

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

**EFEITO DO DICLOFENACO DE SÓDIO NA SEVERIDADE DAS CRISES
CONVULSIVAS E MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO MODELO ANIMAL DE
KINDLING INDUZIDO POR PENTILENOTETRAZOL**

VINÍCIUS VIEIRA

ORIENTADORA

Prof^a Dr^a Adriana Simon Coitinho

Porto Alegre, 2015

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

**EFEITO DO DICLOFENACO DE SÓDIO NA SEVERIDADE DAS CRISES
CONVULSIVAS E MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO MODELO ANIMAL DE
KINDLING INDUZIDO POR PENTILENOTETRAZOL**

VINÍCIUS VIEIRA

ORIENTADORA

Prof^a Dr^a Adriana Simon Coitinho

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Porto Alegre, 2015

*“Algumas pessoas sonham com o sucesso, outras
levantam cedo e batalham para alcançá-lo.”*

Alexsander Mandic

Dedicatória

*Aos meus pais, Tom e Eliane,
que sempre me ensinaram a fazer o melhor,
com dedicação, ética e perseverança,
e também pelo amor incondicional,
sacrifício, paciência e exemplo.*

*Aos meus irmão, Gabriela e Matheus,
que sempre foram companheiros e amigos,
e aguentaram os altos e baixos
com muita paciência e carinho.*

*Ao meu companheiro, Gabriel,
que durante esses dois anos
me ajudou nos momentos de dificuldades.*

Muito obrigado!

AGRADECIMENTOS

Durante a execução deste trabalho, muitas pessoas participaram e contribuíram para que o mesmo pudesse ser executado de forma harmoniosa e efetiva.

Agradeço à minha família, a quem devoto a mais sincera e efusiva admiração. Pela paciência, carinho e dedicação em ensinar que o trabalho realmente dignifica o homem. Mostrar que escolhas são inevitáveis e que a responsabilidade é o pilar que sustenta a vida.

Agradeço também a minha orientadora, Dra. Adriana, pelas possibilidades oferecidas durante esse tempo. Aprendi, com seu brilhantismo científico e acadêmico, que nem tudo ocorre como o esperado, mas que com humildade e perseverança podemos alcançar nossos objetivos. Agradeço por ter me iniciado na pesquisa, ainda nos tempos da graduação, e me ensinado toda a base que tenho hoje e que certamente continuarei levando para toda a minha vida profissional. Tenho a maior admiração pela sua inteligência, paciência e ética incomparáveis.

Agradeço a todos que contribuíram com os experimentos, do laboratório da Prof^a. Rosane, e aos bolsistas de iniciação científica que auxiliaram na execução desse trabalho.

Agradeço aos meus colegas de trabalho do Laboratório Municipal de Novo Hamburgo pelo apoio constante durante essa jornada. Também, à direção da instituição que me permitiu realizar esse mestrado.

Agradeço em especial a minha amiga e colega de profissão, Bruna Schweinberger, por quem tenho imensa admiração por suas qualidades acadêmicas.

E por último, mas não menos importante, agradeço a todos os meus amigos por sempre estarem por perto dando força e ajudando sempre quando precisei. Meu muito obrigado ao Alexandre, ao Anderson, ao Rodrigo.

SUMÁRIO

Resumo.....	06
Abstract.....	07
Lista de Abreviaturas.....	08
Lista de Figuras.....	09
1. TEMA DE ESTUDO.....	11
2. FORMULAÇÃO DO PROBLEMA.....	12
3. HIPÓTISE.....	13
4. INTRODUÇÃO	14
4.1 Epilepsia.....	14
4.2 Fisiopatologia da epilepsia.....	17
4.3 Modelo animal crônico de epilepsia – kindling (abrasamento).....	18
4.4 Inflamação.....	21
4.5 Neuroinflamação e epilepsia.....	28
5. JUSTIFICATIVA.....	29
6. OBJETIVOS.....	30
6.1 Geral.....	30
6.2 Específicos.....	30
7. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
7.1 Animais e tratamento.....	31
7.2 Avaliação da atividade anticonvulsivante.....	31
7.3 Parâmetros comportamentais.....	34
7.4 Determinação das citocinas.....	34
7.5 Grau de severidade dos procedimentos.....	35
7.6 Análise estatística e cálculo do n amostral.....	35
7.7 Destino dos resíduos.....	35
7.8 Considerações éticas.....	37
8. RESULTADOS.....	38
9. DISCUSSÃO.....	50
10. CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

RESUMO

A epilepsia é um distúrbio que afeta 1-2% da população e uma percentagem significativa destes pacientes não respondem aos medicamentos anticonvulsivantes disponíveis no mercado, sugerindo a necessidade de investigar novos tratamentos farmacológicos. Vários estudos demonstram que a inflamação ocorre durante a epileptogênese e pode contribuir para o desenvolvimento e progressão da epilepsia, demonstrando níveis aumentados de interleucinas pró-inflamatórias em modelos animais e em humanos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do anti-inflamatório não-esteroidal diclofenaco de sódio na severidade das crises convulsivas e os níveis de interleucinas pró-inflamatórias em animais no modelo de *kindling* induzido por pentilenotetrazol (PTZ). O modelo de *kindling* foi induzido por injeções de doses subconvulsantes de PTZ (20 mg/kg) em dias alternados durante 15 dias de tratamento. Os animais foram divididos em quatro grupos: grupo controle recebeu solução salina, grupo tratado com diazepam (2 mg/kg) e os grupos tratados com o diclofenaco de sódio (5 e 10 mg/kg). Após o primeiro dia de tratamento, os testes de labirinto em cruz elevada e de campo aberto foram realizados. A gravidade das crises foi avaliada pela escala de Racine. Foram avaliados os níveis de IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa no sangue, hipocampo e no córtex de animais. O tratamento com diclofenaco de sódio, no modelo de *kindling* induzido pelo PTZ, diminuiu a severidade das convulsões e os níveis de interleucina-6 e de TNF-alfa no hipocampo de animais tratados com doses de 5 e 10 mg/kg. Novos estudos são necessários para investigar uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da epilepsia, com este anti-inflamatório não-esteroidal.

ABSTRACT

Epilepsy is a disorder that affects 1-2% of the population and a significant percentage of these patients do not respond to anticonvulsant drugs available in the market suggesting the need to investigate new pharmacological treatments. Several studies have shown that inflammation occurs during epileptogenesis and may contribute to the development and progression of epilepsy, demonstrating increased levels of pro-inflammatory interleukins in animal models and human patients. The objective of this study was to evaluate the effect of non-steroidal anti-inflammatory diclofenac sodium on the severity of seizures and levels of pro-inflammatory interleukins in animals with kindling model induced by PTZ. The kindling model was induced by injections of subconvulsant doses of PTZ (20mg/kg) in alternated days for 15 days of treatment. The animals were divided into four groups: control group given saline, group treated with diazepam (2mg/kg) and groups treated with diclofenac sodium (5 and 10 mg/kg). After treatment the plus-maze and open field tests were conducted. The severity of seizures was evaluated by the Racine scale. We evaluated the levels of IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha in the blood, hippocampus and cortex of animals. The treatment with diclofenac sodium, in the PTZ induced kindling model, decreased severity of seizures and interleukin-6 and TNF-alpha levels in the hippocampus of animals treated with doses of 5 and 10 mg/kg. New studies are needed to investigate a new therapeutic approach in the treatment of epilepsy with this anti-inflammatory non-steroidal.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AINE	Anti-inflamatório não-esteroidal
ANOVA	Análise de Variância
CCL2	<i>chemokine (C-C motif) ligand 2</i>
COX-2	ciclooxigenase-2
CXCL1	<i>chemokine (C-X-C motif) ligand 1</i>
FAP	Fator de Ativação Plaquetária
HMGB1	<i>High mobility group box 1 protein</i>
i.p.	intraperitoneal
ICBS	Instituto de Ciências Básicas da Saúde
IL-1	interleucina-1
IL-1 alfa	interleucina-1 alfa
IL-1 beta	interleucina-1 beta
IL-10	interleucina-10
IL-12	interleucina-12
IL-6	interleucina-6
IL-8	interleucina-8
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
K⁺	íon potássio
MCP-1	<i>monocyte chemotactic protein 1</i>
Na⁺	íon sódio
NF-kB	Fator Nuclear – kappa beta
NLRP1	<i>NLR Family, Pyrin Domain Containing 1</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
PTZ	pentilenotetrazol
SBNec	Sociedade Brasileira de Neurociências
SE	<i>Status Epilepticus</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF-alfa	Fator de Necrose Tumoral-alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquematização do modelo animal de abrasamento (kindling).

Figura 2 – Efeito do diclofenaco de sódio na severidade das convulsões após administração de PTZ nos ratos dos diferentes grupos. Resultados são expressos como média±desvio padrão para dez animais por grupo. * $p < 0,001$, diferente do grupo controle salina (ANOVA de medidas repetidas).

Figura 3 – Efeito do diclofenaco de sódio no número de cruzamentos na tarefa do campo aberto. Resultados são expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$ ANOVA seguida de Tukey).

Figura 4 – Efeito do diclofenaco de sódio no número de rearings na tarefa do campo aberto. Resultados são expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$ ANOVA seguida de Tukey).

Figura 5 – Efeito do diclofenaco de sódio no número de groomings na tarefa do campo aberto. Resultados são expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$ ANOVA seguida de Tukey).

Figura 6 – Efeito do diclofenaco de sódio no número de bolos fecais na tarefa do campo aberto. Resultados são expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$ ANOVA seguida de Tukey).

Figura 7 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio sobre o número de entradas nos braços na tarefa do Plus Maze. Os dados estão expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$; ANOVA seguida de Tukey).

Figura 8 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio sobre o número de entradas nos braços na tarefa do Plus Maze. Os dados estão expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$; ANOVA seguida de Tukey).

Figura 9 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio nos níveis de interleucina-1 beta em soro (n=5-6 por grupo). Os dados estão expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$; ANOVA seguida de Tukey).

Figura 10 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio nos níveis de interleucina-6 em soro (n=5-6 por grupo). Os dados estão expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$; ANOVA seguida de Tukey).

Figura 11 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio nos níveis de TNF-alfa em soro (n=5-6 por grupo). Os dados estão expressos como média±desvio padrão. *p=0,005 diferente do grupo controle (ANOVA seguida de Tukey).

Figura 12 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio nos níveis de interleucina-1 beta em hipocampo (n=5-6 por grupo). Os dados estão expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos (p>0,05; ANOVA seguida de Tukey).

Figura 13 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio nos níveis de TNF-alfa em hipocampo (n=5-6 por grupo). Os dados estão expressos como média±desvio padrão. *p=0,003 diferente do grupo controle (ANOVA seguida de Tukey).

Figura 14 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio nos níveis de interleucina-6 em soro (n=5-6 por grupo). Os dados estão expressos como média±desvio padrão. *p=0,048 diferente do grupo controle (ANOVA seguida de Tukey).

Figura 15 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio nos níveis de TNF-alfa no córtex (n=5-6 por grupo). Os dados estão expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos (p>0,05; ANOVA seguida de Tukey).

Figura 16 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio nos níveis de interleucina-6 no córtex (n=5-6 por grupo). Os dados estão expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos (p>0,05; ANOVA seguida de Tukey).

Figura 17 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio nos níveis de interleucina-1 beta no córtex (n=5-6 por grupo). Os dados estão expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos (p>0,05; ANOVA seguida de Tukey).

1. TEMA DE ESTUDO

Epilepsia, neuroinflamação, diclofenaco de sódio.

2. FORMULAÇÃO DO PROBLEMA

Considerando que existem trabalhos na literatura evidenciando a presença de inflamação no tecido cerebral durante crises convulsivas, surge a seguinte questão:

a) o diclofenaco de sódio possui algum efeito modulador sobre a severidade das convulsões e os níveis de marcadores inflamatórios em modelo crônico de epilepsia?

3. HIPÓTESE

Baseado em estudo prévios e relatos encontrados na literatura de que existe um quadro inflamatório presente no tecido cerebral durante crises convulsivas, acredita-se que o diclofenaco de sódio exerça um efeito diminuindo a severidade das convulsões e diminuindo os níveis de marcadores inflamatórios em modelo animal de epilepsia.

4. INTRODUÇÃO

4.1 Epilepsia

A epilepsia é um distúrbio neurológico caracterizado por uma predisposição persistente do cérebro em gerar crises convulsivas espontâneas e recorrentes (FISHER, 2005), desencadeadas pela excessiva atividade neuronal anormal e sincrônica (MELDRUM & CHAPMAN, 1998), além de disfunções emocionais, cognitivas e consequências sociais (DUNCAN, 2006).

É considerada uma condição crônica que ocorre na ausência de doenças tóxicas metabólicas ou febris (ROGAWISKI & PORTER, 1990). Disparos intensos, sincronizados e rítmicos de populações de neurônios do sistema nervoso central (SNC) são responsáveis pelas manifestações clínicas desse distúrbio e tendem a perdurar por toda a vida (DA COSTA, 1998; MELDRUM, 1999). As crises convulsivas iniciam de forma súbita e variam na sua forma de manifestação, pois podem ocorrer anormalidades sensitivas, motoras, autonômicas e alterações do estado de consciência (FISHER, 2005).

Recentemente, a Liga Internacional Contra Epilepsia (ILAE – *International League Against Epilepsy*) propôs uma nova definição operacional para a epilepsia alterando a definição conceitual proposta em 2005 – como um distúrbio caracterizado por uma predisposição persistente a gerar crises convulsivas – que tem como base o reconhecimento de duas crises não provocadas, separadas por mais de 24 horas de intervalo. Essa nova definição abrange certas circunstâncias especiais e propõe que a epilepsia é uma doença cerebral definida por qualquer uma das seguintes condições:

(1) pelo menos duas crises convulsivas espontâneas não provocadas (ou reflexas) ocorrendo com mais de 24 horas de intervalo; (2) uma crise não provocada (ou reflexa) e uma probabilidade de novas crises semelhante ao risco geral de recorrência (pelo menos 60%), após duas crises espontâneas, ocorrendo dentro de 10 anos; (3) diagnóstico de uma síndrome epilética (FISHER, 2014).

Quando a crise convulsiva é suficientemente prolongada – 5 minutos ou mais de atividade epilética clínica e/ou eletrográfica – é definida como *Status Epilepticus* (SE), podendo ser também crises repetidas em intervalos curtos, resultando em um estado convulsivo contínuo e duradouro (BROPHY, 2012; YACUBIAN, 2002). O SE está associado com uma alta morbidade e mortalidade, e a um risco significativo de déficit cognitivo (BROPHY, 2012). Entre 1 e 8% dos pacientes epiléticos desenvolveram pelo menos um episódio de SE durante a vida (AKMAN, 2003).

As crises convulsivas podem ser classificadas conforme a etiologia, idade de início e topografia das descargas, por exemplo, baseando-se nas manifestações clínicas e eletroencefálicas. A classificação mais utilizada ainda é a da ILAE (1989) que divide as crises em parciais e generalizadas (Tabela 1). As crises são parciais quando as descargas neuronais iniciam em regiões corticais localizadas, porém podem generalizar-se, e as generalizadas quando iniciam em ambos os hemisférios cerebrais (COMMISSION, 1989; GUILHOTO, 2011).

Tabela 1 – Classificação das crises epiléticas conforme a *Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy* (1989).

