,34) = 3.671$, $p = 0.045$] and the diazepam group [$F(3,34) = 3.671$, $p = 0.027$], but not for the saline group (one-way analysis of variance, post hoc Tukey test). This same result was seen for the fifth day of injections. There were lower Racine scale scores for the BETA 0.250 group [$F(3,34) = 5.096$, $p = 0.019$] and the diazepam group [$F(3,34) = 5.096$, $p = 0.044$], but not for the saline group (one-way analysis of variance, post hoc Tukey test).

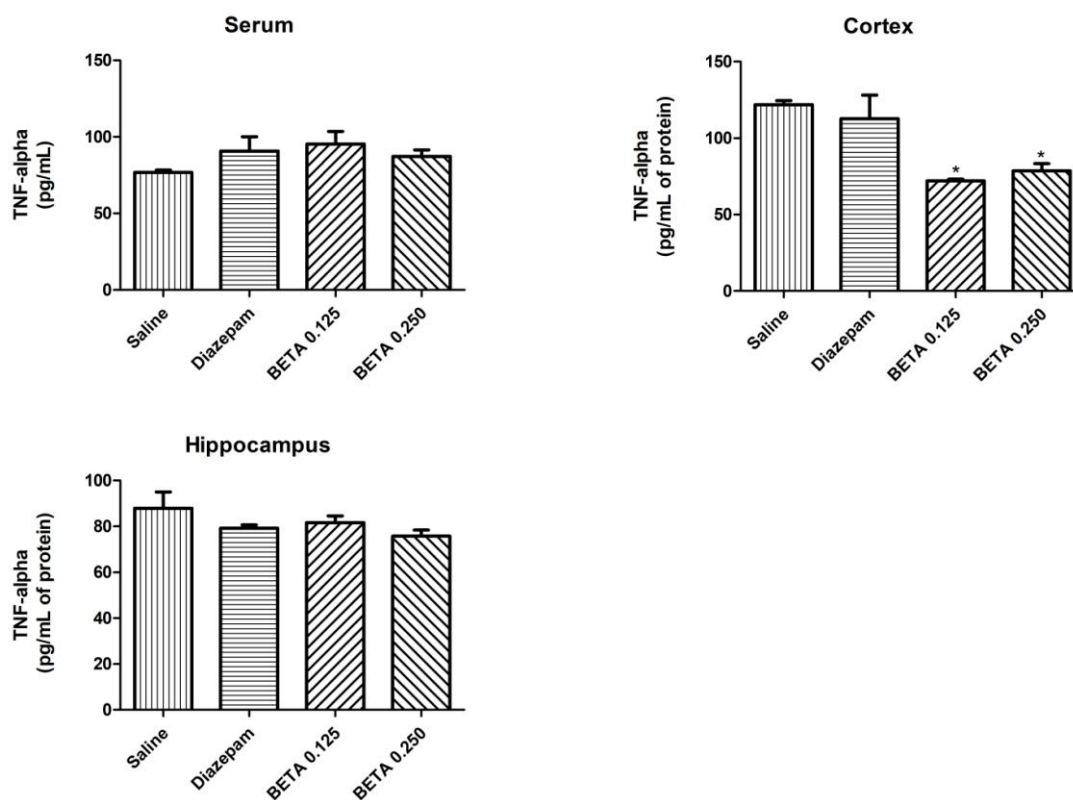


Fig. 4 Effect of BETA on TNF- α levels in the serum, hippocampus, and cortices of the rats after the induced seizures. Results are expressed as the mean \pm SD for 6 animals per group. BETA 0.125 and BETA 0.250 results were different from those of the Saline group; * $p < 0.05$ (One-way analysis of variance, post hoc Tukey).

On the sixth day of injections, there were lower Racine scale scores for the BETA 0.250 [$F(3,34) = 6.062$, $p = 0.042$], BETA 0.125 [$F(3,34) = 6.062$, $p = 0.042$], and diazepam [$F(3,34) = 6.062$, $p = 0.052$] groups, but not for the saline group (one-way analysis of variance, post hoc Tukey test).

On the seventh day of injections, there were lower Racine scale scores for the BETA 0.125 [$F(3,34) = 6.243$, $p = 0.033$] and the diazepam [$F(3,34) = 6.243$, $p = 0.001$] groups, but not the saline group (one-way analysis of variance, post hoc Tukey test). Although the 0.250 mg/kg dose did not show a significant effect [$F(3,34) = 6.243$, $p = 0.258$; one-way analysis of variance), it demonstrated a decreasing trend (Fig 3).

In relation to cytokine levels, there was a reduction in TNF-alpha levels in the cortices of the BETA 0.125 [F(3,16) = 8.864, p = 0.031] and the BETA 0.250 [F(3,16) = 8.864, p = 0.014] different from the Saline (one-way analysis of variance, post hoc Tukey test). However, there was no statistical difference between the TNF-alpha levels in the hippocampus and the serum of the animals [F(3,16) = 8.864, p = 0.162; one-way analysis of variance] (Fig 4).

Regarding IL-1 β , in the cortices, there was a statistically significant decrease in the 0.125 BETA, different from the Diazepam [F(3,14) = 12.150, p = 0.01] and BETA 0.250 [F(3,14) = 12.150, p = 0.002] (one-way analysis of variance, post hoc Tukey test). In this same structure, there was a statistically significant increase in the Diazepam [F(3,14) = 12.150, p = 0.015] and BETA 0.250 [F(3,14) = 12.150, p = 0.015], different from the saline group (one-way analysis of variance, post hoc Tukey test). There was no significant difference between the Diazepam group and BETA groups [F(3,14) = 12.150, p = 0.265; one-way analysis of variance]. Moreover, there was no statistical difference between the IL-1 β levels in the hippocampus and those in the serum of the animals [F(3,14) = 12.150, p = 0.371; one-way analysis of variance] (Fig 5).

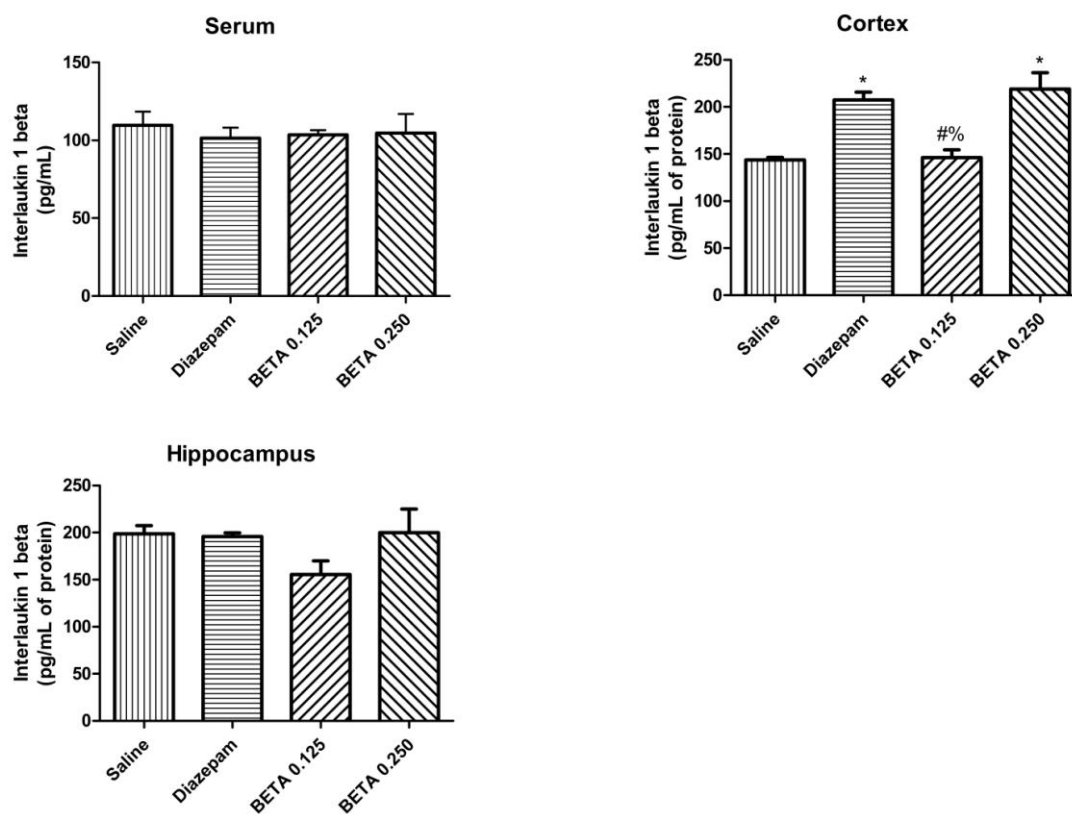


Fig. 5 Effect of BETA on IL-1 β levels in the serum, cortices, and hippocampus in rats after the induced seizures. Results are expressed as the mean \pm SD for 6 animals per group. *different from saline; # different from Diazepam; % different from BETA 0.250; $p < 0.05$ (One- way Analysis of Variance, post hoc Tukey)

Finally, IL-6 levels remained similar in BETA 0.125 and BETA 0.250 compared to Saline and Diazepam groups in cortex, serum and hippocampus ($p > 0,05$; one-way analysis of variance) (Fig 6).

