

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

Edson Fernando Müller Guzzo

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM DEXAMETASONA SOBRE
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E INFLAMATÓRIOS NO MODELO
ANIMAL DE KINDLING INDUZIDO POR PENTILENOTETRAZOL**

Porto Alegre

2019

Edson Fernando Müller Guzzo

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM DEXAMETASONA SOBRE
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E INFLAMATÓRIOS NO MODELO
ANIMAL DE KINDLING INDUZIDO POR PENTILENOTETRAZOL**

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

Orientadora: Prof. Dr. Adriana Simon Coitinho

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Guzzo, Edson Fernando Müller
AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM DEXAMETASONA SOBRE
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E INFLAMATÓRIOS NO MODELO
ANIMAL DE KINDLING INDUZIDO POR PENTILENOTETRAZOL /
Edson Fernando Müller Guzzo. -- 2019.
51 f.
Orientador: Adriana Simon Coitinho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da
Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre,
BR-RS, 2019.

1. Epilepsia. 2. Pentilenotetrazol. 3.
Dexametasona. 4. Kindling. I. Simon Coitinho,
Adriana, orient. II. Título.

EDSON FERNANDO MÜLLER GUZZO

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM DEXAMETASONA SOBRE
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS E INFLAMATÓRIOS NO MODELO DE
KINDLING INDUZIDO POR PENTILENOTETRAZOL**

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

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Adriana Simon Coitinho (Orientadora - UFRGS)

Prof. Dr. Guilherme Baldo (UFRGS)

Profa. Dra. Maria Elisa Calcagnotto (UFRGS)

Profa. Dra. Patrícia Pereira (UFRGS)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a todos os brasileiros que através do pagamento de seus impostos, possibilitam a existência do ensino público, gratuito e de excelência;

Agradeço as instituições Hospital das Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Instituto de Cardiologia (IC-FUC) e Hospital Nossa Senhora da Conceição (HNSC), a seus funcionários excepcionais, por todo o incentivo que tive nestes últimos dois anos, o que possibilitou e me auxiliou muito;

Agradeço aos meus pais que me proporcionaram condições para que eu prosseguisse meus estudos, por terem acreditado nos meus sonhos e me motivado dia a dia;

Agradeço a minha irmã pelos bons momentos de descontração e por todas as alegrias que compartilhamos;

Agradeço as minhas avós biológicas e de coração, e ao meu avô pelos conselhos, boas palavras, alegrias e por tornarem a caminhada mais prazerosa;

Agradeço a minha esposa por acreditar nos meus sonhos e sonha-los junto comigo, pela parceria nestes anos, por ouvir minhas reclamações e por me amparar em meus momentos frágeis;

Agradeço a minha família emprestada de POA por me acolherem tão bem em sua casa, fazendo com que eu me sinta de fato um novo membro da família;

Agradeço a minha orientadora por me auxiliar em meus projetos, pelo incentivo e entusiasmo, pelos ensinamentos compartilhados e pela parceria nestes últimos 6 anos;

Agradeço aos meus colegas de laboratório e aos amigos que conquistei nestes dois últimos anos, pela parceria, pelos bons momentos compartilhados e por toda alegria que me proporcionaram.

“ Os lugares mais sombrios do Inferno são reservados àqueles que se mantiveram neutros em tempos de crise moral. ”

Dante Alighieri

RESUMO

Neste estudo, avaliou-se o potencial anticonvulsivante do fármaco anti-inflamatório dexametasona (DEXA), no modelo animal de *kindling* induzido por pentilenotetrazol (PTZ). Neste modelo crônico, ratos Wistar machos, diariamente, os tratamentos: salina (NaCl 0,9%), dexametasona (DEXA) 1mg, 2mg ou 4mg/Kg ou diazepam (2 mg/Kg) durante 14 dias e, em dias alternados, PTZ (20 mg/Kg). Nos dias em que receberam o PTZ, classificou-se a intensidade das crises epiléticas segundo Racine (1973). Os animais foram eutanasiados no décimo quinto dia e coletaram-se soro, hipocampo e córtex para dosagem das citocinas interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) pelo método de ELISA.

Os animais tratados com DEXA, no modelo de crise epilética induzido por PTZ, em todas as doses, apresentaram redução da intensidade das crises epiléticas de acordo com a escala de Racine, quando comparados ao grupo tratado com solução salina. Não houve diferença significativa entre os animais tratados com DEXA e os tratados com diazepam, indicando que o medicamento anti-inflamatório foi eficiente como agente anticonvulsivante. Além disso, o tratamento com DEXA não alterou a capacidade locomotora e exploratória dos animais, avaliados pelo teste de campo aberto, demonstrando a segurança do tratamento proposto.

Quanto aos níveis das citocinas, não houve alteração no córtex dos animais. No entanto, no hipocampo, os níveis de IL-1 β diminuíram nos grupos tratados com DEXA (1 mg/Kg e 4 mg/Kg) e diazepam quando comparados ao grupo salina. Também houve redução de TNF-alfa nessa estrutura no grupo que recebeu DEXA 4 mg/Kg em comparação com o grupo salina, DEXA 1 mg/Kg e DEXA 2 mg/Kg e um aumento significativo no grupo DEXA 1 mg/Kg em relação ao grupo salina. A diferença entre os níveis de TNF-alfa nas estruturas do sistema nervoso central estudadas sugere que vias neuroinflamatórias específicas são ativadas de maneira tempo e dose dependente, com papéis distintos na epileptogênese.

Finalmente, no soro, verificou-se uma diminuição nos níveis de TNF-alfa nos animais tratados com DEXA 4 mg/Kg em comparação ao grupo salina.

Desta forma, o tratamento com DEXA foi responsável pela diminuição da intensidade das crises epiléticas, no modelo utilizado. Além disso, observou-se a diminuição dos níveis de algumas das citocinas pró-inflamatórias avaliadas. Em suma, estes resultados sugerem o potencial efeito benéfico do uso da DEXA no tratamento da epilepsia, embora novos estudos sejam necessários para melhor compreensão dos efeitos observados.

Palavras-chave: Epilepsia, Pentilenotetrazol, Dexametasona, *Kindling*

ABSTRACT

In this study, the anticonvulsant potential of the anti-inflammatory drug dexamethasone (DEXA) was evaluated in the pentylenetetrazole-induced (PTZ) kindling animal model. In this chronic model, the animals received daily treatments: saline (0.9% NaCl), dexamethasone (DEXA) 1mg, 2mg or 4mg / kg or diazepam (2mg / kg) for 14 days and every other day. PTZ (20 mg / kg). On the days they received PTZ, seizure intensity was classified according to Racine (1973). Animals were euthanized on the fifteenth day and serum, hippocampus and cortex were collected for interleukin 1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) cytokines by ELISA.

DEXA-treated animals in the PTZ-induced seizure model at all concentrations had reduced seizure intensity according to the Racine scale when compared to the saline-treated group. There was no significant difference between DEXA-treated and diazepam-treated animals, indicating that the anti-inflammatory drug was effective as an anticonvulsant agent. Moreover, DEXA treatment did not alter the locomotor and exploratory capacity of the animals evaluated by the open field test, demonstrating the safety of the proposed treatment.

Regarding cytokine levels, there was no change in the cortex of the animals. However, in the hippocampus, IL-1 β levels decreased in the DEXA (1 mg / kg and 4 mg / kg) and diazepam treated groups compared to the saline group. There was also a reduction in TNF-alpha in this structure in the group receiving DEXA 4 mg / kg compared to the saline, DEXA 1 mg / kg and DEXA 2 mg / kg groups and a significant increase in the DEXA 1 mg / kg group compared to saline group. The difference between TNF-alpha levels in the central nervous system structures studied suggests that specific neuroinflammatory pathways are activated in a time and dose dependent manner, with distinct roles in epileptogenesis. Finally, in serum, there was a decrease in TNF-alpha levels in the DEXA 4 mg / kg treated animals compared to the saline group.

Thus, treatment with DEXA was responsible for decreasing the intensity of seizures in the model used. In addition, there was a decrease in the levels of some of the evaluated proinflammatory cytokines. In sum, these results suggest the potential beneficial effect of using DEXA in the treatment of epilepsy, although further studies are needed to better understand the observed effects.

Keywords: Epilepsy, Pentylenetetrazole, Dexamethasone, Kindling

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação expandida dos tipos de crises da ILAE de 2017	19
Figura 2 - Cascata fisiopatológica de eventos que levam da inflamação à epilepsia.	20
Figura 3 - Citocinas analisadas em estudos clínicos com pacientes epiléticos.	22
Figura 4 - Introdução de novos fármacos anticonvulsivantes no mercado de 1853 a 2016.....	27
Figura 5 – Forma molecular da Dexametasona.	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais propriedades farmacocinéticas da dexametasona	29
---	----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Comparação entre estágios da escala de Racine e a classificação internacional das crises epiléticas.	26
--	----

LISTA DE ABREVIACOES

AEDs - farmacos antiepilépticos
AMPA - alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico
AVE - acidente vascular encefálico
BHE - barreira hematoencefálica
Cl⁻ - ions ion cloreto
COX - enzima ciclooxigenase
DEXA - dexametasona
EEG - eletroencefalograma
GABA - cido gama-amino butirico
GluN2B - Receptor ionotrópico de glutamato N2B
HMGB1 - proteina de alta mobilidade Box 1
IFN- γ - Interferon-gama
K⁺ - ions ion potássio
IL-1 - Interleucina 1
IL-10 - Interleucina 10
IL-1 β - interleucina 1 beta
IL-6 - Interleucina 6
ILEA - Liga Internacional Contra Epilepsia
NMDA - N-metil D-Aspartato
PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos
PTZ - pentilenotetrazol
SNC - sistema nervoso central
SNP- sistema nervoso periférico
TCE - traumatismo cranioencefálico
TNF-alfa - fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Sistema nervoso e doenças neurológicas	17
1.2 Epilepsia.....	17
1.2.1 Fisiopatologia da epilepsia e classificação das crises epiléticas.....	18
1.2.2 Influencia da inflamação no processo epileptogênico.....	20
1.2.3 Mediadores inflamatórios	22
1.2.3.1 Fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa)	23
1.2.3.2 Interleucina 1 beta (IL-1 β).....	24
1.2.3.3 Interleucina 6 (IL-6).....	24
1.2.4 Pesquisas clínicas e com modelos animais.....	25
1.2.4.1 Modelo animal de Kindling induzido por Pentilenotetrazol	25
1.2.5 Tratamento da epilepsia e das crises epiléticas.....	27
1.2.5.1 Novas abordagens Terapêuticas	28
1.3 Dexametasona	30
1.3.1 Molécula	30
1.3.2 Farmacodinâmica	31
1.3.3 Indicações	31
2. OBJETIVO.....	33
2.1 Objetivo geral.....	33
2.2 Objetivos específicos	33

3. ARTIGO ORIGINAL	34
4. DISCUSSÃO GERAL	42
5. CONCLUSÕES	46
6. REFERÊNCIAS.....	47
7. ANEXOS.....	51
7.1 Carta De Aprovação CEUA.....	51

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema nervoso e doenças neurológicas

O sistema nervoso consiste em duas divisões, o sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SNP). O SNC consiste no encéfalo (cérebro, cerebelo e tronco encefálico) e na medula espinhal. O SNP consiste em nervos e células nervosas que se situam fora do encéfalo e da medula espinhal. Apesar do aumento das pesquisas em neurociências, o funcionamento do encéfalo ainda é pouco conhecido e a fisiopatologia da maioria das doenças que o atingem é pouco clara. Entre os principais distúrbios do sistema nervoso destacam-se a doença de Alzheimer, autismo, paralisia cerebral, depressão, epilepsia, esclerose múltipla, doença de Parkinson, esquizofrenia, lesão espinhal e acidente vascular encefálico (AVE) (Bear; Connors; Paradiso, 2017).

Milhões de pessoas são afetadas por distúrbios neurológicos: mais de 50 milhões de pessoas têm epilepsia; cerca de 47 milhões são afetados pela demência. Além disso, com o aumento da expectativa de vida e o envelhecimento das populações tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento, provavelmente aumentará a prevalência de muitas condições físicas e mentais crônicas e progressivas, incluindo os distúrbios neurológicos (WHO, 2019).

1.2 Epilepsia

A epilepsia é a doença neurológica mais comum e afeta pessoas de todas as faixas etárias. Dos pacientes que utilizam adequadamente os fármacos anticonvulsivantes disponíveis, cerca de um terço não possuem uma boa resposta clínica, tendo crises epiléticas refratárias. Os indivíduos que possuem epilepsia sofrem grande discriminação da sociedade e de suas famílias, além de terem pouca qualidade de vida (WHO, 2019).

Segundo Fisher et al. (2014) a epilepsia é uma doença cerebral definida por quaisquer das seguintes condições: (1) Pelo menos duas crises não provocadas ocorrendo com intervalo superior a 24 horas; (2) Uma crise não provocada e uma probabilidade de recorrência igual ou

superior ao risco de recorrência geral após duas crises não provocadas nos próximos 10 anos; (3) Diagnóstico de uma síndrome epiléptica (Fisher *et al.*, 2017). Quanto às causas das crises epiléticas, as mais comuns são as de etiologia estrutural, genética, infecciosa, metabólica e imune (Scheffer *et al.*, 2017).

A epilepsia ocorre quando há um desequilíbrio entre a atividade excitatória e inibitória dentro de uma rede neuronal, com preponderância da atividade excitatória. A atividade inibitória reduzida predispõe as redes neurais a operar de forma excessiva, hipersíncrona e oscilatória, que, quando sustentada, desconfigura o processamento neuronal normal, sendo capaz de dessincronizar outras atividades neuronais. Deste modo, regiões encefálicas específicas são capazes de gerar convulsões espontâneas e recorrentes, tornando-se zonas de início e propagação de crises epiléticas (Roland *et al.*, 2019).