I – CRISES PARCIAIS

Crises Parciais Simples

com sintomas motores

com sintomas somatossensoriais ou sensoriais especiais

com sintomas autonômicos

- com sinais psíquicos
- com ilusões
- com alucinações estruturadas
- Crises Parciais Complexas
 - início de crise parcial simples com progressão a perda de consciência
 - com alteração do estado de consciência desde o início
- Crises parciais secundariamente generalizadas
 - crise parcial simples evoluindo para crise tônico-clônica generalizada
 - crise parcial complexa evoluindo para crise tônico-clônica generalizada
 - crise parcial simples evoluindo para crise parcial complexa que evolui para crise tônico-clônica generalizada

II – CRISES GENERALIZADAS

- Crises de ausência
 - crises de ausência típicas
 - crises de ausência atípicas
- Crises mioclônicas
- Crises clônicas
- Crises tônicas
- Crises tônico-clônicas
- Crises atônicas

III – CRISES EPILÉTICAS NÃO CLASSIFICÁVEIS

Nos últimos anos, diversas discussões têm sido realizadas para propor outras classificações com o surgimento de novas ferramentas e técnicas diagnósticas, além dos avanços na área da biologia molecular celular e genética (SCHEFFER, 2011; GUILHOTO, 2011; SHORVON, 2011; YACUBIAN, 2002). Entretanto, as propostas continuam sendo discutidas visando abandonar a classificação rígida de 1989 (GUILHOTO, 2011).

A epilepsia é um distúrbio comum na população geral e afeta aproximadamente 1 a 2% da população mundial (LÓPEZ-HERNÁNDEZ, 2007; ENGEL, 2003). É um problema de saúde pública, atingindo 50 milhões de pessoas no mundo, sendo 40 milhões em países em desenvolvimento, e acomete todas as idades, etnias, gêneros e condições socioeconômicas (SCOTT, 2001; PITKANEN, 2007). Estima-se que sua incidência em países desenvolvidos seja de 50/100.000 pessoas, enquanto que em países em desenvolvimento essa taxa deve dobrar (SANDER & HART, 1999; MARCHETTI & NETO, 2005).

No Brasil, existem poucos estudos publicados sobre a prevalência desse distúrbio. Porém, Marchetti e Neto (2005) inferiram, baseado em estudos internacionais, aproximadamente 340 mil casos novos ao ano (incidência anual estimada de 190/100.000), 1% de prevalência pontual (1,8 milhões de pessoas com epilepsia ativa) e 5% de prevalência de vida (9 milhões de pessoas que já apresentaram crises epiléticas alguma vez nas suas vidas).

4.2 Fisiopatologia da epilepsia

De uma maneira geral, as hipóteses propostas para explicar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na epilepsia incluem principalmente alterações na permeabilidade de canais iônicos e alterações em diversos sistemas de neurotransmissores.

Para manter o potencial de repouso, a enzima transmembrana Na^+/K^+ ATPase bombeia Na^+ para fora da célula e K^+ para dentro dela em uma relação de 3 Na^+ /2 K^+ , ajudando a manter o interior da membrana com uma carga elétrica negativa em relação ao seu exterior (polarizada). Após estímulo nervoso, canais de Na^+ se abrem, ocasionando a entrada desse íon em um processo chamado de despolarização (potencial de ação). Logo após ocorre a repolarização através da saída de K^+ pela abertura de seus canais e através do transporte ativo de sódio para fora da célula pela Na^+/K^+ ATPase. As ondas de despolarizações e repolarizações que se propagam ao longo do neurônio são denominadas impulso nervoso (GLYNN, 1993; SKOU & ESMANN, 1992; JORGENSEN, 1990; SKOU, 1990).

Neste contexto, tem sido descrita a presença de mutações em diferentes subunidades dos canais de Na⁺ do SNC em casos de epilepsias generalizada como as convulsões febris. Essas modificações podem levar a um aumento da corrente de Na⁺ causando excitabilidade neuronal, que é a habilidade do neurônio em gerar e transmitir potencial de ação. Além disso, mutações nos genes que codificam proteínas formadoras de canais de K⁺ provocam redução da repolarização, também contribuindo para o aumento da excitabilidade (HÜBNER & JENTSCH, 2002). O canal de potássio também participa na hiperpolarização que segue as alterações paroxísticas de despolarização. A hiperpolarização é um passo importante desse processo de transmissão, pois determina a frequência de picos elétricos gerados na despolarização celular prevenindo a deflagração da crise epiléptica (DARNELL et al., 1990).

Além disso, se demonstra uma associação entre a epilepsia e alterações em sistemas de neurotransmissores. O aumento da permeabilidade ao Na⁺ gera liberação excessiva de glutamato, um neurotransmissor excitatório. O receptor pós-sináptico de glutamato do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) desempenha importante papel nas alterações despolarizantes capazes de produzir descargas epilépticas (FRANÇA, 1998). Além disso, também tem sido evidenciado que a ineficiência do GABA (neurotransmissor inibitório) também induz a uma maior excitabilidade das células neuronais. Essas anormalidades na neurotransmissão, como o aumento da transmissão excitatória, diminuição da transmissão inibitória ou ambas situações, acometem alterações na excitabilidade de neurônios e suas conexões sinápticas promovendo crises convulsivas (MELDRUM, 1984). Também, tem-se relacionado a plasticidade celular com a epilepsia através do remodelamento sináptico, modificações na morfologia de neurônios e glia, e morte celular por eventos bioquímicos (CHEVAUSS, 1997).

4.3 Modelo animal crônico de epilepsia – *kindling* (abrasamento)

Aplicações repetidas de estímulos subconvulsivantes químicos ou elétricos levam a geração de crises progressivamente mais intensas ao longo das estimulações. Esse processo é chamado *kindling* ou abrasamento (GODDARD, 1969; MASON & COOPER, 1972). O modelo de *kindling* é considerado um modelo crônico de epilepsia, pois após estimulações subconvulsivantes, há gerações de crises convulsivas espontâneas (LOSCHER, 2002). É um dos modelos crônicos de epilepsia que mimetiza a epilepsia do lobo temporal (AVANZINI, 1997; JAMES, 1997) e avalia tanto a epilepsia quanto a epileptogênese (MELDRUM & ROGAWSKI, 2007).

O *kindling* químico pode ser induzido por diferentes tipos de agentes químicos como a picrotoxina e o pentilenotetrazol (PTZ). Nesse modelo ocorrem alterações comportamentais e eletrográficas progressivas devido a repetidas administrações de doses subconvulsivantes desses agentes (MCNAMARA, 1985; BECKER, 1992). Após o modelo de *kindling* foi observado um aumento da atividade de uma subpopulação de sinapses glutamatérgicas via receptores NMDA (MCNAMARA, 1994) e o brotamento de fibras musgosas em células granulares do hipocampo (SUTULA, 1988). Esses fenômenos podem explicar a hiperexcitabilidade cerebral observada nesse modelo.

4.4 Inflamação

A inflamação é caracterizada pela infiltração de células do sistema imune no local do dano tecidual, liberação de citocinas e ativação de fatores de transcrição tal como o Fator Nuclear Kappa-B (NF- κ B). Os macrófagos ativados são a principal fonte de citocinas, modulando o reparo tecidual e evolução do processo inflamatório. Porém, a

resposta inflamatória depende do estado de ativação, sendo que as células classicamente ativadas produzem uma variedade de mediadores pró-inflamatórios, enquanto que os macrófagos alternativamente ativados participam de uma resposta anti-inflamatória (MCMORROW & MURPHY, 2011).

As citocinas são um grupo de proteínas necessárias para conduzir a resposta inflamatória aos locais de lesão. São elas as interleucinas, fatores de necrose tumoral (TNF, sigla do inglês *tumor necrosis factor*), quimiocinas, fatores estimuladores de colônias, interferons e fatores de crescimento (MCLAREN et al., 2011). O presente trabalho enfatizará o papel de algumas interleucinas e do TNF-alfa, os quais são amplamente utilizados em pesquisa para caracterizar estados inflamatórios. Tendo-se em vista que as interleucinas podem apresentar um efeito pró ou anti-inflamatório, o TNF-alfa e as interleucinas 1 e 6 serão alvos deste estudo, uma vez que têm efeito pró-inflamatório.

TNF-alfa

O TNF-alfa é uma proteína sinalizadora produzida principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos-T, tendo a função de induzir a migração de leucócitos para o tecido inflamado e promover apoptose. O TNF-alfa também está presente em células do sistema nervoso (neurônios e células da glia) e tem sido correlacionado com o desenvolvimento de hiperalgesia (TANIGUCHI et al., 2013; ZHANG & AN, 2007).

Interleucina 1

A interleucina 1 (IL-1) é principalmente sintetizada por macrófagos/monócitos e está presente no organismo em duas formas: IL-1alfa e IL-1beta, as quais exercem

atividades biológicas similares. De forma geral, a IL-1 está envolvida na ativação de linfócitos, além de induzir a produção de TNF-alfa e de óxido nítrico. A IL-1beta ainda estimula a atividade de prostaglandina no hipotálamo anterior, levando ao estado de febre (DINARELLO, 1991; LIN et al., 2000).

Interleucina 6

A interleucina 6 (IL-6) é classicamente descrita como uma citocina secretada por linfócitos que está envolvida na diferenciação de células B, além de ser um potente indutor de proteínas de fase aguda. Porém, atualmente a IL-6 é reconhecida como uma citocina multifuncional com ações não só nas células do sistema imune, mas também em células do sistema nervoso (SPOOREN et al., 2011).

Embora a inflamação consista em um evento essencial no combate a estímulos patológicos, a indução de um processo inflamatório exacerbado e/ou inapropriado tem sido correlacionada com os danos teciduais que ocorrem em diversas doenças inflamatórias (MCMORROW & MURPHY, 2011). Mais especificamente, a neuroinflamação consiste em uma resposta complexa que inclui recrutamento de células do sistema imune, indução de alguns caminhos de sinalização celular e liberação de mediadores inflamatórios no cérebro, o que pode contribuir para a ocorrência de disfunção e morte neuronal. Tem sido reportado que as citocinas contribuem para diversos aspectos da neurodisfunção. As citocinas podem, por exemplo, modular a atividade neuronal promovendo a liberação de moléculas neuroativas provenientes da glia ou do endotélio, como por exemplo, o óxido nítrico e o glutamato (ALLAN & ROTHWELL, 2001; MONTGOMERY & BOWERS, 2012).

Neste contexto, a neuroinflamação tem sido relacionada com a fisiopatologia de diferentes doenças neurológicas, incluindo: doença de Alzheimer (HENSLEY, 2010), doença de Parkinson (HIRCH et al., 2012), doença de Huntington (CROTTI & GLASS, 2015), entre outras.

Existem diferentes classes de drogas com propriedades anti-inflamatórias no mercado. Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) são drogas usadas rotineiramente na clínica, frequentemente empregados por serem responsáveis pela diminuição da produção de prostaglandinas. Porém, os AINES levam a vários outros efeitos, como por exemplo nos macrófagos, condrócitos e linfócitos (HIRSCHOWITZ, 1996). Neste trabalho será utilizado o diclofenaco de sódio ((DS), 2-[(2,6- diclorofenil)amino]benzenoacetato de sódio), pois está entre os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) mais utilizados no mundo (SANTOS et al., 2007).

4.5 Neuroinflamação e epilepsia

As crises convulsivas podem desencadear uma série de alterações bioquímicas em diferentes áreas do cérebro, afetando a liberação de neurotransmissores, as sinalizações intracelulares e a expressão gênica de diversas proteínas. Os mecanismos responsáveis pelas alterações celulares que ocorrem durante a epilepsia podem levar à morte celular, neurogênese, alterações nos canais iônicos e das propriedades sinápticas. Como consequência, danos neuronais severos podem ocorrer ao longo do tempo (SIMONIC et al., 2000). Contudo, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na epilepsia ainda não estão bem elucidados. Neste contexto, a neuroinflamação tem sido recentemente correlacionada com os danos neuronais decorrentes da epilepsia e com o

desenvolvimento de maior suscetibilidade a convulsões (VEZZANI & GRANATA, 2005).

Em condições normais, o tecido cerebral expressa diversas citocinas e receptores de citocinas, os quais participam de diferentes processos fisiológicos essenciais, tais como a atividade sináptica, a comunicação celular e a regulação do desenvolvimento neuronal (ASENSIO & CAMPBELL, 1999; CARTIER et al., 2005). Porém, quando ocorre uma injúria tecidual, infiltrações de macrófagos ativados e outros leucócitos liberam proteínas inflamatórias, as quais induzem citocinas, que por sua vez parecem exercer atividade neurotóxica, a exemplo da IL-1 (alfa e beta) e do TNF-alfa (FEUERSTEIN et al., 1997; TOULMOND et al., 1996; WANG & SHUAIB, 2002; RELTON & ROTHWELL, 1992). Tais reações pró-inflamatórias têm a capacidade de causar o aumento da excitabilidade neuronal, levar à morte celular e prejudicar a regeneração das células do SNC (VEZZANI & GRANATA, 2005; LEE et al., 2007; GORTER et al., 2006). Quando esses danos são severos e progressivos, a atividade neuroinflamatória pode levar ao desenvolvimento de doenças neurológicas. Esse fato fica evidente em estudos que mostram que o tratamento com anti-inflamatórios reduz o dano cerebral em diversos modelos animais (WALLENSTEIN, 1987; VEZZANI & GRANATA, 2005).

Em vista da importância desse tema, os estudos clínicos e em animais acerca da relação entre a inflamação e a epilepsia tem se acentuado na última década. Diversos dados publicados de diferentes estudos evidenciaram o papel do aumento das citocinas e outros parâmetros inflamatórios sobre os efeitos causados pelas crises convulsivas de diferentes origens. Um dos primeiros trabalhos demonstrou que o pré-tratamento com o anti-inflamatório dexametasona reduz o edema vasogênico no tálamo após crises convulsivas (SZTRIHA et al. 1986). No final da década de 90, Peltola e colaboradores

(1998) verificaram que havia um aumento nos níveis de IL-6 no fluido cerebrospinal de pacientes com crises convulsivas generalizadas. Posteriormente, um estudo realizado por Haspolat et al. (2002) mostrou que também há um aumento nos níveis de IL-1beta no líquido de crianças com convulsões febris. Como consequência, a elevação de IL-1beta pode levar ao aumento da indução de convulsões ocasionadas por febre (DUBE et al., 2005) e ao aumento da neurotransmissão glutamatérgica (WANG et al., 2000). O excesso de glutamato, por sua vez, parece induzir um aumento significativo na expressão da proteína de fase aguda APP e na consequente liberação de seu fragmento solúvel sAPPalfa (BARGER & HARMON, 1997), o qual possui um importante papel na indução da ativação da microglia e no aumento da produção e liberação de IL-1beta (LI et al., 2000).

Estendendo as investigações, Ravizza e colaboradores (2008) demonstraram que em tecidos cerebrais de humanos com epilepsia de lobo temporal, a IL-1beta e o receptor de IL-1 do tipo 1 estavam sendo amplamente expressos por astrócitos, microglia e neurônios. Essas alterações foram acompanhadas pela presença de monócitos/macrófagos no hipocampo. Ainda, estudos evidenciaram que os hipocampus de pacientes com epilepsia de lobo temporal apresentam astrócitos superexpressando NF- κ B, um fator de transcrição ativado por citocinas como a IL-1 e o TNF-alfa, e que atua na expressão de outros genes pró-inflamatórios como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (CRESPEL et al., 2002).

