

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM ANIMAIS
TRATADOS COM DEXAMETASONA E SUBMETIDOS AO *KINDLING* PELO
PENTILENOTETRAZOL**

Trabalho de Conclusão de Curso

KARINA RODRIGUES LIMA

Porto Alegre, Junho de 2016.

I

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA
GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA MOLECULAR

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM ANIMAIS
TRATADOS COM DEXAMETASONA E SUBMETIDOS AO *KINDLING* PELO
PENTILENOTETRAZOL**

KARINA RODRIGUES LIMA

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

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

Porto Alegre, Junho de 2016.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus pais, Nilza e Luis Eduardo, as minhas irmãs Gabriela e Luiza, e a minha vó, Eneida, pelo apoio, motivação e principalmente pela paciência nesses últimos 4 anos. Não conseguiria sem a ajuda de vocês.

A minha orientadora, Adriana, por ter dado à oportunidade de entrar no seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos, apoio, dedicação e carinho nesse último ano.

Muito obrigada Professora.

Ao Edson, colega de laboratório, muito obrigada pela a ajuda dada nesse último ano. Pelos ensinamentos e pelo companheirismo.

A Dr^a Caroline Mescka, sua ajuda foi essencial para a realização desse trabalho e agradeço muito os seus ensinamentos.

Aos meus colegas de faculdade, que acabaram se tornando grandes amigos que levarei para a vida toda, obrigada pelo companheirismo, pelas risadas, brincadeiras e principalmente pelas sextas-feiras, em especial para a minha dupla desde o 1º semestre, Alexia. Meus últimos 4 anos se tornaram muito mais fáceis com a ajuda de vocês.

A minha amiga, Marina, pela amizade de anos e pelo apoio mesmo durante o período em que ficamos geograficamente longe uma da outra.

A CAPES pelo apoio financeiro

E a todos os outros que, de alguma forma contribuíram para que esses últimos 4 anos se tornassem mais fáceis com seus respectivos apoios, meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

Epilepsia é uma desordem crônica no cérebro que afeta 50 milhões de pessoas no planeta, sendo que, no Brasil, são 1,9 milhões de afetados. O principal tratamento é o uso de fármacos anticonvulsivantes que conseguem controlar as crises convulsivas de 70% das pessoas com epilepsia. Recentemente, vários estudos demonstraram a influência da inflamação sobre o processo epileptogênico. Além da influência da inflamação, outro fator que se acredita estar envolvido no desenvolvimento de neurodegeneração é o estresse oxidativo, isso porque os neurônios são altamente vulneráveis aos efeitos destrutivos das espécies reativas pelo elevado uso de oxigênio e conteúdo de ácidos graxos oxidáveis. Por não conseguir tratar $\frac{1}{3}$ das pessoas afetadas com epilepsia, o conhecimento de novos fármacos que consigam produzir uma resposta anticonvulsivante é de grande interesse. Nesse contexto, o objetivo do trabalho foi analisar parâmetros de estresse oxidativo em animais tratados com dexametasona, um anti-inflamatório esteroide, submetidos ao *kindling* por pentilenotetrazol (PTZ). Ratos Wistar machos foram divididos em cinco grupos (n 10 por grupo) e receberam, intraperitonealmente (i.p), salina (NaCl 0,9 %), dexametasona (1 mg, 2 mg ou 4 mg/Kg) ou diazepam (2 mg/Kg) durante 15 dias e, em dias alternados, também receberam doses subconvulsivantes de PTZ (20 mg/Kg) i.p. Nos dias em que receberam o PTZ, os animais foram observados durante 30 minutos e classificados de acordo com a escala de Racine (1972) em relação à intensidade das convulsões. Os animais tratados apresentaram redução na intensidade das convulsões frente ao grupo salina ($p < 0,001$; ANOVA para medidas repetidas seguido de *post hoc* Tukey). Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados e separaram-se soro, hipocampo e córtex para a dosagem de marcadores de estresse oxidativo. Na avaliação do dano oxidativo se observou um aumento significativo de componentes TBARS, no córtex e no hipocampo, de animais tratados com dexametasona 4 mg/kg, indicando um possível dano lipídico, ($p < 0,05$, ANOVA e *post-hoc* Tukey). Na análise de grupamentos sulfidrilas não se observou diferença significativa entre os grupos, indicando que não houve dano oxidativo. Na avaliação da atividade antioxidante da enzima superóxido dismutase (SOD) houve uma redução significativa, no hipocampo, no grupo tratado com dexametasona 2 mg/kg em relação ao grupo salina e dexametasona 4 mg/kg. Na análise da atividade da catalase (CAT) se observou uma diminuição significativa, no córtex, nos grupos tratados com dexametasona 1 e 2 mg/kg em comparação ao grupo salina. Por fim, na avaliação da atividade da glutathiona peroxidase (GPx) foi observado uma diminuição significativa no grupo dexametasona 2 mg/kg no córtex e no grupo tratado com a dexametasona 1 mg/kg no hipocampo. Assim, pode-se supor que o efeito anticonvulsivante da dexametasona observado deve-se muito provavelmente a mecanismos anti-inflamatórios, mas não antioxidantes.

Desta forma, novos estudos são necessários para melhor elucidar os resultados do presente estudo.

ABSTRACT

Epilepsy is a chronic brain disorder that affects 50 million people worldwide, in Brazil there are 1.9 million affected. The main treatment is the use of anticonvulsant drugs that can control seizures in 70% of people with epilepsy. Recently, several studies have shown the influence of inflammation on the epileptogenic process. Besides the influence of inflammation, another factor believed to be involved in the development of neurodegeneration is oxidative stress, because neurons are highly vulnerable to the destructive effects of reactive species by the high use of oxygen and content of oxidizable fatty acids. Because of the failure to treat 1/3 of those affected with epilepsy, knowledge of new drugs it can produce an anticonvulsant response is of great interest. In this context, the objective of this study was to analyze parameters of oxidative stress in animals treated with dexamethasone, a steroidal anti-inflammatory drug, and submitted to kindling by pentylentetrazol (PTZ). Male Wistar rats were divided into five groups (n=10 per group) and received intraperitoneal (i.p) saline (0.9% NaCl), dexamethasone (1 mg, 2 mg or 4 mg/kg) or diazepam (2 mg/kg) for 15 days and, on alternate days, also received subconvulsivant doses of PTZ (20 mg/kg) i.p. On PTZ days, the animals were observed for 30 minutes and rated according to the Racine scale (1972) relative to the intensity of the seizures. The treated animals showed a reduction in the intensity of seizures in relation the saline group ($p < 0.001$, ANOVA for repeated measures followed by post hoc Tukey). At the end of the treatment, animals were euthanized and we separated serum, hippocampus and cortex for the measurement of oxidative stress markers. In the evaluation of oxidative damage we observed a significant increase of TBARS components in the cortex and hippocampus of animals treated with dexamethasone 4 mg/kg, indicating possible lipid damage ($p < 0,05$, ANOVA and *pos hoc* Tukey). In the sulfhydryl grouping analysis there was no significant difference among the groups, indicating that there was no oxidative damage. In the evaluation of the antioxidant activity of superoxide dismutase (SOD) there was a significant decrease, in the hippocampus, in the group treated with dexamethasone 2 mg/kg as compared to the saline group and dexamethasone 4 mg/kg. Analysis of catalase (CAT) activity, revealed a significant decrease in the cortex in the groups treated with dexamethasone 1 and 2 mg/kg as compared to the saline group. Finally, evaluation of the activity of glutathione peroxidase (GPx) reveled a significant reduction in the dexamethasone 2 mg/kg group, in cortex, and the 1 mg/kg dexamethasone treated group, in hippocampus. Thus, we can assume that the anticonvulsant effect of dexamethasone observed should probably be an anti-inflammatory mechanism, but no antioxidant. Thus, further studies are needed to further elucidate the results of this study.

LISTA DE ABREVIÇÕES

ACTH - Hormônio Adrenocorticotrófico
ATP - Adenosina Trifosfato
CAT - Catalase
CBZ - Carbamazepina
Cl⁻ - Íons Cloro
DEXA –Dexametasona
DTNB – Ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico
ERO - Espécies Reativas a Oxigênio
GABA - ácido γ -aminobutírico
GPx - Glutathione Peroxidase
GR - Glutathione Redutase
GSH - Glutathione Reduzida
GSSG - Glutathione Oxidada
GST - Glutathione-S-transferase
H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio
IFN- Interferons
ILAE- Liga Internacional Contra a Epilepsia
IL - Interleucina
K⁺ - Íons Potássio
LTG - Lamotrigina
MDA - Malonaldeído
NO - Óxido Nítrico
O₂⁻ - Radical Ânion Superóxido
·OH- Radical Hidroxil
ONOO⁻ - Peroxinitrito
PTZ - Pentilenotetrazol
SOD - Superóxido Dismutase
TBARS - Reação com Ácido Tiobarbitúrico Reativo a Espécies
TNF- Fator de Necrose Tumoral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas no desenvolvimento e progressão da epilepsia	2
Figura 2: Eletroencefalograma de um cérebro em condições normais e sob convulsões parciais e generalizadas	3
Figura 3: Mecanismos de defesa antioxidante enzimáticos e não enzimáticos.	9
Figura 4: Representação esquemática do receptor ionotrópico GABA _A	13
Figura 5: Estrutura química da dexametasona	15
Figura 6: Esquema de administração do pentilenotetrazol	20
Figura 7: Desenvolvimento de <i>kindling</i> induzido por PTZ.....	25
Figura 8: Medida dos níveis de peroxidação lipídica no córtex.....	26
Figura 9: Medida dos níveis de peroxidação lipídica no hipocampo.....	27
Figura 10: Níveis de sulfidrilas no córtex.....	29
Figura 11: Níveis de sulfidrilas no hipocampo.....	29
Figura 12: Medida do nível da enzima antioxidante superóxido dismutase no córtex.....	30
Figura 13: Medida do nível da enzima antioxidante superóxido dismutase no hipocampo	31
Figura 14: Medida do nível da enzima antioxidante catalase no córtex.....	32
Figura 15: Medida do nível da enzima antioxidante catalase no hipocampo.....	33
Figura 16: Medida do nível da enzima antioxidante glutationala peroxidase no córtex.	34
Figura 17: Medida do nível da enzima antioxidante glutationala peroxidase no hipocampo.. ..	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Escala de Racine para avaliar a intensidade de respostas motoras de animais induzidos ao kindling.....	20
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Epilepsia.....	1
1.2 Inflamação.....	3
1.3 Estresse Oxidativo.....	5
1.4 Enzimas Antioxidantes	8
1.4.1 Superóxido Dismutase	9
1.4.2 Catalase.....	9
1.4.3 Glutathione Redutase	10
1.4.4 Glutathione Peroxidase	11
1.5 Modelo de Abrasamento (<i>kindling</i>)	11
1.6 Pentilenotetrazol (PTZ).....	12
1.7 Fármacos anticonvulsivantes.....	13
1.8 Dexametasona	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 OBJETIVO GERAL.....	17
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	17
3. JUSTIFICATIVA.....	18
4. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Animais e tratamento	19
4.2 Avaliação da Atividade Anticonvulsivante	19
4.3 Avaliação da Atividade Antioxidante	20
4.3.1 Dano oxidativo	21
4.3.2 Proteínas totais	21
4.3.3 Atividade Superóxido dismutase (SOD)	21
4.3.4 Atividade da Catalase (CAT).....	22
4.3.5 Atividade da Glutathione Peroxidase (GPX).....	22
4.4 Análise Estatística	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
7. PERSPECTIVAS	38
8. REFERÊNCIAS	39

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

Epilepsia é uma desordem cerebral caracterizada por uma predisposição duradoura de gerar convulsões, disfunções emocionais e cognitivas (DUNCAN *et al.*, 2006). De acordo com a Organização Mundial da Saúde afeta 50 milhões de pessoas no planeta, tornando-se a doença neurodegenerativa mais frequente depois do derrame cerebral (WHO, 2015). Durante anos, a distinção entre epilepsia e crises epiléticas permaneceu pouco clara. Então, com o intuito de facilitar a comunicação entre os profissionais de diversas áreas, a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) propôs as seguintes definições: crise epilética é uma ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devido à atividade neuronal anormal sincrônica ou excessiva no cérebro; epilepsia é uma perturbação cerebral caracterizada pela predisposição continuada para gerar crises epiléticas e pelas respectivas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais (FISCHER *et al.*, 2005). O mecanismo de iniciação e propagação das convulsões ocorre através de uma hiperexcitabilidade descontrolada, devido à despolarização prolongada parcial das membranas celulares. Essa despolarização é o resultado do desequilíbrio na polarização do sistema neuronal em favor de influências hiperpolarizantes como uma consequência do reforço de excitação, diminuição da inibição e/ou diversas mudanças no sistema nervoso (MARTINC *et al.*, 2012).

