

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

Túlio Cezar de Souza Bernardino

**Avaliação da expressão de moléculas envolvidas em
neuroinflamação e neuromodulação em *Wistar*
*Audiogenic Rats***

Belo Horizonte - MG

2016

Túlio Cezar de Souza Bernardino

Avaliação da expressão de moléculas envolvidas em neuroinflamação e neuromodulação em *Wistar Audiogenic Rats*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Helton José dos Reis

Co-orientador: Prof. Antônio Carlos Pinheiro Oliveira

Belo Horizonte – MG

2016

043 Bernardino, Túlio Cezar de Souza.

Avaliação da expressão de moléculas envolvidas em neuroinflamação e neuromodulação em Wistar Audiogenic Rats [manuscrito] / Túlio Cezar de Souza Bernardino. - 2016.

128 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Helton José dos Reis. Co-orientador: Prof. Antônio Carlos Pinheiro Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Convulsões - Teses. 2. Epilepsia. 3. Proteínas sensoras de cálcio neuronal. 4. Fosfoproteína 32 regulada por cAMP e dopamina. 5. Fator neurotrófico derivado do encéfalo. 6. Neurociências - Teses. I. Reis, Helton José dos. II. Oliveira, Antônio Carlos Pinheiro. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antônio e Neide, e à minha irmã Luane, pelo amor e apoio incondicional e infinito, por sempre me proporcionar uma base sólida para que pudesse alcançar meus objetivos, por incentivar meu desenvolvimento e por tantos outros motivos! Meu eterno agradecimento!

À Thiara, pelo companheirismo, parceria, carinho e sobretudo amor, mesmo diante dos momentos (frequentes) de ausência, se tornando indiscutivelmente essencial em minha vida. À sua família por me acolher com tanto carinho e amor e, por me incentivar a seguir este caminho!

À minha família, por representar a essência de tudo, por acreditar e torcer pelo meu sucesso sempre. Aos meus primos, pelo carinho e por representar uma bela irmandade. Agradeço em especial ao Daniel por ter sido um grande mentor e companheiro nessa e em outras jornadas.

Aos professores Helton e Antônio, pela oportunidade a mim confiada durante vários anos, pela grande amizade construída, pelos importantes ensinamentos, pela ajuda na tomada das decisões difíceis, por me proporcionar conviver em um ambiente tão rico e, obviamente, pelos inúmeros momentos de boas risadas.

Ao Fabricio e à Lu, pela agradável amizade, pelos momentos de discussão teórica e, principalmente, por aqueles “poucos” momentos de descontração na companhia da Dani e do Fred, na aconchegante sala do Helton.

À todos os professores que participaram de minha formação, por dedicar a transmitir todo tipo de conhecimento que contribuiu com meu saber e por aguçar minha curiosidade sobre os diversos temas.

Aos meus amigos, por vivenciar e contribuir para meu crescimento quanto pessoa e profissional. Ao Pedro, por ser um grande amigo, parceiro e colaborador nas diversas atividades que desempenhamos.

Aos membros do Neurofar, em especial à Aline, David e Natália, que estiveram comigo desde meu início em 2008, e à Flávia, Isabel e Paula, que estiveram presentes nos últimos anos, agradeço pelos bons momentos de aprendizado e de convivência muito prazerosa por tantos anos.

Ao NNC, pelo suporte técnico e por proporcionar a convivência com uma equipe que sempre esteve disposta a contribuir e a somar durante a execução de meu trabalho.

Aos funcionários da Neurociências, do departamento de Farmacologia, do ICB e aos técnicos dos laboratórios, agradeço pela organização proporcionando um ambiente para meu aprendizado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas neurais envolvidas na crise convulsiva audiogênica.....	24
Figura 2. Eventos inflamatórios envolvidos no contexto da epilepsia e convulsão....	36
Figura 3. Painel de atuação da NCS-1 em proteínas participantes de diversos processos neurais	39
Figura 4. Painel de atuação da DARPP-32 em proteínas participantes de diversos processos neurais	41
Figura 5. Desenho metodológico utilizado nos experimentos.	46
Figura 6: Níveis de TNF em diferentes regiões cerebrais após o estímulo audiogênico em WAR.....	51
Figura 7: Comparação entre os níveis de TNF em cada região estudada após o estímulo audiogênico em ratos Wistar não susceptíveis à convulsão audiogênica...52	
Figura 8: Comparação dos níveis de TNF entre os animais WAR e Wistar não susceptíveis em 30 minutos, 4 horas e 24 horas pós-estimulação.....	53
Figura 9: Níveis de TNF em córtex, hipocampo, colículo inferior e estriado 4 horas após o estímulo audiogênico.....	54
Figura 10: Comparação entre os níveis de IL-1 β em cada região estudada após o estímulo audiogênico em WAR..	55
Figura 11: Comparação entre os níveis de IL-1 β em cada região estudada após o estímulo audiogênico em ratos Wistar não susceptíveis à convulsão audiogênica...56	
Figura 12: Comparação dos níveis de IL-1 β entre os animais WAR e controles em 30 minutos, 4 horas e 24 horas pós-estimulação	57
Figura 13: Níveis de IL-1 β em córtex, hipocampo, colículo inferior e estriado 4 horas após o estímulo audiogênico.....	58
Figura 14: Comparação entre os níveis de IL-6 em cada região estudada após o estímulo audiogênico em WAR..	59
Figura 15: Comparação entre os níveis de IL-6 em cada região estudada após o estímulo audiogênico em ratos Wistar não susceptíveis à convulsão audiogênica...60	
Figura 16: Comparação dos níveis de IL-6 entre os animais WAR e controles em 30 minutos, 4 horas e 24 horas pós-estimulação.	61
Figura 17: Níveis de IL-6 em córtex, hipocampo, colículo inferior e estriado 4 horas após o estímulo audiogênico.....	62

Figura 18: Expressão de NCS-1 no cerebelo, córtex e hipocampo de ratos Wistar controles e de ratos WAR.	63
Figura 19: Expressão de DARPP-32 no cerebelo, córtex e hipocampo de ratos Wistar controles e de ratos WAR.	64
Figura 20: Comparação entre os níveis de BDNF em cada região estudada após o estímulo audiogênico em WAR.	65
Figura 21: Comparação entre os níveis de BDNF em cada região estudada após o estímulo audiogênico em ratos Wistar não susceptíveis à convulsão audiogênica...	66
Figura 22: Comparação dos níveis de BDNF entre os animais WAR e controles em 30 minutos, 4 horas e 24 horas pós-estimulação.	67
Figura 23: Níveis de BDNF em córtex, hipocampo, colículo inferior e estriado 4 horas após o estímulo audiogênico.....	68
Figura 24. Desenho esquemático representando os dois padrões de resposta desencadeados através da interação IL-1 β /IL-1R1.....	77

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Composição dos géis utilizados para <i>Western Blotting</i>	114 1140
Quadro 2: Classificação de gravidade das crises audiogênicas.....	45

LISTA DE SIGLAS

AKT: proteína quinase B

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico

AMPC: Adenosina monofosfato cíclico

APS: Persulfato de amônio

ATP: Adenosina trifosfato

BDNF: Fator neurotrófico derivado de cérebro

BSA: Albumina Sérica Bovina

CaMK: Proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina

Cav: canal iônico para íons Ca^{2+} sensível à voltagem

CDK5: *Cyclin-Dependent Kinase 5*

CREB: proteína de ligação do elemento de resposta ao AMP cíclico, representa um fator de transcrição

D1-5R: Receptores dopaminérgicos 1 a 5

DAG: Diacilglicerol

DARPP-32: Fosfoproteína de 32Kd regulada por dopamina e AMP cíclico

EAAT1-5: transportador de aminoácido excitatório 1 a 5, recaptadores glutamatérgicos

ECT: Eletroconvulsoterapia

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

EEG: Eletroencefalograma

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

ELT: Epilepsia do Lobo Temporal

ERK: Quinases Reguladas por Sinal Extracelular

GABA: Ácido Gama-Amino-Butírico

GEPR: *Genetically Epilepsy-Prone Rat*

GRK: *G-protein-coupled receptor kinase*

IL1R1: Receptor 1 para Interleucina 1

IL-1Ra: Antagonista do receptor IL-1R1

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IP₃: Inositol trifosfato

IS: Índice de gravidade

JAK: Janus Quinase
KA: receptor glutamatérgico do tipo kainato
LTD: Depressão Sináptica de Longo Prazo
LTP: Potenciação de Longa Duração
MAPK: Quinases de Proteína Quinase Ativadas por Mitógeno
mGluR: Receptor glutamatérgico metabotrópico
NCS-1: Proteína Neuronal sensora de Cálcio 1
NFkB: factor nuclear kappa B
NGF: Fator de crescimento neural
NMDA: N-metil-d-aspartato
NT-3: Neurotrofina 3
OPD: dihidroclorato de o-fenilenodiamina
p75NTR: receptor inespecífico para neurotrofina
PBS: *Phosphate-buffered saline*
PI3K: Fosfatidilinositol 3-Quinase
PKA: Proteína quinase A
PKC: Proteína quinase C
PLC: Fosfolipase C
PP-1: Proteína Fosfatase 1
PP-2B: Proteína Fosfatase 2B, calcineurina
PTZ: *Pentylentetrazol*
RAS: Proteína de sarcoma de rato; envolvida em diversas vias de sinalização intracelular
RNAm: ácido ribonucleico mensageiro
RSK: Quinase ribossomal S6, principal efetor da via de sinalização RAS-ERK
SDS: Dodecil sulfato de sódio
SE: *Status epilepticus*
SNC: Sistema Nervoso Central
STAT3: *Signal transducer and activator of transcription 3*
TBS: *Tris-buffered saline*
TEMED: Tetrametiletlenodiamina
TNF: Fator de Necrose Tumoral
Trk-B: Receptor de tropomiosina quinase B
WAR: *Wistar Audiogenic Rats*

LISTA DE SOLUÇÕES E REAGENTES

Géis para *Western Blotting*

GÉIS PARA <i>WESTERN BLOTTING</i>				
COMPOSIÇÃO	CONCENTRAÇÃO DO GEL			
	15 %	12 %	8 %	4 %
Acrilamida	4 mL	3,2 mL	2,13 mL	600 µL
Tris 8,8 (1,5 M)	2 mL	2 mL	2 mL	-
Tris 6,8 (0,5 M)	-	-	-	1,125 mL
SDS 10 %	80 µL	80 µL	80 µL	45 µL
H ₂ O	2 mL	2,8 mL	3,87 mL	1,230 mL
APS	80 µL	-	-	30 µL
TEMED	8 µL	-	-	3 µL

Quadro 1: Composição dos Géis utilizados para *Western Blotting*

SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA EXECUÇÃO DO PROTOCOLO DE *WESTERN BLOTTING*

TAMPÃO DE LISE

CONSTITUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO FINAL
NaCl	100 mM
SDS	1%
Triton X-100	2%
Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM
EDTA (pH 8,0)	1 mM

Ajustar para 100 mL de solução com H₂O destilada

TAMPÃO DE AMOSTRA PARA SDS-PAGE 6X

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
Tris-HCl 0,5 M	7 mL
Glicerol	3,6 mL
SDS	1,04 g
β -mercaptoetanol	600 μ L
Azul de bromofenol	1,2 mg

TAMPÃO DE CORRIDA (10X)

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
Tris	30,28 g
Glicina	144 g
SDS	5 g

Ajustar para 1 L de solução com H₂O destilada e pH para 8,3

TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA (10X)

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
Tris	30,2 g
Glicina	5,86 g

Ajustar para 1 L de solução com H₂O destilada e pH para 8,3

Para utilizar: diluir para 1x e acrescentar metanol para concentração de 10%
na solução final.

PONCEAU

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
Ponceau	0,5 g
Ácido acético	1 mL

Ajustar para 1 L de solução com H₂O destilada

TBS (10x)

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
TRIS Base	24,2 g
NaCl	80 g

Ajustar para 1 L de solução com H₂O destilada e pH para 7,6

TBS-T 0,5%

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
TBS 10x	100 mL
Tween 20	5 mL

Ajustar para 1 L de solução com H₂O destilada

TAMPÃO DE MILD STRIPPING

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
Glicina	15 g
SDS	1 g
Tween 20	10 ml

Ajustar para 1 L de solução com H₂O e pH para 2,2

SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA EXECUÇÃO DO PROTOCOLO DE ELISA

TAMPÃO DE EXTRAÇÃO DE CITOCINA

CONSTITUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO
NaCl	0,4 M
Tween 20	0,05 %
BSA	0,5 %
Fluoreto de fenilmetilsufonila	0,1 mM
Cloreto de benzetônio	0,1 mM

EDTA	10 mM
Aprotinina	20 UI

PBS

CONSTITUIÇÃO	CONCENTRAÇÃO FINAL
KH ₂ PO ₄	1,5mM
KCl	2,7mM
Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O	8,1 mM
NaCl	137mM

Ajustar para 1,5 L de solução com H₂O destilada e pH para 7,4

COATING BUFFER

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
NaHCO ₃	8,4 g
SDS	5,8 g

Ajustar para 1 L de solução com H₂O destilada e pH para 9,6

TAMPÃO DE LAVAGEM

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
PBS	1,0L
Tween 20	0,1%

TAMPÃO DE BLOQUEIO

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
PBS	20 mL
BSA	200 mg

DILUENTE DAS AMOSTRAS

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
PBS	40 mL
BSA	40 mg

TAMPÃO CITRATO

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
NaH ₂ PO ₄	13,41 g
Ácido Cítrico	5,19 g
Ajustar para 1 L com H ₂ O destilada e pH para 5,0	

SOLUÇÃO SUBSTRATO

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
Tampão Citrato	10 mL
OPD	4 mg
H ₂ O ₂ (30v/v)	3 µL

SOLUÇÃO STOP

CONSTITUIÇÃO	QUANTIDADE
H ₂ SO ₄	1 M

Sumário

RESUMO.....	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. REVISÃO DA LITERATURA: CONVULSÃO E EPILEPSIA	19
1.2. MODELOS ANIMAIS	23
1.3. EPILEPTOGÊNESE	26
1.3.1. O papel dos neurotransmissores na epileptogênese	26
1.3.2. O BDNF na epileptogênese	31
1.3.3. Ativação glial e neuroinflamação.....	34
1.4. PLASTICIDADE NEURONAL	37
1.4.1. Neuroplasticidade mediada por NCS-1	38
1.4.2. Neuroplasticidade mediada por DARPP-32.....	40
2. OBJETIVOS.....	43
2.1. GERAL.....	43
2.2. ESPECÍFICOS	43
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1. MATERIAL.....	44
3.1.1. Modelo animal: WAR.....	44
3.2. MÉTODOS.....	47
3.2.1. Western Blotting.....	47
3.2.2. ELISA.....	49
3.2.3. Análise estatística.....	50
4. RESULTADOS	51
4.1. AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS EM ANIMAIS WAR SUBMETIDOS A ESTÍMULOS AUDIOGÊNICOS	51
4.1.1. Avaliação da expressão de TNF	51
4.1.2. Avaliação da expressão de IL-1 β	55
4.1.3. Avaliação da expressão de IL-6.....	59
4.2. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE NCS-1 E DE DARPP-32	63
4.3. AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE BDNF	65
5. DISCUSSÃO.....	69
5.1. CITOCINAS INFLAMATÓRIAS	69
5.1.1. TNF.....	72
5.1.2. IL-1 β	76

5.1.3.	<i>IL-6</i>	83
5.2.	NCS-1 E DARPP-32.....	88
5.2.1.	<i>NCS-1</i>	88
5.2.2.	<i>DARPP-32</i>	92
5.3.	BDNF.....	95
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
7.	APÊNDICE	105
A.	CÓPIA DO ARTIGO PUBLICADO EM NEUROSCIENSE LETTERS.....	105
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

RESUMO

Convulsões e epilepsia são condições neurológicas frequentes na prática clínica. Os mecanismos neuronais que constituem os fenômenos de hiperexcitabilidade e de epileptogênese não são totalmente elucidados. É bem reconhecido a participação de neurotransmissores no fenômeno das convulsões, apesar disso, a participação das citocinas inflamatórias e dos fatores neurotróficos tem sido descrita há cerca de duas décadas.