Estudos recentes apontam que 70 milhões de pessoas têm epilepsia em todo o mundo e quase 90% delas são encontradas em regiões em desenvolvimento (Singh; Trevick, 2016). No Brasil, poucos são os dados de prevalência a respeito da doença e não existe, até o momento, estudo de incidência. O estudo mais conhecido concluiu a prevalência de 19 casos a cada 1000 habitantes na cidade de São Paulo (Kanashiro, et al., 2006). Quanto a realidade local, o único estudo encontrado foi realizado por Fernandes, em 1992, que utilizou um instrumento populacional para detectar casos de epilepsia e encontrou uma taxa de prevalência de 16,5 casos a cada 1000 habitantes (Fernandez, 1992).

1.2.1 Fisiopatologia da epilepsia e classificação das crises epiléticas

Uma crise epilética é definida como “a ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas secundários à atividade neuronal cerebral anormal excessiva ou síncrona”, podendo ser originada de redes neocorticais, tálamo-corticais, límbicas ou do tronco encefálico (Fisher *et al.*, 2017). Uma crise epilética resulta de uma dessincronização transitória de neurônios no cérebro que perturba os padrões normais de comunicação neuronal e resulta em descargas

elétricas crescentes e decrescentes no eletroencefalograma (EEG). Esse distúrbio pode produzir vários sintomas e sinais que dependem do local de origem da crise e das conexões deste com os demais pontos do encéfalo. Presume-se, muitas vezes, que as convulsões se originam de um aumento dos estímulos excitatórios e de uma diminuição dos estímulos inibitórios. Esse modelo minimalista deve ser expandido para considerar a presença de redes neuronais dentro de uma estrutura (redes hipocâmpais ou neocorticais) ou como redes cortico-talâmicas e núcleos da base (Moshé *et al.*, 2015).

Segundo a ILEA, as crises epiléticas são divididas em crises de início focal, generalizadas, desconhecidas, com subcategorias de crises motoras, não motoras, com ou sem comprometimento da percepção para as crises de início focal. A classificação operacional expandida da ILAE (*International League Against Epilepsy*) de 2017 para os tipos de crises epiléticas encontra-se na Figura 1. Esta classificação é importante por várias razões: torna-se um instrumento prático de comunicação entre profissionais de saúde e pacientes; permite agrupar pacientes para tratamento; gera uma associação útil entre síndromes específicas ou etiologias; permite que pesquisadores direcionem seus estudos nos mecanismos de diferentes tipos de crises epiléticas e constrói um vocabulário comum para a descrição da doença pelos pacientes (Fisher *et al.*, 2017).



Figura 1. Classificação expandida dos tipos de crises da ILAE de 2017. Fonte: Adaptado de: Fisher *et al.*, 2017.

1.2.2 Influência da inflamação no processo epileptogênico

A inflamação, segundo Abbas e colaboradores (2015) é definida como uma reação complexa do tecido vascularizado a uma infecção, exposição a toxinas ou algum dano celular que envolve acúmulo extra vascular de proteínas plasmáticas e leucócitos. A inflamação aguda é desenvolvida principalmente pelo sistema imune inato, mas também ocorre a participação do sistema imune adaptativo neste processo. O processo inflamatório é considerado protetor no controle de infecções, promovendo reparação tecidual, mas pode causar danos ao organismo e aos tecidos (Abbas; Lichtman; Pillai, 2015).

Estudos clínicos e experimentais mostram a presença de células inflamatórias ativadas (microglia, astrócitos e leucócitos) e um aumento de moléculas pró-inflamatórias em várias formas de epilepsia resistentes ao tratamento farmacológico. Há também evidências de autoanticorpos séricos em algumas formas de epilepsia ou distúrbios convulsivos (Vezzani; Lang; Aronica, 2016). Outros estudos demonstram que a inflamação desempenha um papel

importante durante o processo epileptogênico (processo pelo qual um cérebro normal desenvolve epilepsia), ocorrendo redução do limiar convulsivo, neurodegeneração, neurogênese, plasticidade sináptica e desregulação da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE). Nos casos de traumatismo cranioencefálico (TCE), a neuroinflamação exerce função central. Vários mediadores inflamatórios, incluindo a interleucina 1 β (IL-1 β) e a proteína de alta mobilidade Box 1 (HMGB1), que exibem propriedades epileptogênicas e ictogênicas são ativados, ocorrendo aumento da permeabilidade da BHE. Estes processos desempenham um papel importante no desenvolvimento da epilepsia. Isto nos demonstra que o processo inflamatório pode ser causa ou consequência das crises epilépticas e da epilepsia (Gorter *et al.*, 2017) . Um esquema simplificado da influência da inflamação no processo epileptogênico e na epilepsia pode ser visualizado na Figura 2.

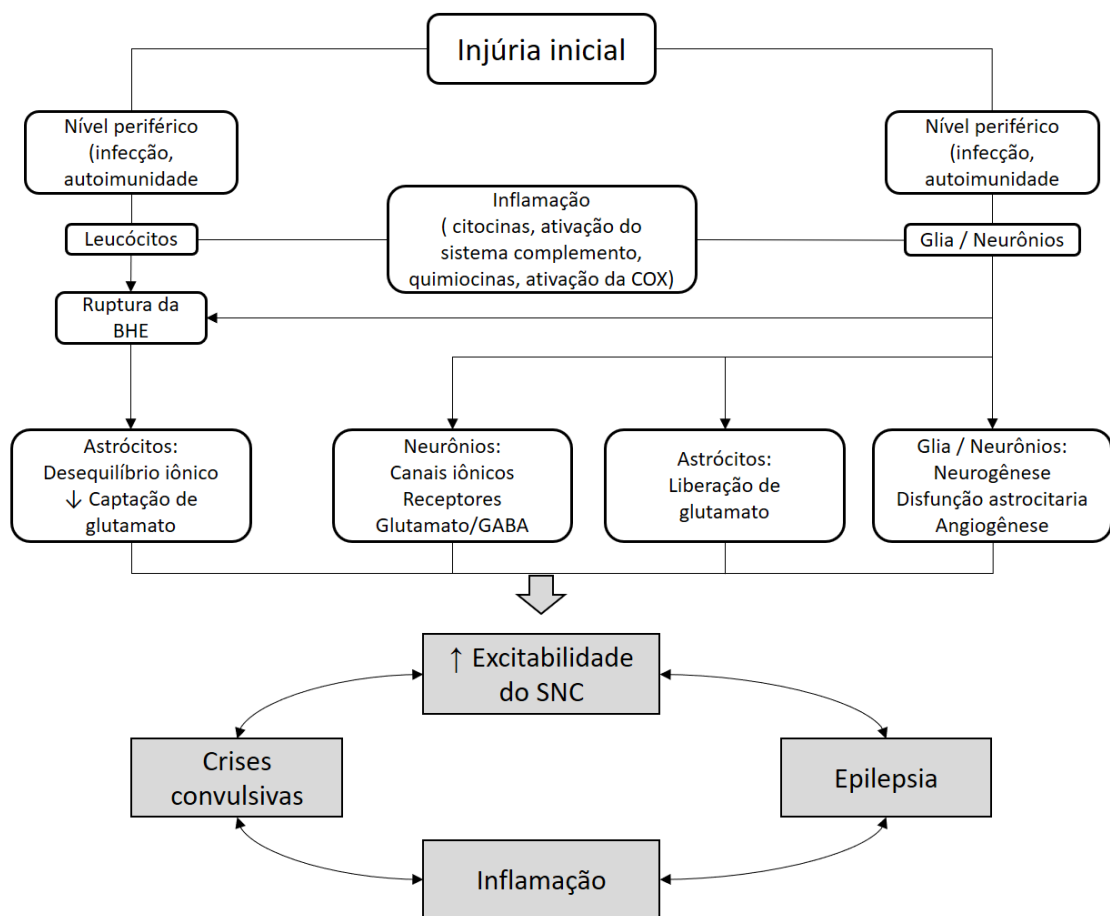


Figura 2. Cascata fisiopatológica de eventos que levam da inflamação à epilepsia. Vários insultos cerebrais como traumatismo craniano, acidente vascular cerebral, infecção, lesão perinatal, convulsões febris e crises epilépticas podem induzir inflamação no SNC, representando fatores de risco para o desenvolvimento da epilepsia. Esta evidência sugere que um evento epileptogênico, mesmo que subclínico, ocorrendo no nascimento ou durante a vida pode iniciar uma cascata de processos inflamatórios crônicos no SNC que contribuem para o aparecimento da epilepsia. BHE: barreira hematoencefálica; COX: enzima ciclooxigenase; GABA: Ácido gama-aminobutírico; SNC: sistema nervoso central. Fonte: Adaptado de Vezzani, 2014.

1.2.3 Mediadores inflamatórios

Entende-se por mediadores inflamatórios as substâncias liberadas em uma área tecidual lesada, por células ativadas do sistema imune, em resposta a uma agressão tecidual. Estas células englobam os mastócitos, basófilos, plaquetas, células da epiderme, linfócitos, macrófagos, entre outras.

Entre os mediadores inflamatórios mais estudados destacam-se: histamina (vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular); cininas (vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular); prostaglandinas (potencialização dos efeitos da histamina e cininas); tromboxanos (coagulante intravascular; mantenedor da normalidade intravascular); leucotrienos (quimiotaxia, agregação e desgranulação de leucócitos); fator de necrose tumoral (TNF-alfa, ativação da coagulação, estimulação da expressão de moléculas de adesão); Interleucina 1 (IL-1, associada à infecção aguda) e Interleucina 6 (IL-6, maturação e ativação de células inflamatórias). Todos os efeitos destes mediadores promovem a reparação tecidual e manutenção da homeostasia (Abbas; Lichtman; Pillai, 2015). Entretanto, sabe-se que o processo inflamatório e a produção de citocinas podem gerar alterações na excitabilidade da rede neuronal, predispondo à ocorrência de crises epilépticas (Klapal; Igelhorst; Dietzel-Meyer, 2016).

Como já citado anteriormente, a inflamação é parte importante no início e na manutenção da epilepsia, e esta ocorre a partir da liberação de mediadores inflamatórios. Muitos mediadores inflamatórios já foram analisados na epilepsia humana e em modelos animais. Em estudos clínicos, uma recente revisão sistemática e meta-análise verificou que um total de 51 diferentes mediadores inflamatórios já foram investigados. Os mediadores

mais estudados relacionados à inflamação são a IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ e TNF-alfa. Destes, a IL-1, IL-1 β e IL-6 estão elevados em grande parte das epilepsias humanas resistentes à terapia medicamentosa, principalmente no soro, líquido cefalorraquidiano e tecido cerebral. A Figura 3 traz em detalhes as diversas citocinas estudadas nas epilepsias humanas no soro, líquido cefalorraquidiano e tecido cerebral de pacientes (de Vries *et al.*, 2016).

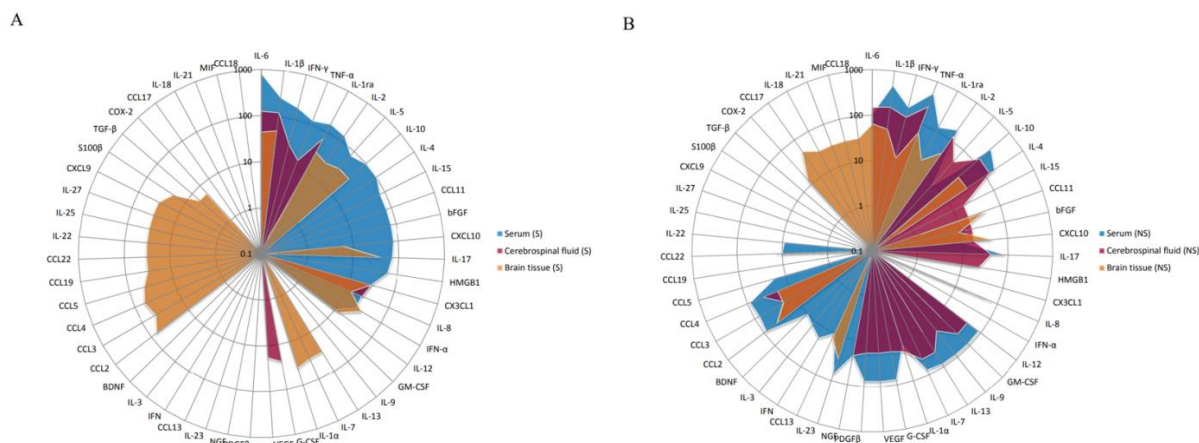


Figura 3. Citocinas analisadas em estudos clínicos com pacientes epiléticos. Gráficos de radar das citocinas incluídas, representadas separadamente para soro, líquido cefalorraquidiano e tecido cerebral (número total de estudos incluídos: 57). Cada eixo do gráfico de radar circular representa uma citocina. O eixo y representa o número de pacientes nos estudos. (A) Citocinas que foram significativamente diferentes entre pacientes com epilepsia e controles. (B) Citocinas que foram estudadas, mas não significativamente diferentes entre pacientes com epilepsia e controles. Fonte: Adaptada de Vries *et al.*, 2016.

1.2.3.1 Fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa)

O TNF-alfa é o mediador das respostas inflamatórias agudas a bactérias e outros micro-organismos infecciosos. Produzido por macrófagos, células dendríticas e outros tipos celulares (Abbas; Lichtman; Pillai, 2015), esta citocina regula os receptores de glutamato do tipo alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA), aumentando a transmissão glutamatérgica. Os receptores AMPA aumentados permitem a absorção excessiva de cálcio, causando neurotoxicidade. Essa citocina não apenas amplifica o número de receptores de glutamato, mas também induz a endocitose do receptor GABA, reduzindo o impulso inibitório e causando mudanças persistentes na excitabilidade celular (Rana; Musto, 2018).

Assim, o TNF-alfa tem propriedades neuromodulatórias ao promover rápidas mudanças na excitabilidade neuronal (Iori; Frigerio; Vezzani, 2016).