O processo de desenvolvimento da epilepsia adquirida ocorre em três grandes fases: aguda, caracterizada pelo dano cerebral inicial; latência, um insulto cerebral que pode levar ao desenvolvimento de uma condição epilética - epileptogênese - sendo um processo de transição que pode levar anos depois do insulto inicial; e crônica, que é a ocorrência espontânea de convulsões (MARTINC *et al.*, 2012). (Figura 1)

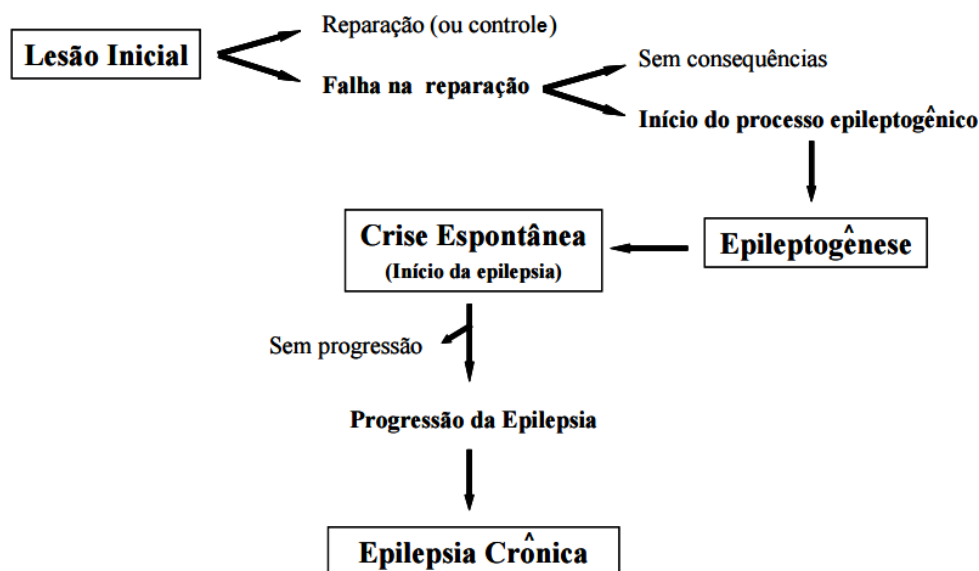


Figura 1- Etapas no desenvolvimento e progressão da epilepsia. Fonte: Alves, 2008

A ILAE classificou as convulsões em dois tipos: convulsões parciais (focal), que são as convulsões que começam em áreas locais do cérebro. Estas são subdivididas em parcial simples, não apresentando alterações da consciência, e parcial complexa, onde ocorrem alterações da consciência. Uma crise parcial pode acabar evoluindo a uma crise generalizada. Essa, caracterizada por envolver ambos os hemisférios cerebrais, provocando perturbação do estado de consciência e crises mioclônicas, contrações musculares súbitas e bruscas que podem envolver áreas como a face, o tronco ou extremidades; tônico-clônicas, surgem repentinamente e caracterizam-se pela contração tônica e sustentada de toda a musculatura corporal; e atônicas, manifestadas como perda súbita do tônus muscular postural e que têm duração de 1 a 2 segundos (BANERJEE *et al.*, 2009; Alves, 2008). (Figura 2)

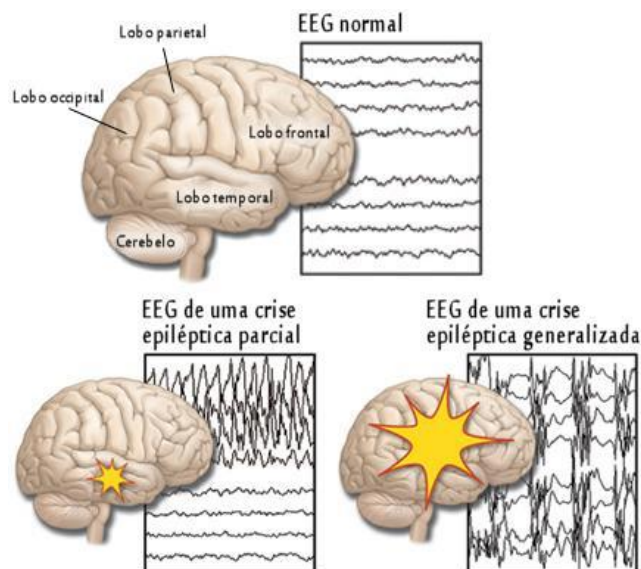


Figura 2: Imagem ilustrativa de um eletroencefalograma de um cérebro em condições normais e sob convulsões parciais e generalizadas Fonte:<http://www.drugs.com/health-guide/partial-seizures-focal-seizures.html>. Último acesso: Junho, 2016

A epilepsia é dividida em três categorias etiológicas gerais: idiopáticas, sintomáticas e criptogênicas. A epilepsia idiopática é definida como de origem genética na qual não possui anormalidade neuroanatômica e neuropatológica, geralmente se desenvolvendo no início da infância. A epilepsia sintomática é definida por ser de origem adquirida ou genética, associada com insulto cerebral identificado, sendo causada por diversos fatores como trauma, tumor, infecção, má formação ou doenças genéticas sistêmicas. A epilepsia criptogênica se presume ser de natureza sintomática na qual a causa não foi identificada, representando 40% dos casos de epilepsia em adultos (ILAE, 1989; SHORVON, 2011).

1.2 Inflamação

A inflamação tem sido implicada na natureza progressiva de doenças neurodegenerativas e em processos inflamatórios, sendo considerada como principal contribuidora das desordens neurodegenerativas agudas e crônicas, como derrame isquêmico e doença de Alzheimer. Diversas descobertas experimentais e clínicas apoiam o papel crucial de processos inflamatórios na epilepsia, principalmente em mecanismos subjacentes às convulsões e na

transformação de uma rede neuronal normal em uma geradora de convulsões (VEZZANI *et al.*, 2011; RIAZI *et al.*, 2010; CHOI *et al.*, 2009). O primeiro conhecimento sobre o potencial papel da inflamação na epilepsia humana foi derivado de evidências clínicas, as quais indicavam que o uso de esteroides e outros tratamentos com anti-inflamatórios exibiam atividade anticonvulsivante em indivíduos refratários aos fármacos (RIIKONEN *et al.*, 2004; WHELESS *et al.*, 2007; WIRRELL *et al.*, 2005) e em casos de convulsões febris, que são causados pelo aumento dos níveis de agentes pró inflamatórios (DUBLÉ *et al.*, 2007).

Inflamação consiste na produção de uma cascata de mediadores inflamatórios, produzidos em células do tecido ou em células sanguíneas imunocompetentes, como também de moléculas anti-inflamatórias e outras substâncias induzidas para resolver a inflamação em resposta a estímulos nocivos, como infecção ou dano, ou em resposta a estimulação imune. Estes mecanismos são designados a defender o hospedeiro contra ameaças de patógenos. A produção desses mediadores inflamatórios envolve a ativação da imunidade inata e adaptativa, ambas implicadas na epilepsia (VEZZANI *et al.*, 2011).

O cérebro é considerado um sítio imunoprevilegiado pela presença da barreira hematoencefálica, elemento regulatório chave de comunicação entre células cerebrais intrínsecas e células imunocompetentes periféricas, pela falta de um sistema convencional linfático e o pelo tráfico limitado de células imunes periféricas. A ativação da micróglia, astrócitos, neurônios, células endoteliais da barreira hematoencefálica e de células imunes periféricas no parênquima cerebral podem induzir a produção de moléculas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (BANKS *et al.*, 2010). Quando ocorre inflamação cerebral seguida de lesão cerebral traumática ou de doenças neurodegenerativas, a ativação da micróglia e astrócitos ocorre em regiões do SNC afetadas pela doença específica, e essas células atuam como as principais fontes de mediadores inflamatórios (GLASS *et al.*, 2010).

A ativação da imunidade inata, e a subsequente transição para a imunidade adaptativa, ocorre através de uma grande variedade de agentes inflamatórios, entre eles citocinas e polipeptídeos que atuam como mediadores solúveis de inflamação. Essas moléculas incluem interleucinas (ILs), interferons (IFNs), fator

de necrose tumoral (TNFs) e fatores de crescimento. As citocinas são liberadas por células imunocompetentes e endoteliais, também sendo produzidas pela glia e neurônios no sistema nervoso central, possibilitando a comunicação entre os efetores e as células alvo durante o desafio imunológico ou a lesão tecidual. Após a sua liberação, as citocinas interagem com um ou mais receptores cognatos (ALLAN *et al.*, 2011). Esses receptores em condições cerebrais normais não são detectados, mas após a ocorrência de convulsões ocorre um aumento da sua produção. Isso foi observado para o receptor de IL-1 β (RAVIZZA E VEZZANI, 2006; RAVIZZA *et al.*, 2008) e de receptor de IL-6 (LEHTIMAKI *et al.*, 2003), ambos de citocinas pró-inflamatórias.

A liberação desses mediadores pró-inflamatórios, quando ocorre um dano nas células produtoras de citocinas, acaba levando a ativação de sinais inflamatórios autócrinos e parácrinos no tecido epiléptico. Além disso, a extensão da inflamação cerebral correlaciona-se positivamente com a frequência de convulsões e com a severidade da neuropatologia, sugerindo uma relação entre inflamação e convulsões (VEZZANI *et al.*, 2011).

1.3 Estresse Oxidativo

Além da influência da inflamação, outro fator que se acredita estar envolvido diretamente no desenvolvimento de neurodegeneração é o estresse oxidativo, esse servindo como um dos principais fatores de propagação que leva a condição epiléptica e ao declínio cognitivo (MARTINC *et al.*, 2012). Evidências demonstram que a formação de espécies reativas ou a diminuição da atividade de sistemas antioxidantes podem resultar em diferentes formas de epilepsia, podendo desencadear um possível aumento na frequência das crises convulsivas (MARTINC *et al.*, 2014; YUKSEL *et al.*, 2000).

O estresse oxidativo ocorre como consequência de um aumento da carga oxidativa que supera a capacidade dos mecanismos antioxidantes e de reparação endógena (HALLIWELL *et al.*, 2007). Esse aumento resulta em uma elevação da concentração de cálcio (Ca²⁺) que persiste na fase crônica da epilepsia, sendo crucial para a continuação de convulsões recorrentes e podendo influenciar no reciclamento do receptor GABA_A e assim, alterando a excitabilidade neuronal

(COYLE *et al.*, 1993; WALDBAUM *et al.*, 2010). Dessa forma, o estresse oxidativo resulta na acumulação de proteínas disfuncionais, produtos de peroxidação lipídica e danos no DNA nuclear e mitocondrial (ERCEGOVAC *et al.*, 2010).

Considera-se o estresse oxidativo um mecanismo citotóxico envolvido na patogênese de várias doenças neurodegenerativas. Isso porque os neurônios são altamente vulneráveis a efeitos destrutivos das espécies reativas pelo seu conteúdo de ácidos graxos oxidáveis, pela presença de metais redox ativos, como o cobre e o ferro, e pelo elevado uso de oxigênio, esse necessário para que o cérebro derive energia da fosforilação oxidativa na cadeia respiratória mitocondrial (VALKO *et al.*, 2007; MARTINC *et al.*, 2014).

A mitocôndria está diretamente envolvida na produção de energia celular na forma de adenosina trifosfato (ATP) pela cadeia respiratória através da fosforilação oxidativa por cinco complexos localizados na membrana interna da organela (BROOKES *et al.*, 2004). Em adição à produção de energia, a mitocôndria também desempenha um papel crucial na manutenção da homeostase de Ca^{2+} intracelular, biossíntese de neurotransmissores, mecanismos de morte celular e geração de espécies reativas a oxigênio (ERO) (HATEFI, 1985; MARTINC *et al.*, 2012).

O aumento do estresse oxidativo mitocondrial e o consequente dano a macromoléculas celulares foram observados após convulsões repetidas ou prolongadas, conforme as observadas no estado epiléptico e em outros danos, como na encefalopatia hipóxico-isquêmica, traumatismo cranioencefálico ou infecção viral (WALDBAUM *et al.*, 2010). O comprometimento na função mitocondrial e o aumento da produção de espécies reativas a oxigênio em convulsões epiléticas já foram demonstrados e observados tanto em humanos (KUDIN *et al.*, 2009; KUNZ *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2008) quanto em diversos modelos animais (WALDBAUM *et al.*, 2010; KUDIN *et al.*, 2002; CHUANG *et al.*, 2004; SLEVEN *et al.*, 2006). Com os resultados observados nesses estudos, é possível sugerir que as mitocôndrias também possuem um envolvimento em formas adquiridas de epilepsia.

Essas mudanças afetam fortemente a excitabilidade e a transmissão sináptica, as quais são propostas como sendo altamente relevantes para a geração de convulsões. As mitocôndrias podem estar envolvidas em vias que

conduzem à morte celular neuronal, característica observada no processo de epileptogênese (KUDIN *et al.*, 2009).

As proteínas mitocondriais podem ser modificadas por carbonilação, nitração, S-glutationilação, ou S-nitrosilação. Essas modificações podem alterar a função de diversas enzimas metabólicas no compartimento extracelular da mitocôndria. O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio leva à regulação decrescente das proteínas da junção de oclusão e à ativação de metaloproteínas de matriz que contribuem na abertura da barreira hematoencefálica. Isso permite a entrada de neurotoxinas e células inflamatórias, que potencializam o estresse oxidativo já existente (HIDER *et al.*, 2008; MARTINC *et al.*, 2012). Assim, o estresse oxidativo emerge como uma causa subjacente comum da disfunção da barreira hematoencefálica. Se ocorrer o rompimento, o transporte de moléculas entre o sangue e o cérebro é alterado em ambas as direções (PUN *et al.*, 2009).

As crises epiléticas podem ocorrer como um sinal de disfunção mitocondrial no sistema nervoso central. Estudos experimentais na área da epilepsia provam que a mitocôndria está intimamente envolvida em vias que levam a morte celular neuronal (KUDIN *et al.*, 2009). Portanto, o aumento do estresse oxidativo e a disfunção mitocondrial podem ser a via final comum que realça todas essas condições neuropatológicas e contribuem para a epileptogênese (MARTINC *et al.*, 2014).