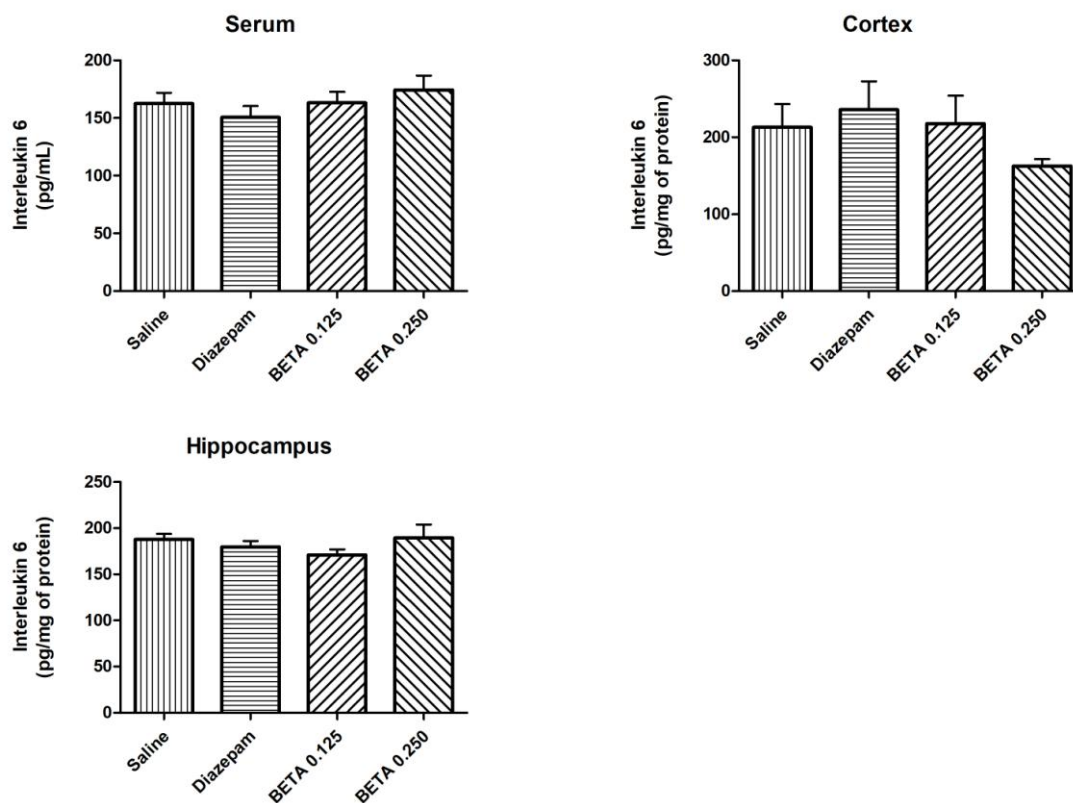


Fig. 6 Effect of BETA on IL-6 levels in the serum, cortices, and hippocampus in rats after the induced seizures. Results are expressed as the mean \pm SD for ten animals per group; $p < 0.05$ (One-way Analysis of Variance).

4. Discussion

The PTZ-induced kindling model is widely used. PTZ-induced chronic epilepsy resulted in glial activation that led to increased expression of cytokines and chemokines. In this PTZ-induced kindling model, betamethasone reduced the intensity of seizures, whereas the saline group did not show the same results. We believe that this beneficial effect is related to a decrease in inflammatory mediators in the CNS. Using the same animal model, other studies also found a reduction in the intensity of seizures and a decrease in inflammatory mediators. Dexamethasone (Guzzo, et al 2018), Liraglutide (Erdogan, Erdogan, Erbas, 2022), prednisolone (de Lima, et al. 2021) and thiamine (Karabulut, Filiz, Akkaya, 2022) are medications that have recently demonstrated an antiepileptogenic effect by reducing inflammatory mediators.

Clinical studies using cannabidiol (extracted from *Cannabis sativa*) showed that this compound is effective as an adjunct to common anti-epileptic drugs in the treatment of epilepsy. The neuroprotective activity appears to be linked to its excellent anti-inflammatory and antioxidant properties (Silvestro et al., 2019). Moreover, another clinical study used low-dose (3-5 mg/kg/d) aspirin therapy in patients with Sturge-Weber syndrome as part of their clinical treatment. Aspirin belongs to the group of non-steroidal anti-inflammatory drugs. Its mechanism of action is based on the irreversible inhibition of the cyclooxygenase enzyme that is involved in the synthesis of prostaglandins. In this study, 91% of the participants showed improved control of seizures (Lance et al., 2013). In another case study, natalizumab (a monoclonal antibody) was used to treat a case of adult Rasmussen encephalitis. This drug, at a monthly dose of 300 mg, significantly reduced seizure frequency in a patient with Rasmussen encephalitis for more than one year (Bittner et al., 2013).

Epilepsy and seizures are associated with neuroinflammation. In turn, neuroinflammation can induce epilepsy in a biunivocal interaction. Many molecular mechanisms have been identified in this loop (such as those involved in brain trauma and tumors, genetic alterations, ischemia, and SARS-COV2). Similarly, the interaction between environmental cues on damage-associated molecular patterns, pathogen-associated molecular patterns, or on neurotransmitters and neuromodulators, influences epileptogenesis. (Pracucci, et al. 2021)

In this research, we evaluated the inflammatory profile of cytokines in the cerebral cortex as a whole. The piriform cortex (PC) is the olfactory cortex that largely extends from the rostral to the dorsal pole in the rodent brain. Apart from its implied roles in the processing of olfaction and memory, the PC is involved in the spread of excitatory waves due to its strong interconnection with the limbic system. Therefore, the PC may play a critical role in the generation and propagation of epileptic seizures,

particularly in temporal lobe epilepsy since the focus of the seizure is generally located in the limbic system. This type of epilepsy can be closely mimicked with a preclinical kindling model (Cheng et al. 2020). Other portions of the cortex are also involved in the pathogenesis of epilepsy; the perirhinal and entorhinal cortices are also involved in the onset and propagation of seizures, mainly generalized ones (Vismer et al., 2015).

In the animals treated with BETA, there was a reduction in cortical cytokines. This decrease in the inflammatory profile of this structure may have lowered the Racine's scale scores for these animals. As for the levels of TNF-alpha, there was a decline in the groups treated with both dosages of BETA, different from the Saline group. TNF-alpha not only amplifies the number of glutamate receptors but also induces GABA receptor endocytosis, reducing the inhibitory drive and causing pertinent changes in excitability. A decline in the levels of this pro-inflammatory cytokine can increase convulsive thresholds and exert a neuroprotective effect (Rana and Musto, 2018). Recent investigations have also reported reduced levels of this cytokine in association with better clinical (Zhou et al., 2019; Ricci et al., 2020) and experimental outcomes (Choo et al., 2018; Shen et al., 2019; Deus et al. 2020). A recent study reported that esculetin, a 5-lipoxygenase inhibitor, showed anticonvulsant and anti-neuroinflammatory effects in a PTZ-induced seizure model, and these findings corroborate our results (Danis, et al. 2023)

Regarding IL-1 β , there were lower levels in the BETA 0.125 group than in the Diazepam. In rodents, IL-1 β is induced in neuronal and glial cells following various epileptogenic injuries (status epilepticus, stroke, neurotrauma, and CNS infections) as well as during seizures (Ravizza and Vezzani, 2018; Morin-Brureau et al., 2018). In clinical studies and animal models of epilepsy, it has been suggested that IL-1 β is always secreted after seizures (Morin-Brureau et al., 2018). In addition, the BETA 0.125 group also presented lower levels of IL-1 β than the BETA 0.250 group. The

BETA 0.250 and Diazepam were similar and differed from the saline which showed increased levels of IL-1 β . Increased levels of this cytokine were also observed in the cortex of animals after febrile convulsions, using a kainic acid model (Deus et al., 2020). Another study, using the PTZ model, showed that cyclooxygenase-2 inhibitors were also able to attenuate the levels of these cytokines in the cortices of mice (Temp et al. 2017).

