

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Amanda Muliterno Domingues Lourenço de Lima

**RELAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM PROCESSOS INFLAMATÓRIOS
DESENCADEADORES DE EPILEPSIA EM MODELO ANIMAL**

Porto Alegre
2021

CIP - Catalogação na Publicação

Muliterno Domingues Lourenço de Lima, Amanda
Relação da microbiota intestinal com processos
inflamatórios desencadeadores de epilepsia em modelo
animal / Amanda Muliterno Domingues Lourenço de Lima.
-- 2021.
141 f.
Orientadora: Sueli Teresinha Van Der Sand.

Coorientadora: Adriana Simon Coitinho.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e
do Ambiente, Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Microbiologia. 2. Epilepsia. 3. Imunologia. 4.
Neurociência. 5. Farmacologia. I. Van Der Sand, Sueli
Teresinha, orient. II. Simon Coitinho, Adriana,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Amanda Muliterno Domingues Lourenço de Lima

**RELAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM PROCESSOS INFLAMATÓRIOS
DESENCADEADORES DE EPILEPSIA EM MODELO ANIMAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Profa. Dra. Sueli Teresinha Van Der Sand

Coorientadora: Profa. Dra. Adriana Simon Coitinho

Porto Alegre

2021

“Os homens pensam que a epilepsia é divina simplesmente porque não têm ideia do que causa a epilepsia. Mas acredito que um dia iremos entender o que causa a epilepsia e, naquele momento, deixaremos de acreditar que é divino. E assim é com tudo no universo.”

Hipócrates (460 – 370 a.C.)

AGRADECIMENTOS

A todos que de alguma forma contribuíram no desenvolvimento do projeto, agradeço pelo incentivo.

Às professoras Dra. Sueli Teresinha Van Der Sand e Dra. Adriana Simon Coitinho pela oportunidade, confiança, apoio e orientação no desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus colegas do Laboratório de Neuroimunologia Ms. Edson Fernando Müller Guzzo, Gabriel de Lima Rosa e Rafael Bremm Padilha pela amizade e colaboração no estudo.

A bolsista Milena Conci de Araujo pela dedicação à pesquisa e suporte nos experimentos.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada pelos auxílios, aprendizados e ensinamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pelas instruções e direcionamento em relação ao regulamento e normas do programa.

Ao Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, e em extensão ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde, por ceder o espaço e equipamentos para a desenvolvimento da pesquisa.

Aos grupos de pesquisa do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), em especial ao professor Dr. Afonso Luís Barth e a Dra. Daiana de Lima Morales pelo sequenciamento das amostras de microbiota intestinal dos animais.

Ao grupo de pesquisa do professor Dr. José Cláudio Fonseca Moreira e ao Ms. Alexandre Kleber Silveira pelo auxílio nas análises de bioinformática dos dados gerados pelo sequenciamento.

Ao Ms. Rodrigo Costa da Silva pelo incansável auxílio na programação das análise dos dados, bioinformática, análise estatística e escrita da tese.

A Andreza Domingues Stefani pela revisão da escrita e da tradução dos artigos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e ao Programa de Fomento à Pesquisa da Pró-Reitoria de Pesquisa e Extensão (PROPESQ) da UFRGS pela concessão de auxílio ao fomento da pesquisa.

RELAÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL COM PROCESSOS INFLAMATÓRIOS DESENCADEADORES DE EPILEPSIA EM MODELO ANIMAL¹

Autor: Amanda Muliterno Domingues Lourenço de Lima

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sueli Teresinha Van Der Sand

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Simon Coitinho

RESUMO

A epilepsia é um distúrbio neurológico caracterizado por convulsões espontâneas e recorrentes. Embora vários estudos tenham demonstrado a associação da inflamação à epilepsia, a estreita relação da microbiota intestinal na regulação do sistema imune e neuromodulação através do eixo intestino-cérebro ainda não foi elucidada. Considerando que parte dos pacientes com epilepsia é refratária aos anticonvulsivantes, a possível relação do perfil microbiano com processos inflamatórios e convulsões pode auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Esse estudo buscou investigar a relação da microbiota intestinal com o desencadeamento do processo inflamatório relacionado à epilepsia. Ratos Wistar machos com 3 meses de idade (n=40) foram submetidos ao modelo de *kindling* induzido pelo pentilenotetrazol (PTZ) (25 mg/kg) intraperitoneal (i.p). Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: controle negativo (cloreto de sódio 0,9%), controle positivo (diazepam 2 mg/kg) e grupos teste prednisolona (1 e 5 mg/kg) i.p. por 14 dias, em que foi observada a latência das crises epilépticas. A análise da comunidade bacteriana foi realizada através de espaçadores intergênicos de rRNA (RISA) e sequenciamento de nova geração (NGS). As citocinas interleucina 1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) foram quantificadas de amostras do intestino. A prednisolona resultou no aumento de citocinas IL-1 β e TNF- α e da latência das crises convulsivas. Apesar de não haver diferença na diversidade da microbiota intestinal entre os tratamentos, a prevalência de representantes de *Actinobacteria*, *Saccharibacteria* e *Verrucomicrobia* pode estar associada a ortólogos funcionais do metabolismo microbiano que modulam o efeito protetor da prednisolona nas crises convulsivas induzidas por PTZ em ratos.

¹Tese de Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (xx p.) outubro, 2021.

RELATIONSHIP OF THE INTESTINAL MICROBIOTA TO INFLAMMATORY PROCESSES UNLEASHING EPILEPSY IN ANIMAL MODEL

Author: Amanda Muliterno Domingues Lourenço de Lima

Advisor: Prof. Dr. Sueli Teresinha Van Der Sand

Co-Advisor: Prof. Dr. Adriana Simon Coitinho

ABSTRACT

Epilepsy is a neurological disorder characterized by spontaneous and recurrent seizures. Although several studies have demonstrated the association of inflammation with epilepsy, the close relationship between the intestinal microbiota in the regulation of the immune system and neuromodulation through the gut-brain axis has not yet been elucidated. Considering that part of the patients with epilepsy is refractory to anticonvulsants, the possible relationship of the microbial profile with inflammatory processes and seizures can help in the development of new therapeutic strategies. This study sought to investigate the relationship between the intestinal microbiota and the triggering of the inflammatory process related to epilepsy. Male Wistar rats with 3 months of age (n=40) were submitted to the kindling model induced by pentylenetetrazole (PTZ) (25 mg/kg) intraperitoneally (i.p). The animals were divided into four experimental groups: negative control (sodium chloride 0.9%), positive control (diazepam 2 mg/kg), and prednisolone test groups (1 and 5 mg/kg) i.p. for 14 days, in which the latency of epileptic seizures was observed. The analysis of the bacterial community was performed using rRNA intergenic spacers analysis (RISA) and high-throughput sequencing (NGS). The cytokines interleukin 1 beta (IL-1 β) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) were quantified from the intestinal samples. Prednisolone increased IL-1 β and TNF- α cytokines and seizure latency. Although there is no difference in the intestinal microbiota diversity between treatments, the prevalence of *Actinobacteria*, *Saccharibacteria*, and *Verrucomicrobia* may be associated with functional orthologs of microbial metabolism that modulate the protective effect of prednisolone in PTZ-induced seizures in rats.

¹Doctoral thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (xx p.) october, 2021.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	5
2.	OBJETIVOS	6
2.1	Objetivo Geral.....	6
2.2	Objetivos Específicos	6
3.	REVISÃO DA LITERATURA	7
4.	MATERIAL E MÉTODOS	17
5.	ARTIGOS	24
5.1.	Effect of prednisolone in a <i>kindling</i> model of epilepsy in rats on cytokine and gut microbiota diversity.....	24
5.2.	Gut microbiota modulation by prednisolone in a rat <i>kindling</i> model of pentylenetetrazol (PTZ)-induced seizure.....	27
5.3.	Metabolomic prediction of the gut microbiota of rats treated with prednisolone in a pentylenetetrazol (PTZ)-induced <i>kindling</i> model.....	29
6.	DISCUSSÃO GERAL	31
7.	CONCLUSÃO	39
8.	REFERÊNCIAS	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	Serotonina
AEDs	Drogas Antiepilépticas
AGCCs	Ácidos graxos de cadeia curta
ANOVA	Análise de Variância
ARRIVE	Animal Research: Reporting of <i>In Vivo</i> Experiments
BHE	Barreira Hematoencefálica
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
COX1	Enzima cicloxigenase 1
COX2	Enzima cicloxigenase 2
CREAL	Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório
DZP	Diazepam
ELISA	Ensaio imunoenzimático
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GG	Aminoácidos gama-glutamilados
HPA	Eixo Hipotálamo-pituitário-adrenal
i.p.	Intraperitoneal
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-22	Interleucina 22
ILAE	Liga Internacional Contra a Epilepsia
INF- γ	Interferon gama
LPS	Lipopolissacarídeos
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
PLA2	Enzima fosfolipase 2
Pred1	Prednisolona 1 mg/kg
Pred5	Prednisolona 5 mg/kg
PTZ	Pentilenotetrazol
RISA	Análise de Espaçadores Intergênicos de RNA ribossômico (rRNA)
SNC	Sistema Nervoso Central
SNE	Sistema Nervoso Entérico
TGF- β	Fator de transformação de crescimento
TLRs	Receptores de membrana do tipo Toll like
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Células T reguladoras
TRP	Triptofano
UPGMA	Método de grupo de pares não ponderados com base na média aritmética

1. INTRODUÇÃO

A epilepsia é um distúrbio neurológico caracterizado por convulsões espontâneas e recorrentes decorrentes de descargas elétricas hipersíncronas e da atividade neuronal anormal excessiva de neurônios (DEVINSKY *et al.*, 2018). Não há uma estimativa correta da prevalência da epilepsia, mas acredita-se que aproximadamente 1 a 2% da população mundial seja afetada por esta condição (VIEIRA *et al.*, 2016). Atualmente, não há cura para a doença e um terço dos pacientes com epilepsia são refratários aos medicamentos anticonvulsivantes (TANG; HARTZ; BAUER, 2017). Embora muitas pesquisas estejam surgindo, a fisiopatologia básica da ictogênese e a ampla complexidade da etiologia da epileptogênese ainda não é totalmente compreendida (YUEN; KEEZER; SANDER, 2018).

Apesar dos recentes progressos, as potenciais causas que levam ao desenvolvimento e progressão da epilepsia ainda não foram elucidadas. A epileptogênese tem sido frequentemente associada aos processos inflamatórios (FALCO-WALTER; SCHEFFER; FISHER, 2018). A inflamação pré-existente contribui para a epileptogênese da mesma forma que a epilepsia desencadeia cascatas inflamatórias (VEZZANI; BALOSSO; RAVIZZA, 2019). A produção excessiva e desregulada de citocinas pode promover a degeneração neuronal e provocar convulsões (RANA; MUSTO, 2018), de modo que a neuroinflamação em muitos aspectos é semelhante à consequência da disbiose intestinal e contribui para a progressão da doença.

Um número crescente de estudos tem demonstrado a associação da progressão da epilepsia mediada pela microbiota intestinal (LUM; OLSON; HSIAO, 2020). Evidências recentes demonstram a influência que a microbiota intestinal exerce sobre o cérebro através do chamado eixo intestino-cérebro (DINAN; CRYAN, 2017c). O sistema imunológico atua como um importante intermediário entre a microbiota intestinal e o cérebro (EL AIDY; DINAN; CRYAN, 2014). A microbiota intestinal exerce um papel fundamental na manutenção da homeostase contribuindo para uma variedade de diferentes processos fisiológicos, incluindo produção e maturação das células do sistema imunológico e regulação da resposta inflamatória (SANDHU *et al.*, 2017).

Desta forma, considerando que parte dos pacientes com epilepsia é

resistente aos tratamentos farmacológicos convencionais, a compreensão da possível relação do perfil microbiano com processos inflamatórios desencadeadores de crises epileptogênicas poderia auxiliar no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Considerando-se ainda, a relevância do tema e a ausência de dados na literatura sobre a possível relação entre a microbiota intestinal e os processos inflamatórios que desencadeiam a epilepsia, pesquisas são necessárias para identificar os microrganismos que podem auxiliar na imunorregulação da mucosa do intestino como possibilidade de tratamento desta doença. A manutenção do equilíbrio do microbioma intestinal poderia auxiliar na possível prevenção e controle de doenças que estão relacionadas a sua disfunção.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a relação da microbiota intestinal com o desencadeamento do processo inflamatório relacionado a convulsão em modelo animal de *kindling* induzido pelo pentilenotetrazol (PTZ).

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Avaliar a diversidade da microbiota intestinal de animais submetidos ao modelo de *kindling* induzido pelo PTZ através da análise de espaçadores intergênicos de RNA ribossômico (rRNA) (RISA);
- 2.2.2 Identificar através do sequenciamento de nova geração (NGS) as comunidades microbianas presentes no intestino dos animais submetidos ao *kindling* induzido por PTZ;
- 2.2.3 Investigar os efeitos da prednisolona na microbiota intestinal em modelo animal de *kindling* induzido pelo PTZ;
- 2.2.4 Investigar os efeitos da prednisolona sobre os níveis de interleucina 1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) em amostras de tecido do intestino de animais submetidos ao *kindling* induzido por PTZ;
- 2.2.5 Correlacionar as espécies bacterianas encontradas com a predição metabólica funcional e sua influência no desencadeamento das

crises convulsivas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Epilepsia

A epilepsia é considerada como uma das doenças neurológicas severas mais comuns e causa de deficiência não negligenciável e mortalidade (WU *et al.*, 2016). É uma doença neurológica caracterizada pela predisposição persistente de ter convulsões recorrentes com consequências cognitivas, psicológicas e sociais associadas (FISHER *et al.*, 2014). De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019), a epilepsia tem alta prevalência, afetando cerca de 50 milhões de pessoas em todo o mundo. A proporção estimada da população geral com epilepsia ativa (ou seja, com convulsões contínuas ou com necessidade de tratamento) está entre 4 e 10 por 1000 pessoas. Globalmente, cerca de cinco milhões de pessoas são diagnosticadas com epilepsia a cada ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Atualmente, não há cura para a doença e um grande esforço tem surgido na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos na progressão da doença e na busca de possíveis tratamentos.

A Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) tem publicado, com base em pesquisas recentes, diretrizes para a classificação das crises convulsivas quanto a características e etiologia da doença que auxiliam no diagnóstico clínico dos pacientes e tem embasado médicos e pesquisadores na busca por tratamentos mais efetivos para esta doença (INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY (ILAE), 2020). A crise epiléptica é determinada por uma mudança comportamental transitória com sinais e/ou sintomas como a perda de consciência, enrijecimento e espasmos, causada pela atividade neuronal anormal excessiva ou síncrona no cérebro (DEVINSKY *et al.*, 2018). Mais especificamente, a epilepsia é diagnosticada por pelo menos duas convulsões não provocadas ou reflexas com mais de 24 horas de intervalo; uma única convulsão não provocada ou reflexa se o risco de recorrência for alto (ou seja, > 60% nos próximos 10 anos); ou pelo diagnóstico de síndrome de epilepsia (FISHER *et al.*, 2014).

São considerados três níveis para a classificação da epilepsia (tipo de crise,

tipo de epilepsia e síndrome), além das causas e das comorbidades associadas que devem ser identificados em cada estágio, pois podem ter importantes implicações (THIJS *et al.*, 2019). Os tipos de epilepsia são categorizados como: focal, generalizada, combinada generalizada e focal (para aqueles que apresentam ambos os tipos de crises), e desconhecida (FALCO-WALTER; SCHEFFER; FISHER, 2018). A crise pode ser focal (quando a atividade neuronal anormal surge em uma ou mais regiões localizadas do cérebro ou hemisfério), generalizada (quando a atividade neuronal anormal começa em uma distribuição generalizada em ambos os hemisférios) ou de início desconhecido (não puderem identificar se o início é focal ou generalizado) (DEVINSKY *et al.*, 2018). As crises focais podem ser subdivididas naquelas em que a consciência é preservada ou prejudicada, e são ainda categorizadas pelas manifestações motoras ou não motoras, sendo elas precoces ou proeminentes (FISHER *et al.*, 2017b, 2017a). As crises generalizadas são divididas em crises motoras e não motoras (THIJS *et al.*, 2019).

Embora existam lacunas cruciais no conhecimento dos eventos espaciais e temporais subjacentes a epilepsia, a etiologia dos mecanismos fisiopatológicos que a desencadeiam é fundamental devido ao seu impacto crítico no prognóstico e tratamento do paciente. As causas associadas aos diferentes tipos de epilepsia são categorizadas como estruturais (em função de anormalidades estruturais observadas por exames de neuroimagem), genéticas (devido a variações do número de cópias ou mutações em determinados genes), infecciosas (decorrentes de infecções agudas em resposta a agentes etiológicos), metabólicas (relacionadas a um distúrbio metabólico), imunes (mediadas pela inflamação do sistema nervoso central) e desconhecidas (sem causa identificável) (FALCO-WALTER; SCHEFFER; FISHER, 2018; SCHEFFER *et al.*, 2017).

Assim como a etiologia, é importante que a presença de comorbidades seja considerada para cada paciente com epilepsia em cada estágio da classificação, permitindo a identificação precoce, o diagnóstico e o manejo adequado (FISHER *et al.*, 2017a). A epilepsia tem sido associada a um número crescente de comorbidades neurológicas e não neurológicas, as quais variam em tipo e gravidade, e incluem desde sintomas mais brandos a danos severos e irreversíveis, afetando a qualidade de vida e podendo acarretar até mesmo a morte prematura dos pacientes. Diversas comorbidades têm sido associadas a

epilepsia, como as seguintes alterações cognitivas: dificuldades sutis de aprendizagem, deficiência intelectual, distúrbios psiquiátricos, afetivos e comportamentais (transtornos do espectro do autismo, ansiedade e depressão). Alterações físicas também têm sido associadas à epilepsia. Podem ser citados como exemplos: transtornos somáticos funcionais (fibromialgia, dores de cabeça tensionais, enxaqueca e alterações do sono), distúrbios do movimento e déficits motores (paralisia cerebral ou deterioração da marcha), distúrbios gastrointestinais (sangramento gastrointestinal, úlceras pépticas e doença inflamatória intestinal), doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, Parkinson e Alzheimer (FISHER *et al.*, 2017a; KEEZER; SISODIYA; SANDER, 2016; VEZZANI; BALOSSO; RAVIZZA, 2019).

A base do tratamento da epilepsia é a terapia farmacológica para o controle das crises (GOLYALA; KWAN, 2017). As drogas antiepilépticas (AEDs) são os principais métodos terapêuticos disponíveis no tratamento da epilepsia. Porém, além dos efeitos adversos, fornecem apenas o tratamento sintomático sendo capazes somente de controlar a ocorrência de convulsões com pouco impacto sobre a doença subjacente. Embora a terapia com AEDs seja eficaz para interromper as convulsões na maioria dos casos de epilepsia, o controle das convulsões não é alcançado em alguns casos e se estima que 30 – 40% dos pacientes se tornam resistentes a este tratamento (KALILANI *et al.*, 2018). A epilepsia refratária está associada ao aumento da morbidade e mortalidade, consequências psicossociais graves, problemas cognitivos e redução da qualidade de vida (TANG; HARTZ; BAUER, 2017). Considerando-se que uma porcentagem significativa dos pacientes não respondem aos anticonvulsivantes disponíveis, a melhor compreensão da natureza heterogênea da epilepsia e dos múltiplos fatores que contribuem para as descargas neurais anormais impulsionam a investigação e o desenvolvimento de novos tratamentos farmacológicos alternativos (GOLYALA; KWAN, 2017).

3.2 Inflamação

Apontada como uma das causas para o desenvolvimento e progressão da epileptogênese, a inflamação é uma resposta fisiológica natural a algum dano, infecção ou estresse biológico e é mediada pelo sistema imunológico inato. No

cérebro, a imunidade inata é predominantemente conferida por células da microglia, que atuam como macrófagos residentes do sistema nervoso e representam a primeira linha de defesa contra lesão. Porém, outras evidências sugerem que neurônios e astrócitos também desempenham um papel importante (WALKER; SILLS, 2012). Citocinas e quimiocinas liberadas da microglia ativada iniciam a cascata de sinalização pró-inflamatória que ocasiona vasodilatação localizada, extravasamento e recrutamento de leucócitos e ativação da resposta imune adaptativa (DAMBACH *et al.*, 2014). O papel da inflamação na etiopatogenia de doenças do sistema nervoso central (SNC) já foi amplamente investigado, e mediadores inflamatórios séricos elevados foram encontrados em muitos distúrbios neurológicos, como isquemia cerebral, esclerose múltipla, Parkinson, Alzheimer e traumatismo cranioencefálico (DE VRIES *et al.*, 2016).

A epileptogênese é um processo complexo através do qual o cérebro é debilitado pela atividade convulsiva recorrente e evolutiva. De acordo com PITKÄNEN e colaboradores (2015), a epileptogênese refere-se ao desenvolvimento e extensão de tecido lesado capaz de gerar crises recorrentes espontâneas, resultando no desenvolvimento de uma condição epiléptica e/ou progressão da epilepsia. Qualquer lesão cerebral, como trauma, acidente vascular cerebral, infecção viral, convulsões febris e estado epiléptico, ocorrendo em qualquer fase da vida é um fator de risco para o desenvolvimento de epilepsia (YUEN; KEEZER; SANDER, 2018). A combinação de insultos cerebrais agudos e fatores intrínsecos (por exemplo, etiologia, local e gravidade da lesão, convulsões sintomáticas agudas, histórico genético e fatores epigenéticos) ou fatores ambientais (por exemplo, infecções sistêmicas, estresse e estilo de vida) determina se uma lesão cerebral desencadeia a epileptogênese (VEZZANI; BALOSSO; RAVIZZA, 2019).

No processo de epileptogênese, a neuroinflamação comumente ocorre após lesões cerebrais agudas e reduz o limiar convulsivo, contribuindo assim para um estado persistente de hiperexcitabilidade da rede neuronal (VEZZANI; BALOSSO; RAVIZZA, 2019). A neuroinflamação pode ser vista como a biossíntese e liberação de moléculas com propriedades inflamatórias por células residentes do cérebro, incluindo microglia ativada e astrócitos, neurônios, células endoteliais da barreira hematoencefálica (BHE) e macrófagos provenientes do sangue (VAN VLIET *et al.*, 2018). A resposta inflamatória no sistema nervoso que

é evocada pelo aumento da atividade neuronal na ausência de condições patológicas evidentes é chamada de inflamação neurogênica (VEZZANI; BALOSSO; RAVIZZA, 2019). Descrita originalmente em tecidos periféricos, a inflamação neurogênica é um estado inflamatório local induzida pela atividade neuronal em resposta a estímulos nocivos (XANTHOS; SANDKÜHLER, 2014).

Além da neuroinflamação, acredita-se que a inflamação sistêmica tenha uma influência no processo epileptogênico. Estudos experimentais e evidências clínicas mostram a ativação dos mecanismos de imunidade inata e adaptativa e a indução dos processos inflamatórios associados nos focos epileptogênicos (VEZZANI; LANG; ARONICA, 2016). A inflamação sistêmica crônica é o resultado da liberação de citocinas pró-inflamatórias de células relacionadas ao sistema imunológico e da ativação crônica do sistema imunológico inato (YUEN; KEEZER; SANDER, 2018). A inflamação periférica contribui para o acúmulo de mediadores inflamatórios, que em consonância com a neuroinflamação, promove a quebra da barreira hematoencefálica, com a consequente infiltração de leucócitos, o que gera hiperexcitabilidade e mudanças morfológicas sinápticas dentro do hipocampo e, em última instância, o desenvolvimento da epilepsia (RANA; MUSTO, 2018).

O envolvimento de vários mediadores inflamatórios já foi relatado na patogênese de convulsões, neuropatologias e comorbidades neurológicas na epilepsia. Mediadores pró-inflamatórios podem atuar como neuromoduladores, ativando vias de sinalização intracelular não convencionais que afetam a função neuronal e a excitabilidade (RAVIZZA; VEZZANI, 2018). As citocinas são mediadores inflamatórios produzidos principalmente pelas células gliais e neurônios durante a inflamação do cérebro. Elas desempenham uma variedade de funções fisiológicas, incluindo a regulação dos processos inflamatórios, modulação dos canais iônicos, transmissão sináptica e plasticidade (ALYU; DIKMEN, 2017; IORI; FRIGERIO; VEZZANI, 2016). No entanto, podem ocorrer consequências patológicas se ocorrer uma desregulação na produção de citocinas ou se a exposição do tecido às citocinas for muito prolongada, como nas doenças neurodegenerativas e na epilepsia (IORI; FRIGERIO; VEZZANI, 2016).

Uma produção excessiva e desregulada de citocinas pode levar à degeneração neuronal e gerar convulsões (VIEIRA *et al.*, 2016). Em condições fisiológicas, as citocinas são encontradas em níveis muito baixos no tecido

cerebral saudável, mas a elevação dos níveis séricos desses marcadores tem sido relatada em diversas doenças neurológicas, incluindo a epilepsia (DE VRIES *et al.*, 2016). Por exemplo, as citocinas pró-inflamatórias interleucina-1 beta (IL-1 β), IL-2, IL-6, interferon gama (INF- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) normalmente concentradas em pequenas quantidades no cérebro, aumentam após as convulsões (RANA; MUSTO, 2018).

As citocinas também são liberadas por astrócitos perivascularares e microglia, contribuindo para a disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) na epilepsia (VEZZANI; LANG; ARONICA, 2016). A BHE desempenha um papel fundamental na regulação da excitabilidade neuronal e manutenção da homeostase iônica. Atualmente, a inflamação do sistema nervoso central (SNC) e os efeitos a longo prazo da exposição a mediadores inflamatórios tem demonstrado participar do extravasamento da BHE e tem sido implicados na progressão da epilepsia e indução de convulsões (ALYU; DIKMEN, 2017).

Além disso, as citocinas podem modificar a função dos receptores de glutamato e ácido γ -aminobutírico (GABA) e também podem modular a permeabilidade do cálcio mediada pelo receptor de glutamato (WEBSTER *et al.*, 2017). Foi sugerido que citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α induzem um aumento na transmissão sináptica excitatória e uma redução na transmissão sináptica inibitória (ALYU; DIKMEN, 2017). A citocina pró-inflamatória IL-1 β , expressa na microglia ativada e astrócitos, aumenta a liberação de glutamato dos astrócitos e diminui a recaptação de glutamato, aumentando assim a disponibilidade de glutamato nas sinapses neuronais e promovendo hiperexcitabilidade neuronal (ALYU; DIKMEN, 2017). TNF- α também foi relatada como responsável pela indução da liberação de glutamato da microglia e dos astrócitos (IORI; FRIGERIO; VEZZANI, 2016).