A disfunção mitocondrial tem ganhado um interesse considerável como potencial fonte de espécies reativas a oxigênio (ERO) e, conseqüentemente, como causa de crises epiléticas, especialmente na forma de epilepsia severa terapia resistente (MARTINC *et al.*, 2012). Os efeitos das espécies reativas a oxigênio são controlados por um sistema de defesa endógeno como o realizado pelas enzimas antioxidantes, que conseguem bloquear a iniciação de reações em cadeia de espécies reativas, e dos antioxidantes não enzimáticos que reagem diretamente com as espécies reativas e, assim, previnem a propagação de reações em cadeia (BARNHAM *et al.*, 2004).

A hipótese de que os fármacos anticonvulsivantes induzem o aumento da produção de metabólitos reativos em células neuronais, levando a um aumento do dano oxidativo e provocando a neurodegeneração já foi levantada (MARTINC *et*

al., 2012). No entanto, outros estudos mostram resultados que não coincidem com essa hipótese e indicam que os responsáveis pelo aumento da produção de espécies reativas são as convulsões (MENON *et al.*, 2012; PEKER *et al.*, 2009). Logo, mais estudos são necessários para um melhor conhecimento da relação fármacos anticonvulsivantes e o estresse oxidativo.

1.4 Enzimas Antioxidantes

Sies (1997) define estresse oxidativo como sendo um desequilíbrio entre a produção de agentes oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes, com potencial para ocasionar dano celular. As principais espécies reativas (oxidantes) vinculadas ao estresse oxidativo são: o radical ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxil ($\cdot OH$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($ONOO^-$). Os seres vivos dispõem de mecanismos protetores para evitar o acúmulo destas espécies reativas, que incluem mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. As principais enzimas antioxidantes são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutatona redutase (GR), a glutatona peroxidase (GPx) e a glutatona-S-transferase (GST). Essas enzimas evitam o acúmulo de O_2^- e de H_2O_2 , e a consequente produção de OH (Figura 3). As defesas não enzimáticas incluem os antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, carotenóides e bioflavonóides) e hidrofílicos (glutatona e ascorbato) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007)

Os neurônios são particularmente vulneráveis a insultos oxidativos devido aos baixos níveis de enzimas antioxidantes, especialmente catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), e de antioxidantes não enzimáticos principalmente vitamina E e glutatona (GSH) (SHIVAKUMAR *et al.*, 1991).

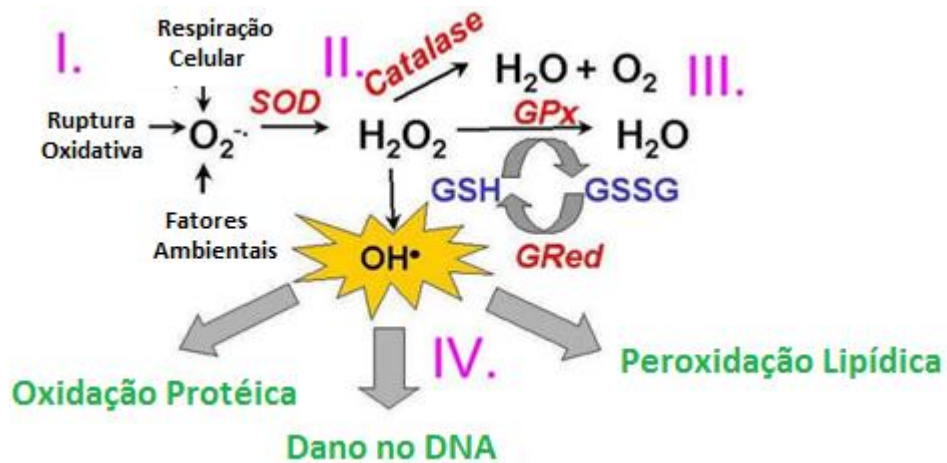
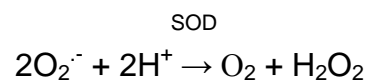


Figura 3: Representação esquemática dos mecanismos de defesa antioxidante enzimáticos e não enzimáticos. Fonte: Adaptado de Wilhelm, 2012.

1.4.1 Superóxido Dismutase

A superóxido dismutase (SOD) consiste num grupo de metaloenzimas que catalisam a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir de radicais superóxidos ($\text{O}_2^{\cdot-}$), consumindo-os, e assim liberando as células do risco de oxidação por esses radicais, como pode ser observado na seguinte equação:

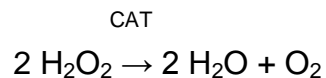


É a única enzima capaz de interferir nas concentrações de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , que são os substratos da reação de Haber-Weiss, que origina radicais OH^{\cdot} e, provavelmente, por isso, a SOD representa o mecanismo de defesa central dos organismos vivos (BOWLER *et al.*, 1992).

1.4.2 Catalase

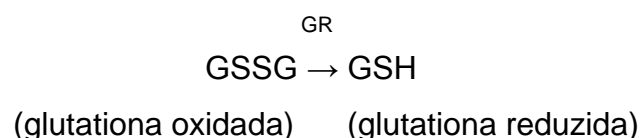
A catalase (CAT) é uma enzima tetramérica, que contém grupos heme, sendo encontrada em todos os organismos vivos. É a única, entre as enzimas degradantes de H_2O_2 , que não consome equivalentes redutores celulares e possui

um mecanismo muito eficiente para remover o peróxido de hidrogênio, que é formado nas células sob condições de estresse (MALLICK e MOHN, 2000). Evidências sugerem que a catalase utiliza um mecanismo de dois estágios, tanto nas reações peroxidativas como nas catalíticas. No primeiro estágio, o ferro do grupo heme da catalase interage com o H_2O_2 para formar um peróxido de ferro rico em oxigênio. Este composto intermediário é denominado de componente I. Em condições de baixas concentrações de H_2O_2 ($<10^{-6}$ mol/L), o componente I pode ser reduzido por uma variedade de doadores de hidrogênio (por exemplo, etanol e ácido ascórbico). Quando há elevadas concentrações de H_2O_2 , o componente I reage com uma segunda molécula de H_2O_2 para produzir água e uma molécula de oxigênio (SCANDALIOS, 1994), como observado pela reação:



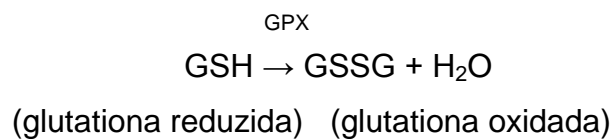
1.4.3 Glutationa Redutase

A glutaciona redutase (GR) contém um grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD) transferidor de elétrons que catalisa a redução dependente de NADPH da glutaciona oxidase (GSSG) para glutaciona reduzida (GSH), um metabólito importante no combate às ROS, especificamente a $\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 . A sua importância consiste em manter o equilíbrio GSH/GSSG na célula, pois a GSH é uma molécula que apresenta uma função essencial de manter as células no seu estado reduzido. Portanto, ela atua como um agente antioxidante, seja interagindo diretamente com as ROS, como indiretamente reduzindo peróxidos através da ação da glutaciona peroxidase (VOET e VOET, 1995).



1.4.4 Glutathione Peroxidase

A glutathione peroxidase (GPx) possui sua atividade diretamente dependente da GR, sendo observada em dois tipos, um deles selênio dependente e o outro não. O primeiro tipo possui um átomo de selênio em cada uma das subunidades do tetrâmero, sendo capaz de reduzir qualquer hidroperóxido orgânico, além do H_2O_2 . O segundo tipo, que não depende do selênio, está apto a reduzir qualquer hidroperóxido orgânico, menos H_2O_2 (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). GPx catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos (H_2O_2) pela glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione oxidada (GSSG) e água (ou alcoóis).



1.5 Modelo de Abrasamento (*kindling*)

Kindling é um modelo crônico de epilepsia onde administrações repetitivas e periódicas de estímulos químicos ou elétricos de sub-convulsivantes que podem levar a ampliação progressiva de convulsões culminam em atividade convulsiva generalizada (McNAMARA, 1984). A primeira descrição do método *kindling* foi dada por Graham V. Goddard (GODDART *et al.*, 1969), baseada em um experimento realizado por Herberg e Watkins (1966) em que eles demonstraram que estímulos elétricos repetitivos em regiões subcorticais de ratos resultava em convulsões iniciais a cada sessão. Goddard descobriu que estímulos iniciais sub-convulsivantes, que não produzem qualquer sinal comportamental ou eletrográfico de convulsões, quando aplicados repetidamente aos ratos, conduziria a convulsões desenvolvidas depois de certos estímulos (GODDART *et al.*, 1969), conseguindo produzir alterações duráveis no cérebro. O dogma “convulsões geram convulsões” (BEN-ARI, 2006), descreve com precisão o princípio e os resultados do procedimento *kindling* (DHIR, 2012).

Considera-se o atingimento de um estado de *kindling* quando os animais, em que houve estímulos elétricos ou químicos, apresentarem uma resposta comportamental com convulsões mais complexas, grau 4 ou 5 da escala da Racine (1972), por um período mínimo de dois dias.

O *kindling* químico envolve a administração de substâncias químicas convulsivantes sistemicamente. Esse método é mais fácil e consome menos tempo comparado com o *kindling* elétrico, não requerendo cirurgias cerebrais ou implantação de eletrodos. Diferentes substâncias convulsivantes podem ser usadas para induzir *kindling* químico em roedores, como por exemplo, antagonistas do receptor GABA_A, N-metil-D-aspartato e cocaína (DHIR, 2012).

1.6 Pentilenotetrazol (PTZ)

O pentilenotetrazol (PTZ) é um antagonista do receptor GABA_A que consegue induzir convulsões severas quando administrado em animais, diminuindo assim a ação inibitória do ácido gama-aminobutírico (GABA) no sistema nervoso central (RAMANJANEYLU E TICKYU, 1984). É um dos modelos de *kindling* químico mais aceito em modelo animal para estudar efeitos de novas moléculas anticonvulsivantes (DHIR, 2012).

PTZ pode ser usado para desenvolver crises convulsivas agudas e crônicas em modelos animais. Após a administração subcutânea ou intraperitoneal de PTZ em roedores, os animais podem apresentar crises convulsivas tônico-clônicas (BRITO *et al.*, 2006). Depois da injeção de PTZ, uma pontuação em relação a severidade da convulsão é calculada de acordo com características específicas: score 0: sem comportamento convulsivante; score 1: clonismos faciais; score 2: movimentação de flexão e extensão da cabeça; score 3: clonismos de patas; score 4: respostas de orientação, onde o animal permanece de pé apenas sobre as patas traseiras (“*rearing*”) seguido de clonismos de patas e queda; score 5: crises tônico/clônicas generalizadas; e score 6: morte (DHIR, 2012).

Os receptores GABA são neurotransmissores inibitórios predominantes no sistema nervoso central de vertebrados. Ao ser liberado pelo neurônio pré-sináptico, este neurotransmissor atua em receptores ionotrópicos (GABA_A e

GABA_C) ou metabotrópicos (GABA_B), localizados na pré- e na pós-sinapse (BLOOMQUIST, 1996; MUSSULINI, 2013). Os receptores GABA_A apresentam sítios de ligação para GABA, benzodiazepínicos, barbitúricos, neuroesteróides, picrotoxina e etanol. (Figura 4). O GABA, ao se ligar no receptor GABA_A, na pós-sinapse promove a abertura do canal iônico do receptor, permitindo o influxo de íons Cl⁻ e o efluxo de íons K⁺ do neurônio alvo, resultando na sua hiperpolarização (SIEGHART E SPERK, 2002). À medida que o PTZ atinge o sistema nervoso central, ele se liga aos receptores GABA_A impedindo a ação do GABA, consequentemente bloqueando o influxo de íons Cl⁻ e o efluxo de íons K⁺ do neurônio (RAMANJANEYLU E TICKYU, 1984). Devido a sua ação antagonista sobre os receptores GABA_A, o PTZ provoca um desequilíbrio no balanço excitação/inibição no sistema nervoso central, resultando na hiperexcitabilidade neuronal e gerando uma crise epiléptica generalizada (FERANDO E MODY, 2012).

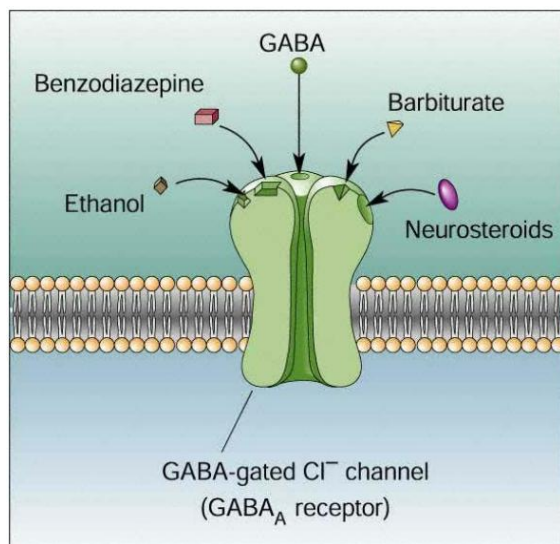


Figura 4: Representação esquemática do receptor ionotrópico GABA_A. Fonte: Wilhelm, 2012

1.7 Fármacos anticonvulsivantes

O principal tratamento para epilepsia é o uso de fármacos anticonvulsivantes, que possuem a habilidade de proteger contra convulsões enquanto permitem o funcionamento normal do sistema nervoso. Para exibir uma

atividade anticonvulsivante o fármaco precisa agir em uma ou em várias moléculas do cérebro, como os canais de íons, enzimas metabólicas, neurotransmissores e transportadores de neurotransmissores. O principal efeito da interação fármaco e molécula alvo é modificar as propriedades de ruptura dos neurônios e reduzir a sincronização em conjuntos neuronais localizados. Esses medicamentos conseguem também inibir a propagação de disparos anormais em locais mais distantes, nas quais são necessários para a expressão da atividade de apreensão comportamental (ROGAWSKI *et al.*, 2004).