Neste contexto, este estudo avaliou o efeito da convulsão audiogênica nos níveis de Interleucina 1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral (TNF), Interleucina 6 (IL-6) e fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) no Sistema Nervoso Central (SNC) dos ratos Wistar audiogênicos (WAR). Além disso, considerando que a epileptogênese representa um fenômeno de plasticidade neuronal que favorece a hiperexcitabilidade, avaliamos duas proteínas de neuromodulação envolvidas em duas vias de sinalização relevantes, a proteína neuronal sensor de cálcio 1 (NCS-1) e a fosfoproteína regulada por dopamina e AMPc de 32kD (DARPP-32). Os níveis de citocinas e de BDNF foram avaliados por ELISA e, os níveis de NCS-1 e DARPP-32 foram determinados por *Western Blotting*.

Após os estímulos audiogênicos, os animais WAR aumentaram a expressão de todas as proteínas estudadas. Os ratos WAR estimulados aumentaram a expressão de IL-1 β , TNF, IL-6 e BDNF no córtex comparado aos WAR não estimulados. Ratos WAR estimulados também aumentaram a expressão dessas citocinas e de BDNF em córtex cerebral, colículo inferior, hipocampo e estriado comparado aos Wistar não audiogênicos.

Os ratos WAR apresentam alteração da expressão das proteínas de neuromodulação estudadas após o evento convulsivo. NCS-1 e DARPP-32 encontravam-se em níveis elevados em hipocampo dos WAR e DARPP-32 encontrava-se diminuída em cerebelo dos WAR comparados aos ratos Wistar não audiogênicos.

A hiperexcitabilidade neuronal dos WAR pode estar associada à neuroinflamação e à neuroplasticidade mediada por BDNF, NCS-1 e DARPP-32. Mais estudos ainda são necessários para concatenar os mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas doenças associadas à epilepsia e convulsões. Ainda permanece incerto se a convulsão audiogênica dos WARs representa uma causa ou consequência do aumento dos níveis de expressão dessas proteínas.

Palavras Chave: Convulsão; Epilepsia; Citocinas; Proteínas Sensoras de Cálcio Neuronal; Fosfoproteína 32 Regulada por cAMP e Dopamina; Fator Neurotrófico Derivado do Encéfalo

ABSTRACT

Seizures and epilepsy are neurological disorders extremely frequent in clinical practice. Neuronal mechanisms that constitutes the hyperexcitability and epileptogenesis phenomenon are not totally elucidated. It's well known the participation of the neurotransmitters in the seizures occurrence, although, the participation of inflammatory cytokines and neurotrophic factors has been described only in the last two decades.

We evaluated the effect of audiogenic seizure on the levels of IL-1 β , TNF, IL-6 and BDNF in Central Nervous System in Wistar Audiogenic Rats (WAR). Moreover, considering that epileptogenesis represents a neuronal plasticity environment that favors hyperexcitability, we evaluate two neuromodulatory proteins related to relevant signaling pathways, named neuronal calcium sensor-1 (NCS-1) and dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein of molecular weight 32 kD (DARPP-32). Levels of cytokines and BDNF were measured by ELISA. NCS-1 and DARPP-32 levels were determined by *Western Blotting*.

After audiogenic seizure stimuli, WAR increased the expression of all studied proteins. Stimulated WAR increased expression of IL-1 β , TNF, IL-6 and BDNF at least in cerebral cortex compared to non-stimulated WAR. Stimulated WAR also increased expression of these cytokines and BDNF in cerebral cortex, inferior colliculus, hippocampus and striatum compared to stimulated non-audiogenic Wistar.

Also, NCS-1 and DARPP-32 were increased in the hippocampus of WAR and DARPP-32 was decreased in the cerebellum of WAR compared to Wistar non-audiogenic.

In conclusion, our study demonstrated that WAR neuronal hyperexcitability can be associated to neuroinflammation and neuronal plasticity mediated by BDNF, NCS-1 and DARPP-32. More research in order to concatenate the physiopathology mechanisms involved in convulsion and epilepsy related diseases are still needed. It remains unclear if WAR audiogenic seizure represents a cause or a consequence of increasing expression levels of these proteins.

KEYWORDS: Seizure; Epilepsy; cytokines; Neuronal Calcium-Sensor Proteins; Dopamine and cAMP-Regulated Phosphoprotein 32; Brain-Derived Neurotrophic Factor.

1. Introdução

1.1. Revisão da literatura: convulsão e epilepsia

Convulsão pode ser definida como a apresentação de sinais ou sintomas focais ou generalizados transitórios devido a uma atividade anormalmente excessiva ou sincrônica dos neurônios cerebrais (FISHER et al., 2014).

Quando as convulsões são focais, as atividades neurais anormais originam-se e limitam-se a apenas um hemisfério cerebral. Por outro lado, as crises convulsivas generalizadas afetam uma ampla rede neuronal em ambos hemisférios cerebrais, resultando em manifestação consistente de envolvimento bilateral (Spencer, 2007).

As convulsões podem estar presentes em diversas condições clínicas, inclusive naquelas em que o evento neural apenas é uma consequência de eventos sistêmicos proconvulsivos sem que haja um substrato neural proconvulsivo previamente estabelecido para deflagrar o processo.

Algumas situações de insulto agudo cerebral podem evoluir com um ou mais eventos convulsivos sem que isso represente uma tendência do paciente em recorrer cronicamente (WIEBE, 2012). Nesse contexto podem ser citados os eventos convulsivos desencadeados por traumas, distúrbios metabólicos, intoxicação, e em situações cuja resposta inflamatória sistêmica aguda encontra-se exacerbada, como no curso de infecções e de febre elevada.

Por outro lado, entende-se por epilepsia a desordem cerebral caracterizada por uma predisposição crônica para desenvolver convulsões de forma espontânea e recorrente (FISHER et al., 2014). De acordo com a *International League Against Epilepsy* (ILAE) é necessário que haja pelo menos um episódio convulsivo que se enquadre na definição para que seja estabelecido o diagnóstico de epilepsia, porém algumas literaturas clínicas sugerem que o diagnóstico seja estabelecido apenas a partir de dois episódios convulsivos dentro do conceito (FISHER et al., 2014).

Apesar da existência de diferentes critérios diagnósticos na literatura, uma unanimidade se faz presente quanto a multiplicidade de apresentações. Diversas são as etiologias e as modalidades clínicas associadas à epilepsia. A importância de reconhecer as várias formas de apresentação das epilepsias e das convulsões, além

dos aspectos clínicos, é conseguir substrato suficiente para elaborar, desenvolver e pesquisar modelos animais para obter conhecimento científico geral e específico para essas desordens neurológicas.

Convulsão e epilepsia são condições neurológicas frequentes e extremamente relevantes do ponto de vista clínico. Estima-se que uma em cada dez pessoas experimentará um episódio de convulsão durante a vida e, na maioria dos casos, este evento não estará associado a epilepsia (WIEBE, 2012). Esta condição pode ocorrer em qualquer faixa etária, sendo mais frequente no sexo masculino e nos extremos de idade. Em crianças, a incidência anual é estimada em 41 a 187 casos para cada 100.000 habitantes (CAMFIELD; CAMFIELD, 2015).

As epilepsias representam a desordem neurológica crônica mais recorrente desconsiderando as cefaleias e, de forma semelhante às convulsões, podem ocorrer em qualquer faixa etária. Na forma ativa, apresenta prevalência entre 3,2 a 5,5 por 1.000 crianças em países desenvolvidos, número que pode saltar para 3,6 a 44 por 1.000 crianças em países subdesenvolvidos (CAMFIELD; CAMFIELD, 2015).

Os dados de prevalência e incidência dos eventos convulsivos e epiléticos no Brasil são restritos a pequenos grupos amostrais e ainda pouco estudados (KANASHIRO, 2006; NETO; MARCHETTI, 2005). Porém, estima-se que os valores encontrados em países desenvolvidos sejam semelhantes aos dados nacionais (KANASHIRO, 2006; NETO; MARCHETTI, 2005).

Os distúrbios neurológicos que se manifestam na forma de epilepsia e de convulsão são diversos e a etiologia do processo é uma importante característica para definir a classificação dessas condições neurológicas. Segundo a ILAE, pode-se classificar as epilepsias em três grupos distintos de acordo com a etiologia: genéticas, estruturais/metabólicas e de causa desconhecida. Atribui-se a estas classificações etiológicas, sub-classificações baseadas nas faixas etárias de apresentação clínica (BERG et al., 2010). Porém, algumas apresentações das síndromes epiléticas são tão complexas do ponto de vista etiológico e clínico que são consideradas como constelações (*constellations*). A esta última categoria, faz parte uma modalidade de epilepsia que se destaca como sendo um protótipo para estudo em vários modelos animais: a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) (LEVESQUE; AVOLI, 2013; LEVESQUE; AVOLI; BERNARD, 2015).

A ELT é a modalidade de epilepsia que produz convulsões focais associadas a alteração cognitiva, com grave repercussão clínica e funcional, e também a mais

frequente em adultos. A base neuronal da ELT é caracterizada pelo recrutamento de estruturas da região límbica, com destaque para o hipocampo, amígdala, córtex entorrinal, região dorso medial do tálamo, áreas neocorticais do lobo frontal e temporal (MCINTYRE; GILBY, 2008).

A maioria dos pacientes que desenvolvem a ELT apresentam história pregressa de convulsões duradouras e complicadas na infância, que, em muitas oportunidades, foram desencadeadas por fatores como febre, meningite, encefalite ou trauma (WIEBE, 2012). Após alguns anos desse evento convulsivo prévio, os pacientes desenvolvem a ELT. Além da possibilidade de associação com fatores ambientais e individuais, também existem as formas hereditárias da ELT (WIEBE, 2012).

É importante considerar uma condição clínica extremamente relevante que está associada ao contexto de epilepsia e convulsão e que participa de forma importante na gênese da ELT: o *Status Epilepticus* (SE). O SE é uma emergência médica caracterizada por continuação do estímulo convulsivo por período superior a trinta minutos sem que o paciente retome ao estado de consciência basal (LOWENSTEIN; BLECK; MACDONALD, 1999; WIEBE, 2012). A manifestação neuronal mantém-se reverberante causando insulto cerebral intenso, associado a hipóxia, acidose láctica e dano muscular (WIEBE, 2012).

Sabe-se que mesmo com cinco minutos de atividade convulsiva constante já há dano cerebral considerável, dessa forma, alguns trabalhos admitem a inclusão dessa característica no critério diagnóstico de SE (LOWENSTEIN et al., 1999). Assim, o SE pode ser considerado também como sendo uma convulsão com duração superior a 5 minutos ou por duas ou mais convulsões discretas desde que o paciente não retome o nível de consciência pré-existente antes do evento convulsivo (LOWENSTEIN et al., 1999).

A manifestação de SE desencadeia um intenso remodelamento nas redes neuronais afetadas e, após um período variável de tempo, resulta em maior susceptibilidade do indivíduo à ocorrência crônica de convulsões espontâneas e recorrentes, o que representa um dos tipos de epilepsia. O remodelamento de redes neuronais que favorece a ocorrência de epilepsia pode ser chamado de epileptogênese.

Os modelos animais utilizados no estudo de epilepsia e convulsão desempenham função primordial para elucidar os mecanismos fisiopatológicos

envolvidos na epileptogênese e nas doenças associadas a essas desordens neurológicas.

Vários modelos animais são utilizados e desenvolvidos com a finalidade de explorar as bases biológicas dos processos neurológicos que envolvem a epilepsia e convulsão humana (LOSCHER, 2002;2011; SARKISIAN, 2001). De forma geral, os modelos animais procuram mimetizar algumas características dos tipos de epilepsia humana, em especial a ELT, com a finalidade de investigar as bases biológicas envolvidas em cada modalidade de epilepsia (KANDRATAVICIUS et al., 2014; YIN et al., 2013).

1.2. Modelos Animais

A maioria dos modelos animais que está associado ao estudo das convulsões representa animais potencialmente saudáveis que receberam alguma intervenção física e/ou química para desenvolverem um perfil pró-epileptogênico (LOSCHER, 2011). Essa intervenção é definida de acordo com o tipo de epilepsia a ser induzido no modelo.

Um exemplo relevante a ser citado é representado pelos modelos animais que desenvolvem convulsão após o tratamento com drogas pró-convulsivantes como o ácido caínico e a pilocarpina. O tratamento dos animais com tais drogas constitui um importante modelo para a ELT (CURIA et al., 2008; LEVESQUE; AVOLI, 2013; LEVESQUE et al., 2015).

Nesses modelos, a administração de uma dose de tais drogas pro-convulsivantes induz uma crise tônico-clônica generalizada seguida de SE. O dano neuronal que ocorre devido ao SE é suficiente para definir uma rede neuronal hiperexcitável com descargas que se originam no lobo temporal (CURIA et al., 2008; LEVESQUE et al., 2015).

Vale considerar que o processo de manipulação e intervenção animal nestes modelos de indução químicos e/ou físicos é relevante e de cunho potencialmente iatrogênico. Por exemplo, observa-se uma elevada taxa de mortalidade dos animais submetidos à estimulação pró-convulsiva com ácido caínico e pilocarpina (LEVESQUE et al., 2015).

O modelo animal utilizado neste trabalho é um modelo genético de desenvolvimento de crise convulsiva por estímulo audiogênico, os ratos Wistar audiogênicos (*Wistar Audiogenic Rats* - WAR). Um outro modelo animal que representa os modelos audiogênicos é o *Genetically Epilepsy-Prone Rat* (GEPR).

Nestes dois modelos, os animais apresentam um perfil pró-convulsivo como característica inata. Assim, diversos tipos de estímulos excitatórios realizados nestes animais, mesmo sublimiares, são capazes de deflagrar o processo convulsivo, uma vez que há uma rede neural naturalmente hiperexcitada (FAINGOLD, 1988; REIGEL; DAILEY; JOBE, 1986).

Scarlatelli-Lima e colaboradores (2003) caracterizaram o perfil de susceptibilidade dos animais WAR aos outros estímulos além do audiogênico. Foram

observadas maior susceptibilidade às crises convulsivas induzidas por eletrochoque transauricular e ao pentilenotetrazol (PTZ) e, uma tendência à maior susceptibilidade dose dependente à pilocarpina (SCARLATELLI-LIMA et al., 2003).