Embora essas correlações tenham sido observadas em vários estudos, os mecanismos subjacentes à relação entre os processos inflamatórios e a epileptogênese, particularmente no contexto de lesão cerebral, ainda são pouco conhecidos. Em muitos aspectos, a neuroinflamação é semelhante às consequências da disbiose intestinal e por isso, o estudo da relação da microbiota intestinal com os processos inflamatórios envolvidos na epilepsia pode contribuir para compreensão dos mecanismos subjacentes envolvidos no desenvolvimento e progressão da doença.

3.3 Microbiota intestinal

O trato gastrointestinal humano é colonizado por trilhões de microrganismos chamados coletivamente de microbiota intestinal (FUNG; OLSON; HSIAO, 2017). A microbiota intestinal é uma comunidade complexa formada pela interação de diversos microrganismos que auxiliam na manutenção do equilíbrio ecológico dinâmico do metabolismo. As bactérias, principalmente bactérias anaeróbias, dominam este ambiente, além de vírus, protozoários, arqueias e fungos (WANG, H.-X; WANG, 2016). Há uma estimativa de que cerca de 100 trilhões de bactérias compõe a microbiota no corpo de um adulto, 80% das quais existem no intestino, cerca de dez vezes mais do que as células do corpo humano (WANG, H.-X; WANG, 2016). Avanços recentes na tecnologia de sequenciamento revelaram que a microbiota intestinal compreende aproximadamente 1.800 diferentes filos e 40.000 espécies bacterianas (SHERWIN *et al.*, 2016). As bactérias do intestino incluem majoritariamente seis filos principais: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Verrucomicrobia* e *Fusobacteria*, sendo *Bacteroidetes* e *Firmicutes* os filos dominantes (ZHU *et al.*, 2017).

Tendências recentes na literatura apoiam o conceito de que o corpo humano deve ser compreendido como um “ecossistema humano”; ou ainda, “bioma humano” (DINAN; CRYAN, 2017a). Esta concepção reconhece a coevolução mutualista dos micróbios e do corpo humano (SUNDMAN *et al.*, 2017). A evolução em comum com o corpo humano possibilitou as bactérias do intestino alcançarem um estado simbiótico mutuamente benéfico com o organismo (ZHU *et al.*, 2017), de modo que esses microrganismos estão associados a múltiplas funções do corpo humano. Embora todo o significado funcional dessa população microbiana não seja completamente conhecido, a composição e a diversidade dessas espécies comensais que habitam o intestino, constituem um sistema microecológico complexo, que pode influenciar profundamente a fisiologia humana e, em última análise, a saúde do hospedeiro humano em vários sistemas fisiológicos (SUNDMAN *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2017).

Diversas evidências tem destacado a importância da microbiota intestinal na manutenção da homeostase, contribuindo para uma variedade de diferentes processos fisiológicos (SANDHU *et al.*, 2017). A microbiota intestinal desempenha

um papel crítico na: maturação e modulação da resposta imune do hospedeiro, proteção contra patógenos, proliferação e vascularização das células hospedeiras, regulação das funções endócrinas intestinais, sinalização neurológica, metabolismo de alimentos e biossíntese de vitaminas, neurotransmissores e várias outras moléculas (LYNCH; PEDERSEN, 2016). Entretanto, as funções de nossa microbiota intestinal vão além disto: as bactérias também podem afetar o funcionamento e o comportamento do cérebro (WEERTH, 2017). A diversidade apropriada na microbiota intestinal é essencial não apenas para a saúde intestinal, mas também para o funcionamento normal em outros órgãos, especialmente o cérebro (DINAN; CRYAN, 2017c).

Embora o conceito do eixo microbiota-intestino-cérebro seja relativamente novo, tem se tornado cada vez mais aceito que a microbiota intestinal estabelece uma comunicação bidirecional com o sistema nervoso central (SNC) (CRYAN *et al.*, 2019). A comunicação entre a microbiota e o SNC ocorre através do eixo intestino-cérebro, que atua como um sistema fisiológico integrador das vias neural, principalmente pelo nervo vago, e vias endócrinas, imunológicas e metabólicas, nas quais hormônios, neurotransmissores e citocinas desempenham uma função essencial (WANG, H.-X.; WANG, 2016; WEERTH, 2017). Essa estreita comunicação entre as bactérias intestinais e o cérebro é facilitada pelo Sistema Nervoso Entérico (SNE), uma rede complexa de neurônios presentes no revestimento do sistema gastrointestinal. O SNE se assemelha em complexidade ao SNC tanto em quantidade de neurônios quanto em neurotransmissores e moléculas de sinalização (WEERTH, 2017).

Bactérias intestinais são reguladores potentes das respostas imunes sistêmicas e das mucosas e contribuem para o desenvolvimento de distúrbios inflamatórios no SNC (FUNG; OLSON; HSIAO, 2017). A microbiota intestinal exerce uma influência significativa sobre as populações relativas, a migração e a função de vários subconjuntos de células imunes, modulando as respostas imunes inatas e adaptativas durante infecção, inflamação e autoimunidade (REA; DINAN; CRYAN, 2016). As espécies bacterianas presentes na microbiota intestinal interagem com o sistema imune e o sistema nervoso por meio da regulação do sistema imunológico através da produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) (SHERWIN *et al.*, 2016). Os AGCCs como o ácido butírico, ácido propiônico e ácido acético produzidos pela fermentação microbiana

promovem a homeostase intestinal e exercem influência do desenvolvimento e função do sistema imunológico, incluindo a permeabilidade da barreira intestinal, produção de muco, regulação de células T periféricas, particularmente células T reguladoras (Treg), e produção de citocinas (CRYAN *et al.*, 2019; ROOKS; GARRETT, 2016).

As citocinas produzidas no intestino podem viajar através da corrente sanguínea até o cérebro. Em circunstâncias fisiológicas normais, é improvável que elas cruzem a BHE, mas evidências crescentes indicam a influência que as citocinas exercem sobre o cérebro através de sua capacidade de sinalização em regiões onde a BHE é relativamente permeável, como o hipotálamo (DINAN; CRYAN, 2017c). Além disso, ativação da resposta imune da mucosa por meio da exposição a bactérias e antígenos bacterianos além da barreira epitelial induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias e, em última análise, ativa outra via de sinalização, o eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA). O eixo HPA interage com outras vias não neuronais e também neuronais de comunicação entre o intestino e o cérebro. As interações do eixo imunidade-HPA estão implicadas em uma variedade de doenças inflamatórias e de estresse; portanto, não é surpreendente que tal conexão também possa afetar a sinalização cerebral da microbiota intestinal (CRYAN *et al.*, 2019).

No entanto, a função reguladora da microbiota pode participar de vias específicas de doenças. As complexas interações microbiota-hospedeiro são dinâmicas, envolvendo uma variedade de mecanismos. Portanto, alterações na microbiota podem resultar na desregulação da homeostase do hospedeiro e no aumento da suscetibilidade a doenças (WANG, B. *et al.*, 2017). Dado que o cérebro depende da microbiota intestinal em função dos produtos metabólicos essenciais, não é surpreendente que a disbiose possa ter consequências negativas graves para o funcionamento do cérebro, tanto do ponto de vista neurológico quanto da saúde mental (DINAN; CRYAN, 2017c). Um desequilíbrio na composição ou função das espécies microbianas normalmente encontradas na microbiota, impulsionada por um conjunto de fatores ambientais e relacionados ao hospedeiro, está associada a alterações na função imunológica e suscetibilidade a doenças inflamatórias, alergias e condições metabólicas (LEVY *et al.*, 2017; ROOKS; GARRETT, 2016), incluindo a epilepsia.

Em síntese, a microbiota intestinal pode estar envolvida na epileptogênese

ao mediar o efeito pró-excitatório da inflamação periférica por meio da ativação do sistema imunológico através da liberação de citocinas e quimiocinas inflamatórias, modulando redes neurais pela produção de neurotransmissores especialmente serotonina, GABA e glutamato, produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) e aminoácidos essenciais da dieta, como o triptofano (TRP) e seus metabólitos, e agindo conseqüentemente no equilíbrio da excitação e inibição. Além disso, a microbiota intestinal pode atuar por meio da desregulação da permeabilidade da barreira intestinal, com aumento dos níveis de lipopolissacarídeo (LPS) e alterando as vias neuroendócrinas através do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) e vias neurais como o nervo vago e o sistema nervoso entérico (SNE) (DE CARO *et al.*, 2019).

Estudos recentes que tem associado a epilepsia a uma alteração na composição da microbiota intestinal, sugerem de maneira geral que a disbiose pode alterar os mecanismos envolvidos no eixo intestino-cérebro (LUM; OLSON; HSIAO, 2020). CAMARA-LEMARROY e colaboradores (2016) e CHEN e colaboradores (2018) determinaram que a síndrome do intestino irritável (IBS) está associada a maior incidência do desenvolvimento de epilepsia. Além disso, a utilização de antibióticos em pacientes refratários aos tratamentos com anticonvulsivantes demonstrou uma significativa redução na frequência das crises epiléticas (BRAAKMAN; VAN INGEN, 2018). Desta forma, essas evidências demonstraram que a alteração da microbiota intestinal parece estar envolvida na latência, frequência e severidade das crises convulsivas, estando possivelmente relacionada ao desenvolvimento e progressão da epilepsia.

Com base nessas conexões estabelecidas entre a doença e a interrupção das interações homeostáticas no hospedeiro, as terapias direcionadas à microbiota podem alterar a composição da comunidade e a restauração da microbiota pode ser usada no tratamento de doenças, tais como a epilepsia. Por exemplo, em pacientes pediátricos com epilepsia refratária (LINDEFELDT *et al.*, 2019; XIE *et al.*, 2017; ZHANG, Y. *et al.*, 2018) e em modelo animal (OLSON *et al.*, 2018), a introdução da dieta cetogênica atenuou os sintomas da epilepsia com impacto na composição e no perfil funcional da microbiota. O transplante da microbiota fecal como tratamento alternativo para a doença de Crohn provou sua eficácia no controle das convulsões, mesmo após a retirada dos medicamentos antiepiléticos (HE, Z. *et al.*, 2017).

Apesar das diversas evidências demonstrando a associação da epilepsia a numerosos mediadores inflamatórios, nenhum estudo buscou analisar a relação da diversidade e do perfil taxonômico da microbiota intestinal com os mecanismos imunológicos envolvidos na progressão e desenvolvimento da doença até o momento. Desta maneira, o trabalho desenvolvido busca melhor compreender a relação da microbiota intestinal com os processos inflamatórios que podem desencadear a epilepsia.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Declaração de ética

Esse estudo integra o projeto intitulado “Influência da inflamação no processo epileptogênico”. O projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) registrado sob o número 23554.

4.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (90 dias, 250 - 300 g, n = 40) do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), alojados no biotério setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS durante a execução dos experimentos. Os animais foram acomodados em caixas de polipropileno medindo 41 x 34 x 16 cm com no máximo 4 animais por caixa. Foram mantidos com água e ração disponíveis *ad libitum* em ambiente sob controle de temperatura (23 ± 1 ° C) e ciclo claro-escuro de 12 horas. Todos os procedimentos experimentais foram realizados seguindo as diretrizes do Comitê Institucional de Uso e Cuidado de Animais da universidade.

4.3 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n= 10 animais por grupo). No grupo controle negativo foi administrado solução de cloreto de

sódio (0,9 g%), no grupo controle positivo foi administrado 2 mg/kg de diazepam e nos dois grupos teste foram administradas doses de 1 mg/kg e 5 mg/kg de prednisolona via intraperitoneal (i.p.) diariamente por 14 dias. O volume administrado foi em torno de 200 – 300 µl por administração (dose/kg/ml) de acordo com o peso dos animais.

4.4 Modelo de *kindling*

A partir do segundo dia de experimento foi administrado 25 mg/kg de pentilenotetrazol (PTZ) i.p. 30 minutos após a administração dos tratamentos em dias alternados para a indução das crises epiléticas. Os animais foram observados por 20 minutos após a administração do PTZ quanto a latência da primeira crise convulsiva.

4.5 Coleta de amostras de fezes e tecido do intestino

Os animais foram sacrificados por decapitação ao final do experimento e amostras de intestino grosso foram coletadas. Amostras fecais foram retiradas dos intestinos e as amostras teciduais do intestino foram lavadas com solução de cloreto de sódio a 0,9 % para retirada das fezes e submetidas a maceração mecânica através do homogeneizador de tecidos TissueRuptor® II (Qiagen, Hilden, Germany). As amostras fecais e teciduais foram armazenadas em freezer a temperatura de -80°C até a análise posterior.

4.6 Determinação de marcadores pró-inflamatórios e proteínas totais em tecido do intestino

Os marcadores pró-inflamatórios foram determinados pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) através da quantificação da concentração de TNF- α (Abcam, Cambridge, EUA) e IL-1 β (Boster Biological Technology, Pleasanton, EUA) no sobrenadante das amostras de intestino maceradas de acordo com as especificações dos fabricantes. A concentração de proteína nas amostras de tecido foi quantificada pelo ensaio de proteínas totais (Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) através do método de biureto de acordo com as

especificações do fabricante. As amostras foram testadas em duplicata e os resultados foram expressos em pg/mg de proteína.