The last cytokine tested was IL-6. Its levels were similar in all the structures we assessed. This cytokine is up-regulated by other cytokines such as TNF-alpha and IL-1 β (Rana and Musto, 2018). The levels of this marker depend on the moment when the animals are euthanized; an increase could occur with the progression of the disease. Patients diagnosed with drug-resistant temporal lobe epilepsy who underwent surgical treatment presented reduced levels of this cytokine in the peripheral nervous system (Lorigados et al., 2018). Increases in this cytokine have also been seen in the serum of patients diagnosed with epilepsy, especially generalized seizures (Ezer, Toydemir, Gökyiğit, 2020). The beneficial effect of anti-inflammatory drugs - including lower Racine scale scores along with reduced levels of pro-inflammatory cytokines - has already been reported in some of the research carried out by our research group (Vieira et al., 2016; Guzzo et al., 2018 and de Lima et al., 2021). Lower cytokine levels were only found in CNS structures, whereas these levels remained the same in the serum.

Other studies reinforce the hypothesis that an attenuated inflammatory response in the CNS reduces the intensity of seizures and improves epilepsy. Unconventional approaches, such as the long-term use of probiotic supplements, have provided protective effects against epileptic seizures, and alleviated the neuroinflammation and oxidative stress linked to epileptogenesis (Kilinc, et al. 2021). Another study found that ghrelin (a neuropeptide synthesized in the gastrointestinal system, as well as the central and peripheral nervous systems) has anticonvulsant properties, and reduces

inflammation in animal serum (Kilinc, Gunes, 2019). Endogenous and exogenous serotoninins also help to reduce seizures by decreasing neuroinflammation (Torun, Kilinc; Kilinc, 2022).

The findings of these animal models of seizures reinforce the results found in our research. Thus, we believe that reducing CNS inflammation is the key to decreasing the intensity of seizures.

5. Conclusion

BETA treatments were effective in reducing the intensity of epileptic seizures. Analyses of cytokine levels demonstrated CNS changes (specifically in the cortex) but no Peripheral Nervous System changes. Both doses of BETA reduced the levels of TNF-alpha in the cortices of the animals, different from the Saline group. Lower quantities of inflammatory mediators in the CNS may have been the key to the reduced severity of seizures on the Racine scale.

6. Acknowledgements

This study was supported in part by grants from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES), Brazilian National Council of Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq), and the Vice-Rectorry of Research at UFRGS (Pró-Reitoria de Pesquisa –PROPESQ/UFRGS).

REFERENCES

1. Abbas AK, et al.. Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, 6e: Sae-E-Book. Elsevier; 2019.
2. ANDRADE-VALENÇA, Luciana et al. Epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, v. 12, p. 31-36, 2006.
3. Beghi E. The epidemiology of epilepsy. *Neuroepidemiology*. 2020;54(2):185–91. <https://doi.org/10.1159/000503831>.
4. Bittner S, et al. Rasmussen encephalitis treated with natalizumab. *Neurology*. 2013;81(4):395–7. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e31829c5ceb>
5. Cheng H, et al. The piriform cortex in epilepsy: what we learn from the kindling model. *Exp Neurol*. 2020;324:113137. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.113137>
6. Choo BKM, et al.. Orthosiphon stamineus Leaf Extract Affects TNF- α and Seizures in a Zebrafish Model. *Front Pharmacol*. 2018;9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00139>
7. DANIS, Aysegul et al. Esculetin alleviates pentylenetetrazole-induced seizures, cognitive impairment and pro-inflammatory cytokines and suppresses penicillin-induced epileptiform activity in rats. *Life Sciences*, v. 313, p. 121300, 2023.
8. de Deus, Júnia Lara, et al. Inflammatory markers in the hippocampus after audiogenic kindling. *Neurosci Lett*. 2020;721:134830. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.134830>
9. ERDOGAN, Mumin Alper; ERDOGAN, Arife; ERBAS, Oytun. The anti-seizure effect of liraglutide on Ptz-induced convulsions through its anti-oxidant and anti-inflammatory properties. *Neurochemical Research*, p. 1-8, 2022

10. GUERRINI, Renzo; SICCA, Federico; PARMEGGIANI, Lucio. Epilepsy and malformations of the cerebral cortex. *Epileptic Disorders*, v. 5, n. 2, p. 9-26, 2003.
11. Guzzo, Edson Fernando Muller, et al. Effect of dexamethasone on seizures and inflammatory profile induced by Kindling Seizure Model. *Journal of Neuroimmunology*.2018;325:92–8.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.10.005>
12. Izquierdo, Ivan. Different forms of post-training memory processing. *Behavioral and Neural Biology*. 1989; 51(2) : 171–202. [https://doi.org/10.1016/S0163-1047\(89\)90812-1](https://doi.org/10.1016/S0163-1047(89)90812-1)
13. Katzung, Bertram G., and Todd W. Vanderah. *Farmacologia básica e clínica*. Artmed Editora, 2022.
14. KARABULUT, Sebahattin; FILIZ, Ahmet Kemal; AKKAYA, Recep. Thiamine alleviates cognitive impairment and epileptogenesis by relieving brain inflammation in PTZ-induced kindling rat model. *Neurological Research*, v. 44, n. 10, p. 902-909, 2022.
15. KILINC, Erkan et al. Protective effects of long-term probiotic mixture supplementation against pentylentetrazole-induced seizures, inflammation and oxidative stress in rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, v. 98, p. 108830, 2021.
16. KILINC, Erkan; GUNES, Handan. Modulatory effects of neuropeptides on pentylentetrazol-induced epileptic seizures and neuroinflammation in rats. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 65, p. 1188-1192, 2019.
17. Lance, Eboni I, et al. Aspirin use in Sturge-Weber syndrome: side effects and clinical outcomes. *Journal of Child Neurology*. 2013;28(2):213–8.
<https://doi.org/10.1177/08830738124636>

18. Lorigados Pedre L, et al. Follow-Up of Peripheral IL-1 β and IL-6 and Relation with Apoptotic Death in Drug-Resistant Temporal Lobe Epilepsy Patients Submitted to Surgery. *Behav Sci (Basel)*. 2018 Feb 5;8(2):21. <https://doi.org/10.3390/bs8020021>
19. Lowry O, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951;193(1):265–75.
20. Morin-Brureau, Mélanie, et al. Microglial phenotypes in the human epileptic temporal lobe. *Brain*. 2018 Nov; 141(12):3343–60. <https://doi.org/10.1093/brain/awy276>
21. Mukhtar I. Inflammatory and immune mechanisms underlying epileptogenesis and epilepsy: from pathogenesis to treatment target. *Seizure*. 2020;82:65–79. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2020.09.015>
22. Percie du Sert N, et al. (2020). The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *PLOS Biology*. [https://doi: 10.1371/journal.pbio.3000410](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410)
23. PRACUCCI, Enrico et al. Neuroinflammation: a signature or a cause of epilepsy?. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 13, p. 6981, 2021.
24. Radu, Beatrice Mihaela, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in clinical and experimental epilepsy. *Epilepsy research*. 2017;131:15–27. [https://doi: 10.1016/j.eplepsyres.2017.02.003](https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.02.003)
25. Rana, A., Musto, A.E. The role of inflammation in the development of epilepsy. *J Neuroinflammation* 15, 144 (2018). [https://doi.org/10.1186/s12974-018-1192-](https://doi.org/10.1186/s12974-018-1192-7)

26. Ravizza T, Vezzani A. Pharmacological targeting of brain inflammation in epilepsy: Therapeutic perspectives from experimental and clinical studies. *Epilepsia Open*. 2018;3(S2):133–42. <https://doi.org/10.1002/epi4.12242>
27. Rosa, Gabriel de Lima, et al. Effects of prednisolone on behavioral and inflammatory profile in animal model of PTZ-induced seizure. *Neurosci Lett*. 2021;743:135560. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135560>
28. Reyyan, Ezer, et al. The relationship between interleukin-6 and epileptic seizure. *Ortadogu Medical Journal*, 2020. 12(2), 225-232. <https://doi.org/10.21601/ortadogutipdergisi.651791>
29. Ricci A, et al. Exploring the mechanisms of action of the antidepressant effect of the ketogenic diet. *Rev Neurosci*. 2020;31(6):637–48. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2019-0073>
30. Silvestro S, et al. Use of cannabidiol in the treatment of epilepsy: efficacy and security in clinical trials. *Molecules*. 2019;24(8):1459. <https://doi.org/10.3390/molecules24081459>
31. Shen Y, et al. Anti-inflammatory treatment with a soluble epoxide hydrolase inhibitor attenuates seizures and epilepsy-associated depression in the LiCl-pilocarpine post-status epilepticus rat model. *Brain Behav Immun*. 2019;81:535–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2019.07.014>
32. Suleymanova EM. Behavioral comorbidities of epilepsy and neuroinflammation: Evidence from experimental and clinical studies. *Epilepsy Behav*. 2021;117:107869. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2021.107869>
33. Temp FR, et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors differentially attenuate pentylenetetrazol-induced seizures and increase of pro- and anti-inflammatory cytokine levels in the cerebral cortex and hippocampus of mice. *European*