Os modelos de convulsão audiogênica aguda, como os WARs e GEPRs, desenvolvem convulsão tônico-clônica generalizada induzida por estímulo sonoro de alta intensidade (110-120 decibéis) (FAINGOLD, 1988; GARCIA-CAIRASCO; SABBATINI, 1989). Sabe-se que o substrato neural associado ao desenvolvimento de convulsão audiogênica aguda nestes modelos é representado pelo colículo inferior, camadas profundas do colículo superior, subnúcleos da formação reticular, substância negra, substancia cinzenta periaquedutal (FAINGOLD, 1988). Dentre essas regiões, o colículo inferior desempenha função crítica na deflagração do estímulo convulsivo e o colículo superior e a substância nigra participam da modulação e generalização do evento audiogênico (GARCIA-CAIRASCO; TERRA; DORETTO, 1993) (Figura 1).

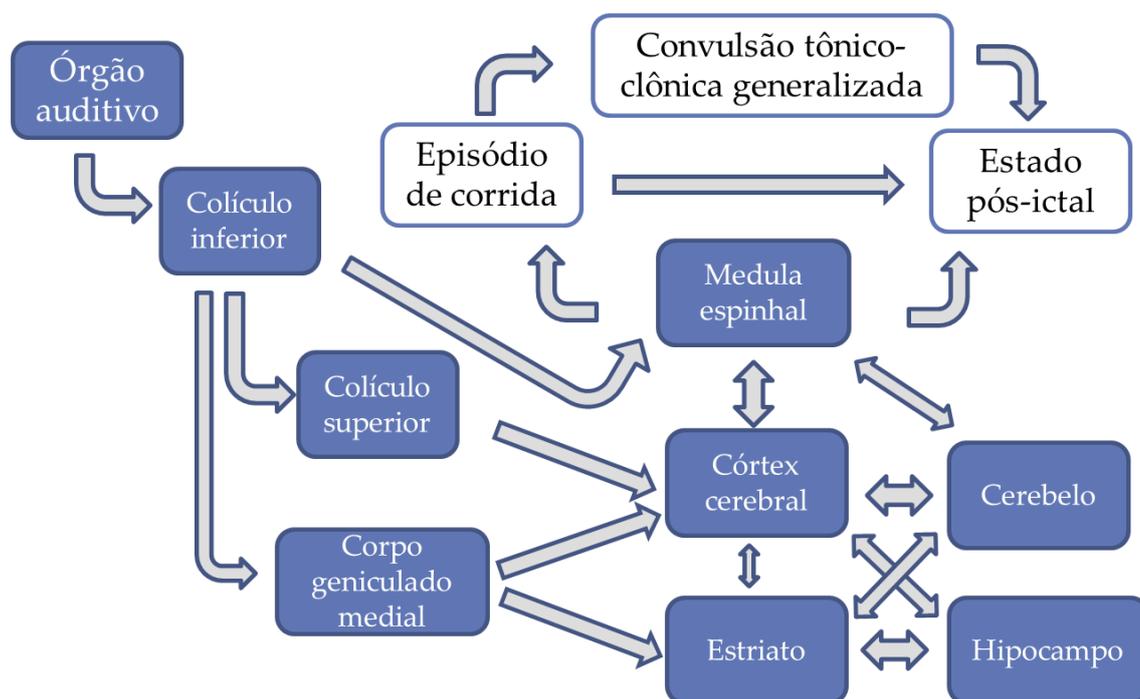


Figura 1. Estruturas neurais envolvidas na crise convulsiva audiogênica. Adaptado de: Garcia-Cairasco et al., 1993; Ross & Coleman, 2000.

Sob ação apenas de estímulos isolados os animais susceptíveis ao evento convulsivo desenvolvem convulsão apenas durante a estimulação sonora, não

ocorrendo de forma espontânea e recorrente como visto na ELT, por exemplo. Dessa forma, apesar de apresentarem um limiar mais baixo para desencadear o evento convulsivo, não há espontaneidade.

Porém, estímulos repetitivos e consecutivos nestes animais susceptíveis causam progressivamente o recrutamento de outras regiões cerebrais como amígdala, hipocampo e córtex cerebral. Esse fenômeno é conhecido como *Audiogenic Kindling* ou abrasamento, e envolve um remodelamento de redes neurais que favorecem a propagação e generalização das crises convulsivas, sendo, portanto, considerado uma repercussão da epileptogênese induzida por estímulos sucessivos (GODDARD; MCINTYRE; LEECH, 1969; MCNAMARA et al., 1980).

A partir deste ponto, os animais passam a desenvolver as convulsões com intensidade de estímulo progressivamente menores. Além disso, o padrão de crise apresentado se torna diferenciado, o que é corroborado através de registro do eletroencefalograma (EEG) (MCNAMARA et al., 1980).

Nos WARs, o processo de *kindling* audiogênico foi acompanhado através de registros de EEG e foram constatadas alterações progressivas no padrão de atividade neural, especialmente no que diz respeito à presença de poli espículas epileptiformes de alta intensidade e sincronizadas nas regiões cerebrais recrutadas durante o abrasamento (DUTRA MORAES; GALVIS-ALONSO; GARCIA-CAIRASCO, 2000).

O processo de *kindling* envolve o recrutamento de estruturas límbicas e credencia o modelo animal como um modelo de ELT (BERTRAM, 2007). Como há remodelamento das redes neurais para recrutar as estruturas límbicas durante a crise convulsiva, os animais submetidos ao *kindling* podem também ser considerados como modelo para estudo de plasticidade neuronal, de epileptogênese e de crises convulsivas parciais com generalização (MCNAMARA et al., 1985).

1.3. Epileptogênese

Atualmente muitos estudos buscam elucidar os mecanismos que compõem a gênese das crises convulsivas e da epilepsia. O epifenômeno da epileptogênese tem sido cada vez mais estudado e nesse ponto os modelos animais desempenham papel essencial (PITKANEN et al., 2015).

A epileptogênese pode ser considerada como o processo neural que está associado ao desenvolvimento do perfil pró-epileptogênico, isto é, hiperexcitável das redes neurais. Por apresentar um menor limiar de excitação, as redes neurais são capazes de se tornar respondedoras sincrônicas frente à estímulos, que em condição fisiológica não seriam capazes de ativá-las (LUKASIUK; BECKER, 2014).

1.3.1. O papel dos neurotransmissores na epileptogênese

Classicamente é muito bem descrito, tanto em estudos clínicos quanto experimentais, o envolvimento de um grande número de neurotransmissores na epilepsia (ITO et al., 1990; MCNAMARA, 1994; MELDRUM, 1975; TURSKY et al., 1976).

O balanço entre a neurotransmissão excitatória glutamatérgica e inibitória GABAérgica é frequentemente associada a uma rede epileptogênica (KAILA et al., 2014).

O glutamato, neurotransmissor excitatório mais prevalente no SNC, é responsável pela mediação da maioria das transmissões excitatórias rápidas (HASSEL; DINGLELINE, 2006). Essa molécula participa da neurotransmissão em 90% dos neurônios e representa a base excitatória das convulsões e epilepsias.

Diante disso, torna-se relevante compreender alguns detalhes da transmissão glutamatérgica no contexto deste trabalho, uma vez que, as proteínas estudadas neste trabalho apresentam relação próxima com alguns constituintes da via de sinalização mediada por esse neurotransmissor.

O glutamato exerce sua ação excitatória via receptores dos tipos ionotrópico e metabotrópico. Os receptores ionotrópicos são canais catiônicos cuja a abertura é potencializada pela ligação com glutamato. Os receptores metabotrópicos desencadeiam sua ação na transdução de sinal via atividade de proteína G (HASSEL; DINGLEDINE, 2006).

Os receptores ionotrópicos são divididos em três classes: N-metil-d-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e cainato (KA).

O NMDA é um receptor glutamatérgico cuja composição tetramérica é composta por uma combinação de diferentes subunidades e atua como um canal iônico para cátions, especialmente os íons Na^+ e os íons Ca^{2+} . Diferenças na configuração de subunidades do receptor NMDA resultam em diferentes sinalizações celulares (GUERRIERO; GIZA; ROTENBERG, 2015).

A ativação de receptores NMDA que contém as subunidades NR1 e NR2A gera sinalização celular para fosforilação e ativação das proteínas quinases reguladas por sinal extracelular (ERK) e proteína de ligação do elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB), além de aumento na expressão de BDNF (GUERRIERO et al., 2015). A ativação do NMDA que contém NR2B resulta em influxo prolongado de íons Ca^{2+} (GUERRIERO et al., 2015).

O receptor do tipo AMPA, que é constituído de 4 subunidades, também é um canal iônico permeável a íons Na^+ e Ca^{2+} . A subunidade GluR1, que torna o AMPA um canal iônico, é ativa em seu estado fosforilado. Esta ativação pode ser efetuada via proteínas quinases dependentes de cálcio/calmodulina (CaMKs) que, inclusive, podem ser ativadas por ação dos receptores NMDA, através das vias de sinalização celular (GUERRIERO et al., 2015).

Os receptores KA, assim como o do tipo AMPA, são receptores glutamatérgicos ionotrópicos para transmissão sináptica excitatória rápida (HASSEL; DINGLEDINE, 2006). Tanto o glutamato quanto o ácido caínico atuam como agonistas do receptor do tipo KA e, a afinidade e a eficiência da resposta agonista neste receptor é definida pelo arranjo das subunidades constitutivas (HASSEL; DINGLEDINE, 2006). O ácido caínico é um importante indutor de crises convulsivas e age como droga base em um modelo de convulsão e epilepsia (LEVESQUE; AVOLI, 2013).

Existem oito tipos de receptores metabotrópicos para glutamato descritos (mGluR1 a mGluR8) e são classificados em três classes funcionais. Os receptores

metabotrópicos do Grupo 1 estimulam a Fosfolipase C (PLC) para produção de inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) com ativação da Proteína quinase C (PKC) e aumento da concentração de íons cálcio no meio intracelular. A ativação de receptores do Grupo 2 ou 3 resulta em inibição da enzima adenilato ciclase, enzima responsável pela conversão de ATP em AMPc, um segundo mensageiro celular (HASSEL; DINGLELINE, 2006).

Os receptores metabotrópicos glutamatérgicos têm papel fundamental na modulação da transmissão sináptica, agindo tanto nos neurônios pré-sinápticos quanto nos pós-sinápticos. Quando ativados, regulam uma ampla variedade de ligantes e canais iônicos sensíveis a voltagem, como os canais para cálcio do tipo N e L, NMDA, receptores do tipo cainato, receptor GABA_A, entre outros.

A remoção do glutamato da fenda sináptica tem papel fundamental para limitar e cessar o estímulo no neurônio pós-sináptico e pré-sináptico. Existem 5 transportadores para glutamato, denominados de EAAT1-5, que estão presentes em neurônios pré-sinápticos e em astrócitos.

Os transportadores EAAT1 e EAAT2, também chamados de GLAST e GLT1 em roedores, são expressos seletivamente em astrócitos (ROTHSTEIN et al., 1996; TANAKA et al., 1997) . Animais que apresentam redução na expressão destes receptores ou que receberam algum bloqueador do transportador glutamatérgico apresentam desde hiperexcitabilidade até crise convulsiva letal (STEINHAUSER; GRUNNET; CARMIGNOTO, 2015).

O ácido gama-amino-butírico (GABA) é o neurotransmissor inibitório mais prevalente do SNC e, de forma semelhante ao glutamato, participa ativamente dos processos que compõem a gênese da epilepsia e do limiar convulsivo. Vários estudos relacionam o processo convulsivo e epiléptico a alterações tanto na expressão quanto no funcionamento das estruturas que constituem as vias GABAérgicas do SNC. Os receptores para GABA e seus transportadores são envolvidos na epileptogênese, e bastante estudados, tanto em humanos quanto em modelos animais (FRITSCH et al., 2009; FUETA et al., 2003; GALANOPOULOU, 2010; KAILA et al., 2014; TREIMAN, 2001).

Os receptores para GABA são de três classes distintas: GABA_A, GABA_B e GABA_C. Os receptores do tipo GABA_A são heteropentâmeros formados por arranjo de 5 subunidades proteicas homólogas dentre um universo de vários subtipos de subunidades. Dessa forma, várias isoformas do receptor GABA_A são encontradas e

têm sido descritas características topográficas e funcionais específicas encontradas no SNC (GONZALEZ; BROOKS-KAYAL, 2011; OLSEN; BETZ, 2006).

Os receptores GABA_A são canais iônicos que estão envolvidos com o processo de influxo de íons cloreto. O influxo desse íon resulta em uma tendência a hiperpolarização do neurônio, aumentando o limiar para disparo do potencial de ação e, assim, reduzindo a probabilidade de resposta excitatória (OLSEN; BETZ, 2006).

Os receptores GABA_B são do tipo metabotrópicos e têm estrutura semelhante aos receptores metabotrópicos glutamatérgicos, por serem acoplados a proteína G (GUERRIERO et al., 2015). A sinalização decorrente da ativação destes receptores, que estão em neurônios pré e pós-sinápticos, resulta em inibição da atividade neuronal.

Tal inibição é decorrente de ativação de ampla variedade de sistemas efetores. Merece destaque a ativação de canais para K⁺, que produzem correntes sinápticas inibitórias lentas, e a redução da condutância a íons Ca²⁺, regulando a produção de IP₃, inibindo a produção de AMPc, além de reduzir a liberação de neurotransmissores pelo neurônio pré-sináptico (TREIMAN, 2001).

Após interação com os receptores o GABA é removido da fenda sináptica por transportadores em neurônios pré-sinápticos e por células gliais (TREIMAN, 2001). Um dos transportadores de GABA, denominado de GAT1, é envolvido na epileptogênese de um importante modelo genético de epilepsia, o camundongo EI (FUETA et al., 2003).

A importância dos receptores GABAérgicos, especialmente o tipo GABA_A, consiste no fato que algumas drogas com propriedade anticonvulsivas atuam como agonistas do receptor GABA_A e que diversas mutações nas subunidades constituintes do receptor GABA_A estão associadas a epilepsias genéticas (idiopáticas) (HIROSE, 2014). Outro fato importante é que o PTZ, droga indutora de crise convulsiva e muito utilizada para induzir modelo de epilepsia em animais, atua como supressora dos efeitos de GABA no receptor GABA_A (HADERA et al., 2015).

Porém, atribuir o desencadeamento da epilepsia a apenas um equilíbrio excitatório/inibitório positivo causado pelo balanço glutamatérgico/GABAérgico não é razoável sob o ponto de vista da complexidade e da multidependência fatorial do evento convulsivo (KAILA et al., 2014; WERNER; COVENAS, 2015).

É notável a participação dos neurotransmissores glutamato e GABA no processo de excitabilidade, como já apresentado, mas é indispensável considerar o

envolvimento de outros efetores nessa complexa equação. Sob essa óptica, a dopamina merece especial destaque, uma vez que, evidências científicas robustas apontam para uma relação intrínseca entre epilepsia e a dopamina (BOZZI; DUNLEAVY; HENSHALL, 2011).