4.7 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras fecais dos ratos foi realizada seguindo o protocolo de extração de isopropanol (HART et al., 2015; YU; MORRISON, 2004) com modificações. O conteúdo de 0,25 g de fezes foi adicionado a um microtubo estéril de 2 ml contendo esferas de vidro de 0,2 mm de diâmetro até $\frac{1}{4}$ do tubo e 800 μ l de tampão de lise (500 mM NaCl; Tris 50 mM HCl, pH 8,0; EDTA 50 mM e dodecilsulfato de sódio 4%) e submetido a agitação em vórtex a uma velocidade máxima de 3.000 rpm por 3 minutos. O lisado foi incubado em banho seco a 70°C por 20 minutos com homogeneização periódica a cada 5 minutos em vórtex na velocidade máxima e centrifugado a 6.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo estéril com adição de 200 μ l de acetato de amônio 10 mM, seguido por agitação em vórtex na velocidade máxima, incubação em gelo por 5 minutos e centrifugação a 6.500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante resultante foi transferido para um novo microtubo estéril com a adição de 1 ml de isopropanol gelado, seguido da incubação em gelo por 30 minutos e centrifugação a 13.000 rpm por 15 minutos. O pellet de DNA foi lavado com 1 ml de etanol 70°GL refrigerado, ressuspendido em 150 μ l de Tris-EDTA (Tris 10 mM e EDTA 1 mM) e 2 μ l de RNase (10 mg/ml) e incubado a 37°C durante 15 minutos. Foi adicionado 200 μ l de água milli-Q estéril e 15 μ l de proteinase K (20 mg/ml), incubado a 70°C em banho seco por 10 minutos e adicionado 200 μ l de etanol absoluto gelado. A amostra de DNA foi purificada com o PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

4.8 Análise de integridade e quantificação de DNA

A integridade do produto da extração de DNA foi visualizada em gel de agarose 0,8% com a adição de tampão GelRed™ (QuatroG Pesquisa e Desenvolvimento) na proporção 1:4 de DNA. Os géis foram submetidos a 100V de voltagem, 80mA de corrente e 80W de potência por 40 min, e visualizados no analisador de imagem iBright™ CL1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA,

USA). A qualidade da extração de DNA foi mensurada através da medida do fator A260/A280 no NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). A média das medidas do fator A260/A280 das amostras foi de $1,91 \pm 0,04$ com uma concentração média de $755,16 \pm 239,86$ ng/ μ L. A quantidade de DNA foi medida no Quantus TM Fluorometer (Promega Corporation, Madison, WI, USA). A quantidade média de DNA foi de $40,24 \pm 26,81$ ng/ μ L.

4.9 Análise de espaçadores intergênicos de RNA ribossômico (rRNA) (RISA)

As condições para a amplificação do DNA seguiram o protocolo descrito anteriormente (DANOVARO *et al.*, 2006) com modificações. Os primers bacterianos universais foram escolhidos de acordo com Danovaro *et al.* (2006): 16S-1392F (5'-GYACACACCGCCCGT-3') e 23S-125R (5'-GGGTTBCCCCATTCRG-3') (Exxtend Biotecnologia Ltda, Paulínia, SP, Brasil). A reação de PCR (50 μ L) continha 50 ng de DNA genômico, tampão (1 x), MgCl₂ (1,5 mM), BSA (200 ng), primers (25 pmol de cada primer), dNTPs (0,2 mM) e Taq polimerase (1U) (Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil). A reação seguiu as condições de desnaturação inicial a 94°C por 3 min, 30 ciclos (desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 55°C por 1 min e extensão a 72 °C por 2 min) e extensão final a 72 °C por 10 min. A reação foi realizada em triplicata. A concentração do produto de PCR foi medida no NanoDrop™ Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA).

4.10 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR com quantidade de 2 μ g foram revelados com a adição de 8 μ L de GelRed™ (Quatro G Pesquisa & Desenvolvimento Ltda) em gel de agarose a 3% submerso em TAE 1 x (Tris-base 2 mM; ácido acético glacial 1 M; EDTA 50 mM, pH 8,0) submetido a 75 V de voltagem, 110 mA de corrente e 80W de potência por 3 horas. Os fragmentos obtidos foram comparados com o marcador molecular Ladder 100 pb (Ludwig Biotecnologia Ltda, Alvorada, RS, Brasil). Os géis foram visualizados utilizando o analisador de imagem iBright™

CL1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

4.11 Análise da estrutura da comunidade microbiana

As imagens dos géis foram analisadas através do programa iBright™ Analysis Software versão 1.4.0 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA). A intensidade das bandas foi determinada pela análise densitométrica através do volume das bandas calculados pelo programa. A diversidade das comunidades bacterianas foi calculada através do índice de diversidade de Shannon (H'), utilizando a equação: $H' = -\sum (n_i / N) \log (n_i / N)$, onde n_i é a quantidade relacionada à intensidade de pico de cada banda e N é a soma de todas as intensidades de pico, obtidas através da curva densitométrica (CIESIELSKI *et al.*, 2013). O programa PyElph foi utilizado para comparar o padrão de presença-ausência de DNA através de uma matriz binária utilizada para calcular o coeficiente de dados e gerar a árvore filogenética (PAVEL; VASILE, 2012). Os resultados foram agrupados pelo método do grupo de pares não ponderados com média aritmética (UPGMA) com 2% de distância. As distâncias representam a dissimilaridade entre as amostras dos diferentes tratamentos utilizados. Para a análise dos agrupamentos foi estabelecido o ponto de corte de distância de 20.0.

4.12 Sequenciamento do DNA

O sequenciamento das regiões variáveis V3 e V4 do gene 16S do RNA ribossomal (rRNA 16S) foi realizada utilizando os primers (5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3') e (3'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-5'). Este par de primers inclui sequências adaptadoras que são complementares às sequências de indexação da plataforma Illumina MiSeq e adaptadores necessários para o sequenciamento. Duas reações em cadeia da polimerase (PCR) foram realizadas usando o Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, 25 ciclos (desnaturação a 95°C durante 30 segundos, hibridização do iniciador a 55°C 30 segundos, extensão a 72°C durante 30

segundos) e alongamento final a 72°C durante 5 minutos. Os amplicons de PCR foram purificados pelo sistema de microesferas Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, Milão, Itália). O segundo PCR usou o produto do primeiro PCR como molde e os índices Illumina (Nextera XT Index Kit, Illumina, San Diego, EUA) como primers. A reação foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de oito ciclos (desnaturação a 95°C por 30 segundos, hibridização do iniciador a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos) e alongamento final a 72°C durante 5 minutos. Após purificação com microesferas, os produtos de DNA eluídos foram quantificados no fluorômetro Qubit (Thermo Fisher Scientific), diluídos se necessário e coletados em proporção igual em uma única biblioteca. O sequenciamento foi realizado na plataforma de sequenciamento Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, EUA).

4.13 Análise de metagenômica

As sequências foram demultiplexadas de acordo com os índices e analisadas usando o aplicativo 16S Metagenomics no BaseSpace Sequence Hub usando o banco de dados Greengenes (disponível online: <http://greengenes.secondgenome.com/downloads/database>).

4.14 Disponibilidade dos dados

Os dados da sequência de alto rendimento de rRNA 16S foram depositados no banco de dados BioProject do National Center for Biotechnology Information (NCBI) com o número de projeto PRJNA616428.

4.15 Predição metagenômica

Para a realização da predição metagenômica foi utilizado o programa PICRUST (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) na plataforma Galaxy versão 1.1.1 de acordo com Langille *et al.* (2013). A abundância de cada Unidade Taxonômica Operacional (OTU) foi corrigida normalizando o número de cópias para refletir a verdadeira abundância do organismo. Um metagenoma virtual de cada amostra foi gerado usando o

banco de dados de abundância ortológica KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). A partir dos resultados previstos do metagenoma, os dados foram agrupados em níveis hierárquicos por categorização de função.

4.16 Análise estatística

Os dados de latência das crises convulsivas e dos marcadores pró-inflamatórios foram apresentados como média e erro padrão. Após a definição dos subgrupos, a análise estatística foi realizada utilizando a Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste *post hoc* de Tukey para dados paramétricos. A correlação entre os marcadores inflamatórios e a diversidade da população foi realizada através do coeficiente de correlação de Pearson. A análise estatística foi realizada usando um banco de dados com base no pacote estatístico SPSS, versão 17.

A análise estatística dos dados de metagenômica foi realizada por meio do GraphPad Prism 6 e do pacote Phyloseq da plataforma R. As variáveis foram expressas em média, desvio padrão e número de sequências por amostra. A análise estatística da diversidade foi realizada por meio de Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste *post hoc* de Tukey. A análise estatística da composição da microbiota intestinal dos ratos foi realizada pelo teste U de Mann-Whitney. As variáveis foram expressas em número de leituras. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos com valor de $p < 0,05$.

A análise estatística da predição metagenômica foi realizada pelo programa STAMP (Statistical analysis of metagenomic profiles) versão 2.1.3 (PARKS *et al.*, 2014). Para a análise do nível KEEG 1, foi utilizado o teste estatístico ANOVA para comparar grupos múltiplos e o método Benjamini-Hochberg para correção de testes múltiplos com base na taxa de descoberta falsa com $p < 0,05$. Para a análise entre grupos nos níveis KEEG 2 e 3 foi utilizado o teste t de Welch bilateral, método de Welch invertido com intervalo de confiança (0,95), teste de correção de Benjamini-Hochberg com filtro q-valor $> 0,05$.

5. ARTIGOS

5.1. Effect of prednisolone in a *kindling* model of epilepsy in rats on cytokine and gut microbiota diversity

O artigo intitulado “Effect of prednisolone in a kindling model of epilepsy in rats on cytokine levels and gut microbiota diversity” submetido a revista *Epilepsy research*, fator de impacto: 2.208.

Effect of prednisolone in a *kindling* model of epilepsy in rats on cytokine and gut microbiota diversity

Amanda Muliterno Domingues Lourenço de Lima^a, Gabriel de Lima Rosa^b, Edson Fernando Müller Guzzo^b, Rafael Bremm Padilha^d, Milena Conci de Araujo^d, Adriana Simon Coitinho^{b,c,d}, Sueli Teresinha Van Der Sand^{a,d}

^a Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil.

^d Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Dra. Adriana Simon Coitinho. Address: Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil, Phone.: 55 51 3308 3320, Fax: 55 51 3308 3166, E-mail address: adriana.simon@ufrgs.br

5.2. Gut microbiota modulation by prednisolone in a rat *kindling* model of pentylentetrazol (PTZ)-induced seizure

O artigo intitulado “Gut microbiota modulation by prednisolone in a rat *kindling* model of pentylentetrazol (PTZ)-induced seizure” publicado na revista *Microbial Pathogenesis*, fator de impacto 3.738.

Gut microbiota modulation by prednisolone in a rat *kindling* model of pentylenetetrazol (PTZ)-induced seizure

Amanda Muliterno Domingues Lourenço de Lima^a, Gabriel de Lima Rosa^b, Edson Fernando Müller Guzzo^b, Rafael Bremm Padilha^c, Rodrigo Costa da Silva^c, Alexandre Kleber Silveira^d, Daiana de Lima Morales^e, Milena Conci de Araujo^c, José Claudio Fonseca Moreira^d, Afonso Luís Barth^e, Adriana Simon Coitinho^{b,c,f}, Sueli Teresinha Van Der Sand^{a,c}

^a Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil.

^d Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Rua Ramiro Barcelos 2.600 – Annex, Porto Alegre, RS, Brazil.

^e Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2.350, Porto Alegre, RS, Brazil.

^f Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Dra. Adriana Simon Coitinho. Address: Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil, Phone.: 555133083320, Fax: 555133083166, E-mail address: adriana.simon@ufrgs.br

5.3. Metabolomic prediction of the gut microbiota of male rats treated with prednisolone in a pentylenetetrazol (PTZ)-induced *kindling* model

O artigo intitulado "Metabolomic prediction of the gut microbiota of male rats treated with prednisolone in a pentylenetetrazol (PTZ)-induced *kindling* model" submetido a revista Neuroscience Letters, fator de impacto 3.046.

Metabolomic prediction of the gut microbiota of male rats treated with prednisolone in a pentylenetetrazol (PTZ)-induced *kindling* model

Amanda Muliterno Domingues Lourenço de Lima^a, Gabriel de Lima Rosa^b, Edson Fernando Müller Guzzo^b, Rafael Bremm Padilha^c, Rodrigo Costa da Silva^c, Alexandre Kleber Silveira^d, Daiana de Lima Morales^e, Milena Conci de Araujo^c, José Claudio Fonseca Moreira^d, Afonso Luís Barth^e, Adriana Simon Coitinho^{b,c,f}, Sueli Teresinha Van Der Sand^{a,c}

^a Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil.

^d Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Rua Ramiro Barcelos 2.600 – Annex, Porto Alegre, RS, Brazil.

^e Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2.350, Porto Alegre, RS, Brazil.

^f Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Rua Sarmiento Leite 500, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author: Dra. Adriana Simon Coitinho. Address: Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil, Phone.: 55 51 3308 3320, Fax: 55 51 3308 3166, E-mail address: adriana.simon@ufrgs.br

6. DISCUSSÃO GERAL

A epileptogênese é conceitualmente definida como o desenvolvimento e extensão do tecido cerebral capaz de gerar convulsões espontâneas (PITKÄNEN; ENGEL, 2014). A influência da neuroinflamação na fisiopatologia da epileptogênese já foi bem estabelecida (ARONICA *et al.*, 2017; VAN VLIET *et al.*, 2018), e por isso a utilização de anti-inflamatórios emerge como uma estratégia terapêutica no tratamento de pacientes com epilepsia refratária (DEY *et al.*, 2016). O uso de anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais, como o diclofenaco de sódio (VIEIRA *et al.*, 2016), a dexametasona (GUZZO *et al.*, 2018) e a própria prednisolona (DE LIMA ROSA *et al.*, 2021), já demonstraram ter efeito na redução da severidade das crises epiléticas em modelo animal de *kindling* induzido pelo pentilenotetrazol. Em nosso estudo, o potencial efeito terapêutico anticonvulsivante da prednisolona em ambas as concentrações administradas foi observado através do aumento da latência das crises epiléticas, semelhante ao efeito do grupo tratado com diazepam.