Em trabalhos posteriores, Choi e colaboradores (2009) desenvolveram um estudo em humanos em que o tecido cortical foi coletado de crianças com epilepsia de diferentes origens. Neste trabalho foi observada ativação da microglia e de astrócitos, morte celular difusa, fragmentação de DNA em neurônios e em astrócitos e níveis elevados de IL-1beta

e IL-8 no córtex. Choi e colaboradores (2011) também realizaram um estudo em humanos e verificaram, em crianças com convulsões febris, um aumento dos níveis séricos de IL-6, IL-1beta e de HMGB1, uma proteína nuclear que desencadeia a inflamação, liga-se a lipopolissacarídeos e a IL-1 e inicia uma resposta pró-inflamatória mediada por receptores do tipo Toll, os quais são ativados através de ligantes específicos, levando ao aumento de NF-κB, IL-6 e TNF-alfa.

Mais recentemente, Kan e colaboradores (2012) observaram o aumento da expressão de mais de vinte parâmetros inflamatórios em cérebro de pacientes com epilepsia do lobo temporal, sugerindo que ocorre a coativação de múltiplos mediadores inflamatórios nessa condição patológica. Além disso, Tan e colaboradores (2015) demonstraram em pacientes com epilepsia do lobo temporal, um aumento da expressão hipocampal de NLRP1, uma proteína essencial para a regulação da imunidade em condições fisiológicas que interage com caspases, levando a morte celular programada (MASTERS et al., 2012).

O papel da neuroinflamação na etiopatogenia da epilepsia também foi evidenciado através de estudos em animais, sendo que em diferentes modelos experimentais, as convulsões agudas levaram à ativação das células da glia e aumentaram a produção de citocinas. Turrin e Rivest (2004) induziram convulsões em camundongos através da administração de pilocarpina e observaram neurodegeneração associada ao aumento da expressão de receptores do tipo Toll 2 e ao aumento da ativação de NF-κB na microglia/macrófagos. Neste mesmo estudo, houve aumento em diferentes áreas cerebrais na expressão de TNF-alfa, IL-12 e ciclooxigenase 2 (COX-2), a qual é induzida rapidamente durante as convulsões e é então distribuída no hipocampo (TOCCO et al.,

1997; DE SIMONI et al., 2000; SHAPIRO et al., 2008; ROJAS et al., 2014). Foresti e colaboradores (2009) ainda verificaram que a indução de SE em ratos (através de injeções de pilocarpina) levou ao aumento hipocampal da quimiocina CCL2, a qual é induzida pelo TNF-alfa e é responsável pelo recrutamento de monócitos.

Os resultados descritos acima foram reforçados por meio de estudos realizados em ratos adultos, nos quais muitos mediadores inflamatórios foram ativados nas células da glia em resposta ao SE, como a IL-1beta, o TNF-alfa, a IL-6 e a COX-2. Em concordância, outros estudos demonstraram que o TNF-alfa é expresso em baixos níveis no cérebro, mas tem sua expressão rapidamente elevada na glia, em neurônios e em células endoteliais em diversas condições fisiopatológicas, incluindo o SE (SRIRAM & O'CALLAGHAN, 2007; KIM et al., 2011). Essas alterações podem contribuir para a excitotoxicidade neuronal no hipocampo, uma região especialmente suscetível aos danos causados pelo SE. De fato, os dados publicados na literatura demonstraram que o aumento das citocinas e a ativação da glia contribuem para o desenvolvimento de patologia hipocampal relacionada a convulsões, como por exemplo, a morte neuronal (JANKOWSKY & PATTERSON, 2001).

O envolvimento da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) na patogênese da epilepsia também tem sido estudado. A MCP-1 é uma quimiocina altamente expressa no cérebro durante o processo inflamatório e tem a função de atrair monócitos para o local lesionado, além de ativar células T e células B (YADAV et al., 2010). Em estudos realizados em animais, a expressão da MCP-1 em hipocampo se encontrava elevada após convulsões agudas (FORESTI et al., 2009; MANLEY et al., 2007). Dados em humanos também mostram que a MCP-1 está elevada em pacientes com epilepsia

intratável sugerindo seu possível envolvimento com essa condição patológica (WU et al., 2008). Além do recrutamento de macrófagos/microglia e de granulócitos para perto do sítio de injúria (MANLEY et al., 2007), níveis elevados de MCP-1 no cérebro inflamado também estão correlacionados com a quebra da barreira cérebro-sangue (BCS) (STAMATOVIC et al., 2005).

Dessa forma, além do dano direto que o processo inflamatório pode induzir ao SNC, também tem sido descrito que a inflamação pode causar danos indiretamente através do rompimento da BCS (KLEEN & HOLMES, 2008). Recentemente, esse processo tem sido correlacionado com a progressão da epilepsia, sendo que a combinação de terapias utilizando um fármaco antiepilético associado a um corticosteroide que estabiliza a BCS, parece controlar de forma mais efetiva as convulsões (SEIFFERT et al., 2004; VAN VLIET et al., 2007; MARCHI et al., 2007; MARCHI et al., 2011). Em estudos realizados por Zattoni e colaboradores (2011), o rompimento da BCS e a neurodegeneração foram acompanhados por ativação da microglia e infiltração de leucócitos em tecido esclerótico de camundongos submetidos a um modelo de epilepsia do lobo temporal. Uma vez direcionados ao cérebro, esses leucócitos, juntamente com a microglia e com os astrócitos, participam da secreção de quimiocinas como a CCL2 (MANLEY et al., 2007).

Estudos dos últimos anos também demonstraram que a administração de um antagonista ao fator de ativação plaquetária (FAP) atenuou a suscetibilidade a convulsões, induziu neuroproteção hipocampal e reduziu a inflamação, sugerindo que o FAP pode mediar a inflamação no cérebro após a epilepsia provavelmente através da ativação de sinalizações intracelulares (MUSTO & SAMII, 2011). No mesmo ano,

trabalhos desenvolvidos por Johnson e colaboradores (2011) evidenciaram que a ligante da quimiocina 1 (CXCL1) e a proteína inflamatória de macrófagos-1alfa (MIP-1alfa) estavam significativamente elevadas em diferentes regiões cerebrais de ratos após SE. Este resultado foi associado a um significativo aumento da infiltração de neutrófilos no cérebro. Mais recentemente, Ho e colaboradores (2015) desenvolveram ainda um estudo em ratos Sprague-Dawley adultos e observaram que a indução de inflamação (através de lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*) resultou no desenvolvimento de neuroinflamação e aumento da suscetibilidade a convulsões induzidas por ácido caínico.

Com base nos dados levantados, é possível inferir que a excitotoxicidade neuronal induzida por convulsões pode ativar uma resposta neuroinflamatória e contribuir para o desenvolvimento de danos neurológicos. Após a incidência de crises convulsivas, o aumento da expressão gênica de múltiplas proteínas pró-inflamatórias parece influenciar no desenvolvimento de convulsões recorrentes e nos danos teciduais a diferentes áreas cerebrais. Neste contexto, alguns autores sugerem que os níveis plasmáticos alterados de citocinas estão associados com a frequência e severidade das convulsões e que poderia causar neurodegeneração em indivíduos suscetíveis (LEHTIMAKI et al., 2007, MLODZIKOWSKA-ALBRECHT et al., 2007, ALAPIRTTI et al., 2009, NOWAK et al., 2011).

Contudo, apesar das constantes pesquisas acerca da epilepsia, um número significativo de pacientes continua apresentando episódios de convulsões mesmo após o tratamento medicamentoso (SPENCER, 2002). Dessa forma, um dos pontos mais importantes referente à pesquisa sobre essa condição diz respeito à necessidade de se desenvolver novas terapias. Com base nessas observações, faz-se necessário a realização de mais estudos acerca do efeito neuroprotetor de fármacos anti-inflamatórios

sobre o desenvolvimento de epilepsia. Os modelos experimentais em animais são muito úteis e podem ser utilizados para estudar as mudanças neuroquímicas que ocorrem durante o desenvolvimento e propagação das convulsões. Além disso, os modelos animais são importantes para o desenvolvimento de tratamentos direcionados às causas e consequências da epilepsia.

5. JUSTIFICATIVA

Os diferentes achados que demonstram o papel do processo inflamatório na atividade epileptogênica sugerem que novas estratégias terapêuticas que modulem a resposta das citocinas pró-inflamatórias poderão ser utilizadas para o tratamento da epilepsia. Tendo-se em vista que em torno de 1/3 dos pacientes tratados com anticonvulsivantes não respondem ao tratamento, a possível aplicação de medicamentos já amplamente utilizados, mas com novo enfoque terapêutico pode vir a ser muito útil para o controle das crises epiléticas e a melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

6. OBJETIVOS

6.1 Geral

- Investigar o efeito do fármaco diclofenaco de sódio sobre o processo inflamatório e comportamental no modelo animal crônico de convulsão (abrasamento) induzido pelo PTZ.

6.2 Específicos

- Investigar o efeito do fármaco diclofenaco de sódio sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 beta, interleucina-6 e do TNF-alfa no modelo animal de abrasamento (*kindling*) induzido pelo PTZ.
- Investigar o efeito do fármaco diclofenaco de sódio sobre parâmetros comportamentais no modelo animal de abrasamento induzido pelo PTZ.

7. MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 Animais e tratamentos

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

Quatro grupos experimentais foram avaliados (n= 10 em cada grupo): grupo controle positivo (recebeu diazepam na dose de 2mg/kg), grupo controle negativo (recebeu cloreto de sódio 0,9g%), grupo diclofenaco de sódio 5 (recebeu diclofenaco de sódio na dose de 5mg/kg) e grupo diclofenaco de sódio 10 (recebeu diclofenaco de sódio na dose de 10mg/kg). Os animais receberam as diferentes doses de diclofenaco de sódio, diazepam e cloreto de sódio, via intraperitoneal (i.p.), diariamente, durante 15 dias.

7.2 Avaliação da Atividade Anticonvulsivante

O modelo de abrasamento (*kindling*), considerado um modelo crônico de epilepsia foi utilizado (GODDARD, 1967). Neste modelo há progressão das crises convulsivas e

geração de crises recorrentes e espontâneas (LOSCHER, 2002). Os animais receberam as mesmas doses descritas dos tratamentos durante 15 dias e, em dias alternados, também receberam doses subconvulsivantes de PTZ intraperitonealmente (20 mg/Kg). O PTZ foi injetado 30 minutos após a administração dos tratamentos e os animais foram observados durante 30 minutos avaliando a severidade da convulsão pela escala adaptada de Racine, conforme estudos prévios (COITINHO *et al*, 2015; RODRIGUES *et al*, 2013; RACINE, 1972) (Figura 1). O tempo e a latência de convulsão, bem como a mortalidade, também foram registrados.

Racine classificou estas fases de progressão em cinco diferentes estágios: 1) clônus facial; 2) movimentos de flexão e extensão da cabeça; 3) clônus de patas dianteiras; 4) resposta de orientação, na qual o animal permanece de pé apenas sobre as patas traseiras (*rearing*); 5) *rearing* seguido de queda.

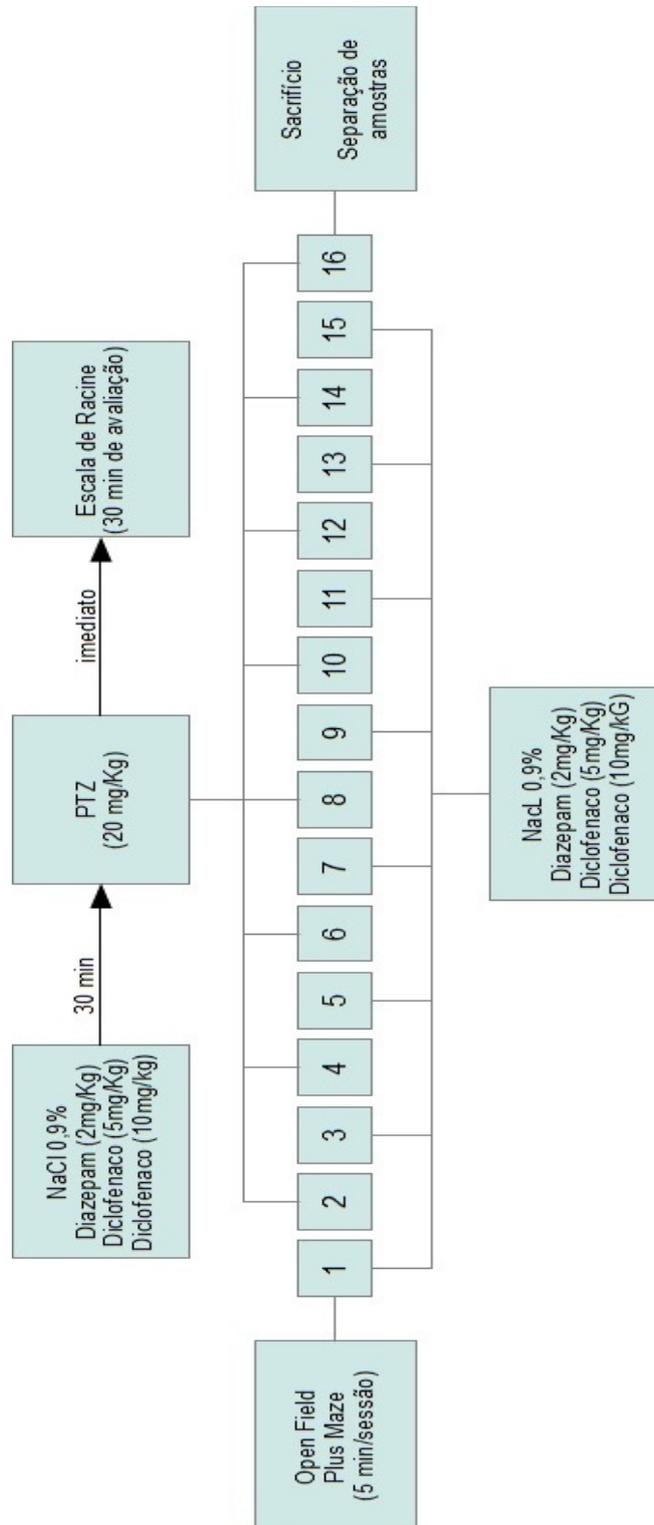


Figura 1 – Esquematização do modelo animal de abrasamento (kindling).

7.3 Parâmetros Comportamentais

No 1º dia, após o tratamento com as diferentes doses dos fármacos, foram avaliados parâmetros comportamentais dos ratos, através dos testes de avaliação da atividade locomotora e exploratória (*Open Field*) e atividade ansiolítica (*Plus Maze*). No teste de *Open Field* ou teste de campo aberto, os ratos foram colocados em uma caixa de acrílico, com o chão dividido em 12 quadrantes iguais com linhas pretas. Inicialmente os ratos foram colocados no quadrante esquerdo, explorando livremente a caixa por 5 minutos. O número de cruzamentos (*crossings*), performance de orientação (*rearing*), *groomings* e número de bolos fecais durante a exploração foram registrados (IZQUIERDO, 1989). No teste de *Plus Maze* os ratos foram expostos ao labirinto em cruz elevado conforme descrito por PELLOW (1985), o qual consiste em dois braços abertos opostos, cruzados por dois braços fechados. Os animais ficaram livres para explorá-lo. O número total de entradas e o tempo gasto nos quatro braços foram registrados em sessões de duração de 5 minutos.