A participação da dopamina nas crises convulsivas e síndromes epiléticas nos humanos e nos diversos modelos animais existentes ainda tem sido estudada e gradativamente mais bem elucidada (STARR, 1996) (BRODIE et al., 2016). A dopamina é considerada um neurotransmissor infrarregulador da atividade convulsiva, fato endossado tanto pela ação antiepilética da apomorfina, um agonista dopaminérgico não seletivo que é reconhecida há mais de um século, quanto pelo efeito pró-convulsivo das drogas antagonistas dos receptores dopaminérgicos do tipo D1 e D2 (BRODIE et al., 2016)(MARROSU; DEL ZOMPO; CORSINI, 1983; STARR, 1996). O equilíbrio fisiológico da atividade dopaminérgica deve ser considerado um fator crucial para a determinação da resposta aos estímulos indutores das crises epiléticas (STARR; STARR, 1993).

A dopamina age através de dois grupos de receptores acoplados a proteína G: o grupo de receptores do tipo D1 e do tipo D2. A ativação dos receptores do tipo D1, grupo composto pelos receptores D1 e D5, resulta em redução do limiar de convulsão e aumento da gravidade da descarga epileptiforme (BOZZI et al., 2011; DENINNO et al., 1991). Administração de dose sublimiar de pilocarpina é capaz de induzir atividade epileptiforme e convulsão na presença de agonistas do receptor D1 (STARR; STARR, 1993).

Por outro lado, o efeito da ativação de receptores do tipo D2, grupo composto pelos receptores dopaminérgicos D2, D3 e D4, é predominantemente inibitório na modulação das crises (BOZZI et al., 2011). Em dois modelos experimentais de indução da epilepsia límbica, a sinalização através dos receptores D2 é capaz de inibir as descargas epileptiformes (STARR, 1996; TURSKI et al., 1988). Esses receptores parecem essenciais para o controle da generalização das crises e não para o início das mesmas (BARONE et al., 1993).

A via clássica de transdução de sinais modulada pelos receptores dopaminérgicos é a via da enzima adenilato ciclase, que regula a produção de AMPc e, conseqüentemente, a ativação da proteína quinase A (PKA). Enquanto os receptores do tipo D1 ativam a adenilato ciclase, os receptores do tipo D2 a inibem (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011). Porém, as vias de sinalização celular induzidas

pela ativação destes receptores são muito mais complexas e envolvem ativação e inativação de diversas outras enzimas, como a proteína quinase B (AKT), CREB, fosfoproteína de 32Kd regulada por dopamina e AMP cíclico (DARPP-32), proteína fosfatase 1 (PP-1), proteína fosfatase 2 (PP-2B) (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011).

Além dessa função desempenhada pelos receptores dopaminérgicos pós-sinápticos descrita até o momento, existem receptores dopaminérgicos no neurônio pré-sináptico, chamados de autorreceptores. Os autorreceptores dopaminérgicos são responsáveis pela modulação da sinapse conduzida pelo neurônio pré-sináptico, atuando, geralmente, como um mecanismo de *feedback* negativo controlando a taxa de disparo neuronal, a síntese e liberação de neurotransmissores (SIBLEY, 1999).

Os receptores D2 parecem ser os autorreceptores predominantes nessa modulação da sinapse dopaminérgica. Os autorreceptores D2, através de sua ação inibitória e maior sensibilidade aos agonistas dopaminérgicos quando comparado ao receptor D2 (pós-sináptico), são capazes de induzir efeitos bifásicos na transmissão dopaminérgica (BEAULIEU; GAINETDINOV, 2011).

O mecanismo pró-excitatório exibido pelas redes neurais associadas ao epifenômeno da convulsão e das epilepsias evidentemente possuem íntima relação com os neurotransmissores, conforme já apresentado. Porém, diante da complexidade dos mecanismos intracelulares associados, é evidente a participação de outras proteínas no processo de epileptogênese. Além do papel dos neurotransmissores e seus respectivos receptores, tem sido bem documentado o papel de neurotrofinas na epileptogênese (SIMONATO; TONGIORGI; KOKAIA, 2006; WANG, Y. et al., 2009).

1.3.2. O BDNF na epileptogênese

Os fatores neurotróficos, como o BDNF, NGF, NT-3, representam proteínas que atuam como indutores e reguladores do processo de plasticidade e possuem função chave na modulação das atividades sinápticas (AMMENDRUP-JOHNSEN et al., 2015).

Dentre as neurotrofinas, o BDNF é a mais estudada e mais bem caracterizada por sua relevante ação no SNC. Em quantidades adequadas, tal neurotrofina desempenha função crítica na manutenção e desenvolvimento das redes neuronais no sistema nervoso central (ADACHI et al., 2014).

O BDNF tem sido associado a diversas doenças neurológicas incluindo as neurodegenerativas, as psiquiátricas, as isquêmicas e as epiléticas (ADACHI et al., 2014; TAPIA-ARANCIBIA et al., 2004). Há pelo menos duas décadas, o BDNF é descrito como sendo um fator neurotrófico que tem papel crucial na epileptogênese, conforme será abordado a seguir (LAHTEINEN et al., 2003; LARMET et al., 1995).

A hiperexpressão de BDNF ou a aplicação de BDNF exógeno tanto em experimentos *in vitro* quanto *in vivo* resulta em diversos efeitos pró-excitatórios, assim como a indução de crise convulsiva resulta em aumento na produção de BDNF pelas células do SNC (BINDER et al., 2001; CROLL et al., 1999; XU et al., 2004). A aplicação aguda e crônica de BDNF de fonte exógena resulta em ampliação da eficácia sináptica em fatias hipocámpais de ratos, em fatias de córtex e em cultura neuronal de hipocampo de rato (ESCOBAR; FIGUEROA-GUZMAN; GOMEZ-PALACIO-SCHJETNAN, 2003; GOTTSCHALK et al., 1998; LESSMANN; GOTTMANN; HEUMANN, 1994; XU et al., 2004). Esse efeito é causado pela modulação induzida por BDNF na função dos receptores NMDA e em diversos canais iônicos como os para sódio e potássio sensíveis a voltagem. Tal fato pode representar um *background* funcional para reforçar a atuação de BDNF como um fator de potencialização de convulsões fármaco-induzidas (GILL et al., 2013; HEINRICH et al., 2011).

Sabe-se que após um evento convulsivo em ratos, os níveis de expressão de RNAm para BDNF, proteína BDNF e de seu receptor de alta afinidade, encontram-se elevados no hipocampo (BINDER et al., 2001; HEINRICH et al., 2011). Em modelo de eletroconvulsão em camundongo, também foi observado aumento nos níveis de BDNF e de Trk-B, seu receptor de alta afinidade, em regiões límbicas (DUMAN; VAIDYA, 1998). Além disso, é bem reconhecido que o BDNF se encontra com níveis elevados após alguns dias do evento convulsivo em tecidos epileptogênicos (GALL, 1993; LARMET et al., 1995).

Apesar de atuar como um fator pró-epileptogênico, alguns estudos têm apresentado resultados divergentes a essa função do BDNF colocando-o como um fator protetor ao desenvolvimento de crises convulsivas (PALMA et al., 2005;

SIMONATO et al., 2006). Um exemplo destes estudos evidencia que a perfusão crônica de BDNF durante a primeira semana de *kindling* hipocampal foi capaz de suprimir o desenvolvimento de epileptogênese em modelo animal de estimulação elétrica utilizando eletrodos transcranianos (LARMET et al., 1995).

Da mesma forma em que apresenta papel funcional evidente para hiperexcitar a rede neural, o BDNF atua como um regulador negativo para a rede hiperexcitada. Esse duplo papel desempenhado pelo BDNF tem associação com sua capacidade de modular tanto a via glutamatérgica quanto a GABAérgica.

Apesar de ser evidente o aumento dos níveis de BDNF no contexto de epileptogênese e de convulsão, nota-se que ainda não é estabelecido um claro delineamento fisiológico. Apesar de ainda não serem evidentes os mecanismos de ação específicos dos fatores neurotróficos na epileptogênese, sabe-se que seu envolvimento no processo de gênese e modulação da atividade convulsiva é evidente e fundamental.

1.3.3. Ativação glial e neuroinflamação

Assim como os neurônios, que participam de forma elementar na epileptogênese, as células gliais também desempenham papel relevante neste fenômeno. A função dos astrócitos em regular a concentração de íons e neurotransmissores liberados na fenda sináptica é crucial para a intensidade e perpetuação do estímulo do neurônio pós-sináptico. A partir dessa ação, essas células gliais passaram a ser estudadas como importantes moduladores da epileptogênese (STEINHAUSER et al., 2015).

A relação intrínseca entre epilepsia e ativação de astrócitos é bem documentada. Nesse contexto de ação tripartite, entre os neurônios pré e pós-sinápticos e as células gliais, há participação de diversos efetores que estão associados a atividade intrínseca das células gliais (HADERA et al., 2015; PAL, 2015).

Sabe-se que os astrócitos são ativos no processamento e na modulação sináptica e que a interação com os neurônios desencadeia respostas intracelulares semelhantes às aquelas observadas nessas últimas (CROFT; DOBSON; BELLAMY, 2015). A sinalização celular existente entre esses dois tipos celulares causa influxo de íons Ca^{2+} nos astrócitos, com repercussão funcional importante.

O aumento de íons Ca^{2+} no ambiente intracelular dos astrócitos causa liberação de neurotransmissores clássicos, como o glutamato e ATP, e daquelas proteínas produzidas decorrente da ativação da glia, como as prostaglandinas e as citocinas (BEN ACHOUR; PASCUAL, 2010; CROFT et al., 2015; STEINHAUSER et al., 2015).

A ativação de astrócitos no contexto de ampliação da atividade neuronal, de lesão neuronal e de aumento da interação neurônio-astrócito, pode ocorrer por ação de diversas moléculas, dentre elas a IL-6, e resulta em uma reatividade de glia, também chamada de gliose reativa (PEKKNY; WILHELMSSON; PEKNA, 2014; ROBEL et al., 2015). Sabe-se que há intensa gliose nos tecidos epileptogênicos dos pacientes refratários ao tratamento farmacológico e dos modelos animais para epilepsia (DEVINSKY et al., 2013; ROBEL et al., 2015).

O recrutamento e a ativação de astrócitos e das células gliais no processo de plasticidade sináptica fornece substrato para sugerir o envolvimento das citocinas inflamatórias, produzidas por células gliais ativadas, no amplo arsenal bioquímico no

processo de epileptogênese e de modulação da transmissão sináptica (DEVINSKY et al., 2013; VEZZANI; RAVIZZA; et al., 2008).

A hipertrofia das células gliais, marco microscópico da ativação glial, vem acompanhada de mudanças bioquímicas na maquinaria celular e consequente produção e secreção de quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento e de matriz extracelular (ROBEL et al., 2015). Sabe-se que vários mediadores inflamatórios são expressos em células gliais ativadas em tecidos epileptogênicos e algumas das citocinas mais estudadas nesse contexto são o TNF, IL-1 β e IL-6 (DEVINSKY et al., 2013; VEZZANI et al., 2011).

Nos últimos anos, dados clínicos e experimentais demonstraram a importância do processo inflamatório na epilepsia (VEZZANI et al., 2013; VEZZANI et al., 2011; VEZZANI; GRANATA, 2005), em particular nos mecanismos geradores da crise, na transformação da rede neuronal na epileptogênese e na hiperexcitabilidade (DEVINSKY et al., 2013; PITKANEN et al., 2002).

De forma semelhante à participação da ativação glial, atualmente, levanta-se uma questão central se o processo inflamatório é um epifenômeno da crise e está associado ao dano neuronal ou se contribui na etiopatologia da epilepsia (ROBEL et al., 2015; VEZZANI; BALOSSO; RAVIZZA, 2008)(Figura 2).

Sabe-se que manifestação de crise convulsiva/epiléptica em modelos animais e em humanos incorre no aumento de TNF, IL-1 β e IL-6 em várias regiões do SNC, do líquido ou do soro sanguíneo. Por outro lado, em modelos animais sabe-se que a administração exógena e/ou a superexpressão de tais citocinas resulta em uma hiperexcitabilidade da rede neural, mediada pela redução do limiar convulsivo (ERTA; QUINTANA; HIDALGO, 2012; ULUDAG et al., 2013; ULUDAG et al., 2015; VEZZANI et al., 2012; VEZZANI; VIVIANI, 2015).

Eventos inflamatórios envolvidos no contexto da epilepsia e convulsão

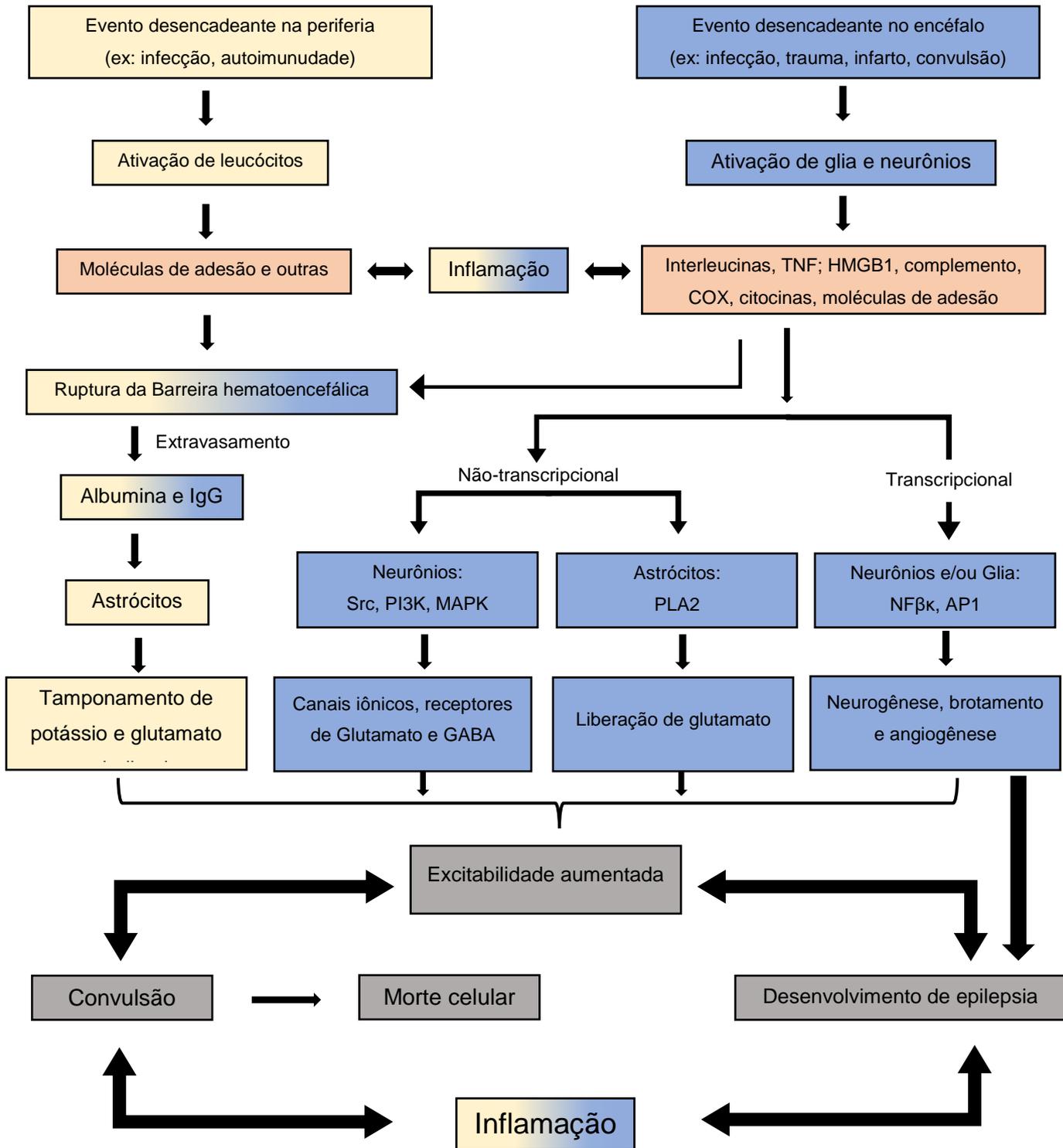


Figura 2. Eventos inflamatórios envolvidos no contexto da epilepsia e convulsão. Traduzido de Vezzani et al., 2011.