A administração da prednisolona demonstrou um aumento da latência e das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β em nível local no tecido intestinal. O aumento de citocinas pró-inflamatórias tanto em nível sistêmico quanto central também já havia sido observado em estudos anteriores que avaliaram os efeitos dos anti-inflamatórios em modelo animal (GUZZO *et al.*, 2018; VIEIRA *et al.*, 2016). O conhecimento sobre os efeitos fisiopatológicos das moléculas da cascata inflamatória reguladas no tecido epilético, incluindo as citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e TNF- α , ainda são muito limitadas. Vias neuroinflamatórias específicas ainda não elucidadas podem ser ativadas, agindo na regulação da expressão dessas citocinas com diferentes papéis na epileptogênese (GUZZO *et al.*, 2018; VIEIRA *et al.*, 2016).

Por estar implicada na comunicação com o sistema nervoso central (SNC) através de diversas vias integradas pelo eixo intestino-cérebro, a microbiota intestinal pode exercer influência na modulação de mediadores inflamatórios. Em comparação a outros estudos nos quais foi observada diferença na diversidade da microbiota intestinal entre controles saudáveis e pacientes epiléticos (LINDEFELDT *et al.*, 2019; XIE *et al.*, 2017), os resultados em conjunto de nosso estudo, tanto pela análise das regiões espaçadoras intergênicas (RISA) quanto

pelo sequenciamento de nova geração (NGS), revelam que não houve diferença significativa na diversidade da comunidade da microbiota intestinal entre os diferentes tratamentos administrados. Além disso também foi possível observar o agrupamento das amostras dos animais tratados com prednisolona 1 mg/kg e 5 mg/kg, e dos animais tratados com prednisolona 5 mg/kg e diazepam através de ambas as técnicas. Assim, o efeito do tratamento com prednisolona demonstra maior semelhança ao diazepam, tanto no aumento da latência das convulsões quanto na diversidade da comunidade da microbiota intestinal.

Embora se busque correlacionar a diversidade da comunidade microbiana aos mecanismos envolvidos na patogênese de uma determinada doença, a simplificação do conceito de diversidade dentro da amostra pode impedir o aprofundamento em mecanismos mais específicos que sustentam os resultados da comunidade (SHADE, 2017). A mudança na composição da microbiota intestinal pode expor o organismo a componentes bacterianos ocasionando a desregulação do sistema imunológico e indução da epileptogênese. A microbiota intestinal regula o sistema imunológico do hospedeiro de uma maneira específica, e alterações na composição da microbiota intestinal podem levar a estados alterados de ativação imune intestinal e sistêmica (FUNG, 2020). Desta forma, parece mais pertinente analisar o perfil da microbiota intestinal no que diz respeito aos grupos taxonômicos e a predição metabolômica que a compõe, buscando compreender a complexidade das interações entre membros específicos e a relação funcional da comunidade microbiana.

Acreditamos que alguns grupos taxonômicos possam estar envolvidos com a modulação dos processos inflamatórios que promovem a epilepsia e que a administração da prednisolona possa ter selecionado algumas espécies com o potencial efeito protetor às crises epiléticas. No grupo controle de nosso estudo foi identificada a prevalência de *Clostridium* XIVa, Lachnospiraceae e *Clostridium xylanovorans*. O aumento significativo da abundância de Clostridia, Clostridiales e Lachnospiraceae já havia sido relatado em amostras de pacientes pediátricos com epilepsia refratária após o tratamento com dieta cetogênica (ZHANG, Y. *et al.*, 2018). O contraditório papel de membros do grupo Clostridia reflete na modulação da microbiota intestinal de forma que algumas espécies podem estar associadas à infecções (ROY SARKAR; BANERJEE, 2019), enquanto outras podem modular vários aspectos do sistema imunológico (SCHIRMER *et al.*, 2019).

Espécies pertencentes ao cluster Clostridia XIVa, assim como membros do grupo Lachnospiraceae e a espécie *Clostridium xylanovorans*, são produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), têm o potencial de induzir células T reguladoras (Treg) do cólon e são capazes de suprimir condições inflamatórias (ATARASHI *et al.*, 2011). AGCCs servem como fontes de energia para células epiteliais intestinais, modulam a produção de citocinas e induzem a expansão de células Treg (SCHIRMER *et al.*, 2016). Espécies de *Clostridium* dos clusters IV, XIVa e XVIII induzem a produção de TGF- β e IL-17, mas não de IL-6 e TNF- α (ATARASHI *et al.*, 2013), demonstrando o potencial efeito anti-inflamatório destas espécies. Desta forma, o grupo controle negativo demonstrou uma reduzida produção de citocinas pró-inflamatórias, como a TNF- α , em comparação com os grupos tratados, muito provavelmente em função da prevalência da presença de membros do grupo Clostridia. Embora tenha havido uma menor latência das crises epiléticas, outros mecanismos ainda não elucidados, associados ou não à inflamação, podem estar relacionados ao desencadeamento da epileptogênese.

Concomitante a prevalência de membros do cluster Clostridia XIVa, Lachnospiraceae e *Clostridium xylanovorans* no grupo controle negativo, foi observado um aumento de vias associadas ao metabolismo de aminoácidos, nucleotídeo açúcares, galactose, amido e sucrose, além do aumento de sequências associadas aos transportadores e transportadores ABC. A elevação de alguns metabólitos de carboidratos pode desempenhar um papel potencial no mecanismo de epileptogênese (WANG, D. *et al.*, 2016). Isso porque a alta demanda de energia dos neurônios decorrente da atividade neuronal excessiva na epilepsia é coberta principalmente pelo suprimento de glicose realizada por transportadores específicos expressos e regulados em resposta à atividade cerebral (KOEPSELL, 2020). Transportadores especializados como o sistema de utilização de amido (Sus), responsável pela conversão de amido em glicose (PORTER; LUIS; MARTENS, 2018), e sistemas transportadores ABC (transportadores de cassete de ligação de ATP), encarregados do transporte de carboidratos (KOROPATKIN; CAMERON; MARTENS, 2012) são necessários ao metabolismo microbiano de glicose. Desta forma, o aumento de metabólitos de carboidratos e transportadores podem estar associados aos processos epileptogênicos no grupo controle negativo provavelmente em resposta a excitabilidade neuronal.

Em contraste, os grupos diazepam e prednisolona em que o efeito do aumento da latência foi observado, foram os grupos que apresentaram a maior concentração das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β . A capacidade de produção de TNF- α e INF- γ parece ser fortemente influenciada pelo microbioma, enquanto outras citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-17 e IL-22 exibem menos, porém mais específicas, associações com a microbiota intestinal (SCHIRMER *et al.*, 2016). Assim, IL-1 β está intrínsecamente associada a determinadas espécies, enquanto TNF- α parece ser modulada pela comunidade presente na microbiota como um todo. A prednisolona exerce suas ações anti-inflamatórias interferindo na conversão do ácido aracdônico (ARA) em mediadores lipídicos inflamatórios, como as prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) e leucotrienos (LTs), pela inibição das enzimas fosfolipases (PLA2) e ciclooxigenases (COX1 e COX2) (CAIN; CIDLOWSKI, 2017). Embora esteja estabelecido que os glicocorticóides inibem a transcrição de citocinas pró-inflamatórias produzidas por monócitos e macrófagos (CAIN; CIDLOWSKI, 2017), em nosso estudo observamos um aumento de IL-1 β e TNF- α . Desta forma, acreditamos que a presença de bactérias específicas possam exercer a influência no aumento da latência das crises convulsivas nos grupos tratados com prednisolona concomitantemente à ativação das vias inflamatórias.

O aumento de sequências associadas ao metabolismo lipídico nos grupos tratados com prednisolona pode estar associado a inibição da conversão do ARA em mediadores inflamatórios, em favor ao direcionamento das vias metabólicas para a conversão de ARA em fosfolipídeos e glicerofosfolipídeos. Distúrbios no metabolismo de ácidos graxos e glicerofosfolipídeos acompanhados por alterações nas enzimas metabólicas correspondentes foram relatados em modelos animais de epilepsia (JOHNSON *et al.*, 2020). Evidências crescentes indicam um papel das vias de sinalização lipídica na epileptogênese; assim, os sinais lipídicos emergem como potenciais biomarcadores para o início e evolução do distúrbio epilético (ZHANG, H. *et al.*, 2020). Assim a prednisolona, além de modular as cascatas inflamatórias tanto em nível intestinal quanto no SNC (DE LIMA ROSA *et al.*, 2021), pode intervir nas crises epiléticas também através do metabolismo lipídico microbiano intestinal. O ARA é um ácido graxo poli-insaturado (PUFA) que representa 5 a 11% do total de fosfolipídeos cerebrais presentes na membrana celular de neurônios e células gliais (astrócitos, microglia

e oligodendrócitos) (JOFFRE *et al.*, 2016). A maioria dos PUFAs usados na síntese de glicerofosfolípídeos da membrana neural do cérebro são derivados do trato gastrointestinal, não do SNC (ZHENG *et al.*, 2020). Os glicerofosfolípídeos são os principais constituintes lipídicos das membranas celulares neuronais e da mielina, e precursores de mediadores lipídicos envolvidos nos processos de transdução de sinal, afetado diretamente as funções fisiológicas das células neurais e a regulação da função sináptica (LEE *et al.*, 2018; ZHANG, H. *et al.*, 2020).

O aumento significativo do filo Verrucomicrobia observado no grupo em que foi administrada prednisolona 1 mg/kg, provavelmente foi devido a predominância da espécie *Akkermansia muciniphila*. Por sua capacidade de degradar a mucina e controlar a espessura do muco, *Akkermansia muciniphila* contribui para a manutenção da barreira intestinal e regulação do sistema imunológico (ZHANG, T. *et al.*, 2019). *Akkermansia muciniphila* também está associada a indução da produção de citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e TNF- α) por células mononucleares do sangue periférico (OTTMAN *et al.*, 2017b). Entretanto, já foi relatado que citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β são capazes de induzir convulsões por meio da modulação da transmissão glutamatérgica (ALYU; DIKMEN, 2017). Ainda de acordo com (OTTMAN *et al.*, 2017b), as citocinas IL-8, IL-6, IL-1 β , IL-10 e TNF- α induzidas por *Akkermansia muciniphila* podem não ser estritamente definidas como anti ou pró-inflamatórias, mas podem ter um papel mais complexo na preservação do equilíbrio do ecossistema intestinal. Por coincidência, a abundância de *Akkermansia muciniphila* foi aumentada nos grupos tratados com diazepam e prednisolona, da mesma forma que o aumento de IL-1 β e TNF- α e também o aumento da latência das crises epiléticas. De modo que outros mecanismos, além da modulação via citocinas pró-inflamatórias, podem estar associados aos efeitos protetivos da prednisolona e das espécies de bactérias presentes na microbiota associadas ao tratamento.

O aumento da abundância relativa de *Akkermansia muciniphila* já havia sido relatado em estudo anterior que avaliou o efeito da dieta cetogênica em camundongos e quando co-administrada com *Parabacteroides* conferiu proteção às crises convulsivas (OLSON *et al.*, 2018). Além de estar estreitamente relacionada a modulação do sistema imunológico, *Akkermansia muciniphila*

também está associada a regulação dos níveis de neurotransmissores no sistema nervoso central (SNC). *Akkermansia muciniphila* é capaz de restaurar a diminuição de aminoácidos gama-glutamilados (GG), produtos metabólitos secundários, que quando regulados por essas bactérias, aumentam as razões GABA/glutamato do hipocampo, o que aumenta a biodisponibilidade de GABA na região do hipocampo levando à proteção da convulsão (CHENG, 2020).

Outro grupo que apresentou aumento significativo no tratamento com diazepam e prednisolona 1mg/kg foi Candidatus_Saccharibacteria. Com o genoma altamente reduzido, o grupo Candidatus_Saccharibacteria (anteriormente conhecido como TM7), é incapaz de sintetizar qualquer um de seus aminoácidos, nucleotídeos, lipídeos e precursores da parede celular, dependendo metabolicamente de uma bactéria hospedeira, e por isso vive fisicamente aderido à superfície de outras bactérias, como *Actinomyces* (BOR, B. *et al.*, 2019; BOR, Batbileg *et al.*, 2016; HE, X. *et al.*, 2015). A associação de TM7 devido a sua capacidade de formação de biofilme é potencialmente benéfica para bactérias hospedeiras, o que permite a espécies como *Actinomyces*, as quais são fortes indutores da expressão do gene TNF- α , escapem do sistema imunológico *in vivo*, reduzindo diretamente a inflamação (BEDREE *et al.*, 2018; HE, X. *et al.*, 2015). A produção de biofilme mascara a expressão de proteínas de superfície necessárias para a indução de TNF- α em macrófagos e algumas evidências até sugerem que representantes do grupo TM7 são capazes de modular a resposta imune do hospedeiro, suprimindo diretamente a expressão de TNF- α em macrófagos (HE, X. *et al.*, 2015).