- Journal of Pharmacology. 2017;810:15–25.
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.013>
34. Therajaran P, et al. Microglial polarization in posttraumatic epilepsy: potential mechanism and treatment opportunity. *Epilepsia*. 2020;61(2):203–15.
<https://doi.org/10.1111/epi.16424>
35. TORUN, Ibrahim Ethem; KILINC, Yasemin Baranoglu; KILINC, Erkan. A serotonina endógena e exógena, mas não o sumatriptano, melhora as convulsões e a neuroinflamação no modelo de convulsão induzida por pentilenotetrazol em ratos. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, v. 80, p. 48-55, 2022.
36. VEZZANI, Annamaria. Epilepsy and inflammation in the brain: overview and pathophysiology: epilepsy and inflammation in the brain. *Epilepsy currents*, v. 14, n. 2_suppl, p. 3-7, 2014.
37. VEZZANI, Annamaria et al. The role of inflammation in epilepsy. *Nature reviews neurology*, v. 7, n. 1, p. 31-40, 2011.
38. Vieira V, et al. Effect of diclofenac sodium on seizures and inflammatory profile induced by kindling seizure model. *Epilepsy Res*. 2016;127:107–13.
<https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2016.08.020>
39. Vismar MS, et al. The piriform, perirhinal, and entorhinal cortex in seizure generation. *Front Neural Circuits*. 2015;9.
<https://doi.org/10.3389/fncir.2015.00027>
40. VLIET, EA et al. Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarker candidates in epilepsy: emerging evidence from preclinical and clinical studies. *Neuropathol Appl Neurobiol*, v. 44, n. 1, p. 91-111, 2018.
41. Younus I, Reddy DS. A resurging boom in new drugs for epilepsy and brain disorders. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2018;11(1):27–45.
<https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1386553>

42. Yuen, Melissa V., et al. "Betamethasone dipropionate: Summary Report." (2021).
43. Zhou T, et al. Effects of carbamazepine combined with vitamin B12 on levels of plasma homocysteine, hs-CRP and TNF- α in patients with epilepsy. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2018 Mar 1;15(3):2327–32. <https://doi.org/10.3892/etm.2018.5698>

3.3 MÉTODOS E RESULTADOS: ARTIGO 3

Artigo submetido dia 16/10/2023

Título do artigo: Piroxicam reduced the intensity of epileptic seizures in a kindling seizure model

Periódico: Neurological Research (Online ISSN: 1743-1328 - Print ISSN: 0161-6412)

Autores: Edson Fernando Muller Guzzo, Gabriel de Lima Rosa, Amanda Muliterno Domingues Lourenço de Lima, Rafael Bremm Padilha, Adriana Simon Coitinho.



Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

Dear Adriana Coitinho,

Thank you for your submission.

Submission ID	232499840
Manuscript Title	PIROXICAM REDUCED THE INTENSITY OF EPILEPTIC SEIZURES IN A KINDLING SEIZURE MODEL
Journal	Neurological Research

If you made the submission, you can check its progress and make any requested revisions on the [Author Portal](#)

Thank you for submitting your work to our journal.

If you have any queries, please get in touch with journalshelpdesk@taylorandfrancis.com.

Kind Regards,
Neurological Research Editorial Office

4. DISCUSSÃO GERAL

Nesta tese, o potencial anticonvulsivante dos fármacos dexametasona, betametasona e piroxicam foi avaliado, através do modelo animal de crises epiléticas *kindling* induzidas pelo PTZ. Dentre os parâmetros comportamentais, avaliaram-se a intensidade das crises epiléticas e o tempo de latência para primeira crise epilética. Além disso, o teste de campo aberto (avaliação da capacidade locomotora e exploratória) e a avaliação da consolidação da STM (pelo teste de esquiva inibitória) ou da memória de longa duração (tarefa de reconhecimento de objetos) foram realizados.

Bioquimicamente, verificaram-se os níveis de mediadores inflamatórios tanto no SNC (córtex e hipocampo) como periféricamente (soro). Citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e IL-6) e/ou anti-inflamatória (IL-10) foram quantificadas através do teste de ELISA. A análise do EO foi realizada no hipocampo dos animais submetidos ao tratamento com dexametasona através da dosagem de SOD, CAT, GPx, TBARS e SH.

Nesta seção, os resultados obtidos nos três estudos realizados foram agrupados. Desta forma, a discussão destes resultados foi realizada de forma conjunta.

Testes comportamentais foram realizados no início de cada experimento. A realização destes testes visa à verificação da segurança dos fármacos utilizados. O teste de campo aberto analisa o comportamento exploratório e da atividade locomotora dos animais, com intuito de avaliar modificações comportamentais (GOULD; DAO; KOVACSICS, 2009; WALSH; CUMMINS, 1976). Não houve diferença significativa no número total de cruzamentos, bolos fecais e comportamentos do tipo *rearing* e *grooming* nos animais avaliados. Desta forma, demonstrou-se que a betametasona (0,125 e 0,250 mg/Kg), o piroxicam (0,15 e 0,30 mg/Kg) e os controles (diazepam 2 mg/Kg e solução salina) não alteraram a capacidade locomotora e exploratória dos animais. Os animais que receberam dexametasona (1, 2 e 4 mg/Kg) foram submetidos ao mesmo protocolo experimental (estudo do nosso laboratório publicado anteriormente). Nestes animais a capacidade locomotora e exploratória também foi preservada (GUZZO; LIMA; VARGAS; COITINHO, 2018).

Para a avaliação do efeito da dexametasona sobre a consolidação da STM utilizou-se o teste de esquiva inibitória. Já o efeito do piroxicam sobre a memória de longa duração (LTM) foi investigado através da tarefa de reconhecimento de objetos. Não se observou prejuízo na consolidação da memória pelos fármacos administrados nas duas tarefas utilizadas.

Sabe-se que a epilepsia pode piorar a aquisição de memória: pacientes com epilepsia generalizada idiopática, mesmo em uso de AEDs tem piora na consolidação da STM, comparado a controles saudáveis (HÖTTING; KATZ-BILETZKY; MALINA; LINDENAU et al., 2010); na epilepsia do lobo temporal medial ocorre prejuízo na consolidação da STM (mesmo após a realização de lobectomia), especialmente na localização de objetos (ZOKAEI; NOUR; SILLENCE; DREW et al., 2019); crises epiléticas frequentes (4 ou mais crises por mês) são relacionadas com memória deficiente a longo prazo (MAMENISKIENE; JATUZIS; KAUBRYS; BUDRYS, 2006).

Os efeitos maléficos de crises epiléticas na consolidação da memória foram revertidos pelo treinamento físico de baixa intensidade, no modelo animal de crise induzido pela pilocarpina. Neste estudo, utilizando o teste de reconhecimento de objetos, a consolidação da LTM foi preservada em animais submetidos ao treinamento físico de baixa intensidade por quatro semanas consecutivas (CÓRDOVA; LOSS; DE OLIVEIRA, 2013). Se múltiplas crises epiléticas acarretam danos neurológicos, a influência de uma única crise permanece incerta. Estudo com animais demonstrou que uma única crise epilética (no sétimo dia após o nascimento) não afetou a consolidação da STM no teste de reconhecimento de objetos (CORNEJO; MESCHES; BENKE, 2008).

Finalizados os testes comportamentais iniciais, a próxima etapa foi a realização do tratamento crônico. No total, todos os animais, nos três experimentos, receberam sete doses de PTZ, intraperitonealmente (ip.) em dias alternados, além dos tratamentos farmacológicos diariamente (também por via ip.). No dia em que receberam o PTZ, foram observados por 20 minutos e verificou-se a severidade máxima da crise epilética atingida (animais tratados com piroxicam e betametasona), segundo escala de Racine, e a latência para primeira crise epilética (animais tratados com dexametasona). A síntese dos resultados da latência para primeira crise dos grupos que receberam dexametasona é descrito na Tabela 2. Este fármaco, em todas as doses, foi capaz de reduzir a latência para primeira crise em pelo menos duas administrações, sendo que a maior dose reduziu a latência em cinco administrações, mostrando-se mais efetiva.

Tabela 3 - Latência para primeira crise epiléptica comparada ao grupo controle Salina.

	Administração de PTZ						
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°
Dexa 1 mg/kg	↑	=	↑	=	=	=	↑
Dexa 2 mg/kg	=	=	↑	=	=	↑	↑
Dexa 4 mg/kg	↑	↑	=	=	↑	↑	↑

Animais tratados com dexametasona em três diferentes dosagens. Dexa: dexametasona; PTZ: pentilenotetrazol, = não houve diferença significativa comparado ao grupo salina ($p > 0,05$); ↑ aumento da latência comparado ao grupo salina ($p < 0,05$).

Também se avaliou a intensidade máxima das crises epilépticas nos animais que receberam os fármacos anti-inflamatórios betametasona (segundo artigo) e piroxicam (terceiro artigo) A síntese dos resultados da intensidade máxima das crises epilépticas de acordo com os tratamentos utilizados é descrito na Tabela 3. Ambos os fármacos foram eficazes em reduzir a severidade das crises epilépticas, com destaque para as maiores doses administradas.