A maioria dos fármacos anticonvulsivantes possui mais de um mecanismo de ação. DECKERS e colaboradores (2000) propuseram uma classificação de fármacos anticonvulsivantes baseada nos seus mecanismos. O primeiro grupo consiste de anticonvulsivantes que bloqueiam disparos repetitivos em neurônios individuais, esse efeito sendo principalmente devido ao bloqueio de canais de cálcio e sódio dependentes de voltagem. Esses fármacos são efetivos contra convulsões tônico-clônicas e parciais. O segundo grupo inclui fármacos que induzem eventos inibitórios mediados pelo ácido γ -aminobutírico (GABA), podendo ser utilizados em todos os tipos de convulsões. Já o terceiro grupo consegue bloquear inibidores de canais de cálcio tipo T. (CZAPIN *et al.*, 2005). Além destes, um grupo separado de fármacos consegue reduzir as crises convulsivas mediadas por aminoácidos excitatórios, por exemplo, glutamato e aspartato (DECKERS *et al.*, 2000).

Os fármacos já utilizados clinicamente conseguem controlar as crises convulsivas de 70% das pessoas afetadas pela epilepsia, fornecendo controle sintomático das convulsões, mas não interferindo na fisiopatologia subsequente da doença (PERUCCA *et al.*, 2007). Desta forma, mesmo com a grande disponibilidade de fármacos anticonvulsivantes, cerca de um terço dos indivíduos com epilepsia são refratários a eles e continuam apresentando convulsões (WHO, 2016). Mesmo com a introdução de novos fármacos no mercado, que conseguem fornecer uma melhor tolerabilidade, segurança e interações farmacocinéticas reduzidas, eles não conseguem diminuir a epilepsia fármaco-resistente (RAVIZZA *et al.*, 2014). Assim, é de grande interesse o desenvolvimento de terapias efetivas para esses indivíduos refratários tendo-se em vista que os fármacos anticonvulsivantes disponíveis são principalmente sintomáticos, atuam diminuindo

a frequência das convulsões, mas não afetam a patologia subjacente ou a progressão da epilepsia (ROGAWSKI *et al.*, 2004).

1.8 Dexametasona

Uma possível abordagem terapêutica a ser utilizada no tratamento de pessoas com epilepsia é a dexametasona (Figura 5) que é um potente glicocorticoide sintético com ação que se assemelha com hormônios esteroides, conseguindo atuar como anti-inflamatório e imunossupressor (SCHIMMER *et al.*, 2001).

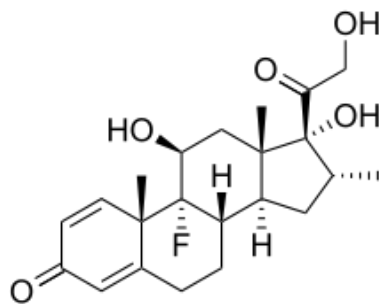


Figura 5: Estrutura química de dexametasona. Fonte: Kronenberg *et al.*, 2010

A sua eficácia e o seu perfil adverso já foram relatados em estudos para tratamento de crianças com epilepsia refratária. Haberlandt e colaboradores (2010) realizaram um estudo comparativo entre o uso de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (15-20 IU/dia) e o uso da dexametasona (0,2 mg/kg) em 28 pacientes com diversas síndromes epilépticas intratáveis, como a síndrome de West, síndrome Lennox-Gastaut e padrão de ponta-onda contínua durante o sono. Destes pacientes, 14 foram tratados com ACTH (15-20 IU/dia) durante 1989 a 2001 e os outros 14 foram tratados com dexametasona (0,2 mg/kg) durante 2003 a 2006. Dos pacientes tratados com dexametasona, 4 deles se tornaram livres de convulsões, 1 exibiu diminuição da frequência de convulsões e 2 exibiram melhoras de acordo com os resultados do eletroencefalograma. Com esses resultados, eles concluíram que o uso da terapia com dexametasona é um

tratamento alternativo efetivo ao ACTH, mas necessitaria ser investigado com um grupo maior de pacientes (HABERLANDT *et al.*, 2010).

Em 2011, Marchi e colaboradores avaliaram a eficiência da utilização da dexametasona em pacientes afetados por convulsões epiléticas resistentes a fármacos. Neste estudo, 43 pacientes foram avaliadas (24 mulheres e 19 homens), em que a primeira convulsão foi presenciada antes dos 13 anos de idade, e o período de tratamento com dexametasona variou de $6,4 \pm 5,2$ anos. Em 15 pacientes foi possível observar uma diminuição significativa da ocorrência de convulsões (MARCHI *et al.*, 2011).

Chen e colaboradores (2015) utilizaram a dexametasona (0,15 mg/kg/dia) em 15 pacientes, entre 4 a 12 anos, com epilepsia refratária padrão de ponta-onda contínua durante o sono durante 2007 a 2015. Destes, 7 mostraram respostas iniciais, baseadas nas avaliações clínicas e no eletroencefalograma, depois de 4 semanas de tratamento. Com esses resultados, eles concluíram que o tratamento oral contínuo com a dexametasona é uma terapia eficaz e tolerável, devendo ser utilizada como uma opção de tratamento para padrão de ponta-onda contínua durante o sono (CHEN *et al.*, 2015).

Desta forma, tendo-se em vista os resultados promissores da dexametasona no tratamento da epilepsia fármaco-resistente, torna-se importante avaliar o efeito deste fármaco em relação a parâmetros oxidativos, sabidamente envolvidos na etiologia das crises convulsivas, avaliando uma possível atividade antioxidante.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar parâmetros de estresse oxidativo em animais tratados com dexametasona e submetidos ao modelo de abrasamento (*kindling*) induzido por pentilenotetrazol (PTZ).

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Investigar a peroxidação lipídica, conteúdo de sulfidrilas, atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase em amostras de estruturas cerebrais (córtex e hipocampo) de animais tratados com dexametasona e submetidos ao modelo de abrasamento (*kindling*) induzido por pentilenotetrazol (PTZ).

3. JUSTIFICATIVA

De acordo com o a Organização Mundial da Saúde, 50 milhões de pessoas no mundo possuem epilepsia tornando-a uma das doenças neurológicas mais comuns. No Brasil, esta doença afeta pelo menos 1,8% da população. O principal tratamento baseia-se no uso de fármacos anticonvulsivantes, mas 30% dos pacientes não respondem a esses medicamentos.

A epilepsia está diretamente envolvida com a inflamação neuronal, que ocorre pela liberação de mediadores celulares, e através de respostas oxidativas, resultantes de danos teciduais ou contra ameaças patogênicas que induzem a inflamação. Além disso, ainda não se sabe se o estresse oxidativo atua na epilepsia como causa ou consequência de processos epileptogênicos, mas diversos estudos acreditam que um aumento na geração de radicais livres pode levar a convulsões prolongadas. Assim, o estresse oxidativo é considerado um dos mecanismos citotóxicos fundamentais envolvido na patogênese de doenças neurodegenerativas, isso porque os neurônios são altamente vulneráveis aos efeitos destrutivos das espécies reativas de oxigênio. Desta forma, o conhecimento de novas abordagens terapêuticas anticonvulsivantes que atenuem o estresse oxidativo e, por consequência, as crises convulsivas, é de grande interesse para o tratamento da epilepsia principalmente nos pacientes refratários.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais e tratamento

Foram utilizados 50 ratos Wistar machos com três meses de idade foram utilizados nesse estudo. Os animais foram manipulados em condições laboratoriais padrão consistindo de um ciclo 12h claro e 12h escuro e temperatura fixa (22-24°C), com acesso livre a comida e água. Foram divididos em 5 grupos experimentais (n= 9-10 animais por grupo) que foram tratados durante um período de 14 dias em dias alternados sendo o grupo 1 e grupo 2 como sendo os controles, em que o grupo 1 recebeu salina e o grupo 2 recebeu diazepam (2 mg/Kg), um fármaco anticonvulsivante que usualmente é um dos primeiros a ser usado em pacientes com epilepsia. Os grupos 3, 4 e 5 foram tratados com o fármaco dexametasona, fármaco anti-inflamatório esteroide, em diferentes concentrações (1, 2 e 4 mg/Kg, respectivamente).

4.2 Avaliação da Atividade Anticonvulsivante

O modelo de abrasamento (*kindling*), considerado um modelo crônico de epilepsia, foi utilizado (GODDARD, 1967). Neste modelo, os animais receberam as mesmas doses descritas dos tratamentos durante 14 dias e, em dias alternados, também receberam doses subconvulsivantes de PTZ intraperitonealmente (30 mg/Kg) (Figura 6). O PTZ foi injetado 30 minutos após a administração dos tratamentos. Nestes grupos, os animais foram observados por 30 minutos e a severidade da convulsão foi graduada de acordo com a escala adaptada por Racine (RACINE, 1972) (Tabela 1). O tempo e a latência de convulsão, bem como a mortalidade foram registrados.

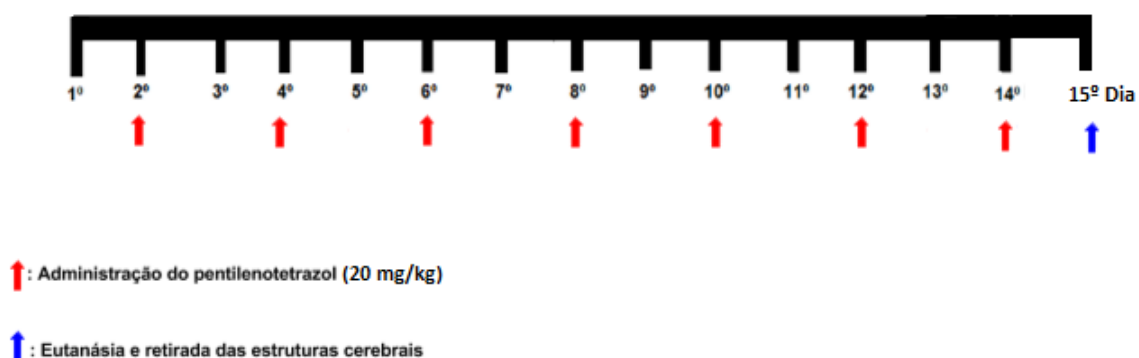


Figura 6: Ilustração do esquema de administração do pentilenotetrazol

Tabela 1: Escala de Racine para avaliar a intensidade de respostas motoras de animais induzidos ao *kindling*

ESCALA DE RACINE (1972)	
Grau	Alteração comportamental
0	Imobilidade
1	Automatismos faciais
2	Mioclônias de cabeça e pescoço
3	Clônias de patas anteriores
4	Clônias de patas posteriores
5	Elevação e queda

4.3 Avaliação da Atividade Antioxidante

Após o término da avaliação anticonvulsivante, os animais foram sacrificados por decapitação e houve a retirada das estruturas cerebrais (córtex, hipocampo) para a avaliação da atividade antioxidante nos grupos controle e tratados. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até a realização dos ensaios. Não foi possível a utilização de sedativos antes do sacrifício, pois os mesmos interferem nos parâmetros que foram investigados.

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada através dos testes de peroxidação lipídica, grupamentos sulfidrilas, atividade das enzimas superóxido

dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Nessas avaliações, foram utilizados de 5 a 8 animais por grupo.

4.3.1 Dano oxidativo

O dano lipídico foi determinado pelo método baseado nas substâncias reativas ao *ácido tiobarbitúrico* (TBARS) durante uma reação de aquecimento ácido, a qual é amplamente usada como um método sensível para medir peroxidação lipídica, descrito por WILLS (1966). Os resultados são expressos em nmol de TBARS/ mg de proteína.

O conteúdo de grupamentos sulfidrilas, uma medida de defesa celular não enzimática, foi determinado através da sua redução com DTNB produzindo um composto corado, lido espectrofotometricamente a 412 nm (ASKENOV E MARKESBERY, 2001).

4.3.2 Proteínas totais

A determinação das proteínas totais foi realizada pelo método de Lowry (1951), como proposto por WU (1922), e os valores foram expressos em mg/mL.

4.3.3 Atividade Superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi medida espectrofotometricamente, em todas as amostras, segundo descrito por BANNISTER E CALABRESE (1987). A SOD pode ser medida de forma indireta, seguindo a diminuição de absorvância da adrenalina oxidada a 480 nm. Os resultados foram expressos em U SOD/mg de proteína. Uma unidade é definida como a quantidade de enzima que inibe a velocidade da formação de adenocromo em 50% (BANNISTER & CALABRESE, 1987).

4.3.4 Atividade da Catalase (CAT)

O método de medida para a atividade da catalase (CAT) foi o descrito por AEBI (1984), em que a enzima catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio em H_2O e O_2 . A velocidade de decomposição da H_2O_2 foi medida espectrofotometricamente a 230nm, durante 180 segundos. Os resultados foram expressos em mmol H_2O_2 /mg de proteína/minuto.