Em função de sua necessidade obrigatória de se associar a outras espécies, a prevalência de Saccharibacteria reflete no aumento significativo da abundância de membros do grupo Actinobacteria observada nos grupos tratados com diazepam em relação aos grupos controle negativo e prednisolona 5 mg/kg, e prednisolona 1 mg/kg em comparação ao grupo controle negativo. A abundância do filo Actinobacteria já havia sido relatado em voluntários saudáveis em comparação aos pacientes epiléticos (ŞAFAK *et al.*, 2020). Além de seu papel na modulação do sistema imune, membros do filo Actinobacteria, com destaque para a família Bifidobacteria, têm papel fundamental no desenvolvimento e manutenção da homeostase intestinal, além de ter um efeito benéfico para o SNC pela produção de AGCCs (BINDA *et al.*, 2018).

Bifidobacterium, representante do grupo Actinobacteria, que foi prevalente nos grupos diazepam e prednisolona em comparação com o controle negativo; e espécies de *Lactobacillus*, presentes principalmente no grupo diazepam, quando co-administradas promovem a redução das crises epiléticas (PENG, W. *et al.*, 2018), e aumentam a imunidade sistêmica e local. A suplementação de probióticos com uma mistura de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* não apenas diminuiu as atividades epiléticas em modelo animal quimicamente induzidas por PTZ (BAGHERI *et al.*, 2019), mas também reduziu mais de 50% da frequência das convulsões em pacientes com epilepsia (GÓMEZ-EGUÍLAZ *et al.*, 2018). *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os principais produtores de GABA e desempenham um papel fundamental no desenvolvimento e funcionalidade da resposta imune inata e adaptativa. A redução das convulsões foi correlacionada com o aumento do nível de GABA em ratos tratados com probióticos, cujo efeito foi capaz de contribuir para o alívio dos efeitos da inflamação (BAGHERI *et al.*, 2019).

A predominância de determinados grupos bacterianos como representantes dos filos Actinobacteria, Saccharibacteria e Verrucomicrobia nos grupos tratados com prednisolona foi acompanhada do aumento de sequências funcionais associadas ao metabolismo de aminoácidos, co-fatores, vitaminas, pantotenato, coenzima A (CoA) e ciclo do citrato (TCA). Algumas espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, possuem a capacidade de converter a glutamina em glutamato, que além de ser um neurotransmissor, também é um substrato para a posterior conversão em GABA (BAGHERI *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2020). A síntese de aminoácidos e sua interconversão em neurotransmissores é realizada a partir da atividade enzimática de cofatores como as vitaminas (KENNEDY, 2016). O ácido pantotênico (vitamina B5) é um substrato para a síntese de coenzima A (CoA), um cofator essencial para o ciclo do TCA. O pantotenato, via CoA, contribui para a estrutura e função das células cerebrais por meio de seu envolvimento na síntese de aminoácidos, neurotransmissores, ácidos graxos, colesterol, fosfolipídios e hormônios esteróides, incluindo a acetilcolina. A vitamina B5 também está envolvida na manutenção da barreira intestinal, ativação respostas imunológicas Th1 e Th17, na produção de moléculas pró-inflamatórias (incluindo IL-6 e TNF- α) e síntese de acetilcolina, atuando na regulação do sistema nervoso parassimpático (GOMINAK, 2016; YOSHII *et al.*, 2019), podendo estar associada

com a modulação dos mecanismos envolvidos na epileptogênese.

A prevalência destes filos pode ter refletido também no aumento das vias microbianas associadas ao metabolismo de glicanos, lipídeos, terpenóides, policetídeos e xenobióticos demonstrado nos grupos tratados com prednisolona. A microbiota intestinal tem a capacidade de metabolizar carboidratos complexos como glicanos em ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs) (como acetato, butirato, lactato e propionato) através da atividade enzimática de microrganismo intestinais, como *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium* cluster *XVIa* (DALILE *et al.*, 2019; KOROPATKIN; CAMERON; MARTENS, 2012), observados em nosso estudo. Os AGCCs estão correlacionados a produção de mucina, manutenção da integridade do epitélio intestinal, diferenciação de células T virgens em células Treg, indução da expressão de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10), diminuição da ativação microglial, modulação dos níveis de neurotransmissores glutamato e GABA no hipocampo e dos níveis de potássio intracelular, o que implica no envolvimento dos AGCCs no funcionamento dos sistemas de sinalização celular e na função neuronal (ALESSANDRI *et al.*, 2019; RÍOS-COVIÁN *et al.*, 2016; RIVIÈRE *et al.*, 2016; SILVA; BERNARDI; FROZZA, 2020).

Além disso, já foi estabelecido que alguns membros de Actinobacteria, estão envolvidos na produção de terpenóides e policetídeos. Já foi demonstrado que os terpenóides possuem atividade anti-inflamatória e neuroprotetora, e desempenham um papel importante no canal de sódio (MRUDULAKUMARI VASUDEVAN; LEE, 2020). Enquanto um dos policetídeos mais amplamente conhecidos, o antibiótico macrolídeo, foi associado a redução de crises convulsivas em pacientes epilépticos provavelmente por modular a microbiota intestinal e a atividade do citocromo P450 (BRAAKMAN; VAN INGEN, 2018). A expressão de enzimas metabólicas do hospedeiro, como o citocromo P450, a ativação e a biodisponibilidade de fármacos é influenciada pelo metabolismo microbiano intestinal de xenobióticos (COLLINS; PATTERSON, 2020; WILSON; NICHOLSON, 2017). Desta forma o aumento de sequências associadas a síntese de terpenóides, policetídeos e xenobióticos pode estar associado a metabolização da prednisolona pela microbiota intestinal resultando na sua ativação e disponibilidade, além de contribuir para a atividade anti-inflamatória da droga.

Os mecanismos pelos quais a prednisolona exerce o seu efeito protetor nas

crises epilépticas ainda não foram completamente elucidados, mas os resultados deste trabalho demonstraram que grupos bacterianos específicos como representantes dos filos Actinobacteria, Saccharibacteria e Verrucomicrobia presentes na microbiota intestinal se correlacionam com o aumento da latência das crises convulsivas e exercem influência nos mecanismos envolvidos na epileptogênese provavelmente através do metabolismo microbiano de aminoácidos, lipídeos, glicanos e vias associadas. Estas vias podem estar associadas a regulação de moléculas do sistema imunológico, produção de AGCCs e modulação de GABA. Em última análise, esses grupos bacterianos parecem ter um papel protetor no desenvolvimento e progressão da epilepsia, principalmente devido à capacidade de alterar a atividade cerebral por meio da modulação da neurotransmissão excitatória/inibitória no SNC, mas também através dos efeitos que podem induzir nas respostas imunes inatas e adaptativas. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar quais os mecanismos envolvidos em cada uma das vias metabólicas microbianas e o papel que os microrganismos desempenham na atenuação das crises epilépticas através da administração de anti-inflamatórios.

7. CONCLUSÃO

A inflamação sistêmica e central está associada ao desenvolvimento e progressão da epilepsia, e por isso anti-inflamatórios tem sido utilizados como opção no tratamento de pacientes epilépticos. A prednisolona se apresentou como um promissor fármaco alternativo e uma nova estratégia terapêutica no tratamento de epilepsia. O aumento da latência das crises convulsivas em modelo animal semelhante ao diazepam demonstra o efeito protetor do medicamento. O diazepam é um medicamento rotineiramente utilizado no tratamento da epilepsia. O anti-inflamatório resultou no aumento de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α em amostras de tecido intestinal, principalmente na menor concentração. Esse aumento pode ter ocorrido em função da regulação de vias neuroinflamatórias ainda não conhecidas.

A prednisolona não apresentou diferença significativa em relação a diversidade da microbiota intestinal, mas demonstrou uma semelhança com a comunidade encontrada no grupo tratado com diazepam. A alteração na estrutura

da comunidade a nível taxonômico em comparação ao grupo controle negativo indica que a presença de determinados membros específicos exercem uma influência fundamental na modulação do sistema imune e, em última análise, na neuroinflamação. Apesar do papel controverso de Clostridia, a prevalência do cluster XIVa, assim como membros da família Lachnospiraceae e *Clostridium xylanovorans* no grupo controle regulam negativamente citocinas pró-inflamatórias. A predominância dos filos Saccharibacteria, Actinobacteria e Verrucomicrobia, representado por *Akkermansia muciniphila*, no grupo tratado com prednisolona estão associadas a regulação do sistema imune e neuromodulação.

A presença de membros específicos estão associados a produção de AGCCs, diferenciação de células Treg, produção de citocinas e biodisponibilidade de GABA. O aumento de IL-1 β e TNF- α induzidas por determinados grupos taxonômicos podem não ser estritamente definidas como anti ou pró-inflamatórias, mas podem ter um papel mais complexo na preservação do equilíbrio do ecossistema intestinal. Além disso, o efeito protetor na severidade das crises convulsivas através da presença destes mesmos grupos taxonômicos já foi correlacionada anteriormente em função do aumento do nível de GABA. Desta forma, o efeito protetor da prednisolona em crises epiléticas está intimamente relacionada com a microbiota intestinal na medida em que é a presença de determinadas espécies que modulam o sistema imune inato e adaptativo e a neuromodulação.

A prednisolona pode ter efeito na microbiota intestinal de ratos no modelo de *kindling* induzido por PTZ através do aumento de sequências funcionais principalmente associadas ao metabolismo microbiano de carboidratos, lipídios, aminoácidos e vias associadas. A influência que prednisolona pode exercer na redução das crises convulsivas pode ocorrer via modulação da microbiota, metabolismo energético microbiano, regulação do sistema imunológico através da expressão de citocinas pró-inflamatórias e modulação GABA-érgica e dos canais iônicos dependentes de voltagem. Embora mais estudos sejam necessários para elucidar os mecanismos envolvidos em cada uma destas vias metabólicas observadas, a prednisolona demonstra ser um fármaco promissor na redução das crises convulsivas em pacientes epiléticos através da modulação do metabolismo da microbiota intestinal de forma anti-inflamatória e neuroprotetora.

8. REFERÊNCIAS

ALESSANDRI, Giulia *et al.* Bifidobacterial Dialogue With Its Human Host and Consequent Modulation of the Immune System. [s. l.], v. 10, n. October, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02348>

ALYU, Feyza; DIKMEN, Miriř. Inflammatory aspects of epileptogenesis: Contribution of molecular inflammatory mechanisms. **Acta Neuropsychiatrica**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 1–16, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/neu.2016.47>

ARONICA, Eleonora *et al.* Neuroinflammatory targets and treatments for epilepsy validated in experimental models. **Epilepsia**, [s. l.], v. 58, p. 27–38, 2017.

ATARASHI, Koji *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. **Science**, [s. l.], v. 331, n. 6015, p. 337–341, 2011.

ATARASHI, Koji *et al.* Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. **Nature**, [s. l.], v. 500, n. 7461, p. 232–236, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature12331>

BAGHERI, Samaneh *et al.* Effect of probiotic supplementation on seizure activity and cognitive performance in PTZ-induced chemical kindling. **Epilepsy and Behavior**, [s. l.], v. 95, p. 43–50, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.03.038>

BARNES, Peter J. Glucocorticosteroids BT - Pharmacology and Therapeutics of Asthma and COPD. *In*: PAGE, Clive P; BARNES, Peter J (org.). Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 93–115. Disponível em: https://doi.org/10.1007/164_2016_62

BEDREE, Joseph K. *et al.* Quorum Sensing Modulates the Epibiotic-Parasitic Relationship Between Actinomyces odontolyticus and Its Saccharibacteria epibiont, a Nanosynbacter lyticus Strain, TM7x. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 9, n. SEP, p. 1–14, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02049>

BELKAID, Yasmine; NAIK, Shruti. Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals. **Nature immunology**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 646, 2013.

BINDA, Cecilia *et al.* Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis. [s. l.], v. 50, p. 421–428, 2018.

BONAZ, Bruno; BAZIN, Thomas; PELLISSIER, Sonia. The vagus nerve at the interface of the microbiota-gut-brain axis. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. FEB, p. 1–9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00049>

BOR, B. *et al.* Saccharibacteria (TM7) in the Human Oral Microbiome. **Journal of Dental Research**, [s. l.], v. 98, n. 5, p. 500–509, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0022034519831671>

BOR, Batbileg *et al.* Phenotypic and Physiological Characterization of the

Epibiotic Interaction Between TM7x and Its Basibiont Actinomyces. **Microbial Ecology**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 243–255, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0711-7>

BRAAKMAN, Hilde M.H.; VAN INGEN, Jakko. Can epilepsy be treated by antibiotics? **Journal of Neurology**, [s. l.], v. 265, n. 8, p. 1934–1936, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00415-018-8943-3>

CAIN, Derek W.; CIDLOWSKI, John A. Immune regulation by glucocorticoids. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 233–247, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nri.2017.1>

CAMARA-LEMARROY, Carlos R. *et al.* Prevalence and impact of irritable bowel syndrome in people with epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, [s. l.], v. 63, p. 29–33, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.05.041>

CERBO, Alessandro Di *et al.* Mechanisms and therapeutic effectiveness of lactobacilli. [s. l.], p. 187–203, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2015-202976>

CHEN, Chien-Hua; LIN, Cheng-Li; KAO, Chia-Hung. Irritable Bowel Syndrome Increases the Risk of Epilepsy. **Medicine**, [s. l.], v. 94, n. 36, p. e1497, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001497>

CHEN, Zhibin *et al.* Treatment outcomes in patients with newly diagnosed epilepsy treated with established and new antiepileptic drugs a 30-year longitudinal cohort study. **JAMA Neurology**, [s. l.], v. 75, n. 3, p. 279–286, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2017.3949>

CHENG, D. A review of a potential and promising probiotic candidate — Akkermansia muciniphila. [s. l.], p. 1–10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jam.14911>

CIESIELSKI, Slawomir *et al.* Ribosomal intergenic spacer analysis as a tool for monitoring methanogenic archaea changes in an anaerobic digester. **Current Microbiology**, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 240–248, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0353-2>

COLLINS, Stephanie L.; PATTERSON, Andrew D. The gut microbiome: an orchestrator of xenobiotic metabolism. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 19–32, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.12.001>

COUNCIL, National Research. **National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals**. [S. l.]: Washington, DC, The National Academies Press, 2011.