1.2.3.2 Interleucina 1 beta (IL-1 β)

A IL-1 β também é uma citocina mediadora das respostas inflamatórias agudas, com ações semelhantes ao TNF-alfa. É a principal forma biologicamente ativa da interleucina 1, sendo produzida por muitos tipos celulares como os neutrófilos, células epiteliais e células endoteliais (Abbas; Lichtman; Pillai, 2015). Esta citocina aumenta a liberação de glutamato de astrócitos e diminui a sua recaptação aumentando assim a disponibilidade desse neurotransmissor nas sinapses neuronais e promovendo hiperexcitabilidade neuronal. Tem sido sugerido que a IL-1 β induz convulsões através da supra-regulação de receptores NMDA em células pós-sinápticas através de uma ativação da subunidade GluN2B do receptor NMDA (Rana; Musto, 2018). Observou-se que concentrações elevadas de IL-1 β diminuem a neurotransmissão mediada pelo GABA levando à geração de crises epiléticas devido à hiperexcitabilidade (Roseti; *et al.*, 2015). O acúmulo desta citocina ocorre no tecido cerebral de animais durante o estado de mal-epilético, sendo este um evento que predispõe os animais a refratariedade ao uso de diazepam durante esta condição (Xu *et al.*, 2016).

1.2.3.3 Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6, outra importante citocina em respostas inflamatórias agudas, apresenta efeitos locais e sistêmicos incluindo a indução de síntese hepática de outros mediadores inflamatórios, estimulação da produção de neutrófilos e diferenciação de linfócitos T. É sintetizada por fagócitos monucleares, células endoteliais vasculares, fibroblastos e outras células em resposta a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), IL-1 e TNF (Abbas; Lichtman; Pillai, 2015). Os níveis de IL-6 encontram-se elevados em pacientes pediátricos com crises motoras generalizadas diárias, afetando o prognóstico da doença (Ishikawa *et al.*, 2015). Também foram observados níveis aumentados no soro de pacientes adultos com epilepsia do lobo temporal comparado a outros sem a doença (Uludag; *et al.*, 2015). Outro estudo encontrou aumento desta citocina no líquido cefalorraquidiano de cães

que apresentaram crises epiléticas de etiologia neoplásica, inflamatória ou idiopática, comparado com cães saudáveis. Além disso, também se observou aumento de TNF-alfa nesta estrutura (Merbl *et al.*, 2014).

1.2.4 Pesquisas clínicas e com modelos animais

O papel destes mediadores inflamatórios e do processo inflamatório como um todo na patogênese da epilepsia e na própria doença quando já estabelecida tem sido alvo de diversos estudos clínicos e em modelos animais. Dentre os modelos animais utilizados temos principalmente o uso de roedores (Grone; Baraban, 2015). A identificação de potenciais agentes terapêuticos para o tratamento da epilepsia requer o uso de modelos animais de crise epilética e de epilepsia. Com exceção de alguns tratamentos recentes, a atividade anticonvulsivante de todos os medicamentos usados clinicamente foi, em sua maior parte, definida por modelos de crise epilética aguda em roedores usando o eletrochoque e com a administração de substâncias pró-convulsivantes. Um destes modelos, amplamente utilizado e validado é o modelo de *kindling* (Löscher, 2017).

1.2.4.1 Modelo animal de Kindling induzido por Pentilenotetrazol

O modelo animal de *kindling* é um exemplo de modelo crônico de epilepsia descrito por Goddard em 1968. Repetidas estimulações (elétricas ou químicas) periódicas induzem repetidos picos de convulsões. Com várias estimulações, alguns efeitos ocorrem, culminando em uma diminuição do limiar para a ocorrência de crises epiléticas e, uma vez ocorrendo as convulsões generalizadas do tipo tônico-clônica, estas alterações podem persistir por anos (Funchal; Dani, 2014).

As convulsões comportamentais que acompanham o *kindling* seguem uma progressão previsível em roedores e são tipicamente mensuradas segundo a escala de Racine (1972). Esta escala é dividida em cinco estágios, sendo os dois primeiros referentes às crises iniciais focais, os estágios três e quatro, convulsões parciais com generalização secundária e, o último estágio, movimentos clônicos bilaterais acompanhados por perda do tônus postural (Racine, 1972). Segundo Sutula e Kotloski (2017) os escores da Escala de Racine podem ser

comparados às crises epiléticas em humanos segundo classificação da ILEA, como demonstrado no Quadro 1.

<u>Estágios das crises epiléticas</u>	<u>Classificação internacional</u>
Estágio I – Clonias da face e nariz	→ Focal
Estágio II – Mioclonias da cabeça	→ Focal
Estágio III – Clonias de membros superiores	→ Focal ou generalização secundária
Estágio IV – Clonias de membros inferiores	→ Generalização secundária
Estágio V – Elevação e queda	→ Generalização secundária
(Racine, 1972)	(Fisher et al., 2005)

Quadro 1. Comparação entre estágios da escala de Racine e a classificação internacional das crises epiléticas. À esquerda, estágios da Escala de Racine com respectivas alterações comportamentais. A direita, comparação entre os estágios da escala de Racine e a classificação internacional das crises epiléticas segundo Fisher et al. 2005. Fonte: Adaptado de Sutula e Kotloski, 2017.

Este modelo permite, de forma segura, mensurar a progressão do processo epileptogênico, se comparado com modelos crônicos mais rápidos, entretanto é um modelo trabalhoso e demorado de se desenvolver. Como supracitado, para o estabelecimento do *kindling*, pode-se utilizar de estimulação elétrica ou química. Dentre os agentes químicos mais utilizados neste processo tem-se o PTZ (Funchal; Dani, 2014).

Este composto, no princípio classificado como estimulante cardiovascular, apresenta atividade pró-convulsivante em camundongos, ratos, macacos e humanos. É solúvel em água, administrado por via subcutânea, endovenosa ou intraperitoneal (a mais utilizada). Baixas doses administradas repetidamente em ratos podem induzir o estado de mal-epilético. Este modelo é o que possui maior semelhança com a epilepsia tônico-clônica desencadeada em humanos (Funchal; Dani, 2014). As crises induzidas pela administração repetida de PTZ alteram a inibição mediada por GABA_A (este composto tem como principal ação o antagonismo do receptor GABA) e a excitação mediada por glutamato, o que pode contribuir para o aumento da suscetibilidade à crise epilética. A ligação do PTZ com o receptor GABA_A impede a ação deste receptor, conseqüentemente bloqueia o influxo de íons

íon cloreto (Cl⁻) e o efluxo de íons íon potássio (K⁺) do neurônio, assim ocorre o desequilíbrio no balanço excitação/inibição no SNC, resultando em hiperexcitabilidade dos neurônios e gerando as crises epilépticas (Kamokhina; Samokhin, 2018).

1.2.5 Tratamento da epilepsia e das crises epilépticas

O acometimento de indivíduos por crises epilépticas é citado desde a antiguidade. Ao longo destes anos, diversos métodos terapêuticos foram empregados na busca do controle dos episódios epilépticos. Rezas, poções, exorcismo, magia e outros tantos “tratamentos” já foram empregados, entretanto nenhum destes foi capaz de trazer a cura aos pacientes. Atualmente, os tratamentos farmacológicos e, em alguns casos específicos, o tratamento cirúrgico, são as abordagens terapêuticas mais eficientes no controle das crises epilépticas. O primeiro registro de uso de terapia farmacológica na epilepsia data o ano de 1857 em que se utilizou o brometo de potássio para tratar o que se chamava de epilepsia histérica (Shorvon; Perucca; Engel, 2015).

Desde 1989, 18 novos fármacos antiepilépticos (AEDs) foram licenciados para uso clínico e atualmente existem 27 AEDs licenciados para o tratamento de pacientes com epilepsia. Os mecanismos farmacológicos levam à modulação da neurotransmissão excitatória e inibitória, diminuindo a excitabilidade do SNC, diminuindo a predisposição do indivíduo às crises epilépticas. O tratamento com estes fármacos, seja como mono ou politerapia, evita com sucesso as convulsões em aproximadamente 70% dos pacientes com epilepsia. Portanto, há refratariedade ao tratamento farmacológico em um terço dos pacientes (Knezevic; Marzinke, 2018).

Os AEDs podem ser classificados em fármacos de primeira geração (fenobarbital, acetazolamida, trimetadiona, etossuximida, fenitoína, entre outros), fármacos de segunda geração (clordiazepóxido, sultiame, diazepam, carbamazepina, valproato, clonazepam e clobazam) e fármacos de terceira geração (progabida, vigabatrina, topiramato, lacosamida, everolimus, entre outros). O estudo com animais no *screening* de novos fármacos

anticonvulsivantes, em 1937, foi responsável pelo aumento das possibilidades terapêuticas na epilepsia. Outro marco no desenvolvimento dos AEDs foi o projeto de triagem de fármacos anticonvulsivantes (Anticonvulsant Screening Project - ASP), em 1975, pois após este período surgiram os fármacos de terceira geração no tratamento da epilepsia. Na Figura 4 temos uma linha do tempo mostrando o surgimento dos AEDs (Löscher; Schmidt, 2017).

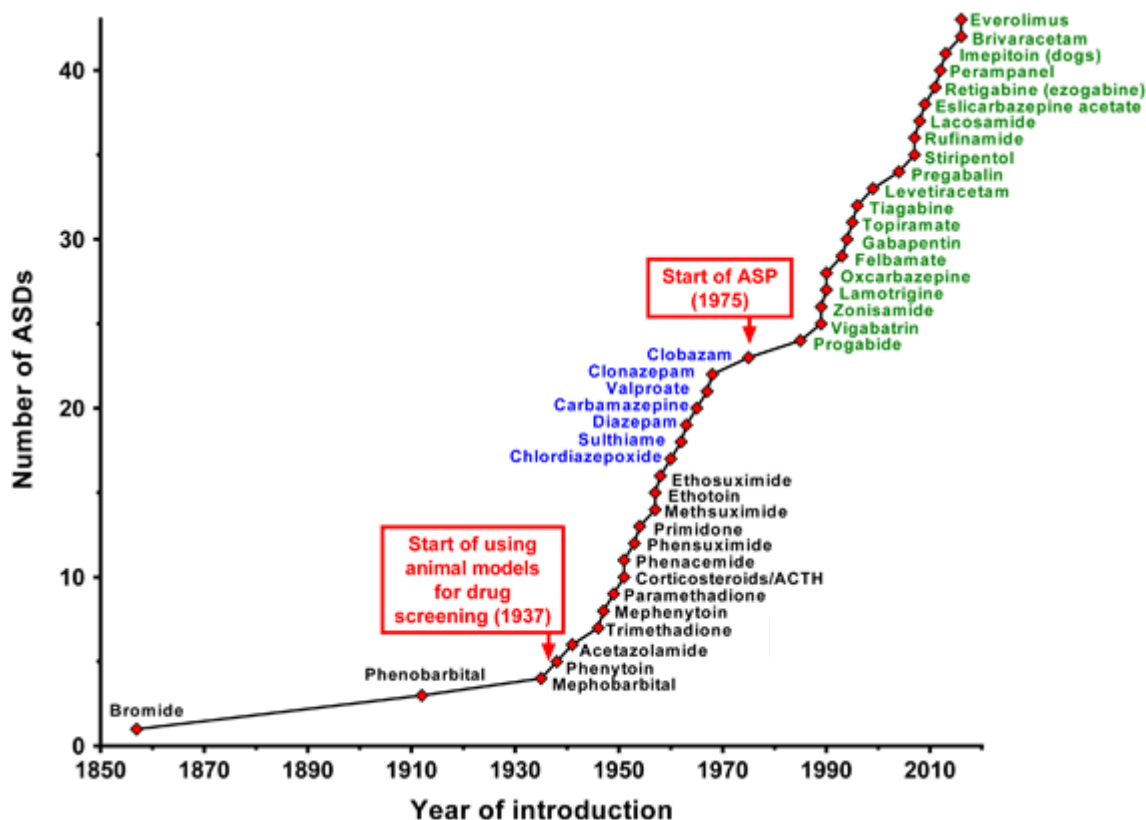


Figura 4. Introdução de novos fármacos anticonvulsivantes no mercado de 1853 a 2016. O licenciamento destes fármacos foi diferente entre os diversos países. Aqui, o ano do primeiro licenciamento ou a primeira menção de uso clínico. Fonte: Adaptado de Losher, Schmidt, 2017.

1.2.5.1 Novas abordagens Terapêuticas

As novas abordagens terapêuticas para o controle das crises epilêpticas em pacientes diagnosticados com epilepsia podem ser divididas em abordagens não farmacológicas e farmacológicas. Na primeira, o controle das crises epilêpticas é realizado a partir de tratamento não medicamentoso tendo como um dos exemplos a neuroestimulação. Esta técnica já tem sido utilizada há muitos anos nos casos de pacientes com epilepsia resistente a

medicamentos e que não são candidatos à cirurgia. A novidade é o local e o modo de tratamento: a forma clássica consiste na estimulação transcraniana do nervo vago, em que apenas 5% dos pacientes tornam-se livres das crises. As novas técnicas incluem estimulação transcutânea do nervo trigêmeo, além do nervo vago. Os resultados são encorajadores e ensaios clínicos estão sendo realizados. A utilização de estimulação magnética transcraniana como um possível tratamento coadjuvante nas epilepsias resistentes a terapia medicamentosa, é uma alternativa terapêutica ainda em estudo (Manford, 2017).