Tabela 4 – Severidade das crises epilépticas comparadas ao grupo controle salina.

	Administrações de PTZ						
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°
Beta 0.125 mg/kg	=	=	=	=	=	↓	↓
Beta 0.250 mg/kg	↓	=	=	↓	↓	↓	=
Piro 0.15 mg/kg	=	↓	=	↓	=	=	=
Piro 0.30 mg/kg	=	↓	=	↓	=	=	↓

Animais tratados com betametasona e piroxicam em duas diferentes dosagens. Beta: betametasona; Piro: piroxicam; PTZ: pentilenotetrazol, = não houve diferença significativa comparado ao grupo salina ($p > 0,05$); ↓: diminuição do escore máximo da escala de Racine comparado ao grupo Salina ($p < 0,05$).

Em estudo anteriormente publicado por nosso grupo de pesquisa, a dexametasona foi eficiente em reduzir a intensidade das crises epilépticas, neste mesmo modelo animal (GUZZO; LIMA; VARGAS; COITINHO, 2018). No modelo da pilocarpina, a dexametasona foi eficaz em reduzir a severidade das crises epilépticas na dosagem de 10 mg/Kg, sendo que nesse estudo o aumento da dose não trouxe efetividade (AL-SHORBAGY; EL SAYEH; ABDALLAH, 2011). Já no modelo do ácido caínico a terapia

aguda (por dois dias) com dexametasona reduziu a intensidade das crises epiléticas. A terapia prolongada (7 dias), neste estudo, reduziu a severidade das crises, mas aumentou a mortalidade dos animais. (FOX; MITHAL; SOMOGYI; VIEN et al., 2020). Além disso, pacientes com epilepsia refratária ao tratamento farmacológico habitual tiveram melhora clínica e eletroencefalográfica das crises epiléticas após o uso de dexametasona como terapia coadjuvante e permaneceram livres de crises epiléticas durante o tratamento (RAMOS; CRUZ; VILLEMARETTE-PITTMAN; OLEJNICZAK et al., 2019).

Já o piroxicam (2 mg/Kg) utilizado no modelo de *kindling* por PTZ, reduziu a gravidade das crises epiléticas e aumentou a latência para a primeira crise (NASSAR; MANSOUR; SHOMAN; HAMED, 2013). Em outro modelo de crises epiléticas induzidas por eletrochoque, o piroxicam aumentou a atividade protetora do valproato de magnésio e da difenilhidantoína, protegendo os animais (KAMIŃSKI; KOZICKA; PARADA-TURSKA; DZIKI et al., 1998). Até o momento, nenhum estudo clínico utilizando o piroxicam no tratamento de crises epiléticas/epilepsia foi encontrado.

Após a conclusão dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados por decapitação. Coletou-se o sangue troncular, hipocampo e córtex. A partir destas amostras, realizaram-se as dosagens de IL-6 e TNF- α no soro dos animais tratados com piroxicam e IL-6, TNF- α e IL-1 β no soro dos animais tratados com betametasona. Não houve alteração dos níveis de citocinas (pró-inflamatórias e anti-inflamatórias) no soro em ambos os tratamentos investigados.

Estudos com pacientes demonstraram aumento de IL-6 seis horas após a ocorrência de uma crise epilética tônico-clônica generalizada (SHIN; CHU; LEE; LEE et al., 2022) e de IL-1 β , duas horas após a ocorrência de crises epiléticas febris em crianças (CHOI; CHOI; KIM; KIM et al., 2019). Outro estudo observou que crianças com crises febris demonstraram níveis elevados de IL-6 (KUMAR; KURVARI; KUMAR; TEJASHREE et al., 2022). Já em estudo com pacientes epiléticos com crises epiléticas generalizadas observou-se que a terapia com valproato de sódio foi capaz de reduzir os níveis de IL-6 no soro destes pacientes 4-6 meses após o início deste tratamento (STEINBORN; ZAROWSKI; WINCZEWSKA-WIKTOR; WÓJCICKA et al., 2014). Existe um consenso sobre o aumento de IL-6 no soro e no LCR durante as crises epiléticas na maioria dos estudos em animais (SOLTANI KHABOUSHAN; YAZDANPANA; REZAEI, 2022).

Em modelos animais, estudo do nosso grupo de pesquisa com o modelo de *kindling* por PTZ mostrou que o tratamento com dexametasona reduziu os níveis de TNF-

α no soro dos animais (GUZZO; LIMA; VARGAS; COITINHO, 2018). A prednisolona, por outro lado, não reduziu o nível de citocinas no soro de neste mesmo modelo (DE LIMA ROSA; GUZZO; DOMINGUES; PADILHA et al., 2021).

Ao nível central, duas estruturas foram avaliadas: o córtex e o hipocampo. A síntese com os resultados das citocinas no córtex é descrito na Tabela 4:

Tabela 5 – Citocinas avaliadas no córtex de animais submetidos ao modelo animal de *Kindling* por PTZ

	Citocinas quantificadas no córtex			
	IL-1 β	TNF- α	IL-6	IL-10
Beta 0,125 mg/Kg	↓ Comparado ao DZP e Beta 0.250	↓ Comparado ao SAL	=	
Beta 0,250 mg/Kg	↑ Comparado ao SAL	↓ Comparado ao SAL	=	
Piro 0,15 mg/Kg		↑ Comparado ao SAL e DZ	=	↓ Comparado ao SAL e DZP
Piro 0,30 mg/Kg		↑ Comparado ao SAL e DZ	=	↓ Comparado ao SAL e DZP

Animais tratados com betametasona e/ou piroxicam em duas diferentes dosagens. Beta: betametasona; Piro: piroxicam; PTZ: pentilenotetrazol; SAL: grupo Salina; DZP: grupo Diazepam; = não houve diferença significativa ($p > 0,05$); ↑ houve aumento dos níveis ($p < 0,05$); ↓ houve redução dos níveis ($p < 0,05$).

O tratamento com betametasona, na maior dosagem (0,250 mg/Kg) aumentou os níveis de IL-1 β no córtex dos animais. Já com a menor dosagem, este efeito não foi observado. O efeito da IL-1 β na epileptogênese não é completamente compreendido, desempenhando um papel duplo na epileptogênese. Mecanismos de proteção endógenos da IL-1 β foram observados no modelo animal de crises *kindling* induzido por PTZ (KOŁOSOWSKA, et al.; 2014). Por outro lado, Esta citocina e sua via de sinalização estão intimamente relacionadas ao mecanismo da epilepsia e ao desenvolvimento de resistência aos medicamentos e são biomarcadores importantes para a ocorrência, prognóstico e predição da epilepsia (ZHANG; CHEN; ZHAI; LIANG, 2022).

Este efeito antitético também ocorre com o TNF- α . Seus dois receptores possuem efeitos antagônicos: o receptor de TNF 1, associado à inflamação e apoptose, e o receptor de TNF 2, associado à neuroproteção (ORTÍ-CASAÑ, et al.; 2022). O aumento dos níveis

de TNF- α no córtex dos animais tratados com piroxicam, em ambas as doses, pode ter contribuído para o seu efeito anticonvulsivante.

Os tratamentos não alteraram os níveis de IL-6 no córtex dos animais. Semelhante ao soro, o momento da eutanásia pode ter sido a chave para a não visualização deste aumento, já que esta citocina está presente, principalmente, imediatamente após a ocorrência de crises epiléticas (SOLTANI KHABOUSHAN; YAZDANPANA; REZAEI, 2022).

O tratamento com piroxicam reduziu os níveis de IL-10, uma citocina anti-inflamatória. Os níveis de IL-10 no líquido cefalorraquidiano de pacientes com epilepsia apresentaram correlação negativa com a duração da epilepsia, isto é, são maiores no início da doença e tendem a decrescer com passar do tempo (YOON; SUNG; LEE, 2013). Uma das hipóteses que justifica o aumento desta citocina na epilepsia deve-se a mecanismos neutralizadores aos estímulos pró-inflamatórios (DE VRIES; VAN DEN MUNCKHOF; BRAUN; VAN ROYEN-KERKHOF et al., 2016).

Além do córtex cerebral, também se avaliou o hipocampo. A síntese com os resultados dos níveis das citocinas no hipocampo é descrita na Tabela 5.

Tabela 6 – Citocinas avaliadas no hipocampo de animais submetidos ao modelo animal de *Kindling* por PTZ

	Citocinas quantificadas no hipocampo			
	IL-1 β	TNF- α	IL-6	IL-10
Beta 0,125 mg/Kg	=	=	=	
Beta 0,250 mg/Kg	=	=	=	
Piro 0,15 mg/Kg		=	=	↓ Comparado ao SAL e DZ
Piro 0,30 mg/Kg		=	=	↓ Comparado ao SAL e DZ

Animais tratados com betametasona e piroxicam em duas diferentes dosagens. Beta: betametasona; Piro: piroxicam; PTZ: pentilenotetrazol; SAL: grupo Salina; DZP: grupo Diazepam; = não houve diferença significativa ($p > 0,05$); ↓ houve redução dos níveis ($p < 0,05$).