7.4 Determinação das citocinas

O TNF-alfa, a IL-1beta e IL-6 foram dosadas no soro e em estruturas cerebrais (hipocampo e córtex) pelo método de ELISA captura seguindo as especificações do fabricante (*Enzo Life Sciences*). As leituras foram realizadas em leitor de ELISA (SPECTRAMAX 190) a 450 nm. A concentração foi calculada através de curva-padrão obtida com diferentes concentrações da citocina recombinante, conforme especificações do fabricante.

7.5 Grau de severidade dos procedimentos utilizados

De acordo com o GUIA DE SEVERIDADE DOS PROCEDIMENTOS CIENTÍFICOS (CEUA-UFRGS), de 2009, a administração por via intraperitoneal tem classificação leve, a administração do PTZ, grau moderado, e os testes do campo aberto e do *Plus Maze* não oferecem desconforto ao animal uma vez que estão abaixo do limiar inferior.

7.6 Análise Estatística e cálculo do n amostral

Os dados foram apresentados como média e erro padrão. Após a definição dos subgrupos, foi realizada a análise estatística utilizando a Análise de Variância (ANOVA) seguida de teste de Tukey. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se um banco de dados que foi montado no pacote estatístico SPSS versão 13.0. Através de cálculo do tamanho amostral, inferiu-se que o número mínimo de animais que deveriam ser utilizados por grupo para obtenção de poder estatístico foi de 9 (erro amostral de 5%, nível de confiança 95%). Alguns trabalhos publicados (GUPTA et al., 2003, LIAN et al., 2005) que avaliaram os mesmos parâmetros que foram utilizados no presente estudo utilizaram um $n=10$ por grupo para parâmetros comportamentais.

7.7 Destino dos resíduos

Neste estudo, o volume de resíduos gerados não foi grande e poucas substâncias biologicamente perigosas foram utilizadas. Os resíduos biológicos tais como sangue, tecidos e carcaças de animais, além de luvas sujas com material biológico, foram

acondicionados em sacos plásticos branco, previamente identificados e rotulados com o nome do pesquisador responsável, a data e o laboratório onde o lixo foi produzido, e congelados em freezer apropriado até o recolhimento. Estes sacos foram descartados em local próprio para este destino no prédio do Biotério da UFRGS e foram recolhidos por uma empresa especializada contratada pela UFRGS. As vidrarias e tubos que acondicionaram sangue ou outros materiais biológicos foram lavadas com solução de hipoclorito de sódio, enxaguadas, secas e guardadas. Os recipientes foram identificados de acordo com a RDC nº 306 de 2004 que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o gerenciamento de resíduos de serviços de saúde. A maior parte dos resíduos enquadra-se como resíduos químicos do Grupo B (reagentes de laboratório) e foram armazenados em local exclusivo com dimensionamento compatível com as características quantitativas e qualitativas dos resíduos gerados.

Os resíduos líquidos foram acondicionados em recipientes constituídos de material compatível com o líquido armazenado, resistentes, rígidos e estanques, com tampa rosqueada e vedante. O Grupo B foi identificado através do símbolo de risco associado, de acordo com a NBR 7500 da ABNT e com discriminação de substância química e frases de risco. Os resíduos químicos dos equipamentos automáticos de laboratórios clínicos e dos reagentes de laboratórios clínicos, quando misturados, foram avaliados pelo maior risco e tratados conforme descrito: resíduos químicos que não apresentavam risco à saúde ou ao meio ambiente não necessitaram de tratamento, podendo ser submetidos a processo de reutilização, recuperação ou reciclagem. Os resíduos gerados pelos kits de Elisa foram armazenados no laboratório e posteriormente encaminhados ao Instituto de Química da UFRGS para o devido tratamento.

7.8 Considerações éticas

Atendendo a Lei No 11.794/ 2008, capítulo IV, art.14, § 4o, o número de animais a serem utilizados para a execução de um projeto e o tempo de duração de cada experimento foram o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo, poupando-se, ao máximo, o animal de sofrimento. Procedimentos éticos para o cuidado e uso dos animais foram adotados de acordo com as regulamentações publicadas pela Sociedade Brasileira para Neurociência e Comportamento (SBNec). O presente estudo integra um projeto maior chamado “Influência da inflamação sobre o processo epileptogênico” que foi aprovado pela Comissão de pesquisa de Ciências da Saúde e Comitê de Ética no uso de animais da UFRGS em 18/12/2012, sob o número 23554.

8. RESULTADOS

O modelo crônico de epilepsia (*kindling*) induzido pelo PTZ leva a alterações eletrográficas progressivas devido a repetidas administrações subconvulsivantes desse agente químico. Esse padrão de administração resulta, após algumas repetições, ao desenvolvimento de crises convulsivas generalizadas em ratos. Observa-se que esse padrão progressivo na severidade da convulsão, ao longo dos dias, avaliada pela escala de Racine, foi crescente nos animais que receberam salina, o que espera-se para o modelo utilizado. Os animais desse grupo evoluíram para crises convulsivas mais complexas, característico da escala 4 de Racine (resposta de orientação, na qual o animal permanece de pé apenas sobre as patas traseiras). Nos grupos tratados com as doses de diclofenaco de sódio de 5 e 10 mg/Kg, observou-se uma severidade menor, de acordo com a escala de Racine, quando comparado ao grupo controle negativo (salina) (ANOVA de medidas repetidas, $*p < 0,001$). Não houve diferença significativa dos grupos tratados com diclofenaco em relação ao grupo tratado com diazepam, controle positivo ($p > 0,05$). Ressalta-se que nenhum dos animais dos grupos tratados com diazepam e diclofenaco de sódio nas diferentes doses evoluíram para a escala 4 de Racine, demonstrando também, uma diminuição da evolução das crises após o quinto dia de administração do PTZ para esses grupos (Figura 2).

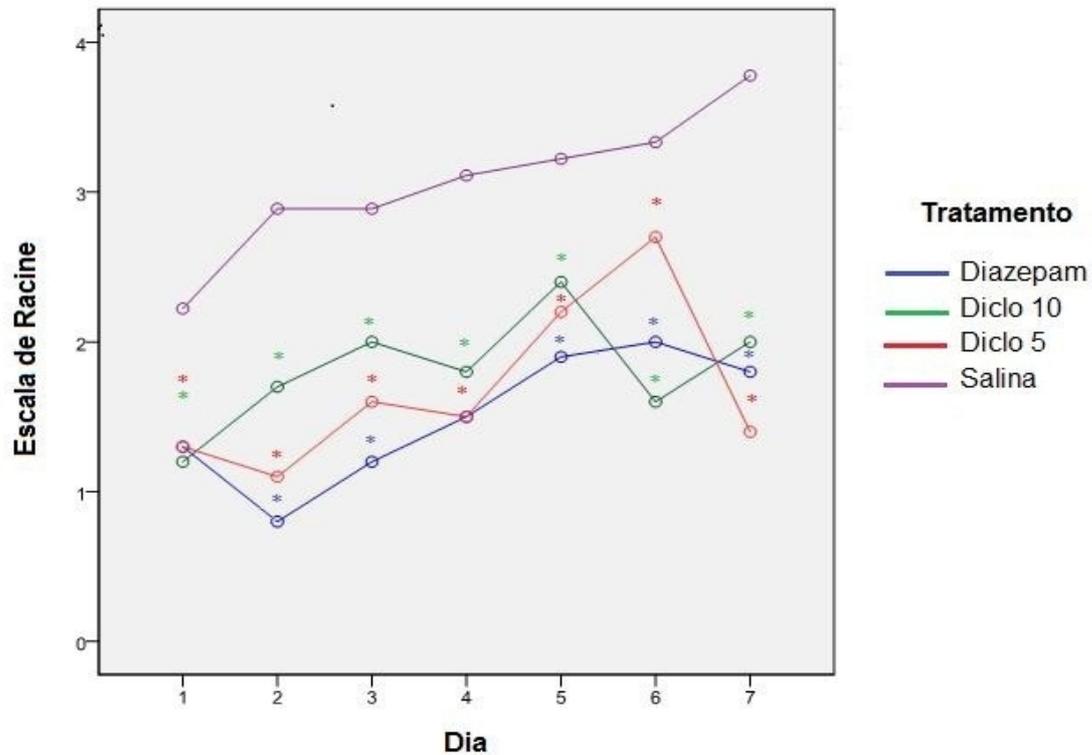


Figura 2 – Efeito do diclofenaco de sódio na severidade das convulsões após administração de PTZ nos ratos dos diferentes grupos. Resultados são expressos como média±desvio padrão para dez animais por grupo. * $p < 0,001$, diferente do grupo controle salina (ANOVA de medidas repetidas).

Após o primeiro dia de tratamento dos animais, foram realizadas avaliações de parâmetros comportamentais pelas tarefas de campo aberto (*Open Field*) e Labirinto em Cruz Elevado (*Plus Maze*). No teste *do campo aberto* foi avaliado o número de cruzamentos (*crossings*), performance de orientação (*rearing*), número de *groomings* e o número de bolos fecais durante a exploração. Não se verificaram diferenças estatísticas significativas nesses parâmetros entre os grupos estudados (ANOVA seguido de Tukey, $p > 0,05$) (Figuras 3, 4, 5 e 6).

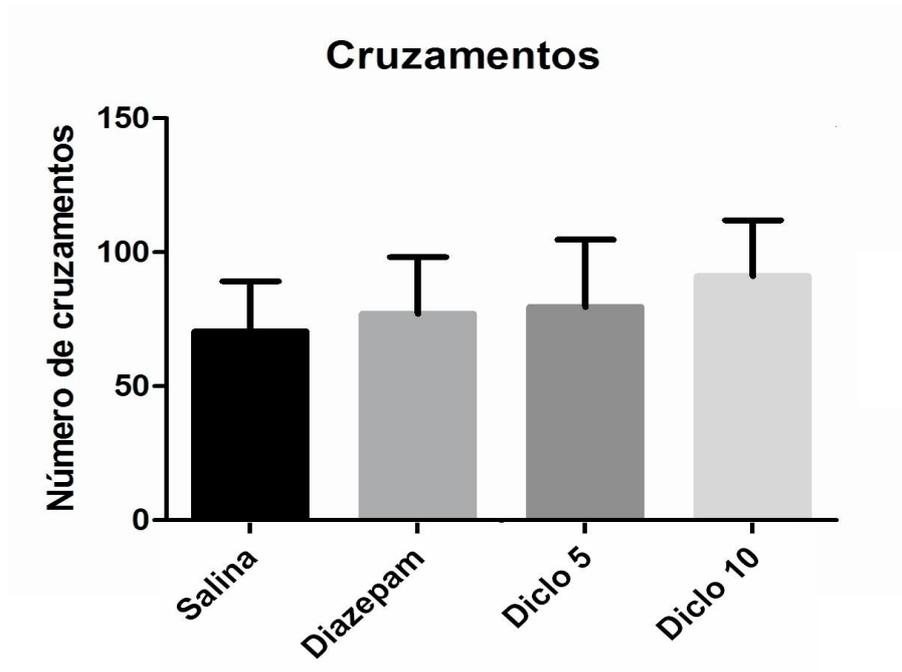


Figura 3 – Efeito do diclofenaco de sódio no número de cruzamentos na tarefa do campo aberto. Resultados são expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$ ANOVA seguida de Tukey).

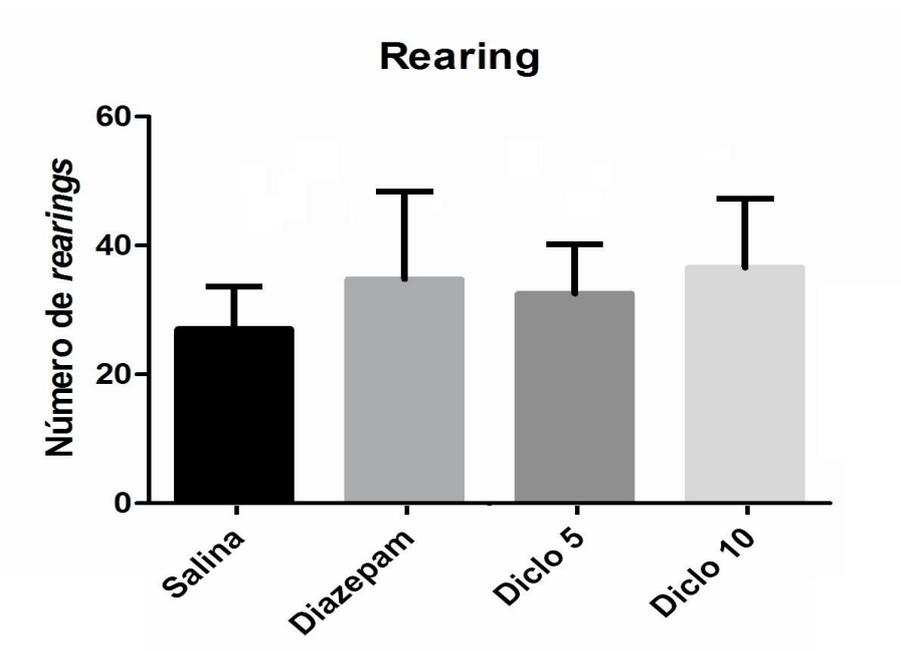


Figura 4 – Efeito do diclofenaco de sódio no número de rearings na tarefa do campo aberto. Resultados são expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$ ANOVA seguida de Tukey).

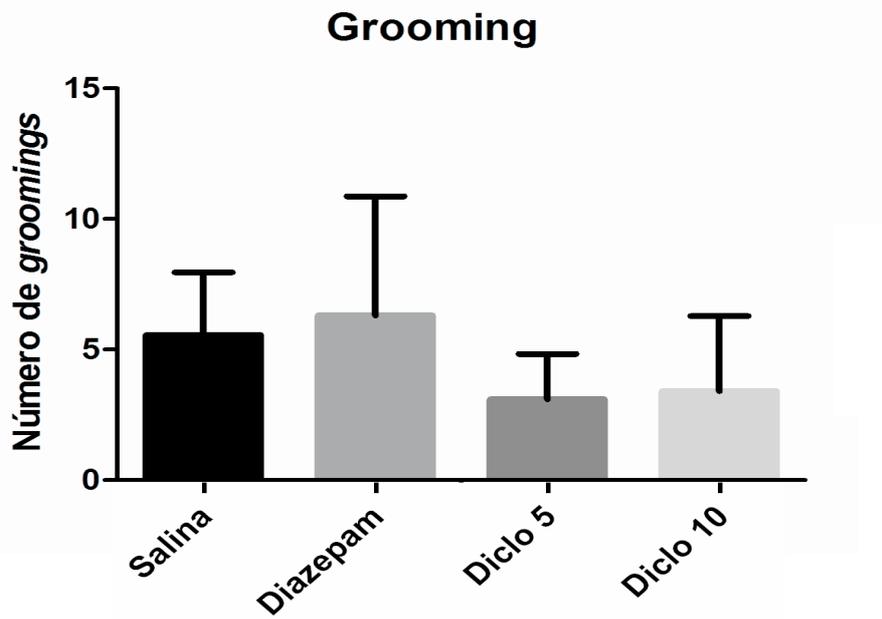


Figura 5 – Efeito do diclofenaco de sódio no número de groomings na tarefa do campo aberto. Resultados são expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$ ANOVA seguida de Tukey).