A segunda diz respeito ao uso de fármacos, anticonvulsivantes ou não, para a atenuação das crises epiléticas. A administração intramuscular de midazolam emergiu como o benzodiazepínico de escolha no tratamento extra-hospitalar do *status epilepticus* e uma alternativa válida em meio intra-hospitalar, mas faltam bons estudos clínicos que embasem este uso. Nos casos das encefalites límbicas, que possuem como importante sintoma clínico as crises epiléticas, o tratamento primário de escolha tem sido a imunoterapia, e não os anticonvulsivantes. Quanto aos novos fármacos anticonvulsivantes, o perampanel e a lacosamida são medicamentos promissores para o tratamento das crises tônico-clônicas generalizadas, especialmente em pacientes farmacorresistentes (Moshé; *et al.*, 2015).

Entre as novas abordagens terapêuticas, as vias inflamatórias têm ganhado destaque nas pesquisas pré-clínicas e clínicas. Esta nova abordagem, utilizando anti-inflamatórios para o tratamento da epilepsia, está fundamentada em recentes estudos que demonstram a influência da inflamação no processo epileptogênico. Os níveis de alguns mediadores inflamatórios como o TNF-alfa, IL-1, receptor do tipo Toll 4, ciclooxigenases, sistema complemento e quimiocinas, apresentam-se fora dos valores basais no soro e líquido cefalorraquidiano de pacientes, bem como em estruturas cerebrais de epilepsias humanas farmacorresistentes. Uma vez que estas vias estão envolvidas na ictogênese e na epileptogênese, fármacos e intervenções específicas, direcionadas a elas, podem diminuir as convulsões ou exibir efeitos anticonvulsivantes e de modificação da doença (Van Vliet et al., 2017).

1.3 Dexametasona

A DEXA é um anti-inflamatório do grupo dos glicocorticoides amplamente utilizado na clínica pelos seus potentes efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores. A dexametasona possui as mesmas ações e efeitos de outros glicocorticoides e encontra-se entre os mais ativos de sua classe (Katzung; Trevor, 2017).

1.3.1 Molécula

As principais características farmacocinéticas da dexametasona estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais propriedades farmacocinéticas da dexametasona.

Nome IUPAC (sistemática)	9-fluoro-11 β ,17,21-triidroxi- 16 α metilpregna-1,4-dieno-3,20-diona
Massa molar	392.464 g/mol
ponto de fusão	261°C
Biodisponibilidade	80–90%
Volume de distribuição	2 l/Kg.
Metabolismo	Principalmente hepático
Meia-vida plasmática	36–56 horas
Excreção	Principalmente renal
Meia-vida de eliminação da dexametasona	1,88 a 2,23 horas

Fonte: Katzung; Trevor, 2017; Medley, 2017

A dexametasona possui um total de 22 carbonos (C₂₂H₂₉FO₅). Sua fórmula molecular é representada na Figura 5 (Katzung; Trevor, 2017).

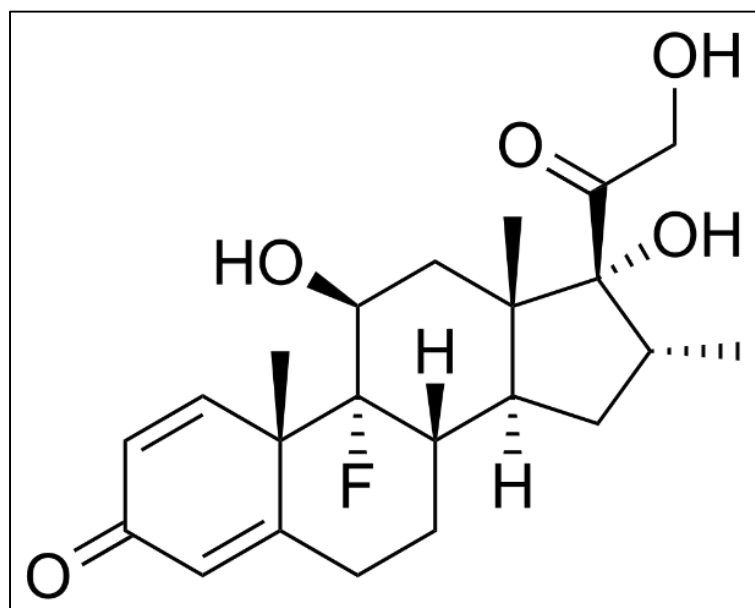


Figura 5. Forma molecular da Dexametasona. Fonte: Adaptado de Katzung; Trevor, 2017

1.3.2 Farmacodinâmica

Ocorre ligação com proteínas receptoras intracelulares específicas, gerando efeitos semelhantes ao cortisol. É um glicocorticoide considerado de ação longa, com potente atividade anti-inflamatória tanto a nível sistêmico (quando administrado na forma injetável ou oral) quanto a nível local (uso tópico). Não ocorre retenção de sal, sendo esta uma vantagem ao uso de mineralocorticoides (Katzung; Trevor, 2017).

A posologia é variada, dependendo da patologia e condições clínicas do paciente, variando de 0,75 a 15 mg por dia. Deve-se utilizar a menor dose capaz de promover o alívio dos sintomas, sem efeitos hormonais excessivos. Em situações agudas, pode-se utilizar altas doses, por um curto período de tempo (Katzung; Trevor, 2017).

1.3.3 Indicações

Este medicamento é destinado ao tratamento de condições nas quais os efeitos anti-inflamatórios e imunossuppressores dos corticosteroides são desejados, especialmente para tratamento intensivo durante períodos mais curtos. As principais indicações são: alergopatias (rinite alérgica sazonal ou perene, asma, dermatite de contato, reações hipersensibilidade a medicamentos); como terapia auxiliar na administração a curto prazo durante episódio agudo ou exacerbação de doenças reumáticas; processos alérgicos e inflamatórios graves, agudos e

crônicos envolvendo o globo ocular; insuficiência adrenocortical primária ou secundária; tratamento paliativo de leucemias e linfomas do adulto e leucemia aguda da infância; casos de edema cerebral de várias causas; para auxílio durante o período crítico de colite ulcerativa e doença de Crohn; entre outras indicações (Katzung; Trevor, 2017).

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do fármaco dexametasona (DEXA) no modelo animal de crise epiléptica crônico (*kindling*) induzido por PTZ.

2.2 Objetivos específicos

Investigar o efeito do fármaco DEXA sobre parâmetros comportamentais no modelo animal de crise epiléptica induzido por PTZ.

Investigar o efeito do fármaco DEXA sobre os níveis de citocinas pró-inflamatórias no modelo animal de crise epiléptica induzido por PTZ.

3. ARTIGO ORIGINAL

Periódico:

Journal of Neuroimmunology

Data:

Recebido 30 de julho 2018, aceito em 5 outubro 2018

Título:

Effect of dexamethasone on seizures and inflammatory profile induced by Kindling Seizure Model

Autores:

Edson Fernando Müller Guzzo, Karina Rodrigues Lima, Carmen Regla Vargas, Adriana Simon Coitinho

DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.10.005>

Citação:

GUZZO, Edson Fernando Müller et al. Effect of dexamethasone on seizures and inflammatory profile induced by Kindling Seizure Model. **Journal of neuroimmunology**, v. 325, p. 92-98, 2018.



Effect of dexamethasone on seizures and inflammatory profile induced by Kindling Seizure Model

Edson Fernando Müller Guzzo^c, Karina Rodrigues Lima^d, Carmen Regla Vargas^{e,f,g,h},
Adriana Simon Coitinho^{a,b,c,*}

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

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

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

^d Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Estado do Rio grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^e Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Bioquímica, UFRGS, Rua Ramiro Barcelos, 2600, CEP 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^f Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

^g Serviço de Genética Médica, HCPA, Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

^h Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Medicina, UFRGS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Epilepsy
Inflammation
Dexamethasone

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of dexamethasone, on the severity of seizures and levels of pro-inflammatory interleukins in animals with kindling model induced by pentylenetetrazole (20 mg/kg) in alternated days for 15 days of treatment. The animals were divided into five groups: control group given saline, a group treated with diazepam (2 mg/kg) and groups treated with dexamethasone (1, 2 and 4 mg/kg). Open field test was conducted. The treatment with dexamethasone decreased the severity of seizures, also decreased TNF-alpha and Interleukin 1 beta levels in the hippocampus and TNF-alpha level in the serum.

1. Introduction

Epilepsy is one of the most common, often chronic, neurological disorders that affects up to 1% of the people worldwide. Treatments mostly aim to suppress seizures, while the underlying pathophysiological mechanisms are not targeted as these are incompletely understood. Understanding the process of epileptogenesis may lead to pathophysiology-driven drug development of, possibly, more effective treatment (de Vries et al., 2016). In order to enhance our understanding of the mechanisms of pharmacoresistance in epilepsy and thereby develop new strategies for more efficacious treatments, studies are necessary. Clinical and experimental data support the participation of inflammation in the epileptic process, suggesting that specific inflammatory pathways are chronically activated in epileptogenic brain areas. Immune reactions may play an important role in promoting increased neuronal excitability, thus decreasing the seizure threshold and promoting a chronic inflammatory state in the brain that is almost invariably associated with neuronal loss, reactive gliosis and activation of microglia (Lorigados Pedre et al., 2013).

It has also been suggested that inflammation can occur as a result of epilepsy, since animal models have also shown that seizure activity can induce neuroinflammation and that recurrent seizures maintain chronic inflammation, thereby perpetuating seizures. An increasing body of literature data suggests that inflammation, and neuroinflammation, are involved in the pathophysiology of particular forms of epilepsy and convulsive disorders (Lorigados Pedre et al., 2013; Vieira et al., 2016; Vitaliti et al., 2014; de Vries et al., 2016).

The role of inflammation in central nervous system disease etio-pathogenesis has already been widely investigated, and elevated serum inflammatory mediators have been found in many neurological disorders such as cerebral ischemia, multiple sclerosis, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, and traumatic brain injury (de Vries et al., 2016). Epilepsies of various etiologies not classically linked to immunological dysfunction can be associated with inflammation resulting from increased levels of inflammatory mediators in the brain. These mediators can be produced by glia, neurons, endothelial cells of the blood–brain barrier, and peripheral immune cells (Marchi et al., 2014; Vezzani et al., 2011).

Abbreviations: IL-1 β , interleukin-1 beta; IL-6, interleukin-6; TNF- α , tumor necrosis factor alpha; PTZ, pentylenetetrazole; DEX, dexamethasone

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

E-mail address: adriana.simon@ufrgs.br (A.S. Coitinho).

<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.10.005>

Received 30 July 2018; Received in revised form 4 October 2018; Accepted 5 October 2018

0165-5728/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

The use of dexamethasone (DEX) therapy in refractory epilepsy has been the subject of few studies. It has already been seen that oral dexamethasone should be an option for treatment of refractory continuous Epileptic encephalopathy with spike-and-wave during sleep (Chen et al., 2016). Another beneficial effect was seen in use the association of albendazole and dexamethasone in children with neurocysticercosis reducing the risk of subsequent recurrence of seizures (Araki et al., 2006). Promising results were seen in a retrospective assessment with pediatric patients who were treated with steroids for intractable epilepsy, thirteen patients received DEX and four had a reduction in the number of seizures without major adverse effects (Verhelst et al., 2005).

The relationship between cytokine elevation and convulsive crises has received increasing attention in recent years. Interleukin-6 (IL-6) is an endogenous pyrogen that exerts multiple effects that are both beneficial and destructive to CNS cells. Under normal physiological conditions, IL-6 expression in the brain is low but levels are elevated in a large number of human CNS disorders, leading the increased central production of inflammatory cytokines. IL-6 can be induced by a variety of molecules including IL-1, tumor necrosis factor- α (TNF- α), transforming growth factor and prostaglandins. The relationship between cytokine elevation and convulsive crises has been described in several studies (Alapirtti et al., 2018; Gao et al., 2017; Lorigados Pedre et al., 2013; Uludag et al., 2015).

TNF- α is another inflammatory factor that is expressed and also upregulated after the seizures (Shimada et al., 2014). This cytokine affects seizure susceptibility in animal models, a progressive reduction of TNFR2 (mediates the neuroprotective actions) with a concomitant increase of TNFR1 (mediates the ictogenic effects) in forebrain neurons was reported in animal models of seizures, therefore shifting the balance towards the excitotoxic effects of this cytokine (Iori et al., 2016). Previous studies by this research group reported a reduction of TNF- α and interleukin-6 in the hippocampus of animals treated with diclofenac sodium, as well as a reduction in the intensity of seizures with this treatment (Vieira et al., 2016).

It has been reported that interleukin-1 beta (IL-1 β) is induced in glia and neurons in human epilepsy and in the related experimental models (Iori et al., 2016). IL-1 β upregulated in rodent brain following chemically and electrically induced seizures and the expression of IL-1 β in glial cells remained elevated for up to 60 days after experimental status epilepticus. It has been observed an overexpression of this interleukin in other epileptic diseases involving hippocampal sclerosis and focal cortical dysplasia (Vitaliti et al., 2014).

Specific anti-inflammatory drugs have shown significant therapeutic effects and a safe profile in proof-of-concept clinical studies (van Vliet et al., 2018). Therefore, the development of new *Antiepileptic Drugs* (AEDs) that can modulate seizures through another mechanism is required for refractory epilepsy treatment. Direct anti-inflammatory treatments have been reported to suppress some type of epileptic seizures that are resistant to conventional AEDs (Shimada et al., 2014). However, there are no studies investigating the role of DEX in the treatment of epilepsy.

DEX is a potent, long-term acting synthetic glucocorticoid drug that has anti-inflammatory and immunosuppressant properties. It is a synthetic corticosteroid and derivative of cortisol (hydrocortisone) and is also known as 1-dehydro-9 α -fluoro-16 α -methylhydrocortisone used for the treatment of many conditions, including skin diseases, rheumatic problems, allergies and asthma (Sauvage and Levy, 2013).

These findings show the relation between the inflammatory process and seizures, suggesting that the modulation of the inflammatory process may be a new therapeutic strategy for the control of the convulsive seizures in patients with refractory epilepsy. Therefore, the effect of the treatment was evaluated with the steroidal anti-inflammatory drug DEX on the intensity of seizures in animals who underwent the kindling model induced by pentylenetetrazole (PTZ). Also, the levels of proinflammatory interleukins IL-1 β , TNF- α and IL-6 were evaluated.