Desta forma, observou-se que, no hipocampo, as citocinas avaliadas tiveram pouca alteração. Em relação ao tratamento com betametasona, o fármaco não apresentou efeito sobre os níveis das citocinas avaliadas (IL-1 β , TNF- α e IL-6). O tratamento com piroxicam, por outro lado, reduziu as concentrações de IL-10 em ambas as doses administradas. Acredita-se que o estado de mal epilético convulsivo e, particularmente, as crises epiléticas febris prolongadas, estão associadas à lesão do hipocampo e aumento dos marcadores inflamatórios neste tecido (SCOTT, 2014). O tecido hipocampal de crianças com epilepsia refratária do lobo temporal tem níveis aumentados de IL-1 β (DE VRIES; VAN DEN MUNCKHOF; BRAUN; VAN ROYEN-KERKHOF et al., 2016). Além disso, a inflamação no hipocampo é frequente em pacientes com epilepsia, inclusive este fato impulsiona a progressão crônica da epilepsia do lobo temporal medial com esclerose hipocampal (YANG; ZHOU; STEFAN, 2010). Em relação aos níveis de IL-10, a correlação negativa com a duração da epilepsia (YOUN; SUNG; LEE, 2013) também poderia justificar os dados encontrados.

Além da análise das citocinas conduziu-se também a análise do EO, realizado nos animais tratados com dexametasona. Observou-se aumento da enzima SOD (uma importante defesa antioxidante) em todos os grupos tratados com PTZ em relação ao grupo basal, o que é um resultado inesperado e diferente do encontrado na literatura (QI; YU; XU; HAO et al., 2018). Este anti-inflamatório não foi capaz de promover o retorno aos valores basais. Outro dado discordante da literatura é a diminuição da enzima CAT causada pela administração de PTZ que, geralmente, está aumentada (GOEL; SAXENA, 2019).

Quanto aos níveis de SH, observou-se aumento causado pelo PTZ, que não retornou aos valores basais com o tratamento farmacológico. Já em relação à atividade da enzima GPX, houve uma tendência à diminuição da atividade com o uso de dexametasona, e a dose de 1 mg/Kg gerou redução estatisticamente significativa em comparação aos grupos veículo e controle. Por fim, os níveis de TBARS aumentaram apenas no grupo que recebeu dexametasona na maior dose, comparado com a menor dose deste mesmo fármaco. Desta forma, mecanismos compensatórios não enzimáticos provavelmente estejam envolvidos e tenham influenciado os resultados encontrados.

Tendo-se em vista os níveis de citocinas inflamatórias encontradas nestas três estruturas (soro, hipocampo e córtex), acreditamos que a redução da intensidade das crises epiléticas obtidas com a betametasona se deva a redução da inflamação ao nível cortical. Já o tratamento com piroxicam pode ter reduzido a intensidade das crises

epiléticas pelo possível efeito neuroprotetor do TNF- α . Em relação ao tratamento com a dexametasona, o aumento da latência para primeira crise epilética, provavelmente, deve-se a redução dos mediadores inflamatórios ao nível central (GUZZO; LIMA; VARGAS; COITINHO, 2018) com uma menor influencia do EO. A epilepsia é uma desordem sistêmica, sua fisiopatologia é motivo de estudos clínicos e experimentais, mas ainda não é completamente compreendida (YUEN; KEEZER; SANDER, 2018). Desta forma, novos estudos que demonstrem a influencia da inflamação e do estresse oxidativo no processo epileptogênico são necessários.

5. CONCLUSÕES

Experimento I

O tratamento com a dexametasona no modelo animal de crises epiléticas induzidas pelo PTZ:

- Não alterou a consolidação da memória de curta duração;
- Diminuiu a latência para a primeira crise epilética;
- Não apresentou efeito antioxidante no modelo animal utilizado neste estudo;
- Mecanismos imunológicos, com liberação de citocinas e mediadores inflamatórios, parecem ser a chave do efeito anticonvulsivante observado.

Experimento II

O tratamento com a betametasona no modelo animal de crises epiléticas induzidas pelo PTZ:

- Não alterou a capacidade locomotora e exploratória dos animais;
- Foi eficaz na redução da intensidade das crises epiléticas;
- Promoveu alterações nos níveis de citocinas no SNC (especificamente no córtex), mas nenhuma ao nível periférico;
- Reduziu os níveis de TNF-alfa (em ambas as doses) no córtex, comparado ao grupo controle salina;
- A redução dos mediadores inflamatórios no SNC pode ter sido a chave para a redução da gravidade das crises epiléticas.

Experimento III

O tratamento com piroxicam no modelo animal de crises epiléticas induzidas pelo PTZ:

- Não alterou a capacidade locomotora e exploratória dos animais;
- Não alterou a consolidação da memória na tarefa de reconhecimento de objetos;
- Foi eficaz na redução da intensidade das crises epiléticas;
- Não alterou os níveis de IL-6 nas estruturas avaliadas;
- No córtex, promoveu aumento de TNF- α e redução de IL-10;
- No hipocampo, ocorreu redução dos níveis de IL-10 e permanência dos valores basais de TNF- α ;

- O efeito anticonvulsivante observado está, provavelmente, relacionado ao aumento dos níveis de TNF- α no córtex (efeito neuroprotetor). A diminuição dos níveis de IL-10 pode estar associada à dose de piroxicam, ou a alguma via inflamatória tempo-dependente.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os fármacos anti-inflamatórios avaliados foram efetivos em reduzir a intensidade das crises epiléticas (piroxicam e betametasona) e aumentar a latência para início das crises (dexametasona) no modelo animal de *kinling* induzido pelo PTZ;

Alteração de mediadores inflamatórios a nível cortical parece ter sido a chave para o efeito anticonvulsivante observado nos animais tratados com betametasona. Já nos animais tratados com piroxicam, o aumento dos níveis de TNF- α no córtex parece ser fator o responsável pela redução da intensidade das crises epiléticas.

O uso de fármacos anti-inflamatórios como coadjuvante nos casos de epilepsias refratárias ao tratamento farmacológico habitual pode ser uma alternativa, embora ainda se faça necessária uma maior compreensão dos mecanismos de ação destes fármacos na epilepsia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULKHALEQ, L. A.; ASSI, M. A.; ABDULLAH, R.; ZAMRI-SAAD, M. *et al.* The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. **Vet World**, 11, n. 5, p. 627-635, May 2018.

AGUIAR, C. C.; ALMEIDA, A. B.; ARAÚJO, P. V.; DE ABREU, R. N. *et al.* Oxidative stress and epilepsy: literature review. **Oxid Med Cell Longev**, 2012, p. 795259, 2012.

ALI, A. Global Health: Epilepsy. **Semin Neurol**, 38, n. 2, p. 191-199, Apr 2018.

ANGEL, M. J.; YOUNG, G. B. Metabolic encephalopathies. **Neurologic clinics**, 29, n. 4, p. 837-882, 2011.

ANYANWU, C.; MOTAMEDI, G. K. Diagnosis and surgical treatment of drug-resistant epilepsy. **Brain sciences**, 8, n. 4, p. 49, 2018.

BALESTRINI, S.; ARZIMANOGLU, A.; BLÜMCKE, I.; SCHEFFER, I. E. *et al.* The aetiologies of epilepsy. **Epileptic Disorders**, 23, n. 1, p. 1-16, 2021.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O. *et al.* Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, 23, p. 629-643, 2010.

BARKER-HALISKI, M.; STEVE WHITE, H. Validated animal models for antiseizure drug (ASD) discovery: Advantages and potential pitfalls in ASD screening. **Neuropharmacology**, 167, p. 107750, May 1 2020.

BASNYAT, P.; PESU, M.; SÖDERQVIST, M.; GRÖNHOLM, A. *et al.* Chronically reduced IL-10 plasma levels are associated with hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy patients. **BMC neurology**, 20, n. 1, p. 1-8, 2020.

BELLISSIMO, M. I.; AMADO, D.; ABDALLA, D. S.; FERREIRA, E. C. *et al.* Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy research**, 46, n. 2, p. 121-128, 2001.

BLÜMCKE, I.; THOM, M.; ARONICA, E.; ARMSTRONG, D. D. *et al.* International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: a Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. **Epilepsia**, 54, n. 7, p. 1315-1329, 2013.

CAMFIELD, P.; CAMFIELD, C. Febrile seizures and genetic epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+). **Epileptic Disord**, 17, n. 2, p. 124-133, Jun 2015.

CASTAÑEDA-CABRAL, J. L.; UREÑA-GUERRERO, M. E.; BEAS-ZÁRATE, C.; COLUNGA-DURÁN, A. *et al.* Increased expression of proinflammatory cytokines and iNOS in the neocortical microvasculature of patients with temporal lobe epilepsy. **Immunologic Research**, 68, p. 169-176, 2020.