4.3.5 Atividade da Glutathiona Peroxidase (GPX)

A atividade da Glutathiona Peroxidase (GPX) foi descrita por PAGLIA (1967), em que a medida ocorre através das mudanças na absorbância de NADPH em 340 nm. Os resultados foram expressos em nmol NADPH/mg de proteína/minuto.

4.4 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média e erro padrão. Após a definição dos subgrupos, foi realizada a análise estatística utilizando a Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste *pos hoc* Tukey. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se um banco de dados que foi montado no pacote estatístico SPSS versão 17.

4.5 Considerações éticas

Atendendo a Lei Nº 11.794/ 2008, capítulo IV, art.14, § 4o, o número de animais a serem utilizados para a execução de um projeto e o tempo de duração de cada experimento foram o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo, poupando-se, ao máximo, o animal de sofrimento. Procedimentos éticos para o cuidado e uso dos animais foram adotados de acordo com as regulamentações publicadas pela Sociedade Brasileira para Neurociência e

Comportamento (SBNec). O presente estudo integra um projeto maior chamado “Influência da inflamação sobre o processo epileptogênico” que foi aprovado pela Comissão de pesquisa de Ciências da Saúde e Comitê de Ética no uso de animais da UFRGS em 18/12/2012.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A epilepsia é uma desordem crônica caracterizada por convulsões recorrentes, as quais podem ocasionar em um aumento na geração de conteúdos reativos a oxigênio no cérebro. Diversas evidências experimentais, tanto em humanos quanto em animais, mostram a relação entre epilepsia e estresse oxidativo (MARTINC *et al.*, 2014; YUKSEL *et al.*, 2000). Apesar da falta de evidências se o estresse oxidativo é uma causa ou consequência dessa patologia, acredita-se que um aumento na geração de radicais livres possa levar a convulsões prolongadas que poderiam resultar em disfunção mitocondrial em diversos tecidos cerebrais que procedem à morte celular neuronal e causam subsequente epileptogênese (CHEN *et al.*, 2010). Desta forma, o conhecimento de possíveis novos fármacos anticonvulsivantes que atenuem o estresse oxidativo e, por consequência, as crises convulsivas, é de grande interesse para o tratamento da epilepsia.

A administração repetitiva de PTZ (20 mg/Kg) em dias alternados (por 14 dias) resultou em *kindling*, dois dias consecutivos em que os animais do grupo salina atingiram a escala 4 de Racine, como indicado pelo gráfico que demonstra a severidade das convulsões desenvolvidas de acordo com a escala de Racine (Figura 7).

Os animais tratados com salina evoluíram para crises convulsivas mais complexas, características da escala 4 de Racine. Nos grupos tratados com as diferentes doses de dexametasona, observou-se uma severidade menor, de acordo com a referida escala, quando comparado ao grupo controle negativo (salina) (ANOVA de medidas repetidas, $*p < 0,001$). Não houve diferença significativa dos grupos tratados com dexametasona em relação ao grupo tratado com diazepam, controle positivo ($p > 0,05$). Ressalta-se que nenhum dos animais dos grupos tratados com diazepam e dexametasona, nas diferentes doses, evoluíram para a escala 4 de Racine.

Além disso, não se observou mortalidade entre os grupos tratados.

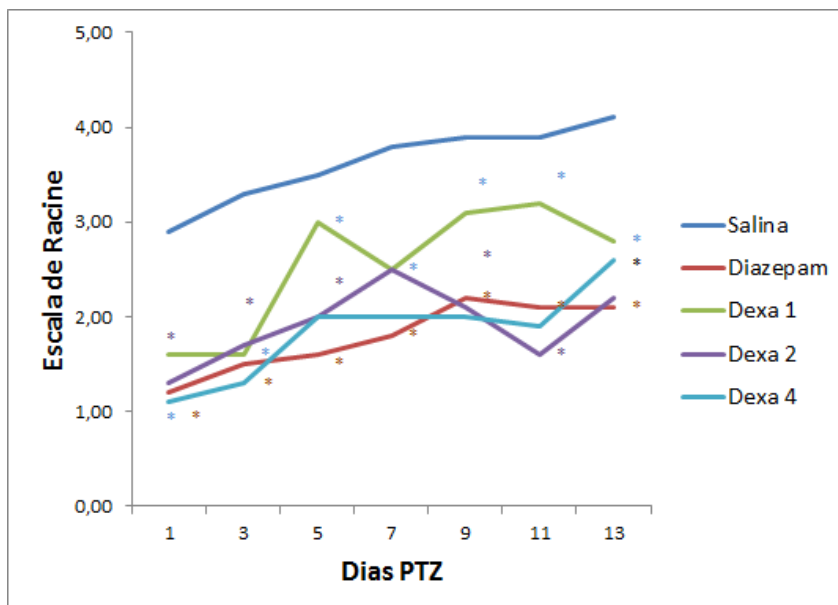


Figura 7: Efeito da dexametasona no desenvolvimento de kindling induzido por PTZ. Resultados são expressos como média (n=10 animais por grupo). * $p < 0,001$, diferente do grupo controle salina (ANOVA de medidas repetidas).

O cérebro é suscetível ao estresse oxidativo pelo seu alto conteúdo lipídico e metabolismo oxidativo. Convulsões contínuas induzem o aumento de espécies reativas a oxigênio (ERO) nesse órgão (MENON *et al.*, 2014).

A análise da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é o principal método para quantificar os produtos finais de peroxidação lipídica, que é a oxidação do radical livre de ácidos graxos poli-insaturados nos sistemas biológicos. É utilizada para medir o estresse oxidativo de tecidos e células, acarretando em alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, consequentemente comprometendo todo o metabolismo celular (SCOCCIA *et al.*, 2001). Todas as organelas podem sofrer alterações quando interagem como as ERO, porém a membrana celular é a estrutura que, se atingida, desencadeia um problema significativo à célula, pois resulta na peroxidação lipídica. Quando a peroxidação lipídica acontece, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, como por exemplo, o malondialdeído (MDA), resultando em morte celular (FERREIRA *et al.*, 1997). A dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS),

introduzido por Buege e Aust (1978), avalia o dano celular pelo estresse oxidativo através da quantificação do MDA produzido pela peroxidação lipídica, sob um fator oxidante específico, de um determinado tecido. O aumento de MDA pode também estar relacionado com a ativação de defesas antioxidantes no tecido cerebral para proteger os mesmos contra dano oxidativo induzido pelo tratamento (TEJADA et al., 2006).

Neste trabalho, observou-se que os níveis de peroxidação lipídica, no córtex, dos animais tratados com dexametasona 4 mg/kg estavam significativamente elevados comparado aos animais tratados com diazepam, dexametasona 1 mg/kg e 2 mg/kg (Figura 8).

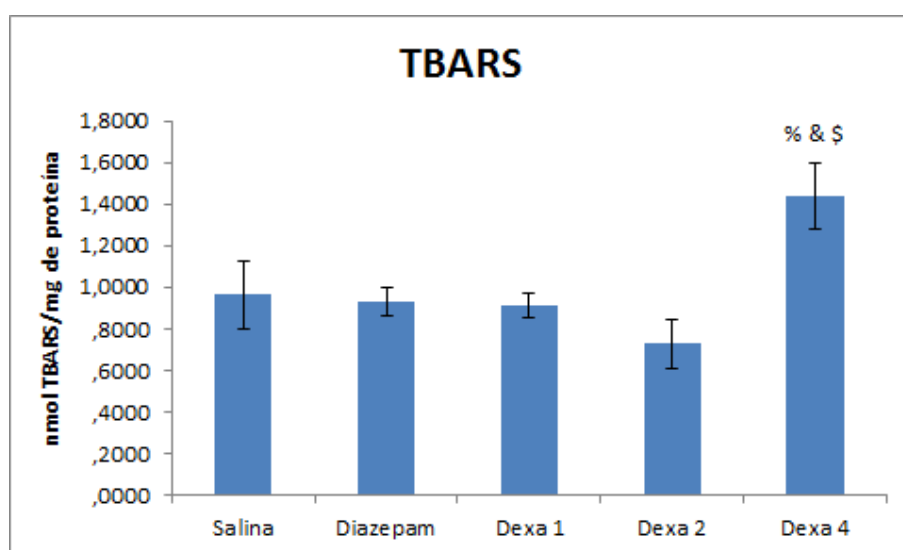


Figura 8: Efeito da dexametasona sobre a peroxidação lipídica no córtex. Os dados estão representados como média \pm erro padrão ($n=5-8$ por grupo) $^{\%}p<0.05$ comparado ao grupo Diazepam, $^{\&}p<0.05$ comparado grupo Dexta 1 mg/Kg, $^{\$}p<0.05$ comparado ao grupo Dexta 2 mg/Kg (ANOVA seguida de pós-hoc de Tukey).

Resultado similar foi observado no hipocampo (Figura 9) só que nesse tecido os níveis de peroxidação lipídica em animais tratados com dexametasona 4 mg/Kg estavam significativamente elevados comparados aos animais tratados com dexametasona 2 mg/kg. Indicando que, o tratamento com a maior concentração de dexametasona levou a um aumento no conteúdo de MDA, e conseqüentemente a uma maior peroxidação lipídica nessas estruturas.

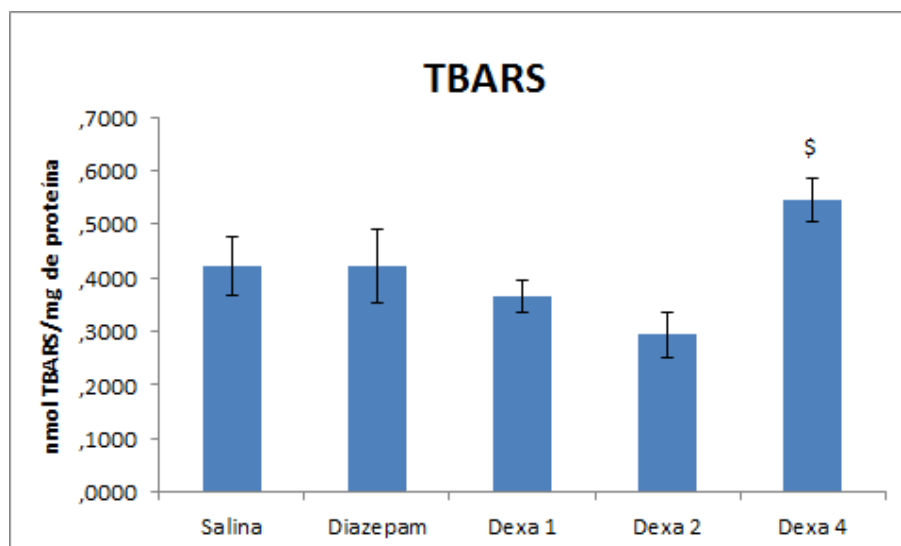


Figura 9: Efeito da dexametasona sobre a peroxidação lipídica no hipocampo. Os dados estão representados como média \pm erro padrão (n=5-8 por grupo) ($^{\$}p<0.05$ comparado ao grupo Dexta 4 mg/Kg; ANOVA seguida de pós-hoc de Tukey).

O resultado esperado seria um nível maior de TBARS no grupo tratado somente com salina e PTZ comparado aos animais tratados com os fármacos. Diversos estudos mostram que em grupos tratados com fármacos anticonvulsivantes ou com compostos naturais, capazes de reduzir atividades convulsivantes, ocorre uma redução significativa da atividade de TBARS em relação aos controles, esses apresentando níveis altos (GOLECCHA *et al.*, 2014; SAHA e CHARKRABARTI, 2014; ZHEN *et al.*, RODRIGUES *et al.*, 2012; MEHLA *et al.*, 2010).

Em outros estudos, em que foi utilizado o PTZ agudamente ou para o desenvolvimento de *kindling*, houve um aumento no conteúdo de MDA nesses grupos comparados ao grupo controle (EL-ABHAR *et al.*, 2003; PATSOUKIS *et al.*, 2004a, PATSOUKIS *et al.*, 2004b) demonstrando que administração de PTZ induziu um aumento na peroxidação lipídica. Porém, cabe ressaltar que, nestes estudos, as doses de PTZ utilizadas foram superiores a utilizada no presente trabalho.

Arora *et al.* (2010) avaliaram os efeitos da carbamazepina (CBZ) e da lamotrigina (LTG) na resposta ao estresse oxidativo em ratos durante epileptogênese química. Os ratos foram divididos em 6 grupos: controle (normal),

PTZ, PTZ + CBZ, PTZ + LTG, CBZ e LTG. Os autores observaram um aumento significativo no conteúdo de MDA nos grupos PTZ, PTZ + CBZ e PTZ + LTG comparado ao grupo controle e uma diminuição significativa no grupo PTZ + LTG comparado ao grupo PTZ. Estes resultados indicam que mesmo com o tratamento com anticonvulsivantes foi possível observar um aumento significativo no conteúdo de MDA, comparado ao grupo controle (ARORA *et al.*, 2010).

Menon *et al.* (2012) realizaram um estudo avaliando o conteúdo de MDA em pacientes com epilepsia sem tratamento e sob o uso de fármacos anticonvulsivantes comparando-os a um grupo controle. Ambos os grupos de pacientes apresentavam níveis significativamente elevados de MDA comparados ao grupo controle, mas não foi possível observar diferença entre os dois grupos de pacientes. Os autores concluíram que o uso de fármacos anticonvulsivantes não influenciou em marcadores oxidativos e sugeriram que a presença de estresse oxidativo seria induzida pela ocorrência de convulsões (MENON *et al.*, 2012).