1.4. Plasticidade Neuronal

A plasticidade das redes neurais representa um evento relacionado a diversos processos fisiológicos e patológicos. A habilidade das redes neurais em moldar o padrão de suas sinapses diante de estímulos é crucial para ocorrência de eventos fisiológicos como o desenvolvimento neural, aprendizado cognitivo e motor, e estabelecimento de memórias (AVANZINI; FORCELLI; GALE, 2014; CROFT et al., 2015).

Por outro lado, a plasticidade neural também está envolvida em processos de reparo e de reabilitação neural após injúria (AVANZINI et al., 2014) e, representa a base para o desenvolvimento de condições como a epilepsia (KANDRATAVICIUS et al., 2014). A epileptogênese, em geral, ocorre no contexto de insulto cerebral transitório, como no SE, que gera uma rede hiperexcitável e predisposta a despolarização desordenada e sincrônica de neurônios (LEVESQUE et al., 2015).

A associação entre neuroplasticidade e epileptogênese pode ser estabelecida na medida em que se constata que a epileptogênese corresponde a uma neuroplasticidade pró-excitatória favorável à ocorrência de convulsões espontâneas e recorrentes em uma rede neural previamente saudável.

Sabendo que o processo de neuroplasticidade representa um evento elementar na fisiopatologia da epilepsia, é possível inferir, então, que vários efetores do processo de plasticidade neural também sejam cruciais para o estabelecimento da epileptogênese. Vários deles ainda não são estudados no contexto de epileptogênese. Assim, é coerente expandir a análise dos mecanismos de epileptogênese na direção daqueles efetores, que são reconhecidamente associados à neuroplasticidade neuronal, mas com pouco ou nenhum estudo no contexto da epileptogênese.

Classicamente a plasticidade neuronal está associada a modificações estruturais sinápticas entre neurônios (MARSHALL, 1985) e há algumas décadas têm surgido evidências robustas que endossam o envolvimento ativo das células gliais (CROFT et al., 2015; GALLO; DENEEN, 2014; PAL, 2015; ROBEL et al., 2015)

A mudança estrutural sináptica decorrente do processo de plasticidade neural envolve, naturalmente, a alteração da maquinaria de transdução e transmissão de sinal tanto intracelular, quanto extracelular. Dessa forma, a tradução bioquímica do

processo de neuroplasticidade pode ser gerada a partir não só de alterações na expressão de enzimas, fatores de transcrição, canais iônicos dependentes de voltagem, receptores ionotrópicos e metabotrópicos como também pode ser gerada pela regulação dos padrões atividade/inatividade desses alvos (NELSON; ALKON, 2015).

Diversos desses agentes já foram descritos como participantes da epileptogênese em seção anterior deste trabalho. Notadamente, antes de serem vinculados ao processo de epileptogênese, já era descrita a participação destes agentes nos diversos eventos decorrentes da plasticidade neuronal (PATTERSON; NAWA, 1993; WILLIAMSON; BILBO, 2013).

Porém, cabe ressaltar que duas proteínas cruciais na modulação e transdução de sinal de importantes vias associadas a plasticidade neuronal e de epileptogênese ainda são muito pouco estudadas no contexto das convulsões e epilepsias (ARONICA et al., 2009; WANG, W. et al., 2014). Essas duas proteínas que ocupam posição de destaque no controle da plasticidade neural são NCS-1 e DARPP-32 (LINDSKOG et al., 2006; MEYER-LINDENBERG et al., 2007; TSUJIMOTO et al., 2002).

1.4.1. Neuroplasticidade mediada por NCS-1

A sinalização via cálcio intracelular é crítica para ocorrência de sinapses e, evidentemente, representa uma via notável para a ocorrência de plasticidade neural (ATAEI; SABZGHABAEI; MOVAHEDIAN, 2015; SHONESY et al., 2014). Os canais para Ca^{2+} estão intimamente envolvidos na neurotransmissão e na geração de crises convulsivas, sendo que mutações genéticas que envolvem os canais para cálcio representam substrato para epilepsias humanas e em animais (ARMIJO et al., 2005).

Durante o evento de epileptogênese, a ativação de proteases dependentes de íons Ca^{2+} , do sistema Ca^{2+} -calmodulina-quinase e de outras proteínas que compõem a maquinaria de transdução de sinal induzida por íons Ca^{2+} , são importantes para o remodelamento da circuitaria neural que culmina em epilepsia (ARMIJO et al., 2005).

NCS-1 é uma proteína membro do complexo de proteínas reguladoras da sinalização de cálcio intracelular e desempenha função importante na modulação da transmissão sináptica (SOUZA et al., 2011; WEISS; HUI; BURGOYNE, 2010).

A ativação de NCS-1 é responsável pela regulação da atividade de diversas proteínas tais como os canais para Ca^{2+} sensíveis a voltagem, receptor para IP_3 , receptores dopaminérgicos do tipo 2, e proteínas quinases (Figura 3) (WEISS et al., 2010).

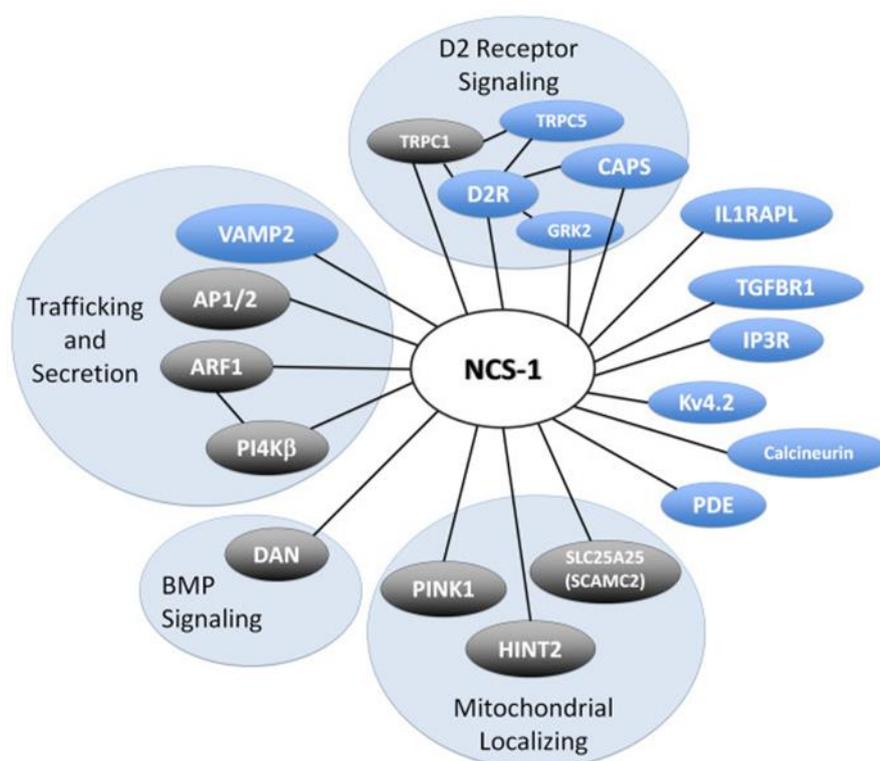


Figura 3. Painel de atuação da NCS-1 em proteínas participantes de diversos processos neurais (retirada de Petko et al., 2009)

Devido a capacidade integrativa importante das vias de sinalização celular induzidas por Ca^{2+} , a proteína NCS-1 desempenha papel fundamental na plasticidade neuronal e nos eventos que dependem deste fenômeno, como a memória e aprendizado (WEISS et al., 2010). Apesar disso o estudo sobre o envolvimento da proteína NCS-1 no contexto de epilepsia e é praticamente inexistente até o momento.

1.4.2. Neuroplasticidade mediada por DARPP-32

A proteína DARPP-32, altamente expressa em neurônios estriatais, desempenha papel primordial na integração das vias de sinalização dopaminérgica e glutamatérgica e atua com função chave no processo de plasticidade sináptica (FERNANDEZ et al., 2006; REIS et al., 2007).

Vários sinais endógenos e exógenos são capazes de interferir na função de DARPP-32 através das diferentes formas de fosforilação possíveis para essa proteína. Neurotransmissores, como glutamato e dopamina, assim como drogas de abuso e fármacos são capazes de interferir na regulação de DARPP-32 (FERNANDEZ et al., 2006).

As diferentes formas de fosforilação de DARPP-32 garantem a proteína a capacidade de modular diversas outras proteínas chaves da sinalização celular (FERNANDEZ et al., 2006). É descrito que a ativação de DARPP-32 na região estriatal, em ratos, induz a potenciação da atividade dos receptores glutamatérgicos NMDA (BLANK et al., 1997). A proteína DARPP-32 pode ser fosforilada pela proteína quinase A (PKA) e pode inibir assim a ação de fosfatase no receptor NMDA. Por outro lado, o aumento intracelular dos níveis Ca^{2+} favorece a desfosforilação da DARPP-32 e, como consequência, a atividade da fosfatase PP-1 (Figura 4)(FERNANDEZ et al., 2006).

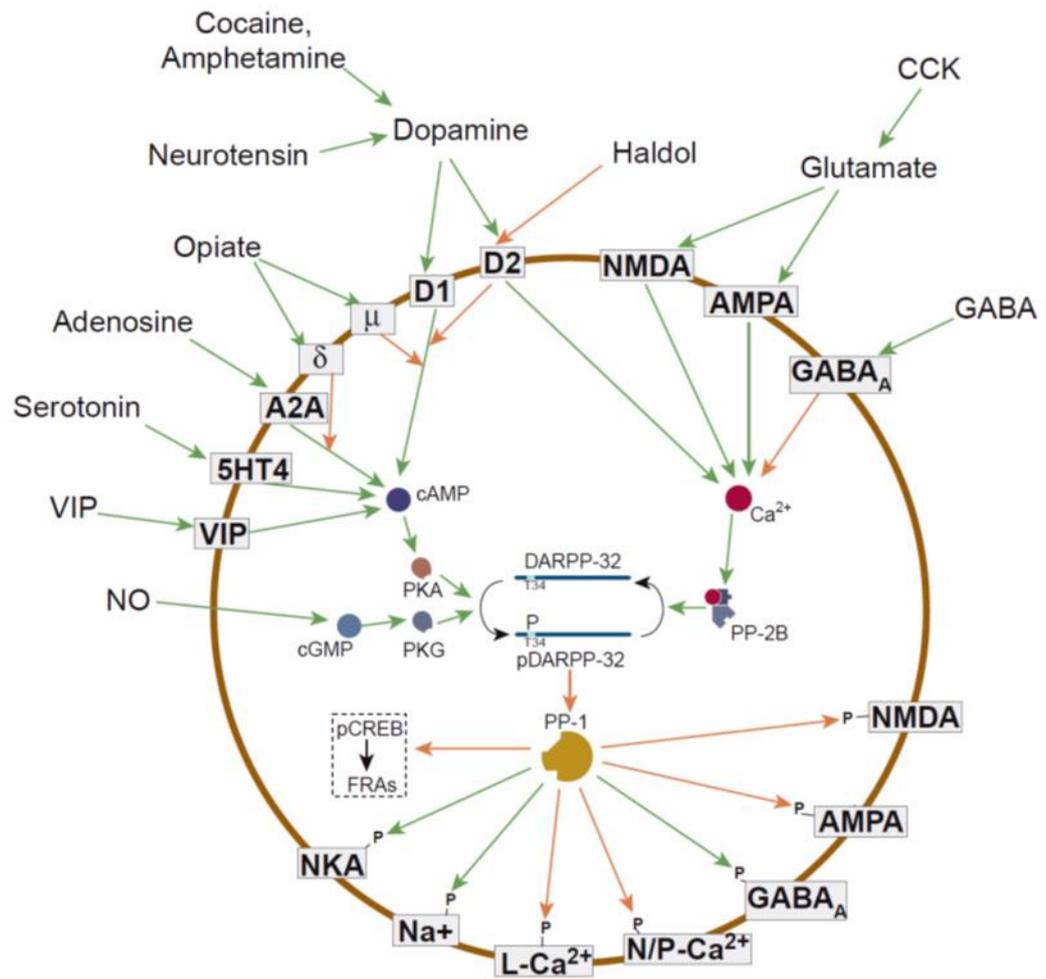


Figura 4. Painel de atuação da DARPP-32 em proteínas participantes de diversos processos neurais, bem como de sua ativação ou inativação desencadeada a partir da interação de medicamentos e de neurotransmissores com seus respectivos receptores (Retirado de Greengard, 2001).

Sabe-se que a ativação de receptores D1 induz o aumento da excitação evocada pelos receptores NMDA e que a ativação dos receptores D2 atenua as respostas induzidas pela ativação dos receptores NMDA (CEPEDA; BUCHWALD; LEVINE, 1993; FLORES-HERNANDEZ et al., 2002). Essa atividade provavelmente é modulada pela ação da DARPP-32 sobre as vias de integração entre a neurotransmissão dopaminérgica e glutamatérgica, mais especificamente sobre o estado funcional da PP-1.

Tendo em vista que a via glutamatérgica e a dopaminérgica são participantes ativas dos mecanismos bioquímicos envolvidos no distúrbio da epilepsia (BOZZI; BORRELLI, 2002), é provável que a atividade e os níveis de expressão DARPP-32 estejam alterados em modelos de estudos dessa patologia.

Baseando em todos os aspectos apresentados durante esta introdução, a hipótese científica que motivou a execução deste trabalho consiste na tese de que há alteração na expressão das citocinas, BDNF e proteínas associadas à neuromodulação após a indução de crise convulsiva audiogênica nos ratos WARs e que, essa expressão estaria aumentada nesses animais.

A ausência de estudos consistentes que avaliam marcadores bioquímicos de neuroinflamação e neuromodulação em animais WAR motivaram e justificaram a execução deste trabalho.

2. Objetivos

2.1. Geral

Avaliar e demonstrar os parâmetros bioquímicos e moléculas de sinalização intracelulares em diferentes regiões do SNC após a indução de crise audiogênica em animais WAR.