CRYAN, John F. *et al.* The microbiota-gut-brain axis. **Physiological Reviews**, [s. l.], v. 99, n. 4, p. 1877–2013, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2018>

DALILE, Boushra *et al.* The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, [s. l.], v.

16, n. 8, p. 461–478, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0157-3>

DAMBACH, Hannes *et al.* Glia and epilepsy: Experimental investigation of antiepileptic drugs in an astroglia/microglia co-culture model of inflammation. **Epilepsia**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. 184–192, 2014.

DANOVARO, R. *et al.* Comparison of two fingerprinting techniques, terminal restriction fragment length polymorphism and automated ribosomal intergenic spacer analysis, for determination of bacterial diversity in aquatic environments. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 72, n. 9, p. 5982–5989, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01361-06>

DE CARO, Carmen *et al.* Can we ‘seize’ the gut microbiota to treat epilepsy? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 107, p. 750–764, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.10.002>

DE LIMA ROSA, Gabriel *et al.* Effects of prednisolone on behavioral and inflammatory profile in animal model of PTZ-induced seizure. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 743, n. November 2020, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135560>

DE VRIES, Evelien E *et al.* Inflammatory mediators in human epilepsy: a systematic review and meta-analysis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 63, p. 177–190, 2016.

DEVINSKY, Orrin *et al.* Epilepsy. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], v. 4, n. May, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.24>

DEVINSKY, Orrin *et al.* Glia and epilepsy: Excitability and inflammation. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 174–184, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.008>

DEY, Avijit *et al.* Anti-Inflammatory Small Molecules to Treat Seizures and Epilepsy: From Bench to Bedside. **Trends in Pharmacological Sciences**, [s. l.], v. 37, n. 6, p. 463–484, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.03.001>

DINAN, Timothy G; CRYAN, John F. Gut–brain axis in 2016: Brain–gut–microbiota axis—mood, metabolism and behaviour. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 69, 2017a.

DINAN, Timothy G.; CRYAN, John F. Gut instincts: microbiota as a key regulator of brain development, ageing and neurodegeneration. **Journal of Physiology**, [s. l.], v. 595, n. 2, p. 489–503, 2017b. Disponível em: <https://doi.org/10.1113/JP273106>

DINAN, Timothy G.; CRYAN, John F. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, [s. l.], v. 46, n. 1, p. 77–89, 2017c. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.gtc.2016.09.007>

DU SERT, Nathalie Percie *et al.* The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **PLoS Biology**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 9–10,

2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410>

EHRCHEN, Jan M.; ROTH, Johannes; BARCZYK-KAHLERT, Katarzyna. More than suppression: Glucocorticoid action on monocytes and macrophages. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 10, n. AUG, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02028>

EL AIDY, Sahar; DINAN, Timothy G; CRYAN, John F. Immune modulation of the brain-gut-microbe axis. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], v. 5, p. 146, 2014.

FALCO-WALTER, Jessica J.; SCHEFFER, Ingrid E.; FISHER, Robert S. The new definition and classification of seizures and epilepsy. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 139, n. July 2017, p. 73–79, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.11.015>

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

FISHER, Robert S *et al.* Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. **Epilepsia**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 531–542, 2017a.

FISHER, Robert S. *et al.* Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 522–530, 2017b. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/epi.13670>

FORBES, Jessica D.; VAN DOMSELAAR, Gary; BERNSTEIN, Charles N. The gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 7, n. JUL, p. 1–18, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01081>

FUNG, Thomas C. The microbiota-immune axis as a central mediator of gut-brain communication. **Neurobiology of Disease**, [s. l.], v. 136, p. 104714, 2020.

FUNG, Thomas C; OLSON, Christine A; HSIAO, Elaine Y. Interactions between the microbiota, immune and nervous systems in health and disease. **Nature neuroscience**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 145, 2017.

GERRITSEN, Jacqueline *et al.* A comparative and functional genomics analysis of the genus *Romboutsia* provides insight into adaptation to an intestinal lifestyle. **bioRxiv**, [s. l.], p. 845511, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/845511>

GIROLAMO, Francesco; COPPOLA, Cristiana; RIBATTI, Domenico. Immunoregulatory effect of mast cells influenced by microbes in neurodegenerative diseases. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 65, p. 68–89, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.06.017>

GOLYALA, Ambica; KWAN, Patrick. Drug development for refractory epilepsy: The past 25 years and beyond. [s. l.], v. 44, p. 147–156, 2017.

GÓMEZ-EGUÍLAZ, M. *et al.* The beneficial effect of probiotics as a

supplementary treatment in drug-resistant epilepsy: A pilot study. **Beneficial Microbes**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 875–881, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3920/BM2018.0018>

GOMINAK, S. C. Vitamin D deficiency changes the intestinal microbiome reducing B vitamin production in the gut. The resulting lack of pantothenic acid adversely affects the immune system, producing a “pro-inflammatory” state associated with atherosclerosis and autoimmun. **Medical Hypotheses**, [s. l.], v. 94, p. 103–107, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2016.07.007>

GUZZO, Edson Fernando Müller *et al.* Effect of dexamethasone on seizures and inflammatory profile induced by Kindling Seizure Model. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 325, p. 92–98, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.10.005>

HAMPTON, Tracy. Gut Microbes May Account for the Anti-Seizure Effects of the Ketogenic Diet. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, [s. l.], v. 320, n. 13, p. 1307–1308, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jama.2017.12865>

HART, Marcia L. *et al.* Comparative evaluation of DNA extraction methods from feces of multiple host species for downstream next-generation sequencing. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 11, p. 1–16, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143334>

HE, Xuesong *et al.* Cultivation of a human-associated TM7 phylotype reveals a reduced genome and epibiotic parasitic lifestyle. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 112, n. 1, p. 244–249, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1419038112>

HE, Zhi *et al.* Fecal microbiota transplantation cured epilepsy in a case with Crohn’s disease: The first report. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 23, n. 19, p. 3565, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i19.3565>

HO, Ying Hao *et al.* Peripheral inflammation increases seizure susceptibility via the induction of neuroinflammation and oxidative stress in the hippocampus. **Journal of Biomedical Science**, [s. l.], v. 22, n. 1, p. 1–14, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0157-8>

HUANG, Congfu *et al.* Distinct Gut Microbiota Composition and Functional Category in Children With Cerebral Palsy and Epilepsy. **Frontiers in Pediatrics**, [s. l.], v. 7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00394>

INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY (ILAE). **About ILAE**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.ilae.org/>.

IORI, Valentina; FRIGERIO, Federica; VEZZANI, Annamaria. Modulation of neuronal excitability by immune mediators in epilepsy. **Current opinion in pharmacology**, [s. l.], v. 26, p. 118–123, 2016.

JOFFRE, Corinne *et al.* Modulation of brain PUFA content in different experimental models of mice. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty**

Acids, [s. l.], v. 114, n. September, p. 1–10, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2016.09.003>

JOHNSON, Alicia *et al.* Changes in lipid profiles of epileptic mouse model. **Metabolomics**, [s. l.], v. 16, n. 10, p. 1–12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11306-020-01729-4>

KALILANI, Linda *et al.* The epidemiology of drug-resistant epilepsy: A systematic review and meta-analysis. **Epilepsia**, [s. l.], v. 59, n. 12, p. 2179–2193, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/epi.14596>

KARAASLAN, Zerrin; TUZUN, Erdem. Inflammatory biomarkers in epilepsy. **Neurological Sciences and Neurophysiology**, [s. l.], v. 36, n. 3, p. 129–135, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5152/nsn.2019.12509>

KATYAL, Jatinder; KUMAR, Hemant; GUPTA, Yogendra Kumar. Anticonvulsant activity of the cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor etoricoxib in pentylenetetrazole-kindled rats is associated with memory impairment. **Epilepsy and Behavior**, [s. l.], v. 44, p. 98–103, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2014.12.032>

KEEZER, Mark R.; SISODIYA, Sanjay M.; SANDER, Josemir W. Comorbidities of epilepsy: Current concepts and future perspectives. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 106–115, 2016. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00225-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00225-2)

KELLY, John R *et al.* Transferring the blues: depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. **Journal of psychiatric research**, [s. l.], v. 82, p. 109–118, 2016.

KENNEDY, David O. B vitamins and the brain: Mechanisms, dose and efficacy—A review. **Nutrients**, [s. l.], v. 8, n. 2, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/nu8020068>

KILKENNY, Carol *et al.* **Animal research: reporting in vivo experiments—the ARRIVE guidelines**. [S. l.]: SAGE Publications Sage UK: London, England, 2011.

KLINDWORTH, Anna *et al.* Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. **Nucleic acids research**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. e1–e1, 2013.

KOEPSSELL, Hermann. Glucose transporters in brain in health and disease. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, [s. l.], v. 472, n. 9, p. 1299–1343, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02441-x>

KOROPATKIN, Nicole M.; CAMERON, Elizabeth A.; MARTENS, Eric C. How glycan metabolism shapes the human gut microbiota. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 323–335, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2746>

LABUS, Jennifer S. *et al.* Evidence for an association of gut microbial

Clostridia with brain functional connectivity and gastrointestinal sensorimotor function in patients with irritable bowel syndrome, based on tripartite network analysis. **Microbiome**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 1–15, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0656-z>

LANGILLE, Morgan G I *et al.* Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature Biotechnology**, [s. l.], v. 31, n. 9, p. 814–821, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>

LEE, Jong Cheol *et al.* High-fat diet-induced lipidome perturbations in the cortex, hippocampus, hypothalamus, and olfactory bulb of mice. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1863, n. 9, p. 980–990, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2018.05.007>

LEVY, Maayan *et al.* Dysbiosis and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, [s. l.], v. 17, n. 4, p. 219–232, 2017.

LI, Qing *et al.* Contribution of glutaminases to glutamine metabolism and acid resistance in *Lactobacillus reuteri* and other vertebrate host adapted lactobacilli. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 86, n. September 2019, p. 103343, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103343>

LINDEFELDT, Marie *et al.* The ketogenic diet influences taxonomic and functional composition of the gut microbiota in children with severe epilepsy. **NPJ Biofilms and Microbiomes**, [s. l.], v. 5, n. 1, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41522-018-0073-2>

LUM, Gregory R.; OLSON, Christine A.; HSIAO, Elaine Y. **Emerging roles for the intestinal microbiome in epilepsy**. [S. l.]: Academic Press Inc., 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2019.104576>

LYNCH, Susan V; PEDERSEN, Oluf. The human intestinal microbiome in health and disease. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 375, n. 24, p. 2369–2379, 2016.

MECHICHI, T *et al.* Characterization of a New Xylanolytic Bacterium , *Clostridium xylanovorans* sp . nov. [s. l.], v. 371, p. 366–371, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(99\)80044-7](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80044-7)

MEDEL-MATUS, Jesús-Servando *et al.* Facilitation of kindling epileptogenesis by chronic stress may be mediated by intestinal microbiome. **Epilepsia Open**, [s. l.], v. 3, n. 2, p. 290–294, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/epi4.12114>

MORALES-SOSA, Mariana *et al.* Immunomodulatory effect of Celecoxib on HMGB1/TLR4 pathway in a recurrent seizures model in immature rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, [s. l.], v. 170, n. May, p. 79–86, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2018.05.007>

MRUDULAKUMARI VASUDEVAN, Ushasree; LEE, Eun Yeol. Flavonoids, terpenoids, and polyketide antibiotics: Role of glycosylation and biocatalytic tactics in engineering glycosylation. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 41, n. April, p. 107550,

2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107550>

MUÑANA, Karen R.; JACOB, Megan E.; CALLAHAN, Benjamin J. Evaluation of fecal *Lactobacillus* populations in dogs with idiopathic epilepsy: a pilot study. **Animal Microbiome**, [s. l.], v. 2, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s42523-020-00036-6>

NIH. Public health service policy on humane care and use of laboratory animals. **Office of Laboratory Animal Welfare**, [s. l.], p. 1–22, 2015. Disponível em: <http://grants.nih.gov/grants/olaw/references/PHSPolicyLabAnimals.pdf>

OLSON, Christine A. *et al.* The Gut Microbiota Mediates the Anti-Seizure Effects of the Ketogenic Diet. **Cell**, [s. l.], v. 173, n. 7, p. 1728-1741.e13, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.04.027>

OSGOOD, Peter T *et al.* 431-Antibiotic-Induced Gaba Induces Visceral Hypersensitivity and Alterations in Gut Motility in Murine Models. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 154, n. 6, p. S-96, 2018.