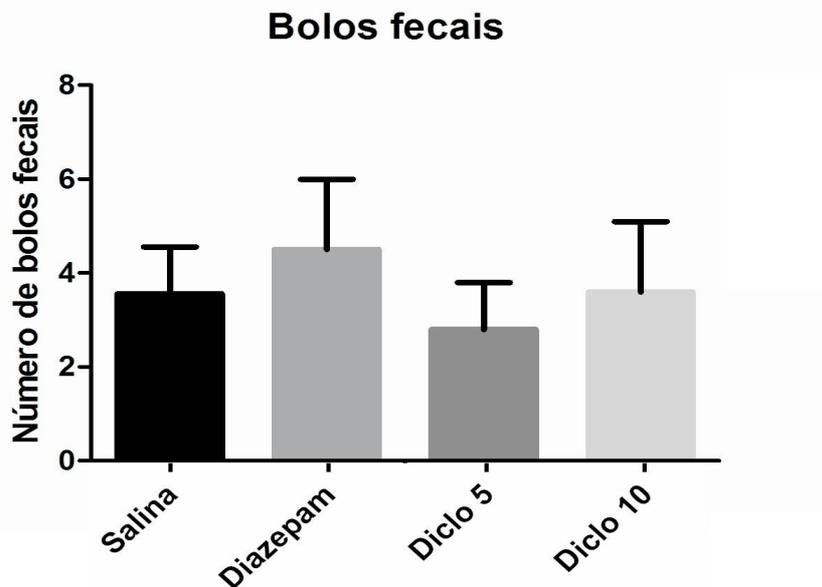


Figura 6 – Efeito do diclofenaco de sódio no número de bolos fecais na tarefa do campo aberto. Resultados são expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$ ANOVA seguida de Tukey).

Na tarefa do labirinto em cruz elevado, foi avaliado o número total de entradas e o tempo de permanência nos quatro braços do aparato. Não se observaram diferenças estatisticamente significativas nesses parâmetros entre os grupos estudados ($p > 0,05$). Porém, observa-se que os animais dos diferentes grupos dispenderam mais tempo nos braços fechados em relação a permanência nos braços abertos e tiveram um número maior de entradas nos braços fechados em relação ao número de entradas nos braços abertos (Figuras 7 e 8).

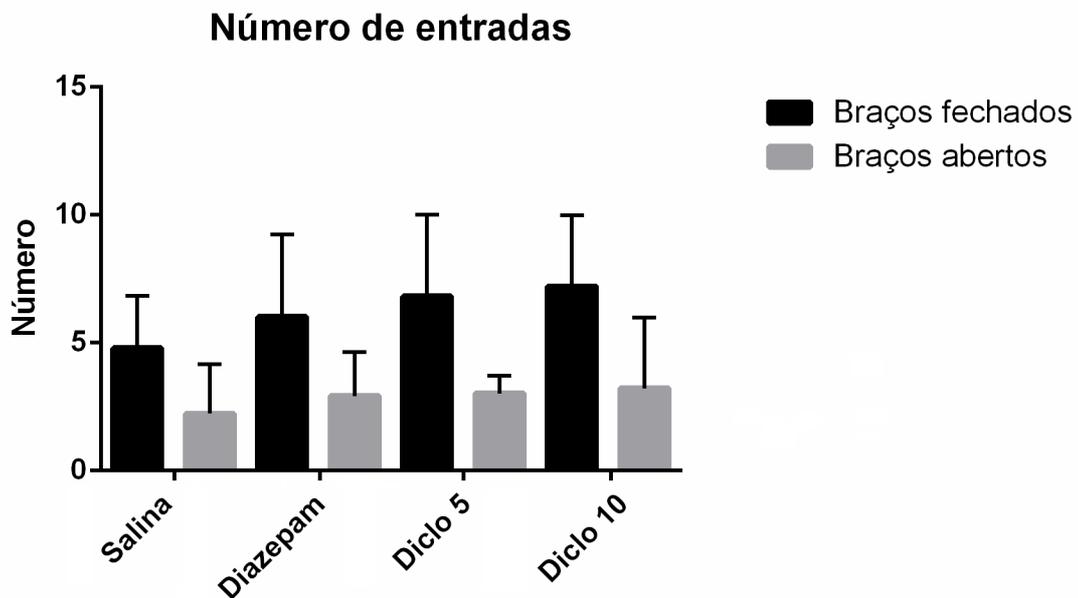


Figura 7 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio sobre o número de entradas nos braços na tarefa do Plus Maze. Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$; ANOVA seguida de Tukey).

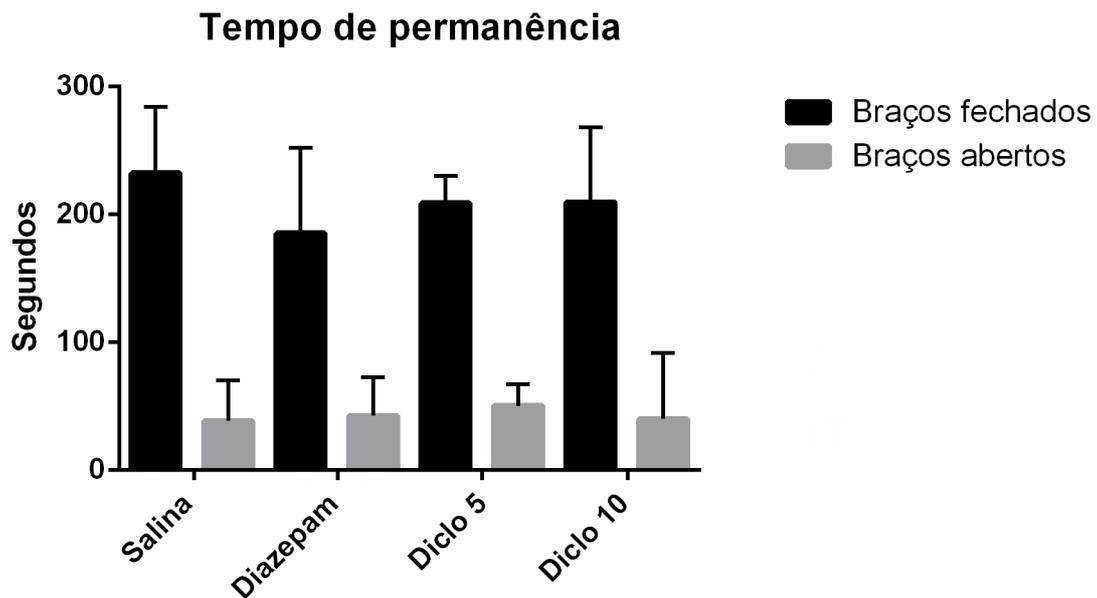


Figura 8 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio sobre o número de entradas nos braços na tarefa do Plus Maze. Os dados estão expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$; ANOVA seguida de Tukey).

Nas figuras 9 e 10, respectivamente, não observou-se diferença estatística significativa entre os grupos para IL-1 beta e IL-6 no soro dos animais (ANOVA seguido de pos hoc de Tukey, $p> 0,05$) . Porém, observou-se um aumento significativo do TNF-alfa no soro de animais tratados com a dose de 10 mg/Kg de diclofenaco de sódio em relação aos demais grupos (ANOVA seguido de pos hoc de Tukey, $*p<0,05$) (Figura 11).

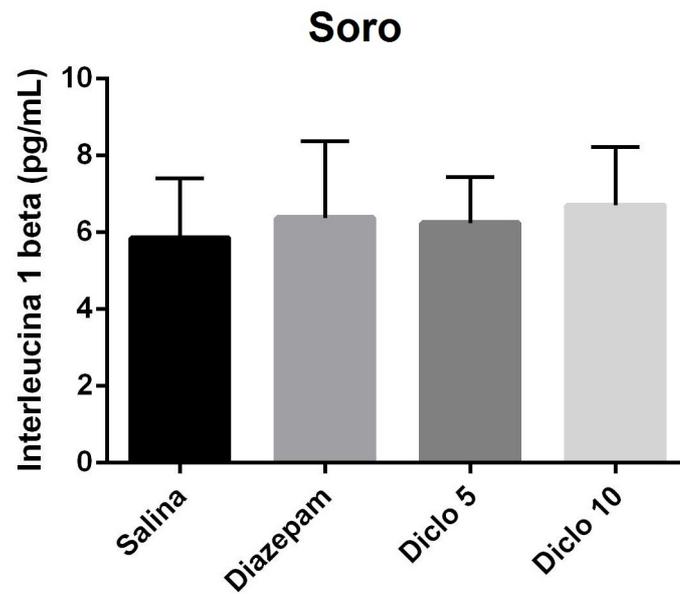


Figura 9 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio nos níveis de interleucina-1 beta em soro (n=5-6 por grupo). Os dados estão expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$; ANOVA seguida de Tukey).

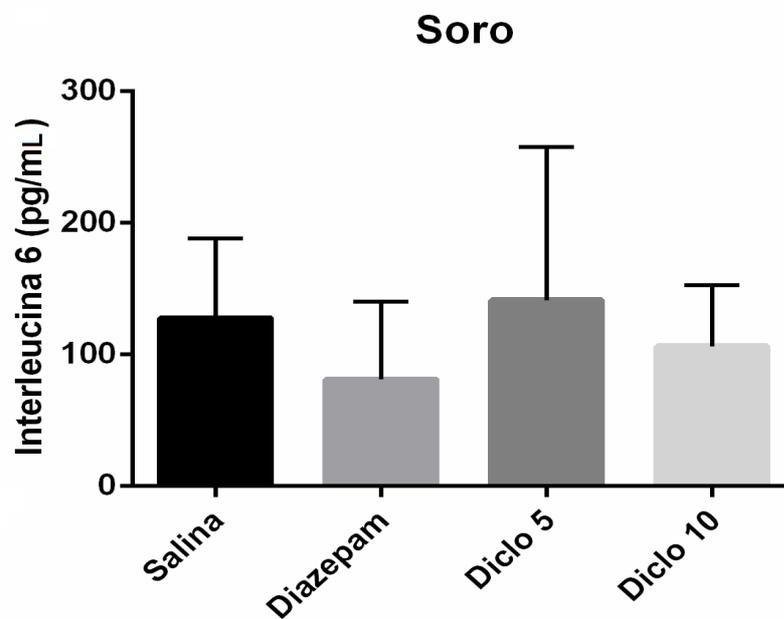


Figura 10 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio nos níveis de interleucina-6 em soro (n=5-6 por grupo). Os dados estão expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$; ANOVA seguida de Tukey).

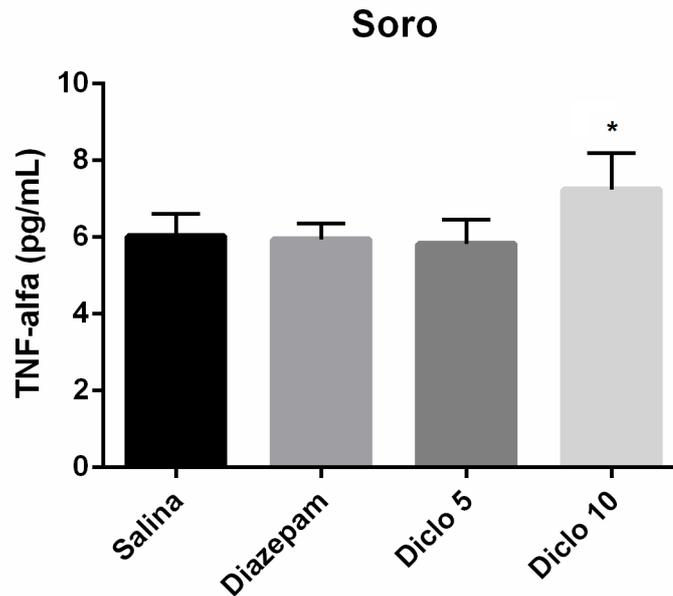


Figura 11 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio nos níveis de TNF-alfa em soro (n=5-6 por grupo). Os dados estão expressos como média±desvio padrão. *p=0,005 diferente do grupo controle (ANOVA seguida de Tukey).

Na avaliação dos níveis de IL-1 beta no hipocampo, não observou-se diferença estatística significativa (ANOVA seguida de Tukey, $p > 0,05$) (Figura 12). Entretanto, verificou-se uma diminuição significativa de TNF-alfa nos grupos tratados com diclofenaco de sódio 5 e 10 mg/Kg em relação ao grupo salina ($p < 0,05$) (Figura 13). Para a IL-6, verificou-se uma diminuição dessa interleucina no grupo tratado com diclofenaco 5 mg/Kg comparado aos demais grupos (ANOVA seguida de Tukey, * $p < 0,05$) (Figura 14).

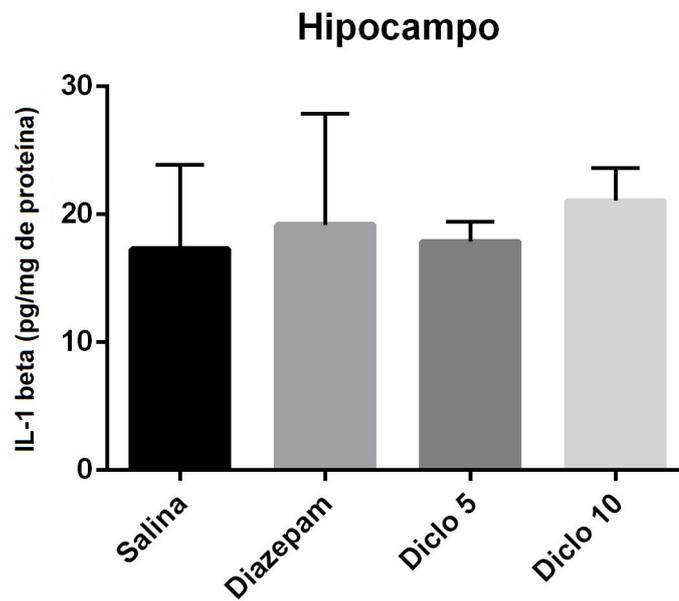


Figura 12 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio nos níveis de interleucina-1 beta em hipocampo (n=5-6 por grupo). Os dados estão expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$; ANOVA seguida de Tukey).

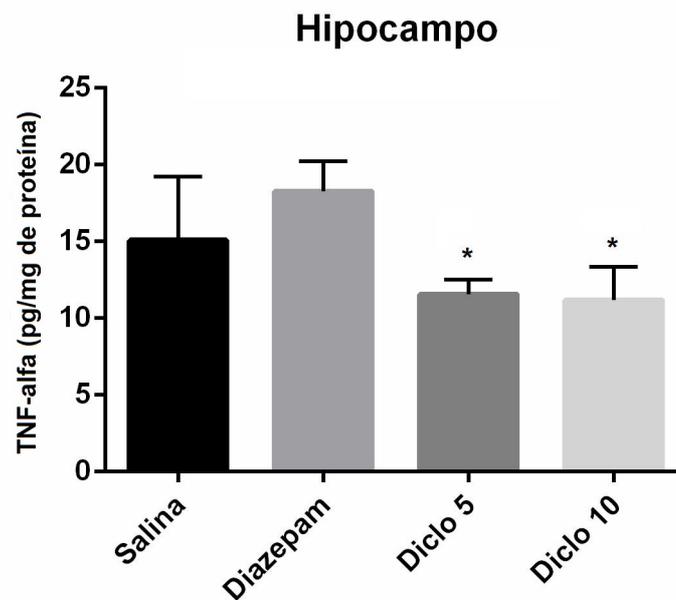


Figura 13 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio nos níveis de TNF-alfa em hipocampo (n=5-6 por grupo). Os dados estão expressos como média±desvio padrão. * $p=0,003$ diferente do grupo controle (ANOVA seguida de Tukey).