2.2. Específicos

- Avaliar a produção de citocinas em animais WAR.
- Avaliar a produção de BDNF em animais WAR.
- Avaliar a produção de NCS-1 e DARPP-32 em animais WAR.

3. Material e Métodos

3.1. Material

3.1.1. Modelo animal: WAR

3.1.1.1. Características gerais

Foram utilizados ratos machos da linhagem WAR, com peso médio de 250 gramas (DORETTO et al., 2003), criados e mantidos no biotério do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e ratos machos Wistar selvagens não susceptíveis ao estímulo sonoro indutor de crises, procedentes da população geral do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CEBIO).

Os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração e ciclo de claro/escuro de 14/10 horas, iniciando o período de luz às 6 horas da manhã. Os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos ditados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA, recentemente denominado de CEUA).

3.1.1.2. Avaliação das crises convulsivas

Aos 70, 74 e 78 dias de idade os animais WAR e Wistar controles foram submetidos à avaliação da susceptibilidade epiléptica audiogênica (*screening*), de acordo com metodologia descrita previamente (DORETTO et al., 2003; GARCIA-CAIRASCO et al., 1996).

Quando submetidos à estimulação sonora de alta intensidade (120 decibéis) os animais WAR apresentam crises do tipo tônico-clônicas generalizadas, que se caracterizam por episódios de corridas, pulos e quedas atônicas, seguidas de convulsão tônica, convulsões clônicas parciais e generalizadas e espasmos clônicos. As crises podem ser classificadas segundo a gravidade de apresentação conforme no quadro apresentado a seguir:

Classificação de gravidade das crises audiogênicas

IS	Comportamento observado
0,0	Sem resposta
0,11	Um episódio de corrida (<i>wild running</i>)
0,23	Um episódio de corrida seguido por pulos e quedas atônicas
0,38	Dois episódios de corrida seguidos por pulos e quedas atônicas
0,61	Todos itens acima associados a convulsão tônica ou arqueamento dorsal da cabeça
0,73	Todos itens acima associados a convulsão clônica parcial (somente membros anteriores ou posteriores) e/ou generalizadas (membros anteriores e posteriores)
0,85	Todos itens acima associados a espasmos clônicos
0,90	Todos itens acima associados a flexão ventral da cabeça
0,95	Todos itens acima associados a hiperextensão de membros anteriores
1,00	Todos itens acima associados a hiperextensão de membros posteriores

Quadro 2: Classificação de gravidade das crises audiogênicas. Dados adaptados de (GARCIA-CAIRASCO et al., 1996) (IS=índice de gravidade)

Todos os animais WAR que foram utilizados neste trabalho apresentaram índice de gravidade das crises maior ou igual a 0,73 ($IS \geq 0,73$) nos três testes do *screening*. Os ratos Wistar controles utilizados apresentaram $IS=0$, o que indica ausência de qualquer comportamento relacionado a crises (GARCIA-CAIRASCO; SABBATINI, 1983; GARCIA-CAIRASCO et al., 1996).

3.1.1.3. Desenho experimental

Todos os animais envolvidos neste trabalho foram submetidos à estímulo audiogênico aos 70, 74 e 78 dias de idade para triagem e seleção dos grupos. Alguns animais foram re-estimulados uma semana após o *screening* para efeito de experimento conforme será descrito abaixo (Figura 5).

Para realização dos ensaios de ELISA os animais foram divididos em três grupos: Wistar com estímulo audiogênico em 30 minutos, 4 horas e 24 horas antes da eutanásia; WAR com estímulo audiogênico em 30 minutos, 4 horas e 24 horas antes da eutanásia e WAR sem estímulo audiogênico.

Para realização dos ensaios de *Western Blotting* os animais foram divididos em dois grupos: WAR e Wistar. Ambos os grupos foram estimulados apenas durante o *screening* e após uma semana foi realizada a eutanásia dos animais.

Esquema do desenho experimental



Figura 5. Desenho metodológico utilizado nos experimentos.

3.2. Métodos

3.2.1. *Western Blotting*

Para realização do *Western Blotting*, os animais foram sacrificados pelo método de decapitação e imediatamente foram dissecadas as regiões de interesse: córtex, hipocampo e cerebelo. Tais regiões foram imersas em 1,3 mL de tampão de lise e congeladas. Posteriormente, todas as amostras foram processadas com um homogenizador de tecidos e submetidas à centrifugação a 10.000g em 4°C por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubos Eppendorf®, sendo o maior volume do sobrenadante para amostra estoque, armazenada em freezer -80°C, e um menor volume para utilização experimental, armazenada em freezer -20°C. Dessa forma, as amostras aliqüotadas eram submetidas a um baixo ciclo de congelamento-degelo.

Para a quantificação da concentração de proteínas das amostras coletadas foi utilizado o método de Bradford (BRADFORD, 1976). A seguir, foi realizada a eletroforese das mesmas amostras em gel desnaturante de poliácridamida de acordo com Laemmli (LAEMMLI, 1970). O gel de concentração utilizado foi o de 4% de concentração e o gel de separação consistiu em 15 % de concentração, conforme quadro apresentado em seção anterior (Quadro 1).

As amostras de córtex, hipocampo e cerebelo foram preparadas com tampão de amostra para SDS-PAGE e, 50 µg de proteínas de cada amostra, foram aplicadas em canaletas do gel manufaturado, de acordo com as especificações do aparato *Mini-PROTEAN® System* da BIO-RAD. Neste aparato, foram separadas imersas em tampão de corrida sob voltagem ajustada entre 100V a 160V em fonte (*PowerPac™ Universal Power Supply* – BIO-RAD). Nessa etapa foi utilizado o padrão de peso molecular (*SeeBlue® Plus2 Pre-stained Protein Standard, Invitrogen*) para guiar o tempo de corrida.

Ao término da eletroforese foi realizada a transferência das proteínas do gel para uma membrana de nitrocelulose (*Amersham™ Protran™ 0,45µ, GE Healthcare Life Sciences*). Para tal, foi utilizado tampão de transferência e um sanduíche composto de papéis filtro, esponja e a membrana de nitrocelulose. Ao final da transferência, a membrana foi corada com solução de ponceau em agitação constante

para verificação da eficiência do processo de transferência e da qualidade de bandas proteicas.

O experimento de *Western Blotting* foi realizado como descrito por Ribeiro e colaboradores (2010). As membranas foram bloqueadas com leite desnatado a 10% em TBS-Tween 0,5% sob agitação (TS-2000A Shaker, BioMixer) durante 1 hora e, em seguida, incubadas com anticorpo primário anti- β actina (1:2000; MAB1501R, Chemicon®) associado ao anti-NCS-1 (1:2000; FL-190, Santa Cruz Biotechnology) ou anti-DARPP-32 (1:500; H-62, Santa Cruz Biotechnology), em tampão de lavagem por 2 horas. As membranas foram então lavadas três vezes por 7 minutos com tampão de lavagem (TBS-Tween 0,5%).

Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-mouse (1:10000, A10551, Invitrogen) ou anti-rabbit (1:5000; T2191, Invitrogen) conjugado com peroxidase em TBS-Tween 0,5% durante 1h. As membranas foram novamente lavadas três vezes por 7 minutos com TBS-Tween 0,5%.

A detecção dos imunoblots foi realizada pelo processo de quimioluminescência, utilizando o Kit ECL *Plus* (Amersham ECL *Plus Western Blotting Detection Reagents*, RPN2132, GE Healthcare Life Sciences), por 5 minutos. Após a exposição do filme de raio X à luminescência das bandas, este foi submetido a solução reveladora e em seguida a solução fixadora (ambas Kodak Dental Developer) para definição e estabilização da sensibilização do filme de raio X.

Os filmes obtidos da revelação foram escaneados e transferidos para formato digital para análise. Bandas não saturadas de β -actina, NCS-1 e DARPP-32 foram quantificadas por sistema de densitometria óptica utilizando o *Image J Software* (versão 1.44, National Institute of Mental Health). As bandas de NCS-1 e DARPP-32 foram normalizadas pela banda de β -actina correspondente.

3.2.2. ELISA

Os *kits* para realização de ELISA da R&D Systems (DuoSet) foram utilizados para detecção de IL-1 β , IL-6, TNF e BDNF em conformidade com os procedimentos descritos pelo fabricante (DE SOUZA BERNARDINO et al., 2015).

As concentrações das citocinas e do BDNF foram avaliadas no sobrenadante do homogenato das regiões cerebrais (córtex, hipocampo, estriado e colículo inferior) em diluição 1:3 em tampão fosfato:albumina bovina 1%.

Em uma placa de 96 poços foram adicionados 100 μ L de solução contendo PBS 1x e concentração adequada do anticorpo captura específico, que permaneceu em contato com a placa durante 18 horas a 4°C. Posteriormente procedeu-se a lavagem em 4 vezes com tampão de lavagem em um lavador de placas (BioTek™ ELx50™ Microplate Strip Washer).

Logo após a fase de captura, procedeu-se o bloqueio da placa, por 2 horas, com 200 μ L de solução PBS-BSA 1%. Posteriormente foram adicionados os padrões de citocinas em concentrações conhecidas e as amostras, que permaneceram incubados por mais 18h a 4°C.

Mais uma série de lavagem foi realizada e logo após foram adicionados 100 μ L da solução de anticorpo de detecção que permaneceu incubada por mais 2 horas.

Após, nova série de lavagens e foi adicionada à placa uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, a placa foi novamente lavada e foi adicionado o tampão substrato contendo orto-fenilenodiamina e H₂O₂.

A reação foi interrompida com 50 μ L de ácido sulfúrico na concentração de 1M. O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria em leitor de placas de ELISA no comprimento de onda de 490nm (BioTek™ ELx 800™ Absorbance Reader).

3.2.3. Análise estatística

O programa *Graph Pad PRISM* (versão 5 *Graph Pad SoftWARe Inc.*) foi utilizado para as análises estatísticas. A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA). Quando o valor de F foi significativo, comparações post hoc foram feitas pelo teste de *Newman-Keuls*. Diferença entre grupos individuais foi avaliada com teste t de *Student*. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. Resultados

4.1. Avaliação dos níveis de citocinas inflamatórias em animais WAR submetidos a estímulos audiogênicos

4.1.1. Avaliação da expressão de TNF

Comparando a repercussão de um estímulo audiogênico em WAR na expressão de TNF em três intervalos de tempo distintos, obtivemos os seguintes resultados: houve maior expressão de TNF após 4 e 24 horas em comparação a 30 minutos em hipocampo, após 24 horas em comparação a 30 minutos em colículo e nenhuma diferença foi observada em córtex quando os mesmos intervalos temporais foram analisados (Figura 6).

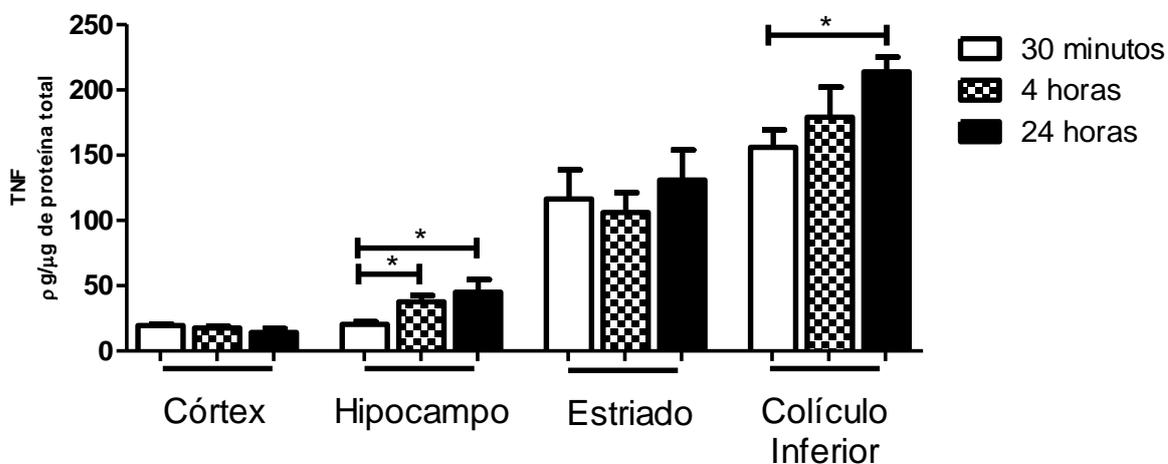


Figura 6: Níveis de TNF em diferentes regiões cerebrais após o estímulo audiogênico em WAR. Resultado expresso em pg de TNF/ μg de proteínas totais. Foram utilizados 7, 6 e 8 ratos para os grupos de 30 minutos, 4 e 24 horas respectivamente [$p < 0,05$ (*)].

Avaliamos também a diferença na expressão de TNF nos intervalos de tempo pós-estímulo dos animais Wistar não susceptíveis ao desenvolvimento de convulsão audiogênica. Observamos que o estímulo sonoro de alta intensidade foi capaz de aumentar o nível de expressão de TNF após 24 horas do estímulo em córtex, estriado e colículo inferior, conforme apresentado em figura abaixo (Figura 7).

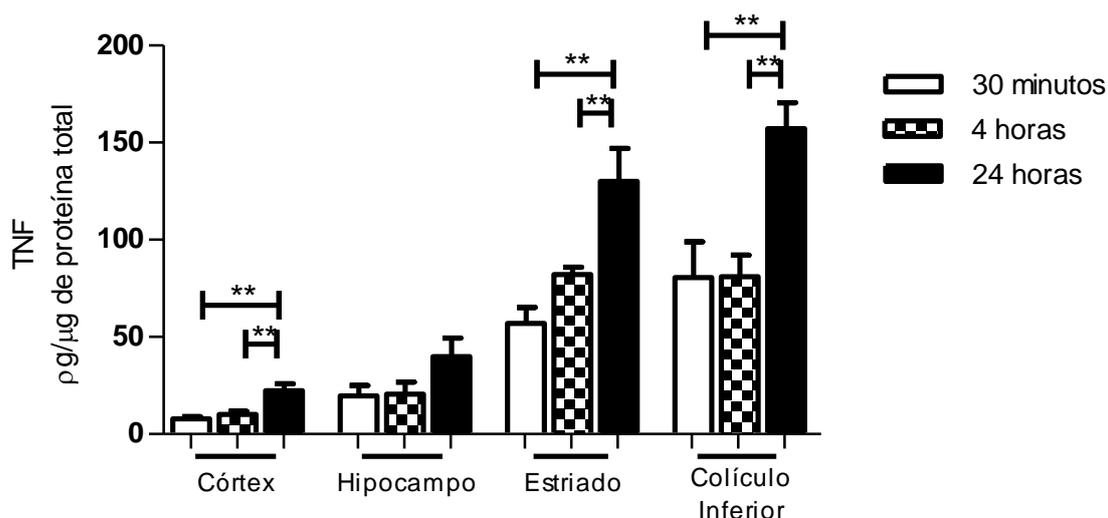


Figura 7: Comparação entre os níveis de TNF em cada região estudada após o estímulo audiogênico em ratos Wistar não susceptíveis à convulsão audiogênica. Resultado expresso em pg de TNF/ μg de proteínas totais. Há maior expressão de TNF em córtex, estriado e colículo inferior 24 horas após o estímulo em comparação com os níveis após 30 minutos e 4 horas. Foram utilizados 4, 5 e 5 ratos para os grupos de 30 minutos, 4 e 24 horas respectivamente [$p < 0,01$ (**)].