OTTMAN, Noora *et al.* Action and function of *Akkermansia muciniphila* in microbiome ecology, health and disease. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 637–642, 2017a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2017.10.001>

OTTMAN, Noora *et al.* Pili-like proteins of *Akkermansia muciniphila* modulate host immune responses and gut barrier function. [s. l.], p. 1–18, 2017b. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173004>

PARKS, Donovan H. *et al.* STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 30, n. 21, p. 3123–3124, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu494>

PAVEL, Ana Brândușa; VASILE, Cristian Ioan. PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. **BMC Bioinformatics**, [s. l.], v. 13, n. 1, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-9>

PENG, Anjiao *et al.* Altered composition of the gut microbiome in patients with drug-resistant epilepsy. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 147, n. 37, p. 102–107, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2018.09.013>

PENG, Weijun *et al.* Association of gut microbiota composition and function with a senescence-accelerated mouse model of Alzheimer's Disease using 16S rRNA gene and metagenomic sequencing analysis. **Ageing (Albany NY)**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 4054, 2018.

PHILIPS, Cyriac Abby *et al.* Corticosteroids, nutrition, pentoxifylline, or fecal microbiota transplantation for severe alcoholic hepatitis. **Indian Journal of Gastroenterology**, [s. l.], v. 37, n. 3, p. 215–225, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12664-018-0859-4>

PITKÄNEN, Asla *et al.* Epileptogenesis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. a022822, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/022822>

10.1101/cshperspect.a022822.

PITKÄNEN, Asla; ENGEL, Jerome. Past and Present Definitions of Epileptogenesis and Its Biomarkers. **Neurotherapeutics**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 231–241, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13311-014-0257-2>

POHLMANN-EDEN, B. *et al.* The relevance of neuropsychiatric symptoms and cognitive problems in new-onset epilepsy - Current knowledge and understanding. **Epilepsy and Behavior**, [s. l.], v. 51, p. 199–209, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.07.005>

PORTER, Nathan T.; LUIS, Ana S.; MARTENS, Eric C. Bacteroides thetaiotaomicron. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 26, n. 11, p. 966–967, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.08.005>

QUIGLEY, Eamonn M.M. Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, [s. l.], v. 17, n. 12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11910-017-0802-6>

RADU, Beatrice Mihaela *et al.* Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in clinical and experimental epilepsy. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 131, p. 15–27, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.02.003>

RANA, Amna; MUSTO, Alberto E. The role of inflammation in the development of epilepsy. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 1–12, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12974-018-1192-7>

RAVIZZA, Teresa; VEZZANI, Annamaria. Pharmacological targeting of brain inflammation in epilepsy: Therapeutic perspectives from experimental and clinical studies. **Epilepsia Open**, [s. l.], n. 1, p. 133–142, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/epi4.12242>

REA, Kieran; DINAN, Timothy G.; CRYAN, John F. The microbiome: A key regulator of stress and neuroinflammation. **Neurobiology of Stress**, [s. l.], v. 4, p. 23–33, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2016.03.001>

RÍOS-COVIÁN, David *et al.* Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. [s. l.], v. 7, n. February, p. 1–9, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00185>

RIVIÈRE, Audrey *et al.* Bifidobacteria and Butyrate-Producing Colon Bacteria : Importance and Strategies for Their Stimulation in the Human Gut. [s. l.], v. 7, n. June, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00979>

RONCHETTI, Simona *et al.* Defining the role of glucocorticoids in inflammation. **Clinical Science**, [s. l.], v. 132, n. 14, p. 1529–1543, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/CS20171505>

ROOKS, Michelle G; GARRETT, Wendy S. Gut microbiota, metabolites and host immunity. **Nature reviews immunology**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 341–352, 2016.

ROY SARKAR, Suparna; BANERJEE, Sugato. Gut microbiota in

neurodegenerative disorders. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 328, n. October 2018, p. 98–104, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.01.004>

ŞAFAK, Birol *et al.* The gut microbiome in epilepsy. **Microbial Pathogenesis**, [s. l.], v. 139, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103853>

SANDHU, Kiran *et al.* Feeding the microbiota-gut-brain axis: diet, microbiome, and neuropsychiatry. **Translational Research**, [s. l.], v. 179, p. 223–244, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.10.002>

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

SCHIRMER, Melanie *et al.* Linking the Human Gut Microbiome to Inflammatory Cytokine Production Capacity. [s. l.], v. 167, n. 4, p. 1125–1136, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.020.Linking>

SCHIRMER, Melanie *et al.* Microbial genes and pathways in inflammatory bowel disease. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 17, n. 8, p. 497–511, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0213-6>

SHADE, Ashley. Diversity is the question, not the answer. **ISME Journal**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 1–6, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ismej.2016.118>

SHERWIN, Eoin *et al.* May the Force Be With You: The Light and Dark Sides of the Microbiota–Gut–Brain Axis in Neuropsychiatry. **CNS Drugs**, [s. l.], v. 30, n. 11, p. 1019–1041, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40263-016-0370-3>

SHI, Na *et al.* Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. **Military Medical Research**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40779-017-0122-9>

SILVA, Ygor Parladore; BERNARDI, Andressa; FROZZA, Rudimar Luiz. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. **Frontiers in Endocrinology**, [s. l.], v. 11, n. January, p. 1–14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025>

STAFSTROM, Carl E; CARMANT, Lionel. Seizures and epilepsy: an overview for neuroscientists. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. a022426, 2015.

STRANDWITZ, Philip *et al.* GABA-modulating bacteria of the human gut microbiota. **Nature Microbiology**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 396–403, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0307-3>

STRATI, Francesco *et al.* New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. [s. l.], p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0242-1>

SUNDMAN, Mark H. *et al.* The bidirectional gut-brain-microbiota axis as a potential nexus between traumatic brain injury, inflammation, and disease. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 66, p. 31–44, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.05.009>

TANG, Fei; HARTZ, Anika M.S.; BAUER, Björn. Drug-resistant epilepsy: Multiple hypotheses, few answers. **Frontiers in Neurology**, [s. l.], v. 8, n. JUL, p. 1–19, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00301>

TAP, Julien *et al.* Identification of an Intestinal Microbiota Signature Associated With Severity of Irritable Bowel Syndrome. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 152, n. 1, p. 111-123.e8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.09.049>

TEMP, Fernanda Rossatto *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibitors differentially attenuate pentylentetrazol-induced seizures and increase of pro- and anti-inflammatory cytokine levels in the cerebral cortex and hippocampus of mice. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 810, n. April, p. 15–25, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.013>

TERRONE, Gaetano; SALAMONE, Alessia; VEZZANI, Annamaria. Inflammation and epilepsy: preclinical findings and potential clinical translation. **Current pharmaceutical design**, [s. l.], v. 23, n. 37, p. 5569–5576, 2017.

THIJS, Roland D *et al.* Seminar Epilepsy in adults. [s. l.], 2019. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32596-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32596-0)

VACCA, Mirco *et al.* The Controversial Role of Human Gut Lachnospiraceae. [s. l.], p. 1–25, 2020.

VAN VLIET, Erwin A *et al.* Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarker candidates in epilepsy: emerging evidence from preclinical and clinical studies. **Neuropathology and applied neurobiology**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 91–111, 2018.

VEZZANI, Annamaria; BALOSSO, Silvia; RAVIZZA, Teresa. Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. **Nature Reviews Neurology**, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0217-x>

VEZZANI, Annamaria; FRIEDMAN, Alon; DINGLEDINE, Raymond J. The role of inflammation in epileptogenesis. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 69, p. 16–24, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.04.004>

VEZZANI, Annamaria; LANG, Bethan; ARONICA, Eleonora. Immunity and inflammation in epilepsy. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. a022699, 2016.

VIEIRA, Vinícius *et al.* Effect of diclofenac sodium on seizures and inflammatory profile induced by kindling seizure model. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 127, p. 107–113, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2016.08.020>

VOGT, Nicholas M *et al.* Gut microbiome alterations in Alzheimer ' s disease. **Scientific Reports**, [s. l.], n. June, p. 1–11, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13601-y>

WALKER, Lauren; SILLS, Graeme J. Inflammation and epilepsy: the foundations for a new therapeutic approach in epilepsy? **Epilepsy Currents**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 8–12, 2012.

WANG, Baohong *et al.* The Human Microbiota in Health and Disease. **Engineering**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 71–82, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ENG.2017.01.008>

WANG, Dian *et al.* GC–MS–Based metabolomics discovers a shared serum metabolic characteristic among three types of epileptic seizures. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 126, p. 83–89, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2016.07.003>

WANG, Hong-Xing; WANG, Yu-Ping. Gut microbiota-brain axis. **Chinese medical journal**, [s. l.], v. 129, n. 19, p. 2373, 2016.

WEBSTER, Kyria M. *et al.* Inflammation in epileptogenesis after traumatic brain injury. **Journal of Neuroinflammation**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–17, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0786-1>

WEERTH, Carolina De. Neuroscience and Biobehavioral Reviews Do bacteria shape our development ? Crosstalk between intestinal microbiota and HPA axis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 83, n. June, p. 458–471, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2017.09.016>

WEIS, Severin *et al.* Effect of Parkinson's disease and related medications on the composition of the fecal bacterial microbiota. **npj Parkinson's Disease**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–9, 2019.

WILSON, Ian D; NICHOLSON, Jeremy K. Gut Microbiome Interactions with Drug Metabolism , Efficacy and Toxicity Europe PMC Funders Author Manuscripts The gut microbiota have the capability of performing a wide range of metabolic reactions on. **Translational Research**, [s. l.], v. 179, p. 204–222, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.08.002>.Gut

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Epilepsy**. [S. l.], 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>. Acesso em: 21 jan. 2020.

WU, Jiaying *et al.* Intestinal Microbiota as an Alternative Therapeutic Target for Epilepsy. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, [s. l.], v. 2016, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/9032809>

XANTHOS, Dimitris N; SANDKÜHLER, Jürgen. Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 43, 2014.

XIE, Gan *et al.* Ketogenic diet poses a significant effect on imbalanced gut microbiota in infants with refractory epilepsy. **World Journal of Gastroenterology**, [s. l.],

l.], v. 23, n. 33, p. 6164–6171, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i33.6164>

YOO, Bryan B.; MAZMANIAN, Sarkis K. The Enteric Network: Interactions between the Immune and Nervous Systems of the Gut. **Immunity**, [s. l.], v. 46, n. 6, p. 910–926, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.05.011>

YOSHII, Ken *et al.* Metabolism of dietary and microbial vitamin b family in the regulation of host immunity. **Frontiers in Nutrition**, [s. l.], v. 6, n. April, p. 1–12, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00048>

YU, Zhongtang; MORRISON, Mark. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. **BioTechniques**, [s. l.], v. 36, n. 5, p. 808–812, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.2144/3605A0808>

YUEN, Alan W.C.; KEEZER, Mark R.; SANDER, Josemir W. Epilepsy is a neurological and a systemic disorder. **Epilepsy and Behavior**, [s. l.], v. 78, p. 57–61, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.8b02528>

YUNES, R A *et al.* Anaerobe GABA production and structure of gadB / gadC genes in Lactobacillus and Bi fi dobacterium strains from human microbiota. **Anaerobe**, [s. l.], v. 42, p. 197–204, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.10.011>

ZHANG, Heng *et al.* Untargeted lipidomic analysis of human hippocampus for temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 161, n. February, p. 106299, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2020.106299>

ZHANG, Ling *et al.* Altered gut microbiota in a mouse model of Alzheimer's disease. **Journal of Alzheimer's Disease**, [s. l.], v. 60, n. 4, p. 1241–1257, 2017.

ZHANG, Ting *et al.* Akkermansia muciniphila is a promising probiotic. **Microbial Biotechnology**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 1109–1125, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13410>

ZHANG, Yunjian *et al.* Altered gut microbiome composition in children with refractory epilepsy after ketogenic diet. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 145, n. March, p. 163–168, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2018.06.015>

ZHENG, Peng *et al.* The gut microbiome modulates gut–brain axis glycerophospholipid metabolism in a region-specific manner in a nonhuman primate model of depression. **Molecular Psychiatry**, [s. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41380-020-0744-2>

ZHU, Xiqun *et al.* Microbiota-gut-brain axis and the central nervous system. **Oncotarget**, [s. l.], v. 8, n. 32, p. 53829–53838, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17754>

Anexos

Anexo 1: Carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do projeto intitulado “Influência da inflamação no processo epileptogênico”, número 23554.



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 23554

Título: Influência da inflamação no processo epileptogênico

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

ADRIANA SIMON COITINHO - coordenador desde 01/08/2012

ROSANE GOMEZ - pesquisador desde 01/08/2012

DREICY GLASSMANN - Outra Função desde 01/08/2012

PAULA MARAFON - Outra Função desde 01/08/2012

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 17/12/2012 - Sala do 2º andar - Prédio da Reitoria - Campus Centro - UFRGS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 216 ratos, Wistar, machos, com 90 dias, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Sexta-Feira, 4 de Janeiro de 2013

STELA MARIS KUZE RATES
Coordenador da comissão de ética

Anexo 2: Adendo da carta de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais do projeto intitulado “Influência da inflamação no processo epileptogênico”, número 23554.



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CARTA DE APROVAÇÃO/ADENDO

NÚMERO: 23554

TÍTULO: Influência da inflamação no processo epileptogênico.

PESQUISADORES: ADRIANA SIMON COITINHO

A Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o Adendo ao Projeto 23554 em reunião realizada em 13/08/2018 - Sala 24 da Faculdade de Ciências Econômicas - Campus Centro - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 50 ratos Wistar machos de 8 semanas de idade; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa. Este documento revoga a Carta de Aprovação emitida anteriormente.

Porto Alegre, 17 de agosto de 2018.

Marcelo Meller Alievi

Coordenador da CEUA/UFRGS