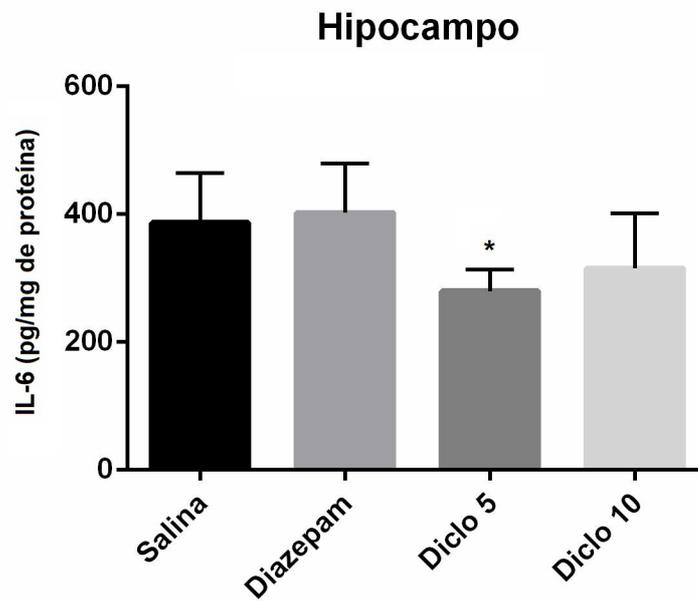


Figura 14 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio nos níveis de interleucina-6 em soro (n=5-6 por grupo). Os dados estão expressos como média±desvio padrão. *p=0,048 diferente do grupo controle (ANOVA seguida de Tukey). .

Quando avaliadas as interleucinas no córtex dos animais, não se observou diferenças estatísticas significativas em nenhum dos grupos, tanto para o TNF-alfa, quanto para a IL-1beta e IL-6 (ANOVA seguida de Tukey, $p > 0,05$) (Figuras 15, 16 e 17).

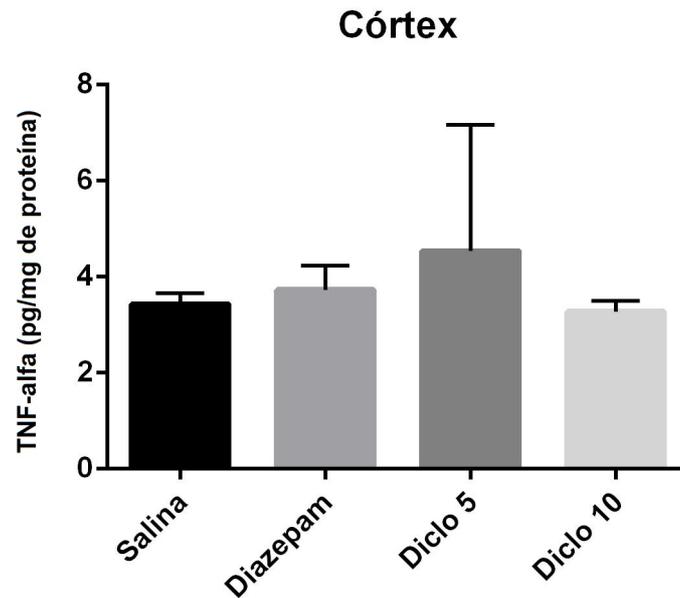


Figura 15 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio nos níveis de TNF-alfa no córtex (n=5-6 por grupo). Os dados estão expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$; ANOVA seguida de Tukey).

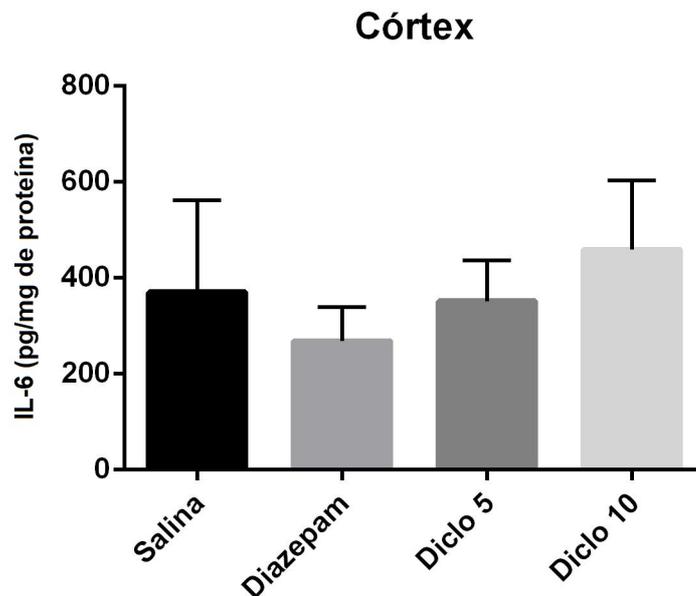


Figura 16 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio nos níveis de interleucina-6 no córtex (n=5-6 por grupo). Os dados estão expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$; ANOVA seguida de Tukey).

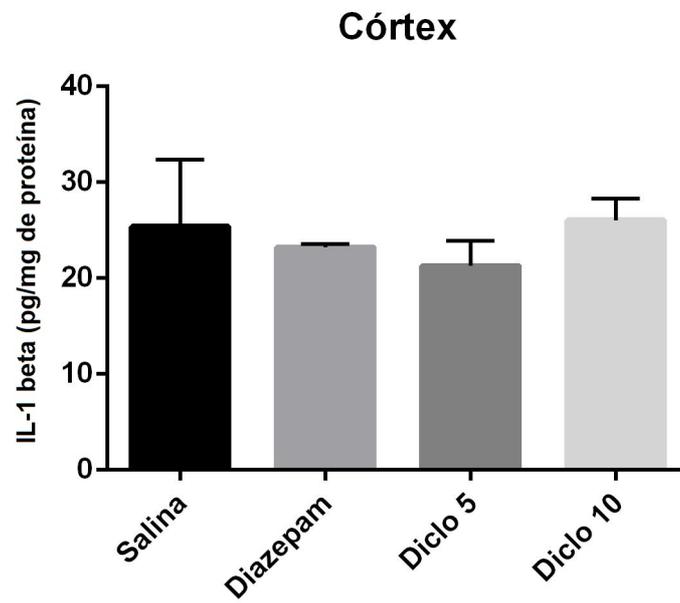


Figura 17 – Efeito do tratamento com diclofenaco de sódio nos níveis de interleucina-1 beta no córtex (n=5-6 por grupo). Os dados estão expressos como média±desvio padrão. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$; ANOVA seguida de Tukey).

9. DISCUSSÃO

Apesar dos avanços das pesquisas sobre a epilepsia, um número significativo de pacientes apresentam recorrência de episódios convulsivos, mesmo sob tratamento. Assim, torna-se importante elucidar os mecanismos patofisiológicos da epilepsia, focalizando o desenvolvimento de novas terapias. Neste contexto, tem sido relatado que a ocorrência de convulsões pode causar um aumento na expressão gênica de várias proteínas pró-inflamatórias, que conduz a dano neurológico. Por isso, alguns autores têm sugerido que os níveis plasmáticos de citocinas estão associados com a frequência e a gravidade das crises. As citocinas IL-1 , IL -6 e TNF-alfa tem recebido uma grande atenção a este respeito (ALAPIRTTI et al., 2009; GOUVEIA et al., 2015; HEIDA & PITTMAN, 2005; JANKOWSKY & PATTERSON, 2001; LEHTIMAKI et al., 2007; MLODZIKOWSKA-ALBRECHT et al., 2007; NOWAK et al., 2011).

Levando-se em consideração de que muitos pacientes com epilepsia apresentam distúrbios psiquiátricos, incluindo a depressão, ansiedade e déficit cognitivo, o primeiro passo do presente estudo foi avaliar o efeito do diclofenaco de sódio sobre alguns parâmetros comportamentais, antes da indução das convulsões nos ratos. Além disso, testes de comportamento são importantes para avaliar a segurança do uso de drogas. Inicialmente foi realizado o teste de campo aberto e avaliou-se o número de *groomings*, *crossings*, frequência de *rearings* e número de bolos fecais. O fármaco analisado nas diferentes doses não teve efeito sobre esses parâmetros, indicando que o tratamento não foi capaz de alterar a motivação, locomoção, capacidade de exploração ou ansiedade, respectivamente.

O teste de labirinto em cruz elevada foi utilizado no presente trabalho para melhor determinar o efeito dos diclofenaco de sódio sobre parâmetros de ansiedade nos ratos antes da indução das convulsões. Foram avaliados o número total de entradas e tempo gasto nos quatro braços do aparato. No entanto, os resultados mostram que não existe uma diferença estatisticamente significativa nos parâmetros avaliados entre os grupos. Portanto, é possível inferir que o fármaco em estudo não têm nenhum efeito sobre a ansiedade.

Com base nestas observações, o presente estudo teve como objetivo investigar os possíveis efeitos anticonvulsivantes de duas doses do anti-inflamatório diclofenaco de sódio. Assim, avaliou-se o efeito deste medicamento na severidade das crises convulsivas induzidas pelo PTZ nos ratos e observou-se que ambas as doses (5 e 10 mg/kg) reduziram a severidade das convulsões, de acordo com a escala de Racine, quando comparado ao grupo salina. Além disso, não houve diferença significativa entre os animais tratados com o diclofenaco de sódio e aqueles tratados com diazepam, o que indica que o diclofenaco foi eficiente como um agente anticonvulsivante. É também importante ressaltar que nenhum dos animais tratados com diazepam ou diclofenaco de sódio progrediram para o nível 4 da escala de Racine.

Em seguida, avaliou-se o efeito de diclofenaco de sódio sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias, ou seja, a IL-1beta , IL-6 e TNF-alfa no córtex, hipocampo e no soro de ratos após indução das crises convulsivas. No córtex, a droga não causou qualquer efeito sobre as citocinas avaliadas. Em relação ao hipocampo, não se observou diferença significativa nos níveis de IL-1beta , mas verificou-se uma importante redução nos níveis de TNF-alfa em resposta a ambas doses de diclofenaco sódico. Holtman e

colaboradores (2013) também encontraram resultados semelhantes em um estudo recente, um aumento de IL -6 após *status epilepticus* induzido pela pilocarpina, mas sem alterações nos níveis de IL-1 neste modelo.

O TNF-alfa é produzido por monócitos/macrófagos e tem um papel no aumento da atividade fagocítica de neutrófilos, ativação da fosfolipase A2, da produção de fator de ativação de plaquetas, a síntese das catecolaminas, a indução da febre, e ativação de mediadores inflamatórios, tais como proteínas de fase aguda e de outras citocinas incluindo IL-1 , IL-6 e IL-8 (BARTON et al., 1996, BEYAERT & FIERS, 1998). Estudos anteriores demonstraram que o aumento dos níveis de TNF-alfa pode estar relacionado com a fisiopatologia da epilepsia desde que a indução de convulsões causou aumento dos níveis de TNF-alfa em diferentes áreas cerebrais associados à neurodegeneração (KIM et al, 2013; VEZZANI et al, 2008). O aumento do TNF-alfa somente no soro também pode sugerir que vias neuroinflamatórias específicas são ativadas de forma, tempo e estrutura dependentes com papéis distintos na epileptogênese.

A dose mais baixa de diclofenaco de sódio também foi capaz de reduzir o teor de IL-6 no hipocampo. IL-6 é uma citocina pleiotrópica que atua em diferentes tipos de células, está envolvida na diferenciação de células B e é um potente indutor de proteínas de fase aguda (SPANGELO & GOROSPE, 1995). De acordo com Lehtimäki e colaboradores (2004), níveis de IL-6 estão aumentados no líquido cefalorraquidiano de pacientes após convulsões e quando estas são recorrentes os níveis de IL- 6 são ainda maiores. A elevação dos níveis desta citocina pode danificar estruturas cerebrais uma vez que estudos demonstraram que camundongos transgênicos que superexpressam IL-6 apresentam disfunção neurológica (CAMPBELL et al., 1993). Por conseguinte, a

observação de que o diclofenaco de sódio reduz o teor de TNF-alfa e IL-6 é muito importante, uma vez que pode evitar um dano ao tecido hipocampal em pacientes com epilepsia.

Embora não se tenha observado alterações no soro de IL-1beta e IL-6, entre os grupos, verificou-se um aumento significativo no soro de TNF-alfa em ratos tratados com a dose mais elevada de diclofenaco de sódio. Este resultado foi inesperado, uma vez que este medicamento geralmente inibe a produção de TNF-alfa no soro. No entanto, tem sido relatado que os níveis de IL-10 aumentam 24-72 horas após convulsões, provavelmente como um mecanismo de compensação, uma vez que pode ter efeito anticonvulsivante por suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF-alfa (YOUN et al., 2012). No entanto, o mecanismo de ação de diclofenaco de sódio é a inibição da biossíntese de prostaglandina, em que é responsável pelo aumento da expressão de IL-10 (KIM et al., 2008). Assim, os níveis reduzidos de prostaglandina induzida por diclofenaco sódico poderia suprimir o aumento dos níveis de IL-10 após convulsões e, conseqüentemente, inibir a diminuição dos níveis de TNF-alfa no soro. Assim, o diclofenaco de sódio, provavelmente, não aumentou os níveis séricos de TNF-alfa mas sim inibiu a sua diminuição.

Em resumo, o presente trabalho revelou que o diclofenaco de sódio diminui a severidade das convulsões; reduz o TNF-alfa e os níveis de IL-6 no hipocampo; e, surpreendentemente, aumenta os níveis de TNF-alfa no soro de ratos após a administração de PTZ . Numerosas citocinas, incluindo o TNF-alfa e IL-6 podem ter efeitos sobre a função neuronal e da glia, conduzindo a neurotoxicidade. Assim, a descoberta de que o diclofenaco de sódio reduz estes níveis de citocinas no hipocampo

associado a uma redução da complexidade das convulsões pode oferecer um benefício terapêutico significativo para os pacientes que sofrem de epilepsia. A dose mais eficaz foi de 5 mg/kg, uma vez que foi capaz de reduzir tanto o conteúdo de TNF-alfa como o de IL-6 no hipocampo.

Estes efeitos benéficos do diclofenaco de sódio no hipocampo são muito importantes já que a presente estrutura do cérebro parece ser a geradora e/ou a propagadora da epilepsia do lobo temporal. Além disso, a epilepsia não tratável do lobo temporal pode induzir neuropatias incluindo esclerose do hipocampo (DUNCAN , 1997). No entanto, mais estudos são necessários para avaliar a real aplicabilidade do diclofenaco de sódio como um fármaco anticonvulsivante ou como uma terapia adjuvante para epilepsia.