De acordo com a análise comparativa entre o efeito da indução audiogênica em animais WAR e em Wistar controles, obtivemos diferenças dos níveis de expressão de TNF em todas as regiões avaliadas. Em colículo inferior, os níveis de TNF foram maiores em 30 minutos, 4 horas e 24 horas; em córtex, os níveis foram maiores em 30 minutos e 4 horas; em hipocampo os níveis foram maiores apenas 4 horas após o estímulo; e, em estriado os níveis foram maiores apenas em 30 minutos (Figura 8).

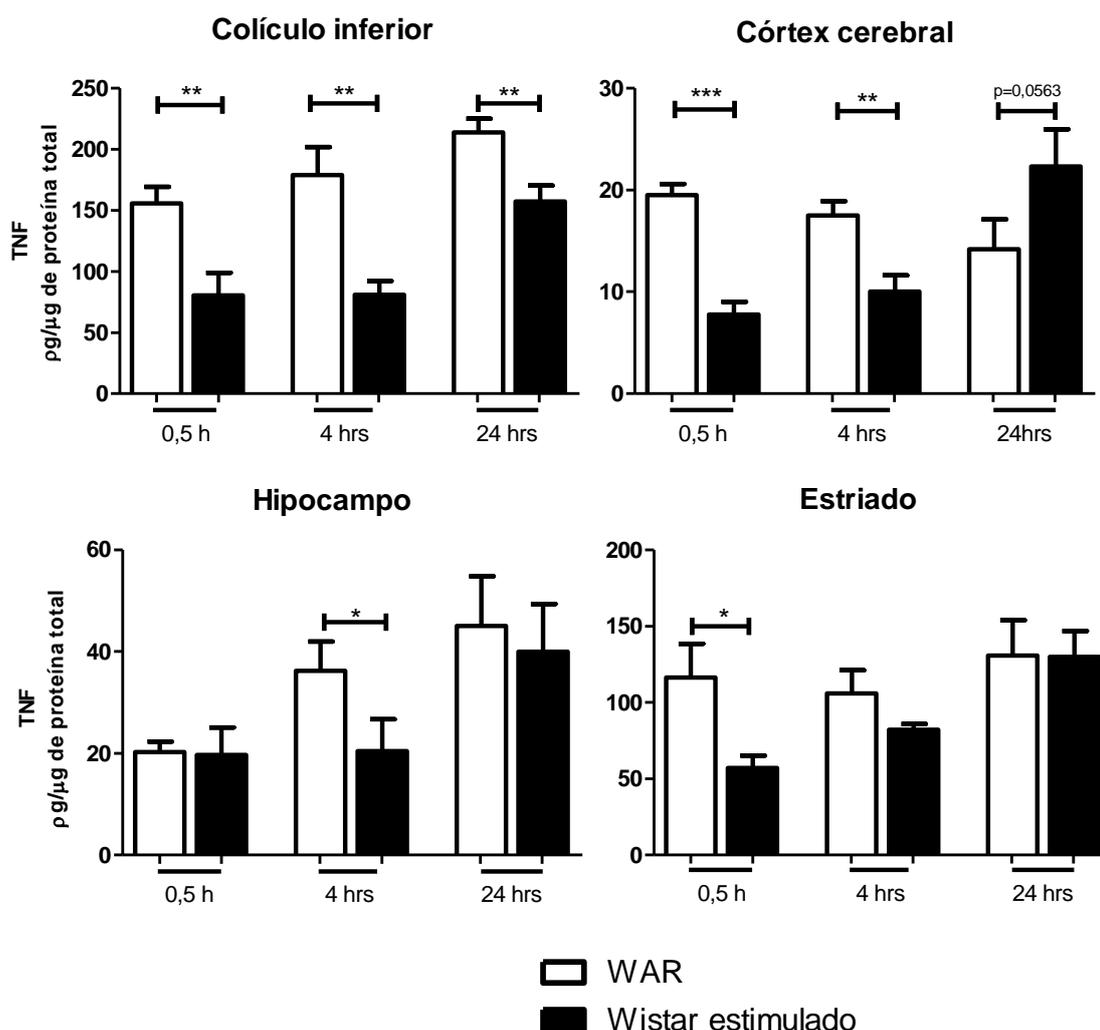


Figura 8: Comparação dos níveis de TNF entre os animais WAR e Wistar não susceptíveis em 30 minutos, 4 horas e 24 horas pós-estimulação. As análises foram feitas em colículo inferior, córtex, hipocampo e estriado. Foram observados níveis maiores na expressão de TNF em todas as regiões dos animais WAR comparados aos animais controles. Resultado expresso em pg de TNF/ μg de proteínas totais. No grupo WAR foram utilizados 7 animais para cada tempo e no grupo Wistar 5 animais [$p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***)].

Obtivemos aumento na expressão de TNF em córtex, colículo inferior e em estriado após 4 horas do estímulo audiogênico induzido em WAR quando comparado aos animais WAR não submetidos ao estímulo; dado apresentado no artigo publicado por nosso grupo (Figura 9) (DE SOUZA BERNARDINO et al., 2015).

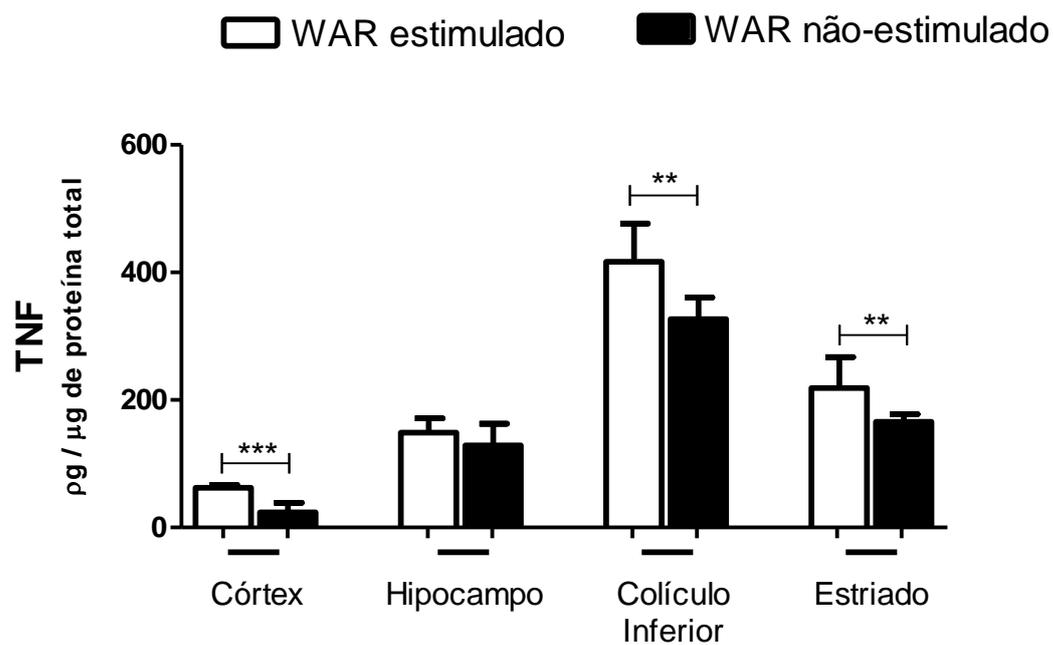


Figura 9: Níveis de TNF em córtex, hipocampo, colículo inferior e estriado 4 horas após o estímulo audiogênico. Foram utilizados 5 ratos WAR estimulados e 6 ratos WAR não estimulados. [$p < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (**)].

4.1.2. Avaliação da expressão de IL-1 β

Comparando a expressão de IL-1 β , em animais WAR submetidos a estímulo audiogênico, não encontramos diferenças estatisticamente relevantes nos intervalos de tempo de 30 minutos, 4 horas e 24 horas (Figura 10).

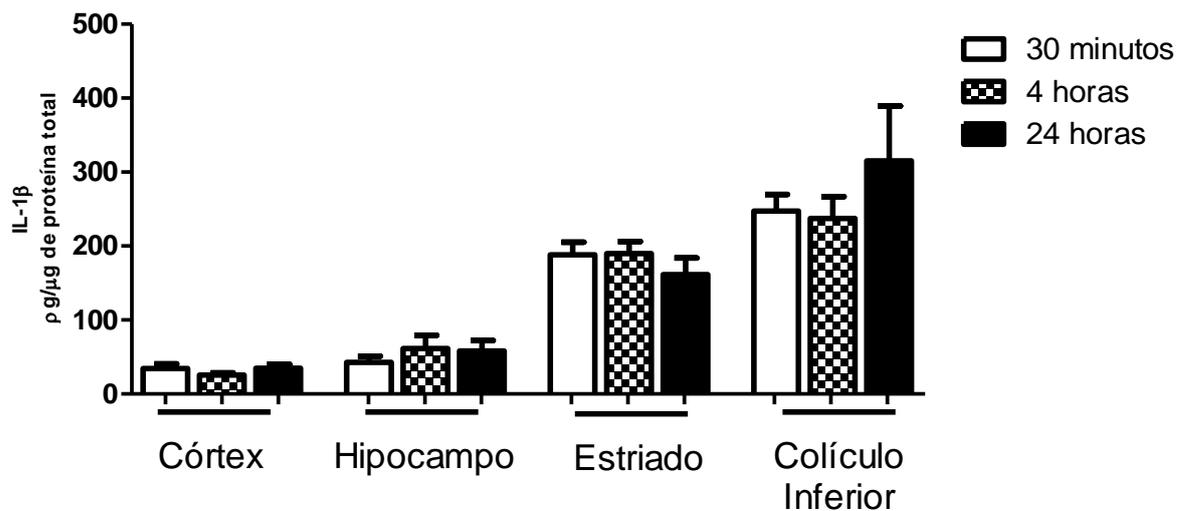


Figura 10: Comparação entre os níveis de IL-1 β em cada região estudada após o estímulo audiogênico em WAR. Resultado expresso em pg de IL-1 β / μg de proteínas totais. Não há diferenças na expressão de IL-1 β entre os tempos avaliados nos 3 tempos. Foram utilizados 7, 6 e 8 ratos para os grupos de 30 minutos, 4 e 24 horas respectivamente.

Avaliamos também a diferença na expressão de IL-1 β nos intervalos de tempo pós-estímulo dos animais Wistar não susceptíveis ao desenvolvimento de convulsão audiogênica. Observamos que o estímulo sonoro de alta intensidade foi capaz de aumentar o nível de expressão de IL-1 β após 24 horas do estímulo em estriado e colículo inferior, conforme apresentado em figura abaixo (Figura 11).

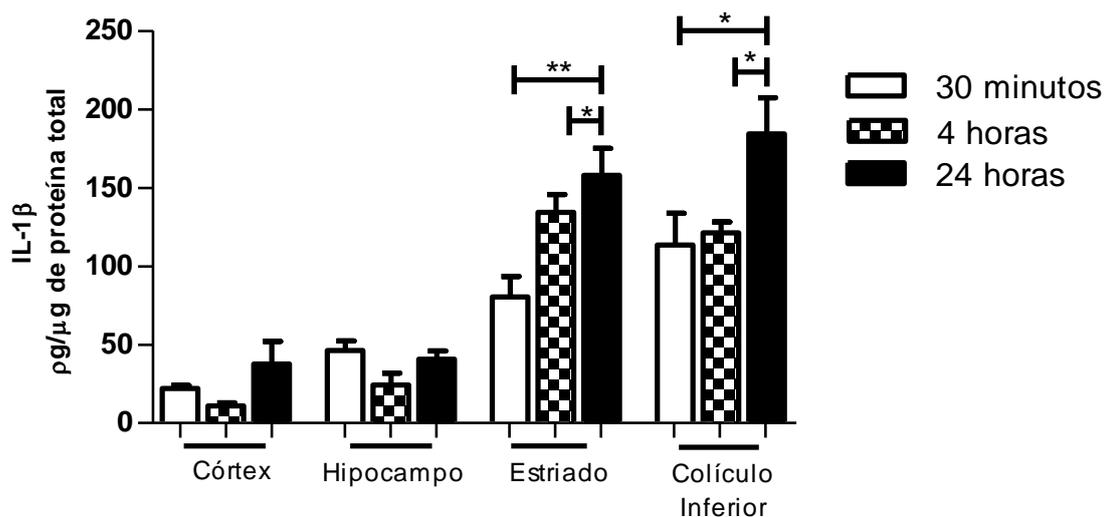


Figura 11: Comparação entre os níveis de IL-1 β em cada região estudada após o estímulo audiogênico em ratos Wistar não susceptíveis à convulsão audiogênica. Resultado expresso em pg de IL-1 β / μ g de proteínas totais. Há maior expressão de IL-1 β em estriado e colículo inferior 24 horas após o estímulo em comparação com os níveis após 30 minutos e 4 horas. Foram utilizados 4, 5 e 5 ratos para os grupos de 30 minutos, 4 e 24 horas respectivamente [$p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)].

Por outro lado, quando comparamos os resultados entre o estímulo de animais WAR com animais Wistar controles, percebemos que houve expressão de maiores níveis de IL-1 β em todas as regiões. Em colículo inferior e em estriado, os valores estavam aumentados após 30 minutos e 4 horas do estímulo. Em hipocampo e em córtex, os níveis estavam aumentados após 4 horas do estímulo, apenas (Figura 12).