A presença de sistemas antioxidantes no cérebro consegue prevenir danos causados por radicais livres e também desempenham um papel importante na progressão da doença no corpo (MENON *et al.*, 2014).

Os grupamentos sulfidríla são compostos que possuem grande importância no sistema antioxidante por oferecerem suas ligações (-SH) à glutathiona (GSH), auxiliando na atenuação das respostas de estresse oxidativo ao induzir a eliminação de radicais livres. No processo inflamatório, EROs são geradas e iniciam uma reação em cadeia que culmina na peroxidação lipídica e morte celular. Os compostos sulfidríla ligam-se aos radicais livres formados durante este processo ou em radicais produzidos após exposição a agentes nocivos. Os grupamentos sulfidrílas refletem o dano oxidativo a proteínas, e sua possível redução indicaria a ocorrência de dano oxidativo no tecido cerebral. Além de refletir dano às proteínas, a diminuição de grupamentos sulfidrílas também reflete diminuição de defesa antioxidante não-enzimática, que reagem diretamente com as espécies reativas e assim conseguem prevenir a propagação de reações em cadeia (ANTUNES e MACEDO, 2011; FEITOSA, 2012).

Neste estudo, o conteúdo de grupamentos sulfidrílas não apresentou diferença significativa entre os grupos tratados tanto no córtex quanto no

hipocampo (Figuras 10 e 11). Esse resultado indica que não houve dano oxidativo a proteínas celulares causado pela administração de PTZ e pela dexametasona.

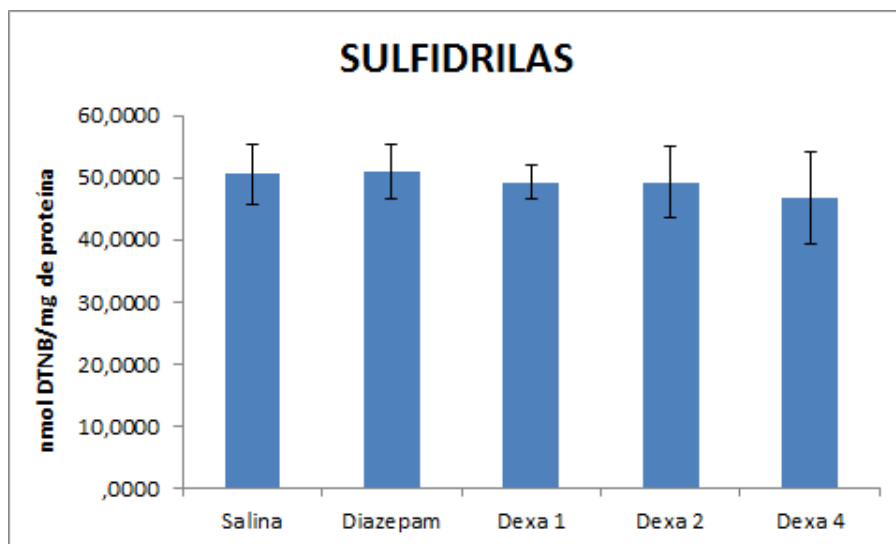


Figura 10: Níveis de sulfidrilas no córtex de ratos administrados com dexametasona, Os dados estão representados como média \pm erro padrão. (n=5-8 por grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$; ANOVA seguida de Tukey).

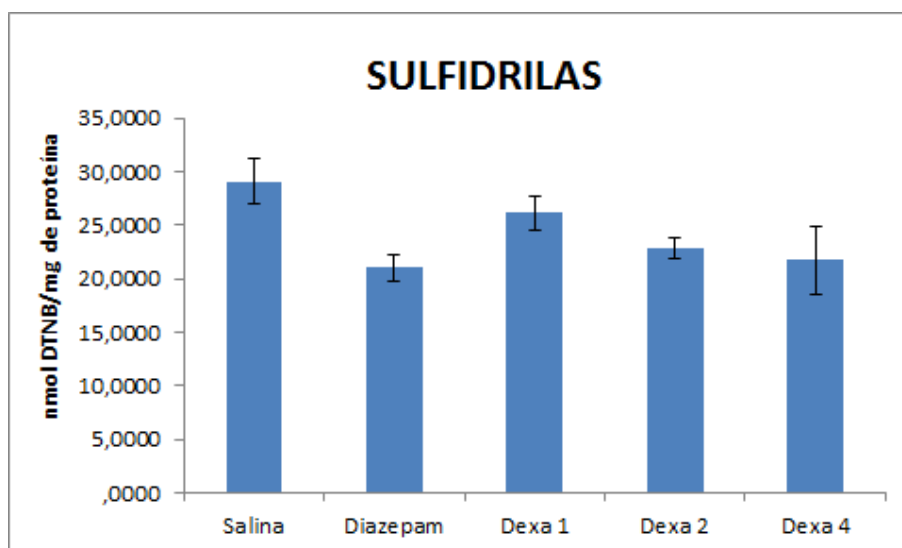


Figura 11: Níveis de sulfidrilas no hipocampo de ratos administrados com dexametasona, Os dados estão representados como média \pm erro padrão. (n=5-8 por grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$; ANOVA seguida de Tukey).

A formação dos EROs se dá primeiramente pelo radical superóxido ($O_2\cdot^-$), que pode ser dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da ação catalítica da enzima superóxido dismutase (SOD). A SOD é a enzima mais abundante e a quinta proteína mais abundante no organismo, mostrando a sua importância (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2009).

No córtex, não foi possível observar diferença significativa na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase entre os diferentes grupos (Figura 12).

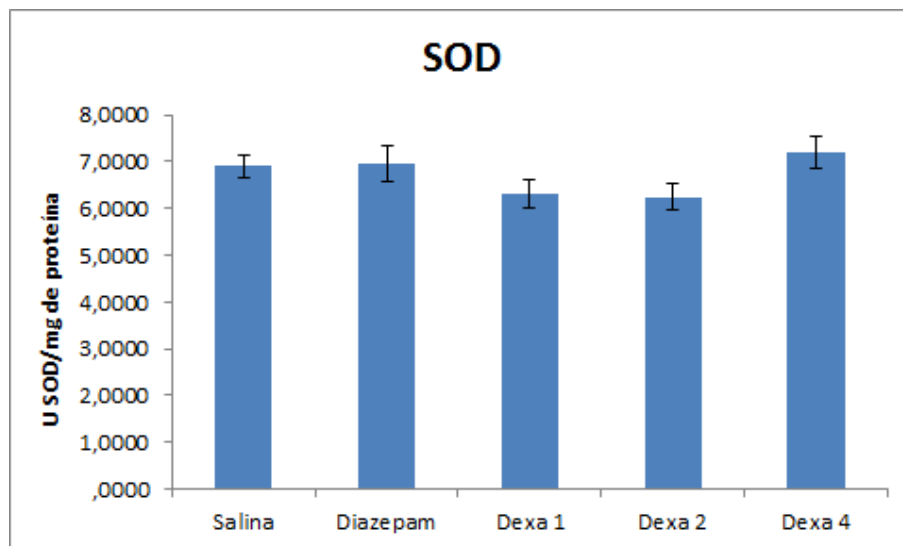


Figura 12: Efeito do tratamento com dexametasona sobre a atividade da enzima superóxido dismutase no córtex. Os dados estão representados como média \pm erro padrão. (n=5-8 por grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$; ANOVA seguida de Tukey).

Erakovic et al., (2003) não observaram alteração dos níveis de SOD no córtex comparando animais controles e animais que haviam sofrido *kindling*. Concluíram que essa inalteração de SOD poderia ser devida a uma regulação elevada tanto da enzima SOD quanto da enzima responsável pela degradação desta, essa produzida pelo estresse oxidativo (ERAKOVIC *et al.*, 2003).

Dentre as enzimas antioxidantes, acredita-se que, no hipocampo, a principal é a SOD, já que essa área cerebral contém grande quantidade de zinco e cobre (FERREIRA *et al.*, 2012).

No presente trabalho, observou-se, no hipocampo, que a atividade da superóxido dismutase apresentou-se significativamente diminuída nos animais tratados com dexametasona 1 mg/kg comparado aos animais tratados com salina

e dexametasona 4 mg/kg (Figura 13). Foi possível observar uma tendência de aumento da atividade da SOD em relação ao aumento da concentração da dexametasona, embora sem significado estatístico (Figura 13).

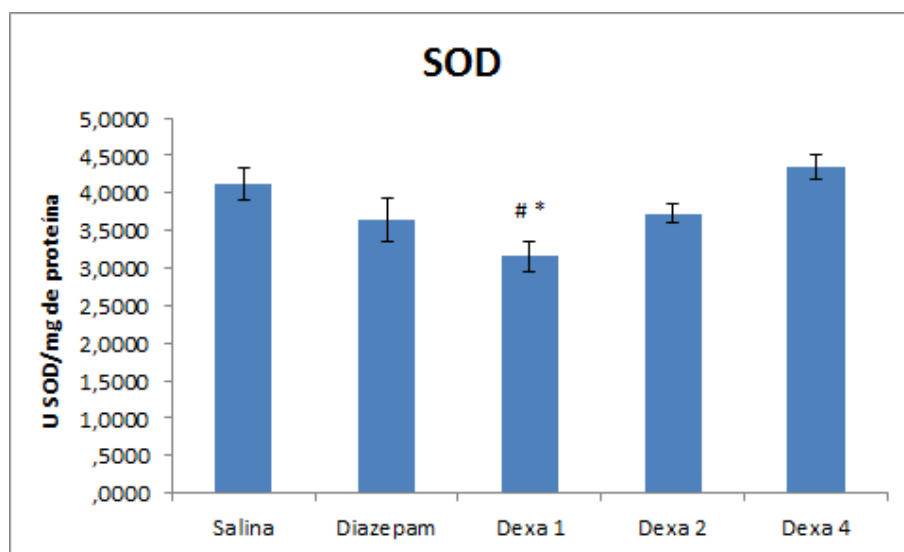


Figura 13: Efeito do tratamento com dexametasona sobre a atividade da enzima superóxido dismutase no hipocampo. Os dados estão representados como média \pm erro padrão. (n=5-8 por grupo). (#p<0.05 comparado ao grupo salina, * p<0.05 comparado ao grupo Dexa 4 mg/Kg; ANOVA seguida de pós-hoc Tukey).

Em outros estudos, contrariamente ao observado neste, foi possível observar que ao utilizar compostos, com potencial anticonvulsivante, houve um aumento significativo da SOD comparado ao grupo só administrado com PTZ (GOLECCHA *et al.*, 2014; SAHA e CHARKRABARTI, 2014; ZHEN *et al.* 2014, RODRIGUES *et al.*, 2012; MEHLA *et al.*, 2010).

El-Abhar *et al.* (2003) utilizaram taurina e nifedipina para avaliar suas ações modulatórias sobre radicais livres. Observaram uma diminuição de SOD no grupo *kindling* PTZ, mas nos grupos tratados com taurina (100 mg/kg i.p) e nifedipina (30 mg/kg, i.p) foi possível observar um aumento nos níveis desta enzima (EL-ABHAR *et al.*, 2003).

A enzima catalase (CAT) é responsável pela redução das moléculas de H₂O₂. É uma das principais enzimas antioxidantes e está estrategicamente

localizada, em altas concentrações, nos peroxissomas, onde se localizam as enzimas produtoras de H_2O_2 , podendo exercer sua função antes da difusão deste substrato para as demais células. Também é encontrada, mas em baixas concentrações, na mitocôndria. É responsável pela detoxificação de outros substratos, como fenóis e alcoóis, e é capaz de decompor milhares de H_2O_2 por minuto, sendo considerado um dos catalisadores mais ativos produzidos pela natureza (SCANDALIOS, 2005).

No córtex, foi observado uma diminuição significativa da atividade da enzima antioxidante catalase nos grupos tratados com dexametasona 1 e 2 mg/kg comparados ao grupo salina (Figura 14). Indicando que a utilização da dexametasona em baixa concentração não induziu um aumento dessa enzima como poderia ser esperado. No entanto, foi possível observar um aumento gradativo, mas não estatisticamente significativo, da atividade da catalase nos grupos tratados com doses crescentes de dexametasona.

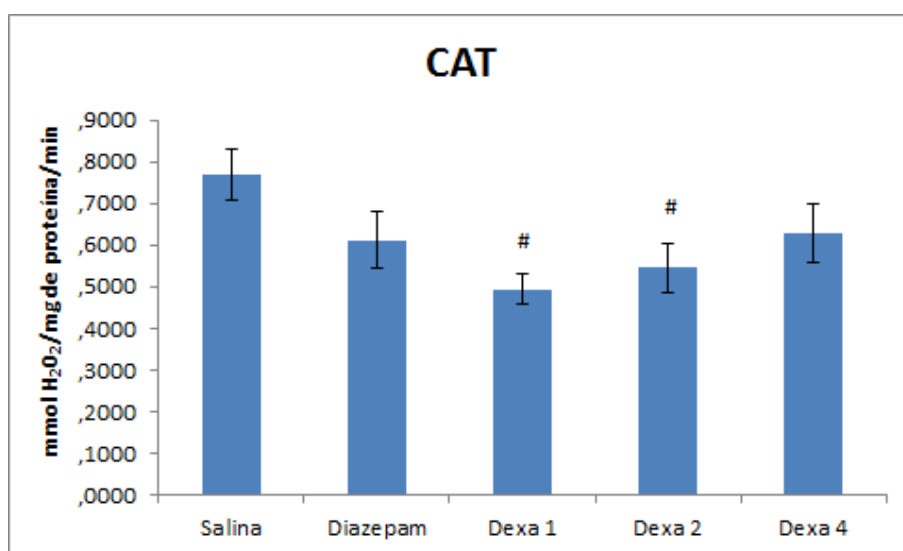


Figura 14: Efeito do tratamento com dexametasona sobre a atividade da enzima catalase no córtex. Os dados estão representados como média \pm erro padrão. (n=5-8 por grupo). (# $p < 0.05$ comparado ao grupo salina; ANOVA seguida de pós-hoc Tukey).