2. Material and methods

2.1. Experimental compound and vehicle

PTZ was purchased from Sigma-Aldrich Co. (Saint Louis, MO, USA), DEX was purchased from UCBVET (Ribeirão Preto, SP, Brazil), and diazepam was purchased from Teuto Brasileiro S.A (Anápolis, Goias, Brazil). PTZ, DEX, and diazepam were dissolved in saline. All drugs were administered by intraperitoneally (i.p.) injection.

2.2. Animals

Male, Wistars, from the central vivarium at Universidade Federal do Rio Grande do Sul at 8–9 weeks of age (250–300 g). The animals were immediately housed in polypropylene boxes that measured 41x34x16 cm, a maximum of 4 per cage, kept in a 12-h bright-dark environment at 23 \pm 1 °C. The animals had ad libitum access to palleted chow and water. The experiments were performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, DHEW Publication No. (NIH) 80-23 (1985) and approved by the local ethical committee at Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2.3. Experimental groups

The animals were divided into five experimental groups (10 animals in each group): positive control group (received diazepam at a 2 mg/kg dose), negative control group (received sodium chloride 0,9 g%), DEX 1 group (received DEX at a 1 mg/kg dose), DEX 2 group (they received DEX at a 2 mg/kg dose) and DEX 4 group (they received DEX at a 4 mg/kg dose). The animals received daily doses of intraperitoneal (i.p.) diazepam, DEX or sodium chloride 0,9 g% for 15 days.

2.4. Kindling model

The kindling model, which is considered a chronic model of epilepsy, was used. The animals of each group received the drug doses described in experimental groups (diazepam 2 mg/kg, sodium chloride 0,9 g/100 ml, DEX 1 mg/kg, DEX 2 mg/kg or DEX 4 mg/kg), for 15 days, and every other day they also received subconvulsants doses of PTZ intraperitoneally (20 mg/kg of body weight). The onset of kindling occurred on day 2 of the study, from the first administration of the PTZ, thus, the antiepileptogenic activity of the drugs tested was evaluated. PTZ was administered 30 min after the administration of the treatments and the animals were observed for 30 min assessing seizure severity using Racine's adapted scale (Vieira et al., 2016) (Fig. 1).

2.5. Behavior test

In the first day, after the treatments with the different drug doses, before the induction of kindling, the animal behavioral patterns were assessed, using the Open Field test. For the Open Field test, the rats were placed in an acrylic box whose lower part was divided by black lines in 12 same-sized quadrants, the rats were placed facing the box wall always in the same quadrant and were left to explore the box freely for five minutes.

The open field apparatus was a 40 cm \times 60 cm linoleum floor surrounded on three sides by a 60 cm-high plywood wall and in the front by a 60 cm-high glass wall. Crossings of the lines (locomotion and exploration), rearing responses (orienting-investigatory responses), grooming and fecal bolus (anxiety manifestation) were analyzed for each rat (Izquierdo, 1989). After each test, the floor was cleaned with water and ethanol (70%) to avoid a potential excitatory effect on locomotion produced by the presence of urine or fecal residues.

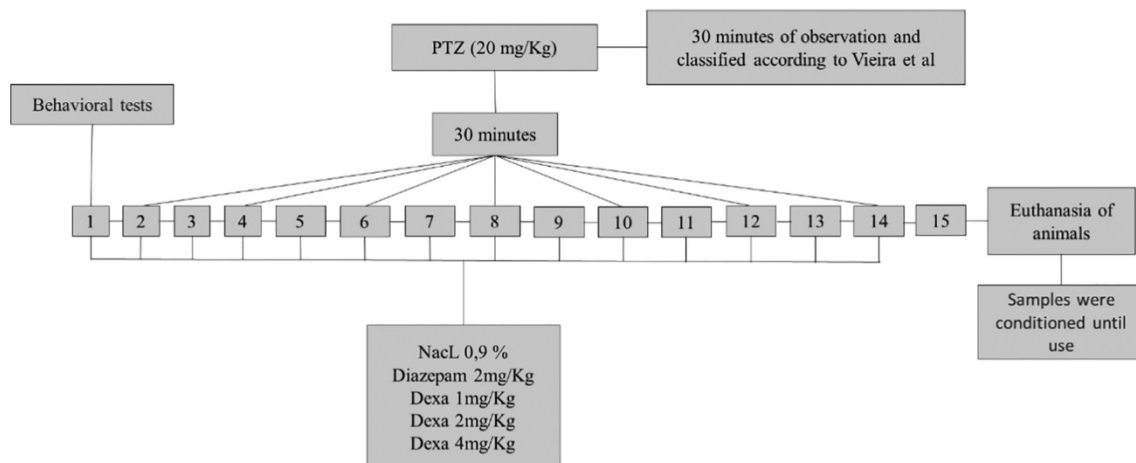


Fig. 1. Study timeline.

2.6. Brain microdissection and tissue preparation

At the end of the study (one day after the last drug dose injected), the animals were sacrificed by decapitation and the brains were immediately removed and kept on an ice-plate. Cerebral areas cortex and hippocampus were dissected and kept chilled until homogenization. The brain tissues were homogenized in 1:5 (w/v) saline solution (0.9% NaCl). The homogenate was centrifuged at $800 \times g$ for 10 min at $4^\circ C$, and the supernatant was used in the assays.

For the acquisition of serum, the whole blood was centrifuged at $1000 \times g$ for 5 min, and serum was immediately removed. Samples were stored at $-80^\circ C$ until further analysis.

2.7. Cytokines determination

The cytokines, TNF- α , IL-1 β and IL-6 were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) kits (Abcam, Cambridge, USA) in serum, hippocampus and cerebral cortex of the animals. The ELISA was based on detectable antigen-antibody reactions enzymes.

The enzyme used in these tests is a peroxidase, which catalyzes the unfolding reaction of hydrogen peroxide. An antigen adhered to a solid support (plaque ELISA) is prepared, the samples are placed in the search for antibodies against the antigen, if there are antibodies in the antigen-antibody binding, they are subsequently detected by the addition of a second antibody directed, which is bound to the peroxidase. This anti-IgG antibody, bound the enzyme, is called conjugate. The substrate is added and the holes where the antigen-antibody reaction happens have coloration, the intensity of the color is directly proportional to the concentration of cytokine in the sample, which is determined by comparison with a serial dilution of recombinant cytokine standard analyzed in parallel. All samples were run in duplicate. The readings were conducted in an ELISA reader (Biochrom Anthos Zenyth 200rt) at 450 nm. Concentration was calculated using standard curve from different concentrations of recombinant cytokine, as per the manufacturer's specifications. The results were expressed as pg/mL for serum and pg/mg of protein for brain tissues (hippocampus and cerebral cortex).

2.8. Protein determination

Protein concentration was determined in cerebral cortex and hippocampus supernatants by the method of Lowry et al (Lowry et al., 1951) using bovine serum albumin as standard.

2.9. Statistical analysis

Data were presented as standard mean and error or median. After defining the subgroups, statistical analysis was conducted using the Analysis of Variance (ANOVA) for repeated measures or One-way Analysis of Variance (ANOVA), followed by the Turkey or Dunnet test for parametric data. Results showing $p < .05$ were considered statistically significant. All statistical analysis was conducted using a database which was set based on the SPSS statistical package, version 13.0.

3. Results

Results obtained from Open Field task (crossing, rearing, grooming and number of stools) were not significantly different between the groups ($p > .05$; one-way analysis of variance) (Fig. 2).

Fig. 3 shows that the saline group evolved to the higher Racine's scale scores since the first PTZ administration. The intensity of seizures was reduced in the group of animals treated with DEX (1, 2 and 4 mg/Kg) and diazepam (2 mg/kg) when compared to the saline group (negative control for anticonvulsant effect) ($*p < .05$; one-way analysis of variance, post hoc Tukey). The intensity of seizures was not different between the animals treated with DEX and those treated with diazepam ($p > .05$).

Fig. 3 also demonstrates that none of the animals who received diazepam or DEX, regardless of dose, evolved to the level 4 of the Racine's scale. Besides, all doses of DEX presented a decrease in the evolution of the seizures after the first day of PTZ administration.

Fig. 4 shows that there was a statistically significant decrease in TNF- α levels in the hippocampus of the animals treated with DEX 4 compared to the saline group ($p = .05$; one-way analysis of variance, post hoc Dunnett) and also a significant decrease in the DEX 4 group compared to the DEX 1 and DEX 2 groups ($p = .00$ and $p = .04$ respectively; one-way analysis of variance, post hoc Tukey). We also observed an increase of TNF- α levels in DEX 1 group compared to the saline group ($p = .024$; one-way analysis of variance, post hoc Tukey). Regarding the TNF- α levels in the serum, we also observed that DEX4 group reduced the TNF- α levels compared to the saline group ($p = 0,05$ one-way analysis of variance, post hoc Dunnett). There was no statistical difference of TNF- α levels in the cortex of the animals ($p > .05$).

Regarding IL-1 β , there was a statistically significant decrease in the hippocampus of DEX (1 and 4 mg/kg) and diazepam treated animals compared to the saline group ($p = .003$ for DEX 1 and diazepam; $p = .001$ for DEX 4; one-way analysis of variance, post hoc Tukey). There was no statistically significant difference of this cytokine in the hippocampus of the DEX treated animals in the concentration of 2 mg/kg ($p > .05$). No statistically significant differences were observed in

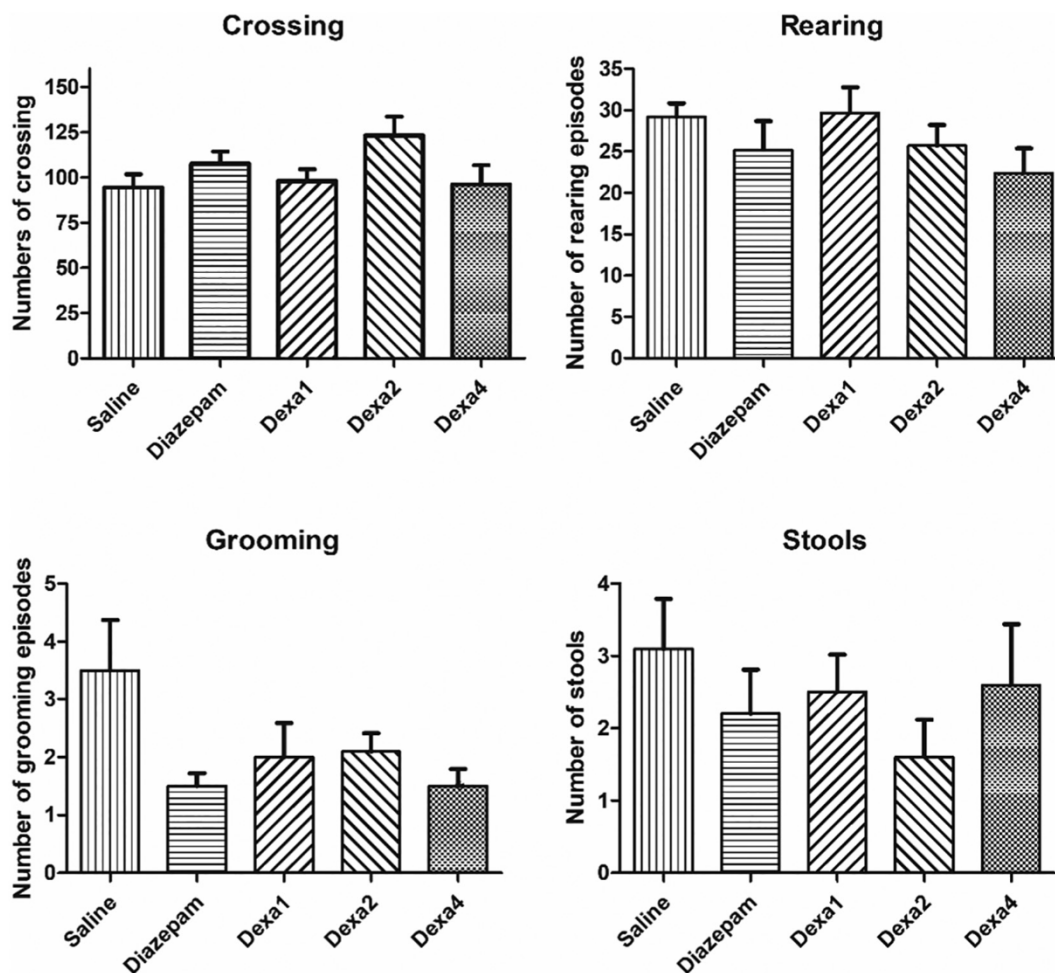


Fig. 2. Analysis of treatments on crossing (A), rearing (B), grooming (C) and number of stools (D) in open field task. Results are expressed as means \pm SD for ten animals in each group. Different from control, $p > .05$ (One-way Analysis of Variance).

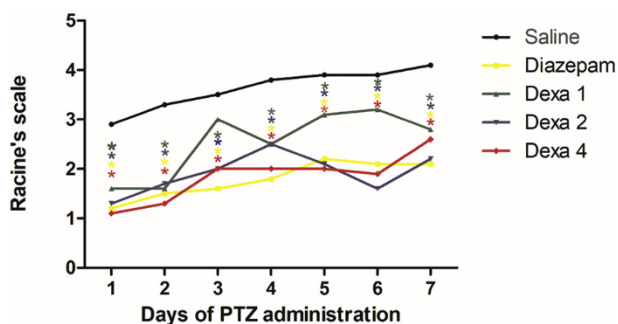


Fig. 3. Effect of DEX on the severity of seizures after PTZ administration in rats. Results are expressed as means for ten animals in each group. Different from control saline, $*p < .05$ (One-way Analysis of Variance, post hoc Tukey).