10. CONCLUSÃO

O tratamento com o diclofenaco de sódio, no modelo de abrasamento induzido pelo PTZ, diminuiu a severidade das convulsões e os níveis de interleucina-6 e TNF-alfa no hipocampo dos animais tratados com as doses de 5mg/kg e 10 mg/kg. Novos estudos são necessários para investigar uma nova abordagem terapêutica no tratamento da epilepsia com este anti-inflamatório não-esteroidal.

REFERÊNCIAS

- Akman, C. I., HU, Y., FU, D., Holmes, G. L. The influence of cognitive reserve on seizure-induced injury. **Epilep. & Beh.**, v. 4, p. 435-440. 2003.
- Alapirtti, T., Rinta, S., Hulkkonen, J., Makinen, R., Keranen, T., Peltola, J. Interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1beta production in patients with focal epilepsy: a video-EEG study. **J. Neurol. Sci.**, v. 280, p. 94–97. 2009.
- Allan, S. M., Rothwell, N. J. Cytokines and acute neurodegeneration *Nat. Rev. Neurosci.*, v. 2, p. 734–744. 2001.
- Asensio, V. C., Campbell, I. L. Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. **Trends Neurosci.**, v. 11, p. 504-512. 1999.
- Avanzini, G., Franceschetti, S. Cellular biology of epileptogenesis. **The Lancet: Neurol.**, vol 2. 2003.
- Barger, S. W., Harmon, A. D. Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. **Nature**, v. 388, p. 878-881. 1997.
- Barton, M. H., Collatos, C., Moore, J. N. Endotoxin induced expression of tumor necrosis factor, tissue factor and plasminogen activator inhibitor activity by peritoneal macrophages. **Equine Vet.**, v.28, p. 382–389. 1996.

- Becker, A., Grecksch, G., Ruthrich, H.I., Pohle, W., Marx, B., Matthies, H. Kindling and its consequences on learning in rats. **Behav. Neural Biol.**, v. 57, p. 37-43. 1992.
- Beyaert, R., Fiers, W. Tumor necrosis factor and lymphotoxin, in: Mire-Sluis, A., Thorpe, R. (Eds.), *Citokines*. **Acad. press**, p. 335–360. 1998.
- Brophy, G. M., Bell, R., Claassen, J., Alldredge, B., Bleck, T. P., Glauser, T., Laroche, S. M., Riviello, J. J., Shutter, L., Sperling, M. R., Treiman, D. M., Vespa, P. M. Guidelines for the evaluation and management of status epilepticus. Neurocritical Care Society Status Epilepticus Guideline Writing Committee. **Neurocrit. Care.**, v. 17, p. 3-23. 2012.
- Campbell, I. L., Abraham, C. R., Masliah, E., Kemper, P., Inglis, J. D., Oldstone, M. B., Mucke, L. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 90, p. 10061–10065. 1993.
- Cartier, L., Hartley, O., Dubois-Dauphin, M., Krause, K. H. Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. **Brain Res. Rev.**, v. 48, p. 16-42. 2005.
- Choi, J., Min, H. J., Shin, J. S. Increased levels of HMGB1 and pro-inflammatory cytokines in children with febrile seizures. **J. Neuroinflam.**, v. 11, p. 135. 2011.
- Choi, J., Nordli, D. R., Alden, T. D., DiPatri, A., Laux, L., Kelley, K., Rosenow, J., Schuele,

S. U., Rajaram, V., Koh, S. Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy. **J. Neuroinflam.**, v. 19, p. 6:38. 2009.

Chu, C. Q., Brennan, F. M., Maini, R. N., Feldmann M. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 1517–1527. 1994.

Coitinho, A. S., Costa, B., dos Santos, M., Fank, B. Vitis labrusca leaf extract prevents pentylenetetrazol-induced oxidative damage but not seizures in rats. **Cell. And Mol. Biol.**, v. 61, p. 39 – 42. 2015.

Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. **Epilepsia**, v. 30, p. 389–399. 1989.

Crespel, A., Coubes, P., Rousset, M. C., Brana, C., Rougier, A., Rondouin, G., Bockaert, J., Baldy-Moulinier, M., Lerner-Natoli, M. Inflammatory reactions in human medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Brain Res.**, v. 952, p. 159–169. 2002.

Crotti, A., Glass, C. K. The choreography of neuroinflammation in Huntington's disease. **Trends Immunol.**, p. 1471-4906. 2015.

Curfs, J. H., Meis, J. F., Hoogkamp-Korstanje, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, p. 742-780. 1997.

- Da Costa, J. C., Palmieri, A., Yacubian, E. M. T., Cavalheiro, E. A. **Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias: Aspectos Clínicos e Cirúrgicos**. São Paulo: Lemos Editorial, p. 33-35. 1998.
- Darnell, J., Lodish, H.; Baltimore, D. **Nerve Cells and the Electric Properties of Cell Membranes**. In DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D., ed. lit. – Molecular Cell Biology. 2nd ed. New York: Scientific American Books, p.763-814. 1990.
- De Simoni, M. G., Perego, C., Ravizza, T., Moneta, D., Conti, M., Marchesi, F., De Luigi, A., Garattini, S., Vezzani, A. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. **Eur. J. Neurosci.**, v. 12, p. 2623–2633. 2000.
- Dinarello, C. A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. **Blood**, v. 77, p. 1627–52. 1991.
- Dube, C., Vezzani, A., Behrens, M., Bartfai, T., Baram, T. Z. Interleukin-1beta contributes to the generation of experimental febrile seizures. **Ann. Neurol.**, v. 57, p. 152–155. 2005.
- Duncan, J. S. Imaging and epilepsy. **Brain**, v. 120, p. 339–377. 1997.
- Duncan, R. The withdrawal of antiepileptic drugs in patients with non-epileptic seizures: safety considerations. **Expert Opin. Drug. Saf.**, v. 5, p. 609-13. 2006.

- Engel, J. Jr., Wiebe, S., French, J., et al. Practice parameter: temporal lobe and localized neocortical resections for epilepsy. **Neurology**, v. 44, p. 741-751. 2003.
- Feuerstein, G. Z., Wang, X., Barone, F. C. Inflammatory gene expression in cerebral ischemia and trauma. Potential new therapeutic targets. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 825, p. 179–193. 1997.
- Fisher, R. S. Commentary: Operational Definition of Epilepsy survey. **Epilepsia**, v. 55, p. 1688. 2014.
- Fisher, R. S., Boas, W. V. E., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel Jr., J. Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Internat. League Against Epilep.**, v. 46, p. 470–472. 2005.
- Foresti, M. L., Arisi, G. M., Katki, K., Montañez, A., Sanchez, R. M., Shapiro, L. A. Chemokine CCL2 and its receptor CCR2 are increased in the hippocampus following pilocarpine-induced status epilepticus. **J. Neuroinflam.**, v24, p. 6:40. 2009.
- Geginat, J., Campagnaro, S., Sallusto, F., Lanzavecchia, A. TCR-independent proliferation and differentiation of human CD4+ T cell subsets induced by cytokines. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 512, p. 107–112. 2002.
- Glynn, I. M. All hands to the sodium pump. **J. Physiol.**, v. 462, p. 1–30. 1993.

- Goddard, G. V. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. **Nature**, v. 214, p. 1020–1021. 1967.
- Goddard, G. V., McIntyre, D. C., Leech, C. K. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. **Exper. Neurol.**, v. 25, p.295-330. 1969.
- Gorter, J. A., van Vliet, E. A., Aronica, E., Breit, T., Rauwerda, H., Lopes da Silva, F. H., Waldman, W. J. Potential new antiepileptogenic targets indicated by microarray analysis in a rat model for temporal lobe epilepsy. **J. Neurosci.** v. 26, p. 11083–11110. 2006.
- Gouveia, T. L., Vieira de Sousa, P. V., de Almeida, S. S., Nejm, M. B., Vieira de Brito, J. M., Cysneiros, R. M., de Brito. M. V., Salu, B. R., Oliva, M. L., Scorza, F. A., Naffah-Mazzacoratti Mda, G. **Epilepsy Behav.**, v. 51, p. 300-305. 2015.
- Guilhoto, L. M., Loddenkmper, T., Gooty, V.D., Rotenberger, A., Takeoka, M., Duffy, F. H., Coulter, D., Urion, D., Bourgeois, B. F., Kothare, S.V. Experience with lacosamide in a series os children with drug-resitant focal epilepsy. **Pediatr. Neurol.**, v. 44, p. 414-9. 2011.
- Gupta, Y. K., Veerendra Kumar, M. H., Srivastava, A. K. Effect of Centella asiatica on pentylenetetrazole-induced kindling, cognition and oxidative stress in rats. **Pharm. Bioche. and Beha.**, v. 74, p. 579-85. 2003.

- Haspolat, S., Mihci, E., Coskun, M., Gumuslu, S., Ozben, T., Yegin, O. Interleukin-1beta, tumor necrosis factor-alpha, and nitrite levels in febrile seizures. **J. Child Neurol.**, v. 17, p. 749–751. 2002.
- Heida, J. G., Pittman, Q. J. Causal links between brain cytokines and experimental febrile convulsions in the rat. **Epilepsia**, v. 46, p. 1906–1913. 2005.
- Hensley, K. Neuroinflammation in Alzheimer's disease: mechanisms, pathologic consequences, and potential for therapeutic manipulation. **J. Alzheimers Dis.**, v. 21, p. 1-14. 2010.
- Hirsch, E. C., Vyas, S., Hunot, S. Neuroinflammation in Parkinson's disease. **Parkinsonism Relat. Disord.**, p. 210-2. 2012.
- Hirschowitz, B. I. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the gut. **South. Med. J.**, v. 89, p. 259-63. 1996.
- Ho, Y. H., Lin, Y. T., Wu, C. W., Chao, Y. M., Chang, A. Y., Chan, J. Y. Peripheral inflammation increases seizure susceptibility via the induction of neuroinflammation and oxidative stress in the hippocampus. **J. Biomed. Sci.**, v. 24, p.22:46. 2015.
- Holtman, L., Van Vliet, E. A., Aronica, E., Wouters, D., Wadman, W. J., Gorter, J. A. Blood plasma inflammation markers during epileptogenesis in post-status epilepticus rat model for temporal lobe epilepsy. **Epilepsia.**, v. 54, p. 589-595. 2013.

- Hubner, C. A., Jentsch, T. J. Ion channel diseases. **Hum. Mol. Genet.**, v. 11, p. 2435-45. 2002.
- Hulkkonen, J., Koskikallio, E., Rainesalo, S., Keränen, T., Hurme, M., Peltola, J. The balance of inhibitory and excitatory cytokines is differently regulated in vivo and in vitro among therapy resistant epilepsy patients. **Epilepsy Res.**, v. 59, p. 199–205. 2004.
- Izquierdo, I. Different forms of posttraining memory processing. **Beha. and Neural Biol.**, v. 51, p. 171-202. 1989.
- Jaleco, S., Swainson, L., Dardalhon, V., et al. Homeostasis of naive and memory CD4+ T cells: IL-2 and IL-7 differentially regulate the balance between proliferation and Fas-mediated apoptosis. **J. Immunol.**, v. 171, p. 61–68. 2003.
- James, O., Namara, M. C., Wada, J. A. Kindling model. IN: **Epilepsy: a comprehensive textbook**, eds. J. Engel Jr, T. A., Pedley, p. 419-425, Lippincott-Raven Publishers, 1997.
- Jankowsky, J. L., Patterson, P. H. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. **Prog. Neurobiol.**, v. 63, p. 125–149. 2001.
- Johnson, E. A., Dao, T. L., Guignet, M. A., Geddes, C. E., Koemeter-Cox, A. I., Kan, R. K. Increased expression of the chemokines CXCL1 and MIP-1 α by resident brain cells precedes neutrophil infiltration in the brain following prolonged soman-

induced status epilepticus in rats. **J. Neuroinflammation.**, v.2, p. 8:41. 2011.

Jørgensen, P. L. Structure and molecular mechanisms of the Na,K-pump. **Monovalent Cat. in Biol. Syst.**, p. 117–154. 1990.

Kan, A. A., de Jager, W., de Wit, M., Heijnen, C., van Zuiden, M., Ferrier, C., van Rijen, P., Gosselaar, P., Hessel, E., van Nieuwenhuizen, O., de Graan, P. N. Protein expression profiling of inflammatory mediators in human temporal lobe epilepsy reveals co-activation of multiple chemokines and cytokines. **J. Neuroinflam.**, v. 30, p.9:207. 2012.

Kim, H. Y., Kim, J. R., Kim, H. S. Upregulation of Lipopolysaccharide-Induced Interleukin-10 by Prostaglandin A1 in Mouse Peritoneal Macrophages. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18, p. 1170–1178. 2008.

Kim, J. E., Ryu, H. J., Kang, T. C. P2X7 receptor activation ameliorates CA3 neuronal damage via a tumor necrosis factor- α -mediated pathway in the rat hippocampus following status epilepticus. **J. Neuroinflam.**, v. 2, p. 8:62. 2011.

Kim, J. E., Ryu, H. J., Kang, T. C. Status epilepticus induces vasogenic edema via tumor necrosis factor- α / endothelin-1-mediated two different pathways. **PloS One.**, v. 8, p. 74458. 2011.

Kleen, J. K., Holmes, G. H. Brain inflammation initiates seizures. **Nat. Med.**, v. 14, p. 1309–1310. 2008.

- Kwan, P., Brodie, M. J. Early Identification Of Refractory Epilepsy. **The New Engl. J. of Med.**, p. 342. 2000.
- Lee, T-S., Mane, S., Eid, T., Zhao, H., Lin, A., Guan, Z., Kim, J. H., Schweitzer, J., King-Stevens, D., Weber, P., Spencer, S. S., Spencer, D. D., de Lanerolle, N. C. Gene expression in temporal lobe epilepsy is consistent with increased release of glutamate by astrocytes. **Mol. Med.**, v. 13, p. 1–13. 2007.
- Lehtimäki, K. A., Keränen, T., Huhtala, H., Hurme, M., Ollikainen, J., Honkaniemi, J., Palmio J., Peltola J. Regulation of IL-6 system in cerebrospinal fluid and serum compartments by seizures: the effect of seizure type and duration. **J. Neuroim.**, v. 152, p. 121–125. 2004.
- Lehtimäki, K. A., Keränen, T., Palmio, J., Mäkinen, R., Hurme, M., Honkaniemi, J., Peltola, J. Increased plasma levels of cytokines after seizures in localization-related epilepsy. **Acta Neurol. Scand.**, v. 116, p. 226–230. 2007.
- Li, Y., Liu, L., Kang, J., Sheng, J. G., Barger, S. W., Mrak, R. E., Griffin, W. S. Neuronal-glia interactions mediated by interleukin-1 enhance neuronal acetylcholinesterase activity and mRNA expression. **J. Neurosci.**, v. 20, p. 149-55. 2000.
- Lian, X. Y.; Zhang, Z. Z.; Stringer, J. L. Anticonvulsant activity of ginseng on seizures induced by chemical convulsants. **Epilepsia.**, v. 46, p. 15-22. 2005.

Lin, E., Calvano, S. E., Lowry, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, v. 127, p. 117-126. 2000.

López-Hernández, E., Bravo, J., Solís H. Epilepsia y antiepilépticos de primera y segunda generación. Aspectos básicos útiles en la práctica clínica. **Rev. Fac. Med. UNAM**, p. 48. 2005.

López-Hernandez, N., Espinosa-Martinez, J. A descriptive analysis os ambulatory neurological care in Elche, alicante. **Rev. Neurol.**, p. 16-31. 2007.