Já no hipocampo, não foi observada diferença significativa entre os diferentes tratamentos (Figura 15).

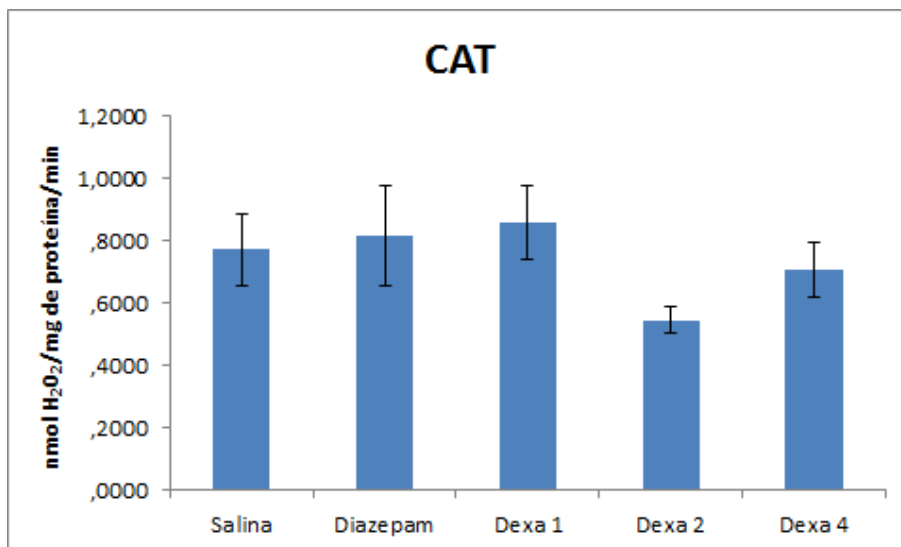


Figura 15: Efeito do tratamento com dexametasona sobre a atividade da enzima catalase no hipocampo. Os dados estão representados como média \pm erro padrão. (n=5-8 por grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$; ANOVA seguida de Tukey).

Menon *et al* (2014) observaram que os níveis de CAT, em pacientes com epilepsia, eram significativamente reduzidos comparados ao grupo controle (MENON *et al.*, 2014). Já no estudo de Saha *et al.* (2014), avaliou-se o pré-tratamento com resveratrol, um polifenol encontrado nas sementes de uva, e observou-se que a atividade da catalase foi significativamente reduzida em ratos tratados com PTZ em comparação aos animais controles. Além disso, houve um aumento significativo da atividade da enzima quando os animais foram pré-tratados com resveratrol (SAHA *et al.*, 2014).

A atividade da glutathione peroxidase (GPx) depende da manutenção do ciclo redox da glutathione, por meio do controle da relação entre glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). GPx não é somente importante em desintoxicar H₂O₂, mas também participa na detoxificação de hidroperóxidos lipídicos usando a glutathione. A alta atividade e expressão de GPx, depois de tratamento com convulsivantes, pode indicar uma possível indução de GPx para reparar hidroperoxidação lipídica nas membranas do córtex (ISKUSNYKH *et al.*, 2013).

No córtex, observou-se uma diminuição estatisticamente significativa em animais tratados com dexametasona 2 mg/kg em relação a todos os outros grupos (Figura16).

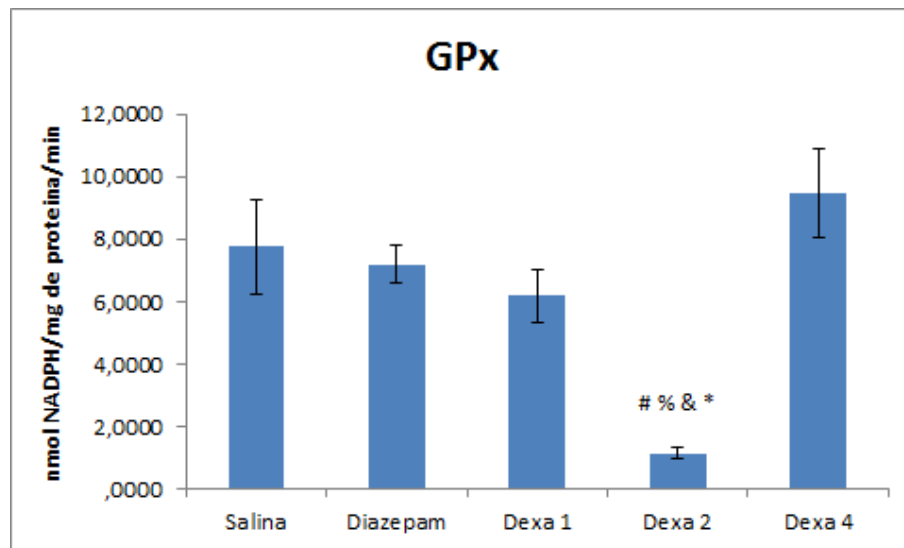


Figura 16: Efeito do tratamento com dexametasona sobre a atividade da enzima glutathione peroxidase no córtex. Os dados estão representados como média \pm erro padrão. (n=5-8 por grupo). # $p < 0.05$ comparado ao grupo salina, % $p < 0.05$ comparado ao grupo diazepam. & $p < 0.05$ comparado ao grupo Dexta 1 mg/Kg, * $p < 0.05$ comparado ao grupo Dexta 4 mg/Kg. (ANOVA seguida de Tukey).

No hipocampo, foi observada uma diminuição significativa da enzima GPx nos animais tratados com dexametasona 1 mg/kg comparado ao grupo salina. Observou-se um discreto aumento, não estatisticamente significativo, da atividade da GPx em relação ao aumento da concentração de dexametasona (Figura 17).

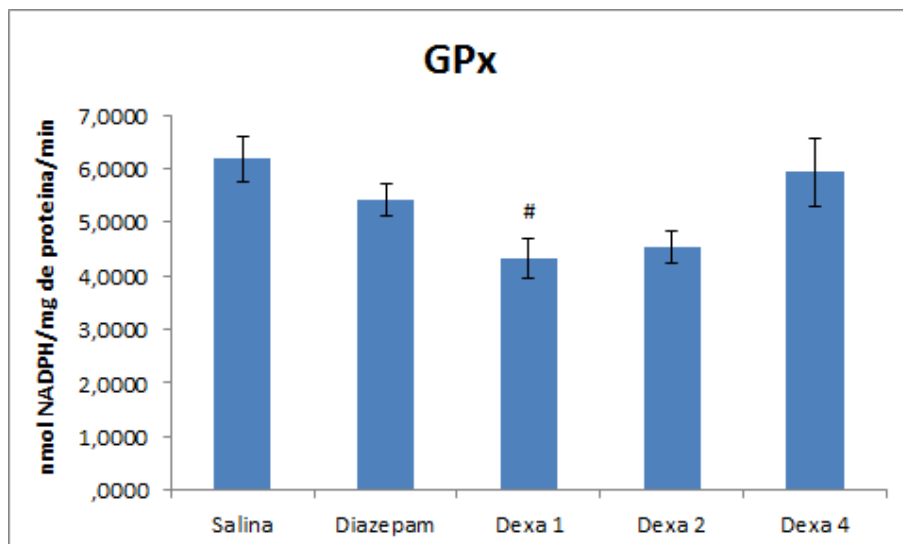


Figura 17: Efeito do tratamento com dexametasona sobre a atividade da enzima glutathione peroxidase no hipocampo. Os dados estão representados como média \pm erro padrão. (n=5-8 por grupo). # $p < 0.05$ comparado ao grupo salina (ANOVA seguida de Tukey).

Erakovic *et al.* (2003) observaram uma diminuição da atividade de GPx em grupos submetidos ao *kindling* induzido por PTZ no córtex e no hipocampo de ratos sugerindo que essa deficiência de GPx provoca um aumento na peroxidação lipídica (ERAKOVIC *et al.*, 2003).

A avaliação de parâmetros de estresse oxidativo em animais tratados com dexametasona e submetidos ao *kindling* pelo pentilenotetrazol mostrou que o uso da dexametasona, fármaco anti-inflamatório esteroide, em três diferentes concentrações induziu crises convulsivas menos severas, demonstrando efeito antiepiléptogênico. No entanto, na análise dos parâmetros de estresse oxidativo e antioxidantes, observou-se, de uma forma geral, que a dexametasona não demonstrou apresentar efeito antioxidante protetor.

A inclusão de um grupo controle basal, que não receberia PTZ, poderia ter auxiliado na interpretação dos resultados obtidos, pois permitiria uma melhor comparação do efeito do convulsivante e dos tratamentos utilizados sobre os parâmetros avaliados. Além disso, a maioria dos estudos que demonstra o papel do PTZ na indução do estresse oxidativo, utilizou doses superiores à que foi utilizada no presente estudo (20 mg/Kg).

Dados de nosso laboratório (não publicados) demonstraram que os animais tratados com a dexametasona apresentaram níveis menores de TNF-alfa comparados ao grupo salina no soro, hipocampo e córtex e também diminuição nos níveis de IL-1beta no hipocampo (* $p < 0,05$, ANOVA univariada; pos hoc Tukey). Assim, pode-se supor que o efeito anticonvulsivante da dexametasona observado, deve-se muito provavelmente a mecanismos anti-inflamatórios, mas não antioxidantes.

Desta forma, novos estudos são necessários para melhor elucidar os resultados do presente estudo.

6. CONCLUSÕES

- A administração de dexametasona, fármaco anti-inflamatório esteroide, em três diferentes doses demonstrou efeito antiepiléptico em modelo animal de convulsão induzido pelo PTZ.
- Observou-se um aumento significativo nos níveis de peroxidação lipídica no grupo tratado com dexametasona 4 mg/kg no córtex, comparado aos grupos diazepam, dexametasona 1 e 2 mg/kg, e no hipocampo, comparado ao grupo dexametasona 2 mg/kg.
- Não houve diferença significativa no conteúdo de grupos sulfidrilas entre os grupos tratados tanto no córtex quanto no hipocampo;
- No córtex, não houve diferença significativa dos níveis da enzima antioxidante superóxido dismutase entre os grupos tratados. No hipocampo, houve uma diminuição significativa no grupo tratado com dexametasona 1 mg/kg comparado ao grupo salina e dexametasona 4 mg/kg.
- A atividade da enzima antioxidante catalase, no córtex, apresentou-se significativamente reduzida nos grupos dexametasona 1 e 2 mg/kg comparado ao grupo salina. No hipocampo, não houve diferença significativa entre os grupos tratados;
- No córtex, houve uma diminuição significativa do nível da enzima antioxidante glutatona peroxidase no grupo tratado com dexametasona 2 mg/kg comparado a todos os outros grupos. E no hipocampo, se observou uma diminuição significativa no grupo dexametasona 1 mg/kg em relação ao grupo salina.
- A dexametasona não apresentou efeito antioxidante no modelo de convulsão utilizado neste estudo.

7. PERSPECTIVAS

Como perspectiva do trabalho pretende-se:

- Incluir de um grupo controle que não receberá nenhum fármaco (naive).
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo no soro de animais tratados com dexametasona e submetidos ao *kindling* por PTZ.
- Avaliar parâmetros de estresse oxidativo em animais submetidos ao modelo agudo do PTZ e tratados com dexametasona.
- Realizar um estudo comparativo da expressão de citocinas pró-inflamatórias e de parâmetros de estresse oxidativo de animais tratados com dexametasona e submetidos ao *kindling* por PTZ.
- Realizar uma análise dos fatores de transcrição NF-kB e Nrf2, com intuito de verificar alterações desses fatores nos animais tratados com dexametasona e submetidos ao *kindling* por PTZ.

8. REFERÊNCIAS

AKSENOV, M.Y.; MARKESBERY, W.R. Change in thiol content and expression of glutathione redox system gene in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letter*. 302:141–145. 2001.

AORA, T.; MEHTA, A. K.; SHARMA, K. K.; MEDIRATTA, P. K.; BENERJEE, B. D.; GARG, G. R.; SHARMA, A. K. Effect of carbamazepine and lamotrigine on cognitive function and oxidative stress in brain during chemical epileptogenesis in rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 106:372-377. 2010

BANKS, W. A.; ERICKSON, M. A. The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiology of Disease*. 37: 26–32, 2010.

BANERJEE, P. N.; FILIPPI, D.; HAUSER, W. A. The descriptive epidemiology of epilepsy - a review. *Epilepsy Research*. 85: 31–45, 2009.

BEN-ARI, Y. Seizures beget seizures: the quest for GABA as a key player. *Critical reviews in neurobiology*. 18: 135–44, 2006.

BLOOMQUIST, J.R. Ion channels as targets for insecticides. *Annual Review of Entomology* 41:163–190. 1996

BOWLER, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Superoxide-dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 43: 83-116, 1992

BRITO, B., FOLMER, V.; PUNTEL, G.O.; FACHINETTO, R.; SOARES, J.C.; ZENI, G.; NOGUEIRA, C. W.; ROCHA, J. B. Diphenyl diselenide and 2, 3-dimercaptopropanol increase the PTZ-induced chemical seizure and mortality in mice. *Brain Research Bulletin*. 68: 414–418, 2006.