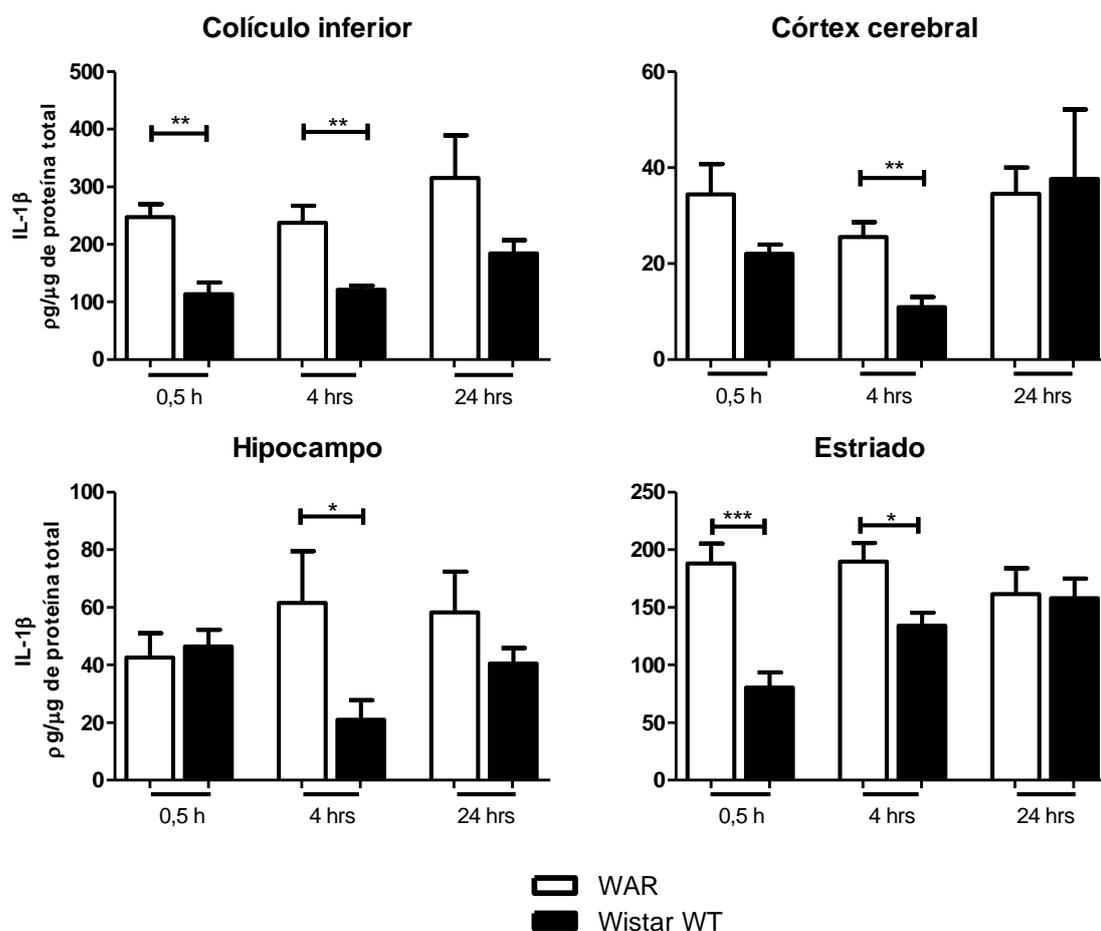


Figura 12: Comparação dos níveis de IL-1 β entre os animais WAR e controles em 30 minutos, 4 horas e 24 horas pós-estimulação. As análises foram feitas em colículo inferior, córtex, hipocampo e estriado. Foram observados aumento na expressão de IL-1 β em todas as regiões dos animais WAR comparados aos animais controles. Resultado expresso em pg de IL-1 β / μ g de proteínas totais. No grupo WAR foram utilizados 7 animais para cada tempo e no grupo Wistar 5 animais [p<0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,001 (***)].

Obtivemos aumento na expressão de IL-1 β em córtex após 4 horas do estímulo audiogênico induzido em WAR quando comparado com animais WAR não submetidos ao estímulo; dado apresentado no artigo publicado por nosso grupo (Figura 13) (DE SOUZA BERNARDINO et al., 2015).

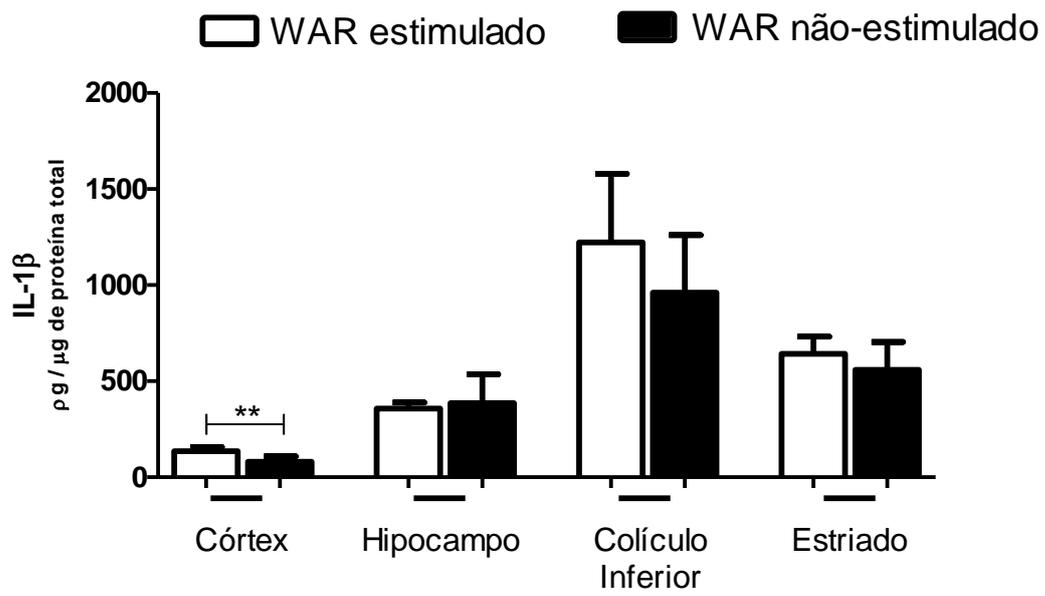


Figura 13: Níveis de IL-1 β em córtex, hipocampo, colículo inferior e estriado 4 horas após o estímulo audiogênico. Foram utilizados 5 ratos WAR estimulados e 6 ratos WAR não estimulados. [$p < 0,01$ (**)].

4.1.3. Avaliação da expressão de IL-6

O estímulo audiogênico não causou aumento na expressão de IL-6 em nenhuma região estudada dos animais WAR comparando níveis após 30 minutos, 4 horas e 24 horas pós estímulo. Porém, houve uma tendência a maior expressão em hipocampo após 4 horas comparado com dados de 30 minutos (Figura 14).

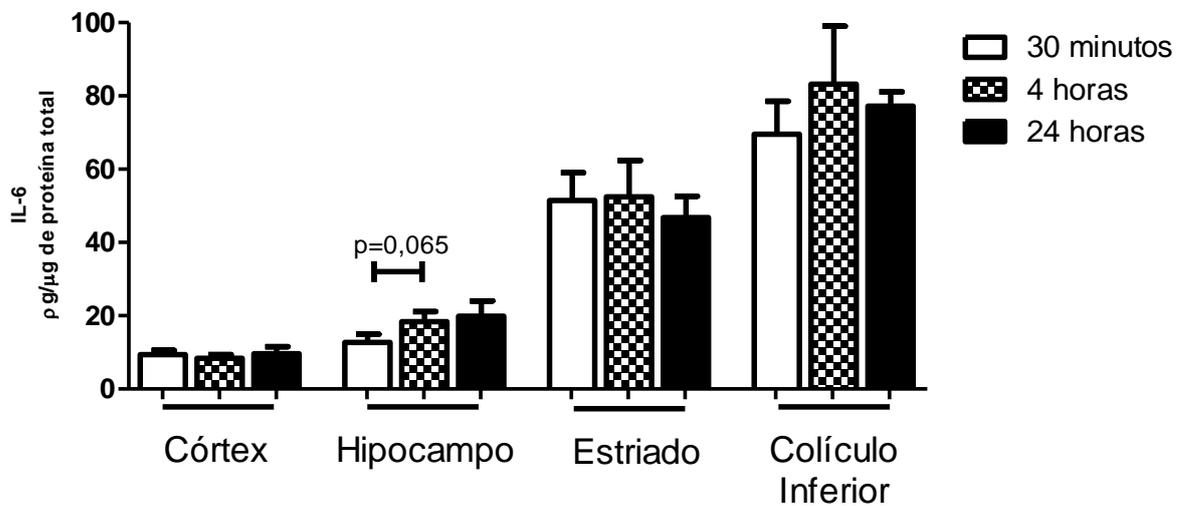


Figura 14: Comparação entre os níveis de IL-6 em cada região estudada após o estímulo audiogênico em WAR. Resultado expresso em μg de IL-6/ μg de proteínas totais. Não há diferenças na expressão de IL-6 entre os tempos avaliados nos 3 tempos. Foram utilizados 7, 6 e 8 ratos para os grupos de 30 minutos, 4 e 24 horas respectivamente.

Avaliamos também a diferença na expressão de IL-6 nos intervalos de tempo pós-estímulo dos animais Wistar não susceptíveis ao desenvolvimento de convulsão audiogênica. Observamos que o estímulo sonoro de alta intensidade não foi capaz de alterar o nível de expressão de IL-6, conforme apresentado em figura abaixo (Figura 15).

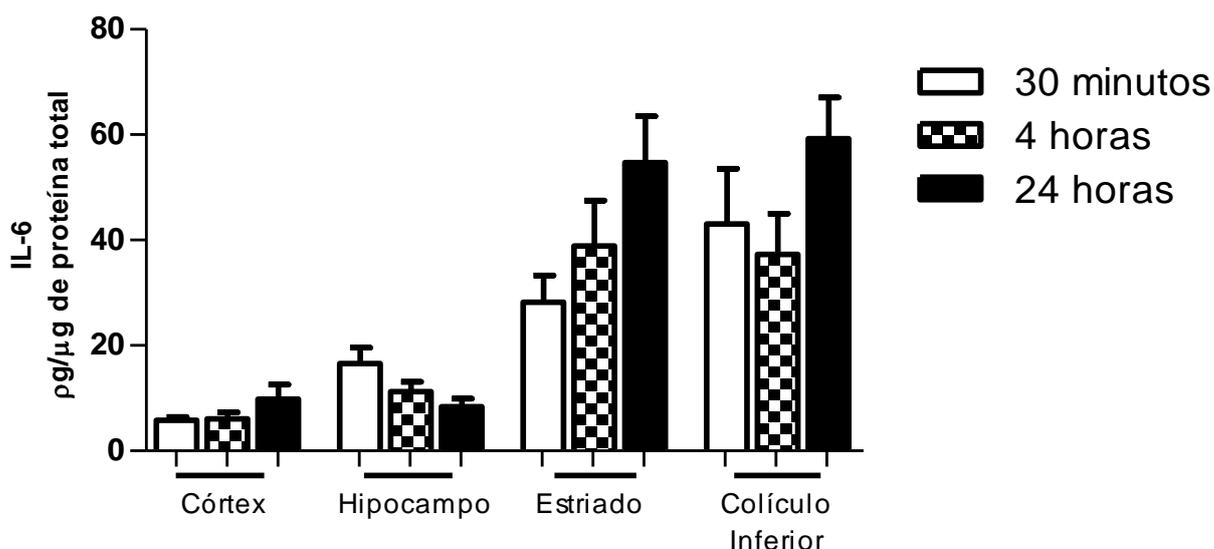


Figura 15: Comparação entre os níveis de IL-6 em cada região estudada após o estímulo audiogênico em ratos Wistar não susceptíveis à convulsão audiogênica. Resultado expresso em pg de IL-6/ μg de proteínas totais. Não há diferenças na expressão de IL-6 nas quatro regiões estudadas nos três intervalos de tempo. Foram utilizados 4, 5 e 5 ratos para os grupos de 30 minutos, 4 e 24 horas respectivamente.

Dados comparativos entre WAR e Wistar controles mostram que o estímulo audiogênico foi capaz de induzir expressão de IL-6 de forma mais expressiva em WARs em todas as regiões, conforme apresentado adiante. Em colículo inferior, houve maior expressão nos níveis em 30 minutos, 4 horas e 24 horas; houve maior expressão em córtex e estriado em 30 minutos e 24 horas. Em hipocampo houve maior expressão após 4 horas do estímulo e houve tendência a maior expressão após 30 minutos (Figura 16).

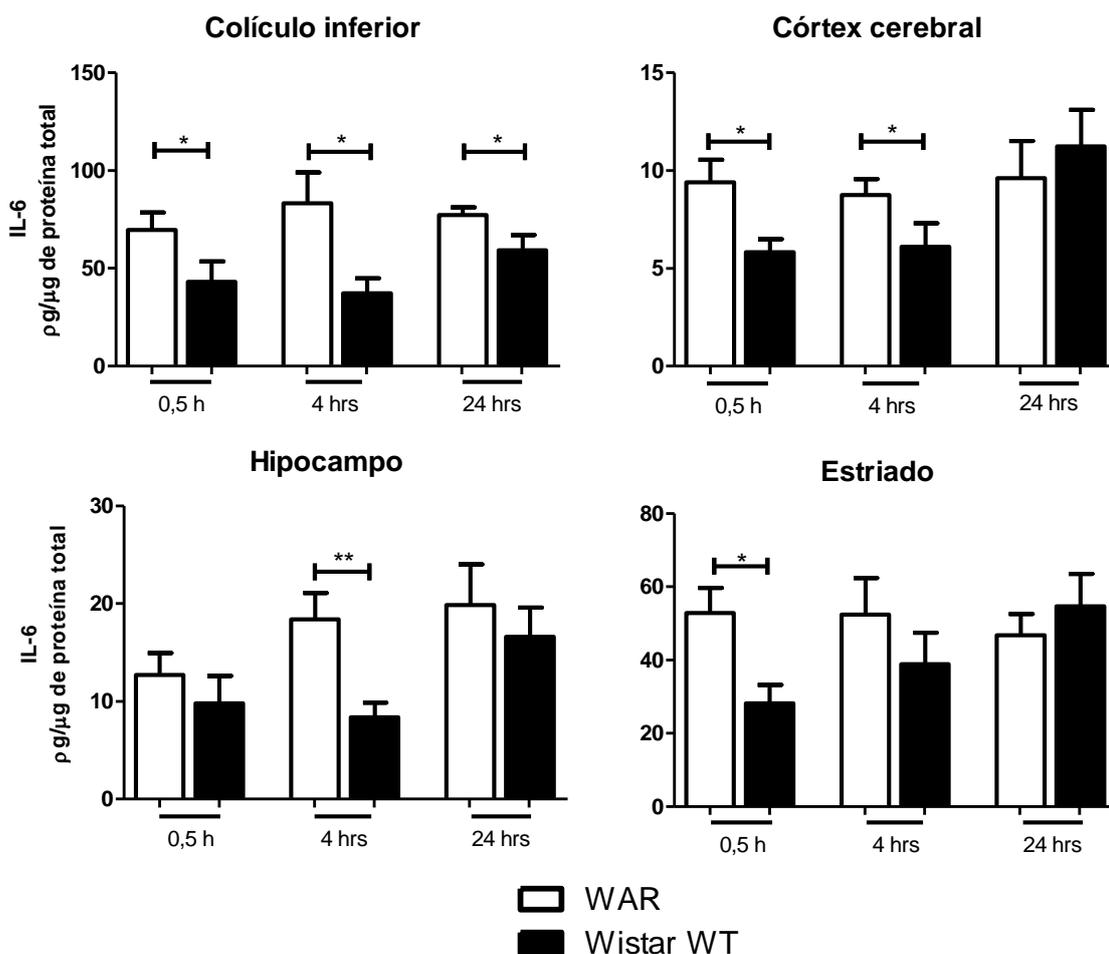


Figura 16: Comparação dos níveis de IL-6 entre os animais WAR e controles em 30 minutos, 4 horas e 24 horas pós-estimulação. As análises foram feitas em colículo inferior, córtex, hipocampo e estriado. Foram observados aumento na expressão de IL-6 em todas as regiões dos animais WAR comparados aos animais controles. Resultado expresso em pg de IL-6/ μg de proteínas totais. No grupo WAR foram utilizados 7 animais para cada tempo e no grupo Wistar 5 animais [$p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)].

Obtivemos maior expressão de IL-6 em córtex e em estriado após 4 horas do estímulo audiogênico induzido em WAR quando comparado com animais WAR não submetidos ao estímulo; dado apresentado no artigo publicado por nosso