Löscher, W. Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. **Trends Pharmacol., Sci** v. 23, p. 113–118. 2002.

Man, S., Ubogu, E. E., Ransohoff, R. M. Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale. **Brain Pathol.**, v. 17, p. 243–250. 2007.

Manley, N. C., Bertrand, A. A., Kinney, K. S., Hing, T. C., Sapolsky, R. M. Characterization of monocyte chemoattractant protein-1 expression following a kainate model of status epilepticus. **Brain Res.**, p. 138–143. 2007.

Marchetti, R. L., Neto, G. J. Epidemiologic aspects and relevance of mental disorders associated ith epilepsy. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 27, p. 323-8. 2005.

- Marchi, N., Angelov, L., Masaryk, T., Fazio, V., Granata, T., Hernandez, N., Hallene, K., Diglaw, T., Franic, L., Najm, I., Janigro, D. Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. **Epilepsia**, v. 48, p. 732–742. 2007.
- Marchi, N., Tierney, W., Alexopoulos, A. V., Puvenna, V., Granata, T., Janigro, D. The etiological role of blood-brain barrier dysfunction in seizure disorders. **Cardiovasc. Psychiatry Neurol.**, p. 2415. 2011.
- Mason, C. R., Cooper, R. M. A permanent changes in convulsive threshold normal and brain damage rats with repeated small doses of pentylenetetrazol. **Epilepsia**, v. 13, p. 663-674. 1972.
- Masters, S. L., Gerlic, M., Metcalf, D., Preston, S., Pellegrini, M., O'Donnell, J. A., McArthur, K., Baldwin, T. M., Chevrier, S., Nowell, C. J., Cengia, L. H., Henley, K. J., Collinge, J. E., Kastner, D. L., Feigenbaum, L., Hilton. D. J., Alexander, W. S., Kile, B. T., Croker, B. A. NLRP1 inflammasome activation induces pyroptosis of hematopoietic progenitor cells. **Immunity**, v. 37, p. 1009-23. 2012.
- McLaren, J. E., Michael, D. R., Ashlin, T. G., Ramji, D. P. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: Implications for cardiovascular disease therapy. **Prog. Lipid Res.**, v. 50, p. 331–347. 2011.
- McMorrow, J. P., Murphy, E. P. Inflammation: a role for NR4A orphan nuclear receptors? **Biochem. Soc. Trans.**, v. 39, p. 688-93. 2011.

McNamara, J. O. Cellular and Molecular Basis of Epilepsy. **The J. of Neuros.**, v. 14, p. 3413-3425. 1994.

McNamara, J. O., Bonhaus, D. W., Shin, C., Crain, B. J., Gellman, R. J., Giancchino, J. L. The kindling model of epilepsy: a critical review. **CRC Critical Rev. Clin. Neurobiolo.**, v. 1, p. 341-391. 1985.

Meldrum, B; Chapman, A. **Epileptic seizures and epilepsy. IN: Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects ads.** G. J. Siegel, B. W. Agranoff, R. W. Alberts, K. Fisher, M. D. Usher, p. 755-768, 6ª edição. Lipincott-Raven Publishers. 1998.

Meldrum, B. Amino acids neurotransmitters in new approaches to anticonvulsant drug action. **Epilepsia**, v. 22, p. 140-149. 1984.

Meldrum, B. S. The revised operational definition of generalised tonic-clonic (TC) status epilepticus in adults. **Epilepsia**, v. 40, p. 123-4. 1999.

Meldrum, B. S., Rogawski, M. A. Molecular Targets for Antiepileptic Drug Development. **Neurotherapeutics: The J. of the American Soc. for Exp.**, v. 4, p. 18.61. 2007.

Mlodzikowska-Albrecht, J., Steinborn, B., Zarowski, M. Cytokines, epilepsy and epileptic drugs—is there a mutual influence? **Pharmacol. Rep.**, v. 59, p. 129–138. 2007.

- Montgomery, S. L., Bowers, W. J. Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. **J. Neuroim. Pharmacol.**, v. 7, p. 42–59. 2012.
- Musto, A. E., Samii, M. Platelet-activating factor receptor antagonism targets neuroinflammation in experimental epilepsy. **Epilepsia**, v. 52, p. 551-61. 2011.
- Nowak, M., Bauer, S., Haag, A., Cepok, S., Todorova-Rudolph, A., Tackenberg, B., Norwood, B., Oertel, W. H., Rosenow, F., Hemmer, B., Hamer, H. M. Interictal alterations of cytokines and leukocytes in patients with active epilepsy. **Brain Behav. Immun.**, v. 25, p. 423–428. 2011.
- Pellow, S., Chopin, P., File, S. E., Briley, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J. Neurosci. Methods.**, v. 14, p. 149-167. 1985.
- Peltola, J., Hurme, M., Miettinen, A., Keranen, T. Elevated levels of interleukin-6 may occur in cerebrospinal fluid from patients with recent epileptic seizures. **Epilepsy Res.**, v. 31, p. 129–133. 1998.
- Pitkänen, A., Kharatishvili, I., Karhunen, H., Lukasiuk, K., Immonen, R., Nairismägi, J., Gröhn, O., Nissinen, J. Epileptogenesis in experimental models. **Epilepsia**, v. 48, p. 13-20. 2007.

- Racine, R.; Okujava, V.; Chipashvili, S. Modification of seizure activity by electrical stimulation. 3. Mechanisms. **Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.**, v. 32, p. 295-9. 1972.
- Rao, R. S, Medhi, B., Saikia, U. N., Arora, S. K., Toor, J. S., Khanduja, K. L., Pandhi, P. Experimentally induced various inflammatory models and seizure: understanding the role of cytokine in rat. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, v. 10, p. 760-767. 2008.
- Ravizza, T., Balosso, S., Vezzani, A. Inflammation and prevention of epileptogenesis. **Neurosci. Lett.**, v. 27, p. 223-230. 2011.
- Ravizza, T., Gagliardi, B., Noe, F., Boer, K., Aronica, E., Vezzani, A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: Evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. **Neurobiol. Dis.**, v. 29, p. 142–160. 2008.
- Relton, J. K., Rothwell, N. J. Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat. **Brain Res. Bull.**, v. 29, p. 243–246. 1992.
- Rodrigues, A. D., Scheffel, T. B., Scola, G., dos Santos, M., Fank, B., Coitinho, A. S, Salvador, M. Purple grape juices prevent pentylenetetrazol-induced oxidative damage in the liver and serum of Wistar rats. **Nutr. Res.**, p. 120 – 125. 2013.
- Rogawski, M. A., Porter, R. J. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds.

Pharmacol. Rev., v. 42, p. 223-86. 1990.

Rojas, A., Jiang, J., Ganesh, T., Yang, M. S., Lelutiu, N., Gueorguieva, P., Dingledine, R.
Cyclooxygenase-2 in epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, p. 17-25. 2014.

Roux, C., Chevassus, H., Farret, A., Costa, F., Petit, P., Galtier, F. Selecting healthy
volunteers in specific populatuions: a retrospective analysis of clinical and
laboratory screening. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 24, p. 121-7. 2009.

Sander, J. W., Hart, Y. M. **Epilepsia: um guia prático**. Merrit Publishing Internacional.
1999.

Santos, L.; Guterres, S. S.; Bergold, A. M. Preparação e avaliação de cápsulas gastro-
resistentes de diclofenaco de sódio. **Latin Americ. J. of Pharm.**, v. 26, n. 3, p.
355-361. 2007.

Scheffer, I. E. Genetic testing epilpesy: what should you be doing? **Epilepsy**, v. 11, p. 107-
11. 2011.

Scott, R. A., Lhatoo, S. D., Sander, J. W. The treatment os epilepsy in developing
countries: where do we go from here? **Bull World Heal. Organ.**, v. 79, p. 344-51.
2003.

Seddon, B., Tomlinson, P., Zamoyska, R. Interleukin 7 and T cell receptor signals regulate
homeostasis of CD4 memory cells. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 680–686. 2003.

- Seiffert, E., Dreier, J. P., Ivens, S., Bechmann, I., Tomkins, O., Heinemann, U., Friedman, A. Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. **J. Neurosci.**, v. 24, p. 7829–7836. 2004.
- Shapiro, L. A., Wang, L., Ribak, C. E. Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats. **Epilepsia**, v. 49, p. 33–41. 2008.
- Shorvon, S., Ferlisi, M. The treatment of super-refractory status epilepticus: a critical review of available therapies and a clinical treatment protocol. **Brain**, v. 13, p. 2802-18. 2011.
- Simonic, A.; Laginja, J.; Varljen, J.; Zupan, G.; Erakovic, V. Lithium plus pilocarpine induced status epilepticus – biochemical changes. **Neuros. Res.**, v. 36, p. 157-166. 2000.
- Sinha, S., Patil, S. A., Jayalekshmy, V., Satishchandra, P. Do cytokines have any role in epilepsy? **Epilepsy Res.**, v. 82, p. 171-176. 2008.
- Skou, J. C. The energy coupled exchange of Na⁺ for K⁺ across the cell membrane. The Na⁺, K⁽⁺⁾-pump. **FEBS Lett.**, v. 268, p. 314–324. 1990.
- Skou, J. C., Esmann, M. The Na,K-ATPase. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 24, p. 249–261. 1992.

- Smith, K. A. Interleukin-2: inception, impact, and implications. **Science**, v. 240, p. 1169-1176. 1988.
- Spangelo, B. L. Gorospe, W. C. Role of the cytokines in the neuroendocrine-immune system axis. **Front. Neuroendocrinol.**, v. 16, p. 1–22. 1995.
- Spencer, S. S. When should temporal-lobe epilepsy be treated surgically? **Lancet Neurol.** v. 6, p. 375-82. 2002.
- Spooren, A., Kolmus, K., Laureys, G., Clinckers, R., De Keyser, J., Haegeman, G., Gerlo, S. Interleukin-6, a mental cytokine. **Brain Res. Rev.**, v. 67, p. 157-83. 2011.
- Sriram, K., O'Callaghan, J. P. Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. **J. Neuroim. Pharmacol.**, v. 2, p. 140-53. 2007.
- Stamatovic, S. M., Shakui, P., Keep, R. F., Moore, B. B., Kunkel, S. L., Van Rooijen, N., Andjelkovic, A. V. Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v. 5, p. 593-606. 2005.
- Sutula, T., He, X. X., Cavazos, J., Scott, G. Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. **Science**, v. 239, p. 1147-1150. 1988.
- Sztriha, L., Joó, F., Szerdahelyi, P., Eck, E., Koltai, M. Effects of dexamethasone on brain edema induced by kainic acid seizures. **Neuroscience**, v. 17, p. 107-14. 1986.

- Tan, C. C., Zhang, J. G., Tan, M. S., Chen, H., Meng, D. W., Jiang, T., Meng, X. F., Li, Y., Sun, Z., Li, M. M., Yu, J. T., Tan, L. NLRP1 inflammasome is activated in patients with medial temporal lobe epilepsy and contributes to neuronal pyroptosis in amygdala kindling-induced rat model. **J. Neuroinflam.**, v. 28, p. 12:18. 2015.
- Taniguchi, K., Yamamoto, S., Hitomi, E., Inada, Y., Suyama, Y., Sugioka, T., Hamasaki, Y. Interleukin 33 is induced by tumor necrosis factor alpha and interferon gamma in keratinocytes and contributes to allergic contact dermatitis. **J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.**, v. 23, p. 428-34. 2013.
- Tocco, G., Freire-Moar, J., Schreiber, S. S., Sakhi, S. H., Aisen, P. S., Pasinetti, G. M. Maturational regulation and regional induction of cyclooxygenase-2 in rat brain: implications for Alzheimer's disease. **Exp. Neurol.**, p. 339–349. 1997.
- Toulmond, S., Parnet, P., Linthorst, A. C. When cytokines get on your nerves: cytokine networks and CNS pathologies. **Trends Neurosci.**, v. 19, p. 409–410. 1996.
- Turrin, N. P., Rivest, S. Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy. **Neurobiol. Dis.**, v. 16, p. 321–334. 2004.
- Van Vliet, E. A., da Costa Araújo, S., Redeker, S., van Schaik, R., Aronica, E., Gorter, J. A. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. **Brain**, v. 130, p. 521–534. 2007.

Vezzani, A. Inflammation and epilepsy. **Epilepsy Curr.**, v. 5, p. 1–6. 2005.

Vezzani, A., Balosso, S., Ravizza, T. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. **Brain Behav. Immun.**, v. 22, p. 797–803. 2008.

Vezzani, A., Granata, T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. **Epilepsia**, v. 46, p. 1724-43. 2005.

Vezzani, A., Maroso, M., Balosso, S., Sanchez, M. A., Bartfai, T. IL-1 receptor/ Toll-like receptor signalling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures. **Brain. Behav. Immun.**, v. 25, p. 1281–1289. 2011.

Virta, M., Hurme, M., Helminen, M. Increased plasma levels of pro and anti-inflammatory cytokines in patients with febrile seizures. **Epilepsia**, v. 43, p. 920–923. 2002.

Walker, L., Sills, G. J. Inflammation and epilepsy: the foundations for a new therapeutic approach in epilepsy? **Epilepsy Curr.**, v. 12, p. 8-12. 2012.

Wallenstein, M. C. Attenuation of penicillin models of epilepsy by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Exp. Neurol.**, v. 98, p. 152–160. 1987.

Wang, C. X., Shuaib, A. Involvement of inflammatory cytokines in central nervous system injury. **Prog. Neurobiol.**, v. 67, p. 161–172. 2002.

- Wang, S., Cheng, Q., Malik, S., Yang, J. Interleukin-1beta inhibits gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor current in cultured hippocampal neurons. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 292, p. 497–504. 2000.
- Webb, L. M., Foxwell, B. M., Feldmann, M. Putative role for interleukin-7 in the maintenance of the recirculating naive CD4+ T-cell pool. **Immunology**, v. 98, p. 400–405. 1999.
- Wu, Y., Wang, X., Mo, X., Xi, Z., Xiao, F., Li, J., Zhu, X., Luan, G., Wang, Y., Li, Y., Zhang, J. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in brain tissue of patients with intractable epilepsy. **Clin. Neuropathol.**, v. 27, p. 55-63. 2008.
- Yacubian, E. M. Treatment os epilepsy in childhood. **J. Pediatr.**, v. 78, p. 19-27. 2002.
- Yadav, A., Saini, V., Arora, S. MCP-1: chemoattractant with a role beyond immunity: a review. **Clin. Chim. Acta**, v. 11, p. 1570-9. 2010.
- Youn, Y. A., Kim, S. J., Sung, I. K., Chung, S. Y., Kim, Y. H., Lee, I. G. Serial examination of serum IL-8, IL-10 and IL-1Ra levels is significant in neonatal seizures induced by hypoxic-ischaemic encephalopathy. **Scand. J. Immunol.**, v. 76, p. 286–293. 2012.
- Zattoni, M., Mura, M. L., Deprez, F., Schwendener, R. A., Engelhardt, B., Frei, K., Fritschy, J. M. Brain infiltration of leukocytes contributes to the pathophysiology of temporal lobe epilepsy. **J. Neurosci.**, v. 16, p. 4037-50. 2011.

Zhang, J. M., An, J. Cytokines, inflammation, and pain. Int. **Anesthesiol. Clin.**, v. 45, p. 27-37. 2007.