CAY-MARTINEZ, K. C.; HICKMAN, R. A.; MCKHANN II, G. M.; PROVENZANO, F. A. *et al.*, 2020, **Rasmussen encephalitis: an update**. Thieme Medical Publishers. 201-210.

CARDENAS-RODRIGUEZ, N.; HUERTA-GERTRUDIS, B.; RIVERA-ESPINOSA, L.; MONTESINOS-CORREA, H. *et al.* Role of oxidative stress in refractory epilepsy: evidence in patients and experimental models. **International journal of molecular sciences**, 14, n. 1, p. 1455-1476, 2013.

CLARK, I. A.; VISSSEL, B. Excess cerebral TNF causing glutamate excitotoxicity rationalizes treatment of neurodegenerative diseases and neurogenic pain by anti-TNF agents. **Journal of neuroinflammation**, 13, n. 1, p. 1-16, 2016.

COSTAGLIOLA, G.; DEPIETRI, G.; MICHEV, A.; RIVA, A. *et al.* Targeting Inflammatory Mediators in Epilepsy: A Systematic Review of Its Molecular Basis and Clinical Applications. **Front Neurol**, 13, p. 741244, 2022.

CORNEJO, B. J.; MESCHES, M. H.; BENKE, T. A. A single early-life seizure impairs short-term memory but does not alter spatial learning, recognition memory, or anxiety. **Epilepsy & Behavior**, 13, n. 4, p. 585-592, 2008.

CÓRDOVA, S. D.; LOSS, C. M.; DE OLIVEIRA, D. L. Low-intensity physical training recovers object recognition memory impairment in rats after early-life induced Status epilepticus. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 31, n. 3, p. 196-201, 2013.

DE LIMA ROSA, G.; GUZZO, E. M.; DOMINGUES, A. M.; PADILHA, R. B. *et al.* Effects of prednisolone on behavioral and inflammatory profile in animal model of PTZ-induced seizure. **Neuroscience Letters**, 743, p. 135560, 2021.

DEVINSKY, O.; VEZZANI, A.; NAJJAR, S.; DE LANEROLLE, N. C. *et al.* Glia and epilepsy: excitability and inflammation. **Trends in neurosciences**, 36, n. 3, p. 174-184, 2013.

DHIR, A. Pentylentetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. **Curr Protoc Neurosci**, Chapter 9, p. Unit9.37, 2012.

DHIR, A. An update of cyclooxygenase (COX)-inhibitors in epilepsy disorders. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, 28, n. 2, p. 191-205, 2019.

DOS SANTOS, M. M.; ASSREUY, A. M. S.; OLIVEIRA, L. G. F.; DE ALENCAR, D. B. *et al.* Ethanolic Extract of the Red Algae *Meristiella echinocarpa* (Areschoug) Confers Neuroprotection in Mice. **Journal of Health & Biological Sciences**, 9, n. 1, p. 1-7, 2021.

FABISIAK, T.; PATEL, M. Crosstalk between neuroinflammation and oxidative stress in epilepsy. **Front Cell Dev Biol**, 10, p. 976953, 2022.

FALCO-WALTER, J., 2020, **Epilepsy—definition, classification, pathophysiology, and epidemiology**. Thieme Medical Publishers, Inc. 333 Seventh Avenue, 18th Floor, New York, NY 617-623.

FISHER, R. S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLU, A.; BOGACZ, A. *et al.* ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, 55, n. 4, p. 475-482, 2014.

FISHER, R. S.; CROSS, J. H.; D'SOUZA, C.; FRENCH, J. A. *et al.* Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. **Epilepsia**, 58, n. 4, p. 531-542, 2017.

FREITAS, R. Investigation of oxidative stress involvement in hippocampus in epilepsy model induced by pilocarpine. **Neuroscience letters**, 462, n. 3, p. 225-229, 2009.

GAVVALA, J. R.; SCHUELE, S. U. New-Onset Seizure in Adults and Adolescents: A Review. **Jama**, 316, n. 24, p. 2657-2668, Dec 27 2016.

GOMEZ, R.; DA SILVA TORRES, I. L. **Farmacologia Clínica**. Elsevier Brasil, 2017. 8535286497.

GÜMÜŞYAYLA, Ş.; VURAL, G.; BEKTAŞ, H.; NEŞELIOĞLU, S. *et al.* Evaluation of Dynamic Thiol-Disulphide Homeostasis in Patients with Epilepsy. **Epilepsi: Journal of the Turkish Epilepsi Society**, 22, n. 3, 2016.

GUZZO, E. F. M.; LIMA, K. R.; VARGAS, C. R.; COITINHO, A. S. Effect of dexamethasone on seizures and inflammatory profile induced by Kindling Seizure Model. **Journal of neuroimmunology**, 325, p. 92-98, 2018.

HENNING, L.; ANTONY, H.; BREUER, A.; MÜLLER, J. *et al.* Reactive microglia are the major source of tumor necrosis factor alpha and contribute to astrocyte dysfunction and acute seizures in experimental temporal lobe epilepsy. **Glia**, 71, n. 2, p. 168-186, Feb 2023.

HERNANSANZ-AGUSTÍN, P.; ENRÍQUEZ, J. A. Generation of Reactive Oxygen Species by Mitochondria. **Antioxidants (Basel)**, 10, n. 3, Mar 9 2021.

HIGURASHI, N.; TAKAHASHI, Y.; KASHIMADA, A.; SUGAWARA, Y. *et al.* Immediate suppression of seizure clusters by corticosteroids in PCDH19 female epilepsy. **Seizure**, 27, p. 1-5, Apr 2015.

HUSSEIN, O. Acute convulsive seizures: when is it too early to treat? **The Permanente Journal**, 23, 2019.

HUSSEIN, O. Acute Convulsive Seizures: When is It Too Early to Treat? **Perm J**, 23, 2019.

IDRISS, H. T.; NAISMITH, J. H. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). **Microsc Res Tech**, 50, n. 3, p. 184-195, Aug 1 2000.

IGHODARO, O.; AKINLOYE, O. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria journal of medicine**, 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

IMDAD, K.; ABUALAIT, T.; KANWAL, A.; ALGHANNAM, Z. T. *et al.* The Metabolic Role of Ketogenic Diets in Treating Epilepsy. **Nutrients**, 14, n. 23, Nov 29 2022.

JOHNSON, E. L. Seizures and Epilepsy. **Med Clin North Am**, 103, n. 2, p. 309-324, Mar 2019.

KOBYLAREK, D.; IWANOWSKI, P.; LEWANDOWSKA, Z.; LIMPHAIBOOL, N. *et al.* Advances in the potential biomarkers of epilepsy. **Frontiers in neurology**, 10, p. 685, 2019.

KOŁOSOWSKA, Karolina *et al.* The role of interleukin-1 β in the pentylenetetrazole-induced kindling of seizures, in the rat hippocampus. **European Journal of Pharmacology**, v. 731, p. 31-37, 2014.

KOLAGAL, V.; KARANAM, S.; DHARMAVARAPU, P.; D'SOUZA, R. *et al.* Determination of oxidative stress markers and their importance in early diagnosis of uremia-related complications. **Indian Journal of Nephrology**, 19, n. 1, p. 8, 2009.

KÖSEM, A.; YÜCEL, Ç.; TITIZ, A. P.; SEZER, S. *et al.* Evaluation of serum thiol-disulphide homeostasis parameters as oxidative stress markers in epilepsy patients. **Acta Neurol Belg**, 121, n. 6, p. 1555-1559, Dec 2021.

LEIBETSEDER, A.; EISERMANN, M.; LAFRANCE, W. C., JR.; NOBILI, L. *et al.* How to distinguish seizures from non-epileptic manifestations. **Epileptic Disord**, 22, n. 6, p. 716-738, Dec 1 2020.

LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Braz J Pharm Sci**, 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LÖSCHER, W. Animal models of seizures and epilepsy: past, present, and future role for the discovery of antiseizure drugs. **Neurochemical research**, 42, n. 7, p. 1873-1888, 2017.

LÖSCHER, W.; POTSCHKA, H.; SISODIYA, S. M.; VEZZANI, A. Drug resistance in epilepsy: clinical impact, potential mechanisms, and new innovative treatment options. **Pharmacological reviews**, 72, n. 3, p. 606-638, 2020.

LOPEZ, J.; GONZÁLEZ, M. E.; LORIGADOS, L.; MORALES, L. *et al.* Oxidative stress markers in surgically treated patients with refractory epilepsy. **Clinical biochemistry**, 40, n. 5-6, p. 292-298, 2007.

ŁUKAWSKI, K.; CZUCZWAR, S. J. Oxidative Stress and Neurodegeneration in Animal Models of Seizures and Epilepsy. **Antioxidants (Basel)**, 12, n. 5, May 5 2023.