BROOKES, P.S.; YOON, Y.; ROBOTHAM, J.L.; ANDERS, M.W.; SHEU, S.S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology. Cellular Physiology*. 287: 817-833. 2004

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal Lipid Peroxidation. *Methods in Enzymology*. 52:302-310. 1978

CHEN, S. D.; CHANG, A. Y.; CHUANG, Y. C. The role of mitochondrial dysfunction in seizure-associated cell death in the hippocampus and epileptogenesis. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 42: 461-465. 2010

CHEN, J.; CAI, F.; JIANG, L.; HU, Y.; FENG, C. A prospective study of dexamethasone therapy in refractory epileptic encephalopathy with continuous spike-and-wave during sleep. *Epilepsy & Behavior*. 55: 1-5. 2015

CHUANG, Y.; CHANG, A. Y.; LIN, J. W.; HSU, S. P.; CHAN, S. H. Mitochondrial Dysfunction and Ultrastructural Damage in the Hippocampus during Kainic Acid – induced Status Epilepticus in the Rat. *Epilepsia*. 45:1202–1209, 2004.

CZAPIN, P.; BLASZCZYK, B.; CZUCZWAR, S. J. Mechanisms of Action of Antiepileptic Drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 3–14, 2005.

DHIR, A. Pentylentetrazol (PTZ) Kindling Model of Epilepsy. n. January, p. 1–12, 2012.

DECKERS, C. L.; CZUCZWAR, S. J.; HEKSTER, Y. A.; KEYSER, A., KUBOVA., MEINERDI, H.; PATSALOS, P. N.; RENIER, W. O.; VAN RIJN, C. N. Selection of Antiepileptic Drug Polytherapy Based on Mechanisms of Action : The Evidence Reviewed. *Epilepsia*. 41: 1364–1374, 2000.

DUNCAN, J. S.; SANDER J. W.; SISODIYA, S. M.; WALKER, M. C. Adult epilepsy. *Lancet*, 367:1087–1100, 2006.

DUBÉ, C.; BREWSTER, A.; RICHICHI, C. Fever, febrile seizures and epilepsy. *Trends in Neuroscience*. 3: 490–496, 2007.

EL-ABHAR, H. S.; EL GAWAD, H. M. Modulation of cortical nitric oxide synthase, glutamate, and redox state by nifedipine and taurine in PTZ-kindled mice. *Epilepsia*. 44:276-81. 2003

ERAKOVIC, V.; ZUPAN, G.; VARLIJEN, J.; SIMONIC, A. Pentylentetrazol-induced seizures and kindling: changes in free fatty acid, superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity. *Neurochemistry International*. 42:173-178. 2003

ERCEGOVAC, M.; JOVIC, N.; SIMIC, T.; BESIAC-BUMBASIREVIC, L.; SOKIC, D.; DJUKIC, T.; SAVIC-RADOJEVIC, A.; MATIC, M.; MIMIC-OKA, J.; PLIJESA-ERCEGOVAC, M. Byproducts of protein, lipid and DNA oxidative damage and antioxidant enzyme activities in seizure. *Seizure: European Journal of Epilepsy*. 19: 205–210, 2010.

FEITOSA M. L. Investigação dos mecanismos de ação da atividade gastroprotetora de 1,4-cineol em modelos de úlcera gástrica em camundongos. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2011

FERANDO, I.; MODY, I. GABA A receptor modulation by neurosteroids in models of temporal lobe epilepsies Hormones in the Brain. *Epilepsia*. 53: 89–101, 2012

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Associação Médica Brasileira. 43:61-68. 1997

FERREIRA, P. B.; ALEMEIDA, A.C.; FREITAS, R. M. Antioxidant effect of buspirone in epilepsy model induced by pilocarpine. *Revista psiquiatria clínica*. 39. 2012

GOLECHHA M.; SARANGAL, V.; BHATIA, J.; CHAUDHRY, U.; SALUJA, D.; ARYA, D. S. Naringin ameliorates pentylenetetrazol-induced seizures and associated oxidative stress, inflammation, and cognitive impairment in rats: possible mechanisms of neuroprotection. *Epilepsy Behavior*. 41:98-102. 2014

HABERLANDT, E.; WEGER, C.; SIGI, S.B.; RAUCHENZAUNER, M.; SCHOLL-BURGI, S.; ROSTÁSY, K.; KARALL, D. Adrenocorticotropic hormone versus pulsatile dexamethasone in the treatment of infantile epilepsy. *Pediatric Neurology*. 42: 21-27. 2010

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 4th ed. Oxford/UK: Clarendon Press/ Oxford Science Publications, 2007.

HATEFI, Y. The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annual Review Biochemistry*. 54: 1015-1069. 1985

HIDER, R.C.; MA, Y.; MOLINA-HOLGEDO, F.; GAETA, A.; ROY, S. Iron chelation as a potential therapy for neurodegenerative disease. *Biochemical Society Transactions*. 36: 1304-1308. 2008

HUANG, R. Q.; BEEL-HORNER, C. L.; DIBAS, M. I.; COVEY, D. F.; DREWE, J. A.; DILLON, G. H. Pentylenetetrazole-Induced Inhibition of Recombinant - Aminobutyric Acid Type A (GABA A) Receptors: Mechanism and Site of Action. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 298: 986–995, 2001.

ISKUSNYKH, I. Y.; POPOVA, T. N.; AGARKOV, A. A.; CARVALHO, M. Â. A.P.; RJEVSKIY, S. G. Expression of Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase and Level of Free Radical Processes under Toxic Hepatitis in Rats. *Journal of Toxicology*. 2013

KRONENBERG, H.M.; MELMED, S.; POLONSKY, K.S.; LARSEN, P.R. Williams Tratado de Endocrinologia. Rio de Janeiro: *Elsevier*. 2010.

KUDIN, A. P.; KUDINA, T. A.; SEYFRIED, J.; VIELHABER, S.; BECK, H.; ELGER, C. E.; KUNZ, W. S. Seizure-dependent modulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in rat hippocampus. *The European Journal of Neuroscience*. 15: 1105–1114, 2002.

KUDIN, A. P.; ZSURDKA, G.; ELGER, C. E.; KUNZ, W. S. Mitochondrial involvement in temporal lobe epilepsy. *Experimental Neurology*. 218: 326–332, 2009.

KUNZ, W.S.; KUDIN, A.P.; VIELHABER, S.; BLUMCKE, I.; ZUSCHRATTER, W.; SCHRAMM, J.; BECK, H.; ELGER, C.E. Mitochondrial complex I deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy. *Annals of Neurology*. 48(5), 766-773. 2000

LEE, Y. M.; KANG H. C.; LEE, J. S.; KIM, S. H.; KIM, E. Y.; LEE, S. K.; SLAMA, A.; KIM, H. D. Mitochondrial respiratory chain defects. *Epilepsia*. 49: 685–690, 2008.

MARCHI, N.; GRANATA, T.; FRERI, E.; CIUSANI, E.; RAGONA, F.; PUVENNA, V.; TENG, Q.; ALEXOPOLOUS, A.; JANIGRO, D. Efficacy of anti-inflammatory therapy in a model of acute seizures and in a population of pediatric drug resistant epileptics. *PLoS One*. 6. 2011

MALLICK, N.; RAI, L.C. Response of the antioxidants systems of the nitrogen fixing cyanobacterium *Anabaena doliolum* to copper. *Journal of Plant Physiology*. 155: 146-149. 1999

MARTINC, B.; GRABNAR, I.; VOVK, T. The role of reactive species in epileptogenesis and influence of antiepileptic drug therapy on oxidative stress. *Current neuropharmacology*. 10: 328–43, 2012.

MARTINC, B.; GRABNAR, I.; VOVK, T. Antioxidants as a preventive treatment for epileptic process: A review of the current status. *Current Neuropharmacology*. 12: 527–550, 2014.

McNAMARA, J.O. Kindling: An animal model of complex partial epilepsy. *Annals of Neurology*. 16: 72-76. 1984

MEHLA, J.; REETA, K. H.; GUPTA, P.; GUPTA Y. K. Protective effect of curcumin against seizures and cognitive impairment in a pentylenetetrazole-kindled epileptic rat model. *Life Sciences*. 20:19-22. 2010

MENON, B.; RAMALINGAM, K.; KUMAR, R. V. Oxidative stress in patients with epilepsy is independent of antiepileptic drugs. *Seizure*. 21:780-784. 2012

MUSSULINI, B. H; Caracterização comportamental do modelo de convulsões induzidas por pentilenotetrazol em zebrafish adulto. 2013. 45 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2013

PATSOUKIS, N.; ZERVOUDAKIS, G.; PANAGOPOULOS, N. T. GEORGIU, C. D. ANGELATOU, F.; MATSOKIS, N. A. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol-induced epileptic seizures. *Neuroscience letters*. 357:83-86. 2004a;

PATSOUKIS, N.; ZERVOUDAKIS, G.; PANAGOPOULOS, N. T. GEORGIU, C. D. ANGELATOU, F.; MATSOKIS, N. A. Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on thiol redox state in mouse cerebral cortex. *Epilepsy Research*. 62:65-74. 2004b;

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

PUN, P.B.; LU, J.; MOOCHALA, S. Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radicals Research*. 43(4), 348-364. 2009

RAMANJANEYULU R, TICKU M.K. Interactions of pentamethylenetetrazole and tetrazole analogues with the picrotoxinin site of the benzodiazepine-GABA receptor-ionophore complex. *European Journal Pharmacology*. 98, 337-45. 1984

RIAZI, K.; GALIC, M.A.; PITTMAN, Q. J. Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: cytokines and brain excitability. *Epilepsy Research*. 89, 34-42. 2010

RIIKONEN, R. Infantile Spams: Therapy and Outcome. *Journal of Child Neurology*. 401–404, 2004.

RODRIGUES, A. D.; SCHFFEL, T. B.; SCOLA, G.; SANTOS, M. T.; FANK, B.; FREITAS, S. C.; DANI, C.; VANDERLINDE, R.; HENRIQUES, J. A. P.; COITINHO, A. S.; SALVADOS, M. Neuroprotective and anticonvulsant effects of organic and conventional purple grape juices on seizures in Wistar rats induced by pentylenetetrazole. *Neurochemistry International*. 60:799-805

SAHA, L.; CHAKRABARTI, A. Understanding the anti-kindling role and its mechanism of Resveratrol in Pentylentetrazole induced-kindling in a rat model. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*. 120:57-64. 2014;

SCANDALIOS, J. G. Regulation and properties of plant catalases. *CRC Press*. 275-315. 1994;

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene degenses. *Brazilian Journal of medical and biological research*. 38: 995-1014. 2005;

SCHIMMER, B.P.; PARKER, K.L. Adrenocorticotrophic hormone: Adrenocortical steroids and their synthetic analogs. Inhibitors of the synthesis and actions of adrenocortical hormones. *The Pharmacological Basis Of Therapeutics*. Tenth Edition. 2001.

SIEGHART W, SPERK G. Subunit composition, distribution and function of GABA_A receptor subtypes. *Current topics in medicinal chemistry*. 2, 795-816. 2002;

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*. 82, 291-295. 1997;

SHIVAKUMAR, B. R.; ANANDATHEERTHAVARADA, H. K.; RAVINDRANATH, V. Free radical scavenging systems in developing rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 18:181-185. 1991

SHORVON, S. D. The etiologic classification of epilepsy. *Epilepsia*. 52: 1052–1057, 2011.

SLEVEN, H.; GIBBS, J. E.; HEALES, S.; THOM, M.; COCK, H. R. Depletion of reduced glutathione precedes inactivation of mitochondrial enzymes following limbic status epilepticus in the rat hippocampus. *Neurochesmitry International*. 48: 75–82, 2006.

TEJADA, S.; ROCA, C.; SUREDA, A.; RIAL, R. V.; GAMUNDÍ, A.; ESTEBAN. S. Antioxidant response analysis in the brain after pilocarpine treatments. *Brain Research Bulletin*. 69:587-592. 2006

VEZZANI, A.; FRENCH, J.; BARTFAI, T.; BARAM, T. Z. The role of inflammation in epilepsy. *Nature Reviews Neurology*. 7:31–40, 2011.

VOET, D.; VOET, J. G. *Biochemistry*. 2 ed. New York: John Wiley, 1995. 1361p.

ZHEN, J.; FANG, H.; FU, L.; WU, Y.; WANG, H.; ZANG, H. WANG, W. Effects of grape seed proanthocyanidin extract on pentylentetrazole-induced kindling and associated cognitive impairment in rats. *International Journal of Molecular Medicine*. 34:391-398. 2014

WALDBAUM, S.; PATEL, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: a contributing link to acquired epilepsy?. *Journal of Bioenergetics Biomembranes*. 42: 449-455. 2010

WILHELM, E. A. Ação farmacológica do 3-alquil selenogeno em modelos de convulsão em ratos jovens. 2012. 103 f. Tese (Doutorado Bioquímica Toxicológica) - Centro de Ciências Naturais e Exatas. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 2012

WILLS, E.D. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochemical Journal*. 99:667–676. 1996

WIRRELL, E.; FARRELL, K.; WHITING, S. The Epileptic Encephalopathies of Infancy and Childhood. *The Canadian Journal of Neurological Sciences*. 32: 409–418, 2005.

WHELESS, J. W.; CLARKE, D. F.; CARPENTER, D. Treatment of Pediatric Epilepsy: Expert Opinion, 2005. *Journal Child Neurology*. 20: 51–56, 2005.