IL-1 β levels in the cortex of the tested groups ($p > .05$). Serum IL-1 β levels in the treated animals could not be detected (Fig. 5).

There were no differences between IL-6 levels in the structures (serum, hippocampus and cortex) assessed ($p > .05$) (Fig. 6).

4. Discussion

Accumulating evidence suggests the relationship between epileptogenesis and the presence of an inflammatory cytokines profile, being this approach a new alternative in the treatment of pharmaco-resistant epilepsies. Two distinct inflammatory processes have been

linked to seizures: Neuroinflammation is present in epileptic brain where it exacerbates seizures or increases their frequency. On the other hand, systemic inflammation can cause epileptiform neuronal discharge via loss of ionic and neurotransmitter homeostasis (Marchi et al., 2014). In this context, inflammatory cytokines such as interleukin IL-1 β , IL-6 and TNF- α received a great deal of attention (Vezzani, 2014; de Vries et al., 2016).

Considering that epilepsy is associated with an increased prevalence of mental health disorders compared with the general population, the first part of this study was to evaluate the effect of DEX on behavior parameters. Behavioral tests are important to ensure safety in the use of the proposed pharmacological treatments. Initially, we performed open field test and assessed the grooming, number of crossing, the frequency of rearing and number of the fecal bolus. The drug analyzed had no effect on these parameters indicating that the treatment was not able to alter motivation, locomotion, exploration capability or anxiety, respectively (Tellez-Zenteno et al., 2007; Walsh and Cummins, 1976).

AEDs are a major treatment consideration for patients with epilepsy, however, produce global changes in the excitation levels in the central nervous system and often lead to cognitive and behavioral deficits (Ortinski and Meador, 2004). Long-term glucocorticosteroid use may be associated with side effects, including osteoporosis, aseptic joint necrosis, adrenal insufficiency (Buchman, 2001). Despite these side effects inherent to drug therapy, we must consider that as seizure frequency increase patients have more impaired in quality of life (Leidy et al., 1999). The possibility of using other adjuvant therapy in cases of epilepsy refractory to conventional treatment should be considered.

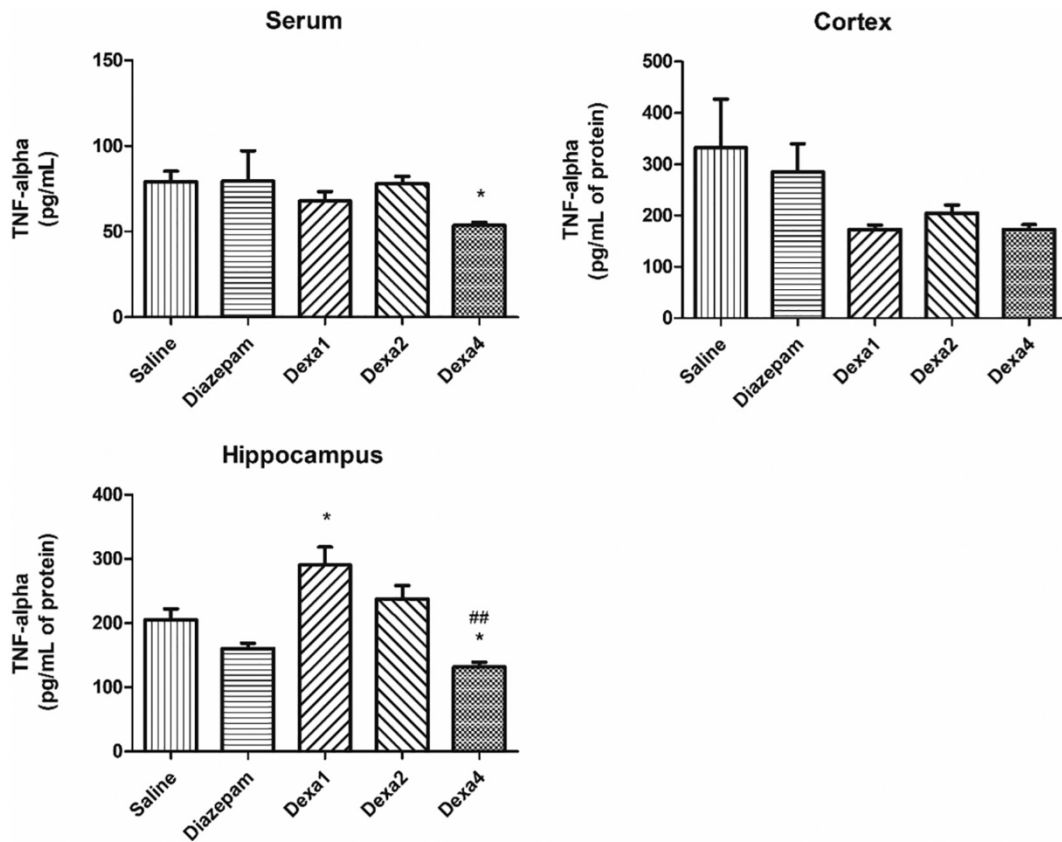


Fig. 4. Effect of DEX on serum (A), hippocampal (B) and cortex (C) TNF- α levels in rats after seizures induction. Results are expressed as means \pm SD for 6 animals in each group. Hippocampal and serum different compared to saline group, * $p < .05$ (One-way Analysis of Variance, post hoc Tukey or Dunnett). Hippocampal different compared to DEX1 and DEX2 groups (## $p < .001$ and $p < .05$ respectively; One-way analysis of variance, post hoc Tukey).

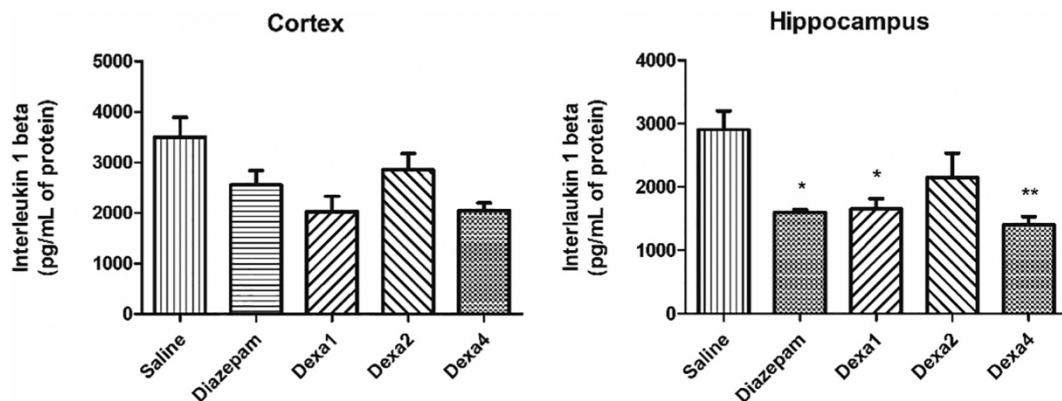


Fig. 5. Effect of DEX on cortex (A) and hippocampal (B) IL-1 β levels in rats after seizures induction. Results are expressed as means \pm SD for 6 animals in each group. Hippocampal different from saline, * $p < .05$ and ** $p < .01$ (One-way Analysis of Variance, post hoc Tukey).

Based on these observations, in the present study, we aimed to investigate the possible antiepileptic effects of three different doses of the anti-inflammatory drug DEX. So, we evaluated the effect of this drug on the severity of convulsive crises induced by PTZ. In the present study, animals treated with DEX at dosages of 1, 2 and 4 mg/kg presented a decrease in the severity of seizures, according to the Racine scale, when compared to the group treated with saline. Besides, there was no significant difference between the animals treated with DEX and those treated with diazepam, indicating that the anti-inflammatory drug was efficient as an antiepileptic agent. It is also important to note that none of the animals treated with diazepam or DEX progressed to the level 4 of Racine's scale. However, because animals were never tested in the absence of DEX or diazepam it is impossible to determine if the effects

presented in this work are due to acute anticonvulsant action or disease-modifying effects. One limitation of our study was that the EEG was not performed to better define the effects of dexamethasone, but we believe that this does not invalidate our data.

Other experimental studies have demonstrated the beneficial effects of DEX on the attenuation of the intensity of seizures (Al-Shorbagy et al., 2011; Borham et al., 2016; Marchi et al., 2011; Sewal et al., 2017) in chronic and acute treatments with dosages ranging from 1 to 20 mg/kg/day. These results are in line with clinical studies in which the use of DEX led to reduction or cessation of seizures and efficacy in cases of West syndrome and continuous slow-wave epilepsy (Chen et al., 2016; Haberlandt et al., 2010; Marchi et al., 2011)

Next, we evaluated the effect of DEX on the levels of pro-

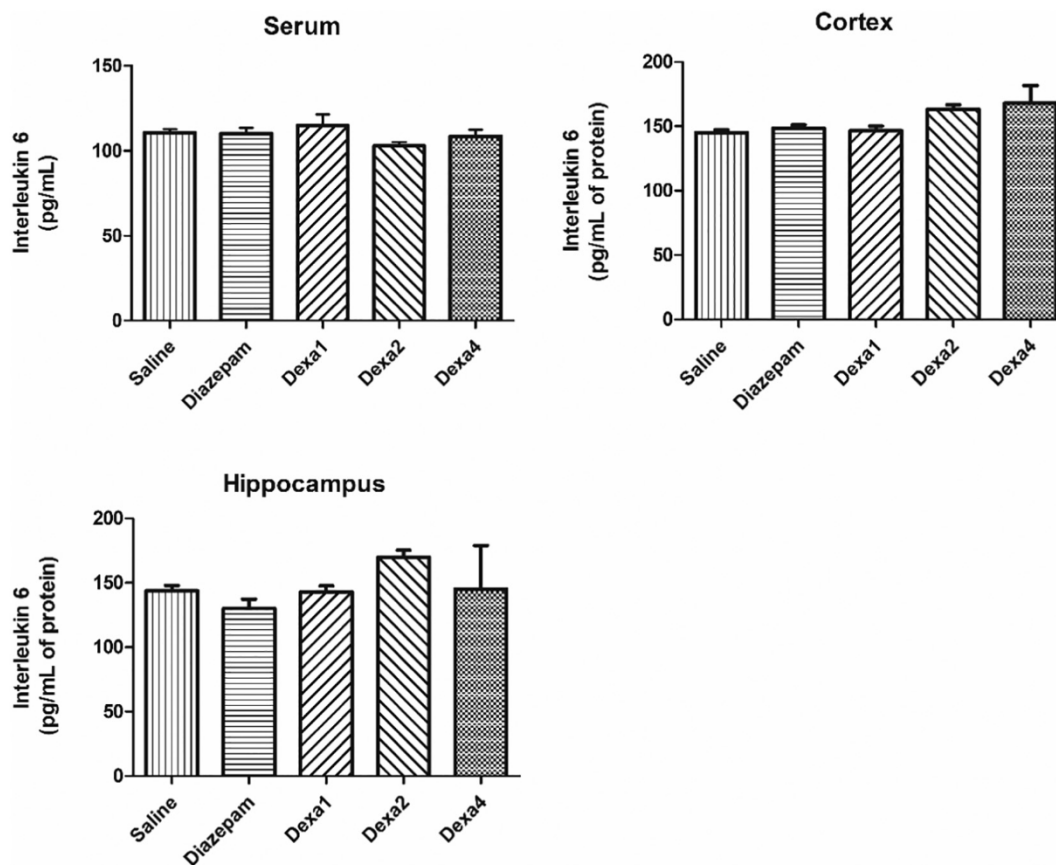


Fig. 6. Effect of DEX on serum (A), hippocampal (B) and cortex (C) IL-6 levels in rats after seizures induction. Results are expressed as means \pm SD for 6 animals in each group. Different from control, $p > .05$ (One-way Analysis of Variance, post hoc Tukey).

inflammatory cytokines namely IL-1 β , IL-6 and TNF- α in two structures of the central nervous system (cortex and hippocampus) and in the serum of rats after chronic epilepsy induction. In the cortex, the drug did not cause any effect on the cytokines evaluated. However, in the hippocampus, IL-1 β levels decreased in the groups treated with DEX (1 mg/kg and 4 mg/kg) and diazepam when compared to the saline group. We also found a reduced TNF- α level in this structure in DEXA 4 group compared to the saline, DEXA 1 and DEXA 2 groups and a significant increase in the DEXA 1 compared to the saline group. The difference between the TNF- α levels in the CNS structures studied suggest that specific neuroinflammatory pathways are activated in a manner, dose and time -dependent structure with distinct roles in epileptogenesis. Finally, in the serum, it was found a decrease in TNF- α levels in animals treated with DEX 4 mg/kg compared to the saline group.

The hippocampus is a trigger region in many cases of refractory epilepsy, especially in temporal lobe epilepsies. It was found, in one recent study of our laboratory, a decrease in the levels of pro-inflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) in the hippocampus of animals treated with diclofenac sodium combined with the reduction of the intensity of the convulsive crises (Vieira et al., 2016) Other drugs have demonstrated potent effects on the modulation of cytokine levels in the hippocampus, such as carbamazepine, vinpocetine and sertraline, which reduced levels of IL-1 β and TNF- α in this structure. Also using a DEX (the dosage of 2.25 mg/kg), it was found decreased levels of IL1 β and IL-6 in the brains in a Li-pilocarpine-induced animal model of epilepsy (Borham et al., 2016; Gómez et al., 2014; Schwartzkroin, 1994; Sitges et al., 2014)

Numerous cytokines, including TNF- α , may have effects on neuronal and glial function, leading to neurotoxicity. TNF superfamily (TNFSF) molecules play an important role in the activation,

proliferation, differentiation, and migration of immune cells into the CNS. Its receptor type1 (TNFR1 or p55) exerts pro-convulsive effects. The discovery that DEX reduces these cytokine level in hippocampus and serum associated to the reduced complexity of seizures may offer a significant therapeutic benefit to patients suffering from epilepsy, and the most effective dose was 4 mg/Kg (Dey et al., 2016; Sonar and Lal, 2015)

As mentioned above there was a reduction in serum TNF- α levels of the animals of group DEXA 4. It is known that many neurological disorders, including seizure, could be aggravated by peripheral inflammation. Peripheral inflammation could induce neuroinflammation via activation of microglia and production of pro-inflammatory cytokines, including IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the brain (Ho et al., 2015) The reduction of TNF- α in the serum of the animals may have influenced the reduction of neural inflammation observed, contributing to the decrease of the intensity of the seizures in the animals treated with DEX. These data support the idea that the release of inflammatory cytokines in the periphery leads to blood-brain barrier dysfunction, increasing the excitability of the central nervous system and predisposing to the onset of seizures and epilepsy itself (Marchi et al., 2012)

The treatment with DEX (1 mg/kg and 4 mg/kg) was able to decrease levels of IL-1 β in the hippocampus similarity to the effects seen on treatment with diazepam. Elevated expression of this cytokine has been reported in both glia and neurons in human epilepsy foci from pharmacoresistant of symptomatic epilepsies and experimental models of seizures and epilepsy (Dey et al., 2016) The capacity to modulate the levels of IL-1 β may suggest a possible benefit in using DEX in refractory epilepsies.

Other limitation of this approach is the inability to measure cytokine levels at different times. The cytokine levels refer to one day after the last drug dose injected. It is known that IL-1 β increase before

seizures and is related to damage in the blood-brain barrier (Marchi et al., 2009) We believe that IL-1 β was increased in the serum of the animals before seizures but did not remain elevated until the moment of our analysis.

Accumulating evidence advocates for a role of cerebrovascular dysfunction in central nervous system (CNS) diseases, negatively impacting neurovascular coupling and neurophysiology. The outer wall of the brain capillary endothelium is enclosed by pericytes and astrocyte end feet, anatomically assembled to guarantee barrier functions. Deconstruction and reactivity of pericytes and glial cells around the capillary endothelium occur in response to traumatic brain injury, epilepsy, and neurodegenerative disorders, impacting vascular permeability and participating in neuroinflammation. The inflammatory response accompanying CNS pathologies promotes an aberrant neurovascular remodeling, formation of scar tissue, and neuronal dysfunction (Giannoni et al., 2018).

Romero et al. (2003) have investigated the effect of dexamethasone on the paracellular permeability and expression of adherens and tight junctional proteins within an immortalised rat brain EC line, GPNT. This previously described cell line retains a variety of morphological and physiological characteristics of primary brain ECs. Under these conditions a decrease in paracellular permeability of GPNT monolayers was observed suggesting that dexamethasone may induce further differentiation of GPNT cells towards an improved BBB phenotype by maintaining intercellular junctions (Romero et al., 2003). Thus, dexamethasone improve cerebrovascular cell integrity could be a potential anti-inflammatory mechanism in case of seizure-induced BBB damage.

5. Conclusions

The treatment with DEX, in the PTZ induced kindling model, decreased the severity of seizures. There was a reduction of TNF- α levels in hippocampus and serum in the animals treated with DEX 4 mg/kg and a reduction of IL-1 β levels in the hippocampus in the animals treated with DEX 1 and 4 mg/kg. New studies are needed to investigate a new therapeutic approach in the treatment of epilepsy with this corticosteroid drug.

Conflict of interest

None.

Funding

This work was supported in part by grants from Pró-Reitoria de Pesquisa UFRGS.

References

Alapirtti, T., Lehtimäki, K., Nieminen, R., Mäkinen, R., Raitanen, J., Moilanen, E., et al., 2018. The production of IL-6 in acute epileptic seizure: a video-EEG study. *J. Neuroimmunol.* 316, 50–55 Mar 15.

Al-Shorbagy, M.Y., El Sayeh, B.M., Abdallah, D.M., 2011. Diverse effects of variant doses of dexamethasone in lithium–pilocarpine induced seizures in rats. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 90 (1), 13–21.

Araki, T., Otsubo, H., Makino, Y., Elliott, I., Iida, K., Ochi, A., et al., 2006. Efficacy of dexamethasone on cerebral swelling and seizures during subdural grid EEG recording in children. *Epilepsia* 47 (1), 176–180.

Borham, L.E., Mahfoz, A.M., Ibrahim, I.A., Shahzad, N., Alrefai, A.A., Labib, A.A., et al., 2016. The effect of some immunomodulatory and anti-inflammatory drugs on Li-pilocarpine-induced epileptic disorders in Wistar rats. *Brain Res.* 1648, 418–424.

Buchman, A.L., 2001. Side effects of corticosteroid therapy. *J. Clin. Gastroenterol.* 33 (4), 289–294.

Chen, J., Cai, F., Jiang, L., Hu, Y., Feng, C., 2016. A prospective study of dexamethasone therapy in refractory epileptic encephalopathy with continuous spike-and-wave during sleep. *Epilepsy Behav.* 55, 1–5.

de Vries, E.E., van den Munkhof, B., Brauns, K.P., van Royen-Kerkhof, A., de Jager, W., Jansen, F.E., 2016. Inflammatory mediators in human epilepsy: a systematic review and meta-analysis. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 63, 177–190.

Dey, A., Kang, X., Qiu, J., Du, Y., Jiang, J., 2016. Anti-inflammatory small molecules to

treat seizures and epilepsy: from bench to bedside. *Trends Pharmacol. Sci.* 37 (6), 463–484.

Gao, F., Gao, Y., Zhang, S.-J., Zhe, X., Meng, F.-L., Qian, H., et al., 2017. Alteration of plasma cytokines in patients with active epilepsy. *Acta Neurol. Scand.* 135 (6), 663–669.

Giannoni, P., Badaut, J., Dargazanli, C., De Maudave, A.F., Klement, W., Costalat, V., Marchi, N., 2018. The pericyte-glia interface at the blood-brain barrier. *Clin. Sci.* 132 (3), 361–374.

Gómez, C.D., Buijs, R.M., Sitges, M., 2014. The anti-seizure drugs vinpocetine and carbamazepine, but not valproic acid, reduce inflammatory IL-1 β and TNF- α expression in rat hippocampus. *J. Neurochem.* 130 (6), 770–779.

Haberlandt, E., Weger, C., Sigl, S.B., Rauchenzauner, M., Scholl-Bürgi, S., Rostásy, K., et al., 2010. Adrenocorticotropic hormone versus pulsatile dexamethasone in the treatment of infantile epilepsy syndromes. *Pediatr. Neurol.* 42 (1), 21–27.

Ho, Y.-H., Lin, Y.-T., Wu, C.-W.J., Chao, Y.-M., Chang, A.Y., Chan, J.Y., 2015. Peripheral inflammation increases seizure susceptibility via the induction of neuroinflammation and oxidative stress in the hippocampus. *J. Biomed. Sci.* 22 (1), 46.

Iori, V., Frigerio, F., Vezzani, A., 2016. Modulation of neuronal excitability by immune mediators in epilepsy. *Curr. Opin. Pharmacol.* 26, 118–123.

Izquierdo, I., 1989. Different forms of post-training memory processing. *Behav. Neural Biol.* 51 (2), 171–202.

Leidy, N.K., Elixhauser, A., Vickrey, B., Means, E., Willian, M., 1999. Seizure frequency and the health-related quality of life of adults with epilepsy. *Neurology* 53 (1), 162–166.

Lorigados Pedre, L., Morales Chacón, L.M., Orozco Suárez, S., Pavón Fuentes, N., Estupiñán Díaz, B., Serrano Sánchez, T., et al., 2013. Inflammatory mediators in epilepsy. *Curr. Pharm. Des.* 19 (38), 6766–6772.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 (1), 265–275.

Marchi, N., Fan, Q., Ghosh, C., Fazio, V., Bertolini, F., Betto, G., et al., 2009. Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* 33 (2), 171–181.

Marchi, N., Granata, T., Freri, E., Ciusani, E., Ragona, F., Puvenna, V., et al., 2011. Efficacy of anti-inflammatory therapy in a model of acute seizures and in a population of pediatric drug resistant epileptics. *PLoS One* 6 (3), e18200.

Marchi, N., Granata, T., Ghosh, C., Janigro, D., 2012. Blood-brain barrier dysfunction and epilepsy: pathophysiologic role and therapeutic approaches. *Epilepsia* 53 (11), 1877–1886.

Marchi, N., Granata, T., Janigro, D., 2014. Inflammatory pathways of seizure disorders. *Trends Neurosci.* 37 (2), 55–65.

Ortinski, P., Meador, K.J., 2004. Cognitive side effects of antiepileptic drugs. *Epilepsy Behav.* 5, 60–65.

Romero, I.A., Radewicz, K., Jubin, E., Michel, C.C., Greenwood, J., Couraud, P.O., Adamson, P., 2003. Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci. Lett.* 344 (2), 112–116.

Sauvage, A., Levy, M., 2013. Dexamethasone: Therapeutic Uses, Mechanism of Action and Potential Side Effects. Nova Science Publishers, Incorporated.

Schwartzkroin, P.A., 1994. Role of the hippocampus in epilepsy. *Hippocampus* 4 (3), 239–242.

Sewal, R.K., Modi, M., Saikia, U.N., Chakrabarti, A., Medhi, B., 2017. Increase in seizure susceptibility in sepsis like condition explained by spiking cytokines and altered adhesion molecules level with impaired blood brain barrier integrity in experimental model of rats treated with lipopolysaccharides. *Epilepsy Res.* 135, 176–186.

Shimada, T., Takemiya, T., Sugiura, H., Yamagata, K., 2014. Role of Inflammatory Mediators in the Pathogenesis of Epilepsy. *Mediat. Inflamm.* 2014, 8.

Sitges, M., Gómez, C.D., Aldana, B.I., 2014. Sertraline reduces IL-1 β and TNF- α mRNA expression and overcomes their rise induced by seizures in the rat hippocampus. *PLoS One* 9 (11), e111665.

Sonar, S., Lal, G., 2015. Role of tumor necrosis factor superfamily in neuroinflammation and autoimmunity. *Front. Immunol.* 6, 364.

Tellez-Zenteno, J.F., Patten, S.B., Jetté, N., Williams, J., Wiebe, S., 2007. Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis. *Epilepsia* 48 (12), 2336–2344.

Uludag, I.F., Duksal, T., Tiftikcioglu, B.I., Zorlu, Y., Ozkaya, F., Kirkali, G., 2015. IL-1 β , IL-6 and IL1Ra levels in temporal lobe epilepsy. *Seiz. Eur. J. Epilepsy* 26, 22–25.

van Vliet, E.A., Aronica, E., Vezzani, A., Ravizza, T., 2018 Feb. Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarker candidates in epilepsy: emerging evidence from preclinical and clinical studies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 44 (1), 91–111.

Verhelst, H., Boon, P., Buyse, G., Ceulemans, B., D'Hooghe, M., De Meirleir, L., et al., 2005. Steroids in intractable childhood epilepsy: clinical experience and review of the literature. *Seizure* 14 (6), 412–421.

Vezzani, A., 2014. Epilepsy and inflammation in the brain: overview and pathophysiology. *Epilepsy Curr.* 14 (s2), 3–7.

Vezzani, A., French, J., Bartfai, T., Baram, T.Z., 2011. The role of inflammation in epilepsy. *Nat. Rev. Neurol.* 7 (1), 31.

Vieira, V., Glassman, D., Marafon, P., Pereira, P., Gomez, R., Coitinho, A.S., 2016. Effect of diclofenac sodium on seizures and inflammatory profile induced by kindling seizure model. *Epilepsy Res.* 127, 107–113.

Vitaliti, G., Pavone, P., Mahmood, F., Nunnari, G., Falsaperla, R., 2014. Targeting inflammation as a therapeutic strategy for drug-resistant epilepsies: an update of new immune-modulating approaches. *Human Vaccines Immunother.* 10 (4), 868–875.

Walsh, R.N., Cummins, R.A., 1976. The open-field test: a critical review. *Psychol. Bull.* 83 (3), 482.

4. DISCUSSÃO GERAL

Neste estudo, o potencial anticonvulsivante e antiepileptogênico do fármaco DEXA foi avaliado no modelo animal de crise epiléptica induzido pelo PTZ. Os animais tratados com DEXA em todas as concentrações apresentaram redução da intensidade das crises epiléticas comparados ao grupo salina. Além disso, esta redução foi semelhante ao tratamento com diazepam, o fármaco controle com ação anticonvulsivante utilizado.

A relação entre a epileptogênese e o processo inflamatório já é amplamente conhecida: dois processos inflamatórios distintos foram associados à ocorrência de crises epiléticas, a neuroinflamação que exacerba as convulsões e aumenta sua frequência e a inflamação sistêmica, que pode causar descargas neuronais epileptiformes, através da perda da homeostase iônica e de neurotransmissores (Marchi; Granata; Janigro, 2014). Mesmo já se tendo estabelecida esta relação, a compreensão dos mecanismos que aproximam a inflamação e o processo epileptogênico continuam sendo o objeto de estudo de grande parte dos artigos sobre esta temática. Em estudo recente, foi possível constatar o importante efeito da DEXA na interrupção do ciclo vicioso descrito por Vezzani *et al.* (2014) onde o processo inflamatório gerado por crises epiléticas e seus mediadores inflamatórios predispõem ao surgimento de novas crises epiléticas. A dosagem utilizada por Ramos *et al.* (2019) foi semelhante à dose utilizada no presente estudo (Ramos *et al.*, 2019).

A primeira parte deste estudo consistiu na avaliação do efeito da DEXA nos parâmetros comportamentais, afim de garantir a segurança no uso dos tratamentos farmacológicos propostos. Realizou-se o teste de campo aberto onde se observou a latência para o início do deslocamento, o número de cruzamentos, atividade exploratória e o número de bolos fecais. A DEXA não apresentou efeito sobre esses parâmetros, indicando que o tratamento não foi capaz de alterar motivação, locomoção, capacidade de exploração ou ansiedade.

Após os testes comportamentais, investigaram-se os efeitos anticonvulsivantes de três doses diferentes da DEXA nas crises induzidas pelo PTZ. Os animais tratados com DEXA nas doses de 1, 2 e 4 mg/Kg apresentaram uma diminuição na severidade das crises, de acordo com a escala de Racine, quando comparados ao grupo tratado com solução salina. Além disso, não houve diferença significativa entre os animais tratados com DEXA e os tratados com diazepam, indicando que o medicamento anti-inflamatório foi eficiente como agente antiepilético. Também é importante observar que nenhum dos animais tratados com diazepam ou DEXA progrediu para o nível 4 da escala de Racine. Resultados benéficos no uso de DEXA em casos de síndrome de West já foram relatados em estudos (Chen *et al.*, 2016; Haberlandt *et al.*, 2010; Marchi *et al.*, 2011).

Em outro estudo utilizando DEXA, em casos de epilepsias refratárias a terapia anticonvulsivante habitual, quatro pacientes, um homem e três mulheres, com idade média de 60,7 anos (51-75), diagnosticados com epilepsia refratária de diferentes etiologias utilizaram este fármaco como coadjuvante no tratamento farmacológico já utilizado. As doses de DEXA utilizadas foram diferentes entre os pacientes: três pacientes utilizaram uma dose inicial de 10 mg/Kg e permaneceram utilizando de 4 a 5,2 mg a cada seis horas, um paciente iniciou com a dose de 4 mg a cada seis horas e manteve esta mesma posologia ao longo do estudo. A adição da DEXA à terapia farmacológica convencional foi responsável pela cessação das crises epiléticas de três a quatro dias após o início de seu uso, reforçando a estreita ligação entre as crises epiléticas e o processo inflamatório e o possível uso de anti-inflamatórios nos casos de epilepsias refratárias (Ramos *et al.*, 2019).

Em estudo, YANG *et al.* (2019) utilizaram o modelo animal de crise epilética induzido pela pilocarpina para avaliar o uso de DEXA (10 mg/Kg) no tratamento das crises epiléticas, além de avaliar a perda de neurônios do hipocampo e marcadores sinápticos. Neste trabalho, a duração das crises epiléticas foi reduzida com o uso de DEXA comparado ao grupo que não recebeu tratamento farmacológico, entretanto, não houve a interrupção das

crises epiléticas nos animais. Nos neurônios hipocampais, houve diminuição do dano à proteína F-actina (proteína formadora dos microfilamentos), atenuação da perda de células piramidais e menor dano a estruturas pré e pós-sinápticas. Estes resultados demonstraram a capacidade da DEXA em atuar na diminuição do dano cerebral provocado pelas crises epiléticas e pelo processo epileptogênico (Yang *et al.*, 2019). Deve-se levar em consideração que os modelos utilizados possuem grandes diferenças e, por muitas vezes, os resultados obtidos no modelo do PTZ não são replicados no modelo da pilocarpina, e o contrário também ocorre. No estudo de Yang *et al.* 2019 mesmo sem a suspensão das crises epiléticas, ocorreu a redução da duração das crises, além de importante efeito neuroprotetor. A diminuição da degeneração neuronal com o uso da DEXA aliado a redução do tempo de crise, além de ser importante evidencia da estreita ligação entre o processo inflamatório e crises epiléticas, demonstra o efeito desta medicação em um estudo clínico, sendo muito semelhante aos efeitos observados em modelos animais (Yang *et al.*, 2019).

Outra parte do presente estudo foi a avaliação do efeito da DEXA nos níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF-alfa em duas estruturas do sistema nervoso central (córtex e hipocampo) e no soro dos animais. No córtex, o medicamento não promoveu alteração nos níveis das citocinas avaliadas. No entanto, no hipocampo, os níveis de IL-1 β diminuíram nos grupos tratados com DEXA (1 mg/Kg e 4 mg/Kg) e diazepam quando comparados ao grupo salina. Também encontramos um nível reduzido de TNF-alfa, nessa estrutura, no grupo que recebeu DEXA 4 em comparação com os grupos salina, DEXA 1 e DEXA 2 e um aumento significativo no DEXA 1 em relação ao grupo salina. A diferença entre os níveis de TNF-alfa nas estruturas do SNC estudadas sugere que vias neuroinflamatórias específicas são ativadas de maneira tempo e dose dependente, com papéis distintos na epileptogênese. Finalmente, no soro, verificou-se uma diminuição nos níveis de TNF-alfa nos animais tratados com DEXA 4 mg/Kg em comparação ao grupo salina.

Evidências sugerem a ocorrência de disfunção cerebrovascular nas doenças que acometem o SNC. A parede externa do endotélio capilar cerebral é delimitada por pericitos e pés terminais de astrócitos, que garantem a função de barreira. Podem ocorrer lesões desta barreira em resposta à lesão cerebral traumática, epilepsia e distúrbios neurodegenerativos, afetando a permeabilidade vascular e potencializando a neuroinflamação. A resposta inflamatória que acompanha as patologias do SNC promove um remodelamento neurovascular aberrante, formação de tecido cicatricial e disfunção neuronal (Giannoni *et al.*, 2018). Romero *et al.* (2003) investigaram o efeito da DEXA na permeabilidade e expressão de proteínas aderentes e juncionais e constataram que seu uso é capaz de melhorar o fenótipo da BHE, mantendo junções intercelulares (Romero *et al.*, 2003). Assim, o mecanismo anti-inflamatório da DEXA, nos casos de crises epiléticas, é capaz de diminuir o dano a BHE e melhorar a integridade das células cerebrovasculares. Este pode ser um potencial mecanismo para os efeitos pré-clínicos e clínicos observados.

5. CONCLUSÕES

O tratamento com a dexametasona, no modelo de crise epilética induzido por PTZ, diminuiu a severidade das convulsões. Houve redução dos níveis de TNF-alfa no hipocampo e soro dos animais tratados com DEXA 4 mg /Kg e redução dos níveis de IL-1 β no hipocampo dos animais tratados com DEXA nas doses de 1 e 4mg /Kg.

A utilização de fármacos anti-inflamatórios na atenuação das crises epiléticas, em pacientes e em modelos animais, tem produzido importantes conhecimentos sobre a relação entre a epilepsia e o processo inflamatório. Entretanto, novos estudos são necessários para a elucidação deste processo fisiopatológico e possível utilização destas abordagens terapêuticas na clínica com segurança e eficácia garantidas.

6. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8ª Edição. Elsevier 2015.

BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017. 8582714335.

CHEN, J.; CAI, F.; JIANG, L.; HU, Y. *et al.* A prospective study of dexamethasone therapy in refractory epileptic encephalopathy with continuous spike-and-wave during sleep. **Epilepsy & Behavior**, 55, p. 1-5, 2016.

DE VRIES, E. E.; VAN DEN MUNCKHOF, B.; BRAUN, K. P.; VAN ROYEN-KERKHOF, A. *et al.* Inflammatory mediators in human epilepsy: a systematic review and meta-analysis. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, 63, p. 177-190, 2016.

FERNANDEZ, J. Prevalence of epilepsy: the Porto Alegre study. **Epilepsia**, 33, n. 3, p. 132, 1992.

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

FISHER, R. S.; CROSS, J. H.; FRENCH, J. A.; HIGURASHI, N. *et al.* Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, 58, n. 4, p. 522-530, 2017.

FUNCHAL, C.; DANI, C. **Neurociências: modelos experimentais em animais**. EDIPUCRS, 2014. 8539705532.

GIANNONI, P.; BADAUT, J.; DARGAZANLI, C.; DE MAUDAVE, A. F. H. *et al.* The pericyte–glia interface at the blood–brain barrier. **Clinical Science**, 132, n. 3, p. 361-374, 2018.

GORTER, J. A.; VAN VLIET, E. A.; ARONICA, E. Status epilepticus, blood–brain barrier disruption, inflammation, and epileptogenesis. **Epilepsy & Behavior**, 49, p. 13-16, 2015.

GRONE, B. P.; BARABAN, S. C. Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. **Nature neuroscience**, 18, n. 3, p. 339, 2015.

HABERLANDT, E.; WEGER, C.; SIGL, S. B.; RAUCHENZAUNER, M. *et al.* Adrenocorticotrophic hormone versus pulsatile dexamethasone in the treatment of infantile epilepsy syndromes. **Pediatric neurology**, 42, n. 1, p. 21-27, 2010.

IORI, V.; FRIGERIO, F.; VEZZANI, A. Modulation of neuronal excitability by immune mediators in epilepsy. **Current opinion in pharmacology**, 26, p. 118-123, 2016.

ISHIKAWA, N.; KOBAYASHI, Y.; FUJII, Y.; KOBAYASHI, M. Increased interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein levels in pediatric epilepsy patients with frequent, refractory generalized motor seizures. **Seizure**, 25, p. 136-140, 2015.

KANASHIRO, Ana Lucia Andrade Noronha et al. Epilepsia: prevalência, características epidemiológicas e lacuna de tratamento farmacológico. 2006.

KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Básica e Clínica-13**. McGraw Hill Brasil, 2017. 8580555973.

KLAPAL, L.; IGELHORST, B. A.; DIETZEL-MEYER, I. D. Changes in neuronal excitability by activated microglia: differential Na⁺ current upregulation in pyramid-shaped and bipolar neurons by TNF- α and IL-18. **Frontiers in neurology**, 7, p. 44, 2016.

KNEZEVIC, C. E.; MARZINKE, M. A. Clinical Use and Monitoring of Antiepileptic Drugs. **The Journal of Applied Laboratory Medicine**, p. jalm. 2017.023689, 2018.

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

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. **Epilepsia**, 52, n. 4, p. 657-678, 2011.

MANFORD, M. Recent advances in epilepsy. **Journal of Neurology**, 264, n. 8, p. 1811-1824, August 01 2017. journal article.

MARCHI, N.; GRANATA, T.; FRERI, E.; CIUSANI, E. *et al.* Efficacy of anti-inflammatory therapy in a model of acute seizures and in a population of pediatric drug resistant epileptics. **PLoS One**, 6, n. 3, p. e18200, 2011.

MARCHI, N.; GRANATA, T.; JANIGRO, D. Inflammatory pathways of seizure disorders. **Trends in neurosciences**, 37, n. 2, p. 55-65, 2014.

MARINO JR., R.; CUKIERT, A.; PINHO, E. Aspectos epidemiológicos da epilepsia em São Paulo: um estudo da prevalência. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, 44, p. 243-254, 1986.

MOSHÉ, S. L.; PERUCCA, E.; RYVLIN, P.; TOMSON, T. Epilepsy: new advances. **The Lancet**, 385, n. 9971, p. 884-898, 2015.

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

RAMOS, A. B.; CRUZ, R. A.; VILLEMARETTE-PITTMAN, N. R.; OLEJNICZAK, P. W. *et al.* Dexamethasone as Abortive Treatment for Refractory Seizures or Status Epilepticus in the Inpatient Setting. **Journal of investigative medicine high impact case reports**, 7, p. 2324709619848816, 2019.

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

ROMERO, I. A.; RADEWICZ, K.; JUBIN, E.; MICHEL, C. C. *et al.* Changes in cytoskeletal and tight junctional proteins correlate with decreased permeability induced by dexamethasone in cultured rat brain endothelial cells. **Neuroscience letters**, 344, n. 2, p. 112-116, 2003.

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

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

SCHARFMAN, H. E. The neurobiology of epilepsy. **Current neurology and neuroscience reports**, 7, n. 4, p. 348-354, 2007.

SHORVON, S.; PERUCCA, E.; ENGEL JR, J. **The treatment of epilepsy**. John Wiley & Sons, 2015. 1118936981.

TELLEZ-ZENTENO, J. F.; PATTEN, S. B.; JETTÉ, N.; WILLIAMS, J. *et al.* Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population based analysis. **Epilepsia**, 48, n. 12, p. 2336-2344, 2007.

ULUDAG, I. F.; DUKSAL, T.; TIFTIKCIOGLU, B. I.; ZORLU, Y. *et al.* IL-1 β , IL-6 and IL1Ra levels in temporal lobe epilepsy. **Seizure-European Journal of Epilepsy**, 26, p. 22-25, 2015.

VAN VLIET, E. A.; ARONICA, E.; VEZZANI, A.; RAVIZZA, T. Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarker candidates in epilepsy: emerging evidence from preclinical and clinical studies. **Neuropathology and applied neurobiology**, 2017.

VEZZANI, A. Epilepsy and inflammation in the brain: overview and pathophysiology. **Epilepsy currents**, 14, n. s2, p. 3-7, 2014.

VEZZANI, A.; LANG, B.; ARONICA, E. Immunity and inflammation in epilepsy. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, 6, n. 2, p. a022699, 2016.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The open-field test: a critical review. **Psychological bulletin**, 83, n. 3, p. 482, 1976.

WEBSTER, K. M.; SUN, M.; CRACK, P.; O'BRIEN, T. J. *et al.* Inflammation in epileptogenesis after traumatic brain injury. **Journal of neuroinflammation**, 14, n. 1, p. 10, 2017.


WHO, W. H. O. **Epilepsy**. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>. Acesso em: 22/08/2019.

XU, Z.-H.; WANG, Y.; TAO, A.-F.; YU, J. *et al.* Interleukin-1 receptor is a target for adjunctive control of diazepam-refractory status epilepticus in mice. **Neuroscience**, 328, p. 22-29, 2016.

YANG, N.; LI, Y.-C.; XIONG, T.-Q.; CHEN, L.-M. *et al.* Dexamethasone ameliorates the damage of hippocampal filamentous actin cytoskeleton but is not sufficient to cease epileptogenesis in pilocarpine induced epileptic mice. **Epilepsy research**, 154, p. 26-33, 2019.

7. ANEXOS

7.1 Carta De Aprovação CEUA

	UFRGS 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