MAHYAR, A.; AYAZI, P.; DALIRANI, R.; HOSEINI, B. M. *et al.* Feasible relation between glutathione peroxidase and febrile seizure. **Iranian Journal of Child Neurology**, 11, n. 1, p. 65, 2017.

MYERS, K. A. Genetic Epilepsy Syndromes. **CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology**, 28, n. 2, p. 339-362, 2022.

MYERS, K. A.; SCHEFFER, I. E.; BERKOVIC, S. F. Genetic literacy series: genetic epilepsy with febrile seizures plus. **Epileptic Disord**, 20, n. 4, p. 232-238, Aug 1 2018.

ORGANIZATION, W. H. Epilepsy: a public health imperative. 2019.

PERUCCA, P.; BAHLO, M.; BERKOVIC, S. F. The genetics of epilepsy. **Annual review of genomics and human genetics**, 21, p. 205-230, 2020.

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

RADU, B. M.; EPUREANU, F. B.; RADU, M.; FABENE, P. F. *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in clinical and experimental epilepsy. **Epilepsy research**, 131, p. 15-27, 2017.

RANA, A.; MUSTO, A. E. The role of inflammation in the development of epilepsy. **Journal of neuroinflammation**, 15, n. 1, p. 144, 2018.

RANA, A.; MUSTO, A. E. The role of inflammation in the development of epilepsy. **J Neuroinflammation**, 15, n. 1, p. 144, May 15 2018.

RHO, J. M.; BOISON, D. The metabolic basis of epilepsy. **Nat Rev Neurol**, 18, n. 6, p. 333-347, Jun 2022.

ROSETI, C.; VAN VLIET, E. A.; CIFELLI, P.; RUFFOLO, G. *et al.* GABAA currents are decreased by IL-1 β in epileptogenic tissue of patients with temporal lobe epilepsy: implications for ictogenesis. **Neurobiology of disease**, 82, p. 311-320, 2015.

RUGG-GUNN, F.; MISEROCCHI, A.; MCEVOY, A. Epilepsy surgery. **Pract Neurol**, 20, n. 1, p. 4-14, Feb 2020.

RUMIÀ, J.; MARMOL, F.; SANCHEZ, J.; GIMÉNEZ-CROUSEILLES, J. *et al.* Oxidative stress markers in the neocortex of drug-resistant epilepsy patients submitted to epilepsy surgery. **Epilepsy Res**, 107, n. 1-2, p. 75-81, Nov 2013.

SAKUMA, H.; HORINO, A.; KUKI, I. Neurocritical care and target immunotherapy for febrile infection-related epilepsy syndrome. **Biomed J**, 43, n. 3, p. 205-210, Jun 2020.

SAMANTA, D. PCDH19-related epilepsy syndrome: a comprehensive clinical review. **Pediatric neurology**, 105, p. 3-9, 2020.

SAMOKHINA, E.; SAMOKHIN, A. Neuropathological profile of the pentylenetetrazol (PTZ) kindling model. **International Journal of Neuroscience**, 128, n. 11, p. 1086-1096, 2018.

SCHEFFER, I. E.; BERKOVIC, S.; CAPOVILLA, G.; CONNOLLY, M. B. *et al.* ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, 58, n. 4, p. 512-521, 2017.

SHIMADA, T.; TAKEMIYA, T.; SUGIURA, H.; YAMAGATA, K. Role of inflammatory mediators in the pathogenesis of epilepsy. **Mediators Inflamm**, 2014, p. 901902, 2014.

SHIMADA, T.; YAMAGATA, K. Pentylenetetrazole-Induced Kindling Mouse Model. **J Vis Exp**, n. 136, Jun 12 2018.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox biology**, 4, p. 180-183, 2015.

SINGH, T.; MISHRA, A.; GOEL, R. K. PTZ kindling model for epileptogenesis, refractory epilepsy, and associated comorbidities: relevance and reliability. **Metab Brain Dis**, 36, n. 7, p. 1573-1590, Oct 2021.

SOLTANI KHABOUSHAN, A.; YAZDANPANA, N.; REZAEI, N. Neuroinflammation and Proinflammatory Cytokines in Epileptogenesis. **Mol Neurobiol**, 59, n. 3, p. 1724-1743, Mar 2022.

SUN, H.; LI, J.; MAIMAITI, B.; LIU, J. *et al.* Circulating malondialdehyde level in patients with epilepsy: A meta-analysis. **Seizure**, 99, p. 113-119, 2022.

SYVERTSEN, M.; NAKKEN, K. O.; EDLAND, A.; HANSEN, G. *et al.* Prevalence and etiology of epilepsy in a Norwegian county—A population based study. **Epilepsia**, 56, n. 5, p. 699-706, 2015.

TANAKA, T.; NARAZAKI, M.; KISHIMOTO, T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 6, n. 10, p. a016295, Sep 4 2014.

TERRONE, G.; BALOSSO, S.; PAULETTI, A.; RAVIZZA, T. *et al.* Inflammation and reactive oxygen species as disease modifiers in epilepsy. **Neuropharmacology**, 167, p. 107742, May 1 2020.

TERRONE, G.; FRIGERIO, F.; BALOSSO, S.; RAVIZZA, T. *et al.* Inflammation and reactive oxygen species in status epilepticus: Biomarkers and implications for therapy. **Epilepsy Behav**, 101, n. Pt B, p. 106275, Dec 2019.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **The American journal of medicine**, 104, n. 3S1, p. 2S-8S, 1998.

VAN ERUM, Jan; VAN DAM, Debby; DE DEYN, Peter Paul. PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale. **Epilepsy & Behavior**, v. 95, p. 51-55, 2019.

- VERA-GONZÁLEZ, A. Pathophysiological Mechanisms Underlying the Etiologies of Seizures and Epilepsy. **Exon Publications**, p. 1-13, 2022.
- VEZZANI, A. Anti-inflammatory drugs in epilepsy: does it impact epileptogenesis? **Expert opinion on drug safety**, 14, n. 4, p. 583-592, 2015.
- VEZZANI, A.; FRENCH, J.; BARTFAI, T.; BARAM, T. Z. The role of inflammation in epilepsy. **Nature reviews neurology**, 7, n. 1, p. 31, 2011.
- VEZZANI, A.; FUJINAMI, R. S.; WHITE, H. S.; PREUX, P.-M. *et al.* Infections, inflammation and epilepsy. **Acta neuropathologica**, 131, p. 211-234, 2016.
- VEZZANI, A.; VIVIANI, B. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. **Neuropharmacology**, 96, p. 70-82, 2015.
- VIEIRA, V.; GLASSMANN, D.; MARAFON, P.; PEREIRA, P. *et al.* Effect of diclofenac sodium on seizures and inflammatory profile induced by kindling seizure model. **Epilepsy research**, 127, p. 107-113, 2016.
- VILLASANA-SALAZAR, B.; VEZZANI, A. Neuroinflammation microenvironment sharpens seizure circuit. **Neurobiology of Disease**, 178, p. 106027, 2023.
- VILLENEUVE, N.; LÉPINE, A.; GIRARD, N.; GUEDJ, E. *et al.* Rasmussen's encephalitis: Early diagnostic criteria in children. **Rev Neurol (Paris)**, 178, n. 7, p. 666-674, Sep 2022.
- VIVIANI, B.; BARTESAGHI, S.; GARDONI, F.; VEZZANI, A. *et al.* Interleukin-1 β enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. **Journal of Neuroscience**, 23, n. 25, p. 8692-8700, 2003.
- WANG, M.; ZHANG, X.; JIA, W.; ZHANG, C. *et al.* Circulating glutathione peroxidase and superoxide dismutase levels in patients with epilepsy: A meta-analysis. **Seizure**, 91, p. 278-286, Oct 2021.
- WEBER, A.; WASILIEW, P.; KRACHT, M. Interleukin-1 (IL-1) pathway. **Science signaling**, 3, n. 105, p. cm1-cm1, 2010.
- WIRRELL, E. Evaluation of First Seizure and Newly Diagnosed Epilepsy. **Continuum (Minneap Minn)**, 28, n. 2, p. 230-260, Apr 1 2022.
- YUEN, A. W. C.; KEEZER, M. R.; SANDER, J. W. Epilepsy is a neurological and a systemic disorder. **Epilepsy Behav**, 78, p. 57-61, Jan 2018.
- YOUN, Y.; SUNG, I. K.; LEE, I. G. The role of cytokines in seizures: interleukin (IL)-1 β , IL-1Ra, IL-8, and IL-10. **Korean journal of pediatrics**, 56, n. 7, p. 271, 2013.
- ZAMYAD, M.; ABBASNEJAD, M.; ESMAEILI-MAHANI, S.; MOSTAFAVI, A. *et al.* The anticonvulsant effects of *Ducrosia anethifolia* (Boiss) essential oil are produced by its main component alpha-pinene in rats. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, 77, p. 106-114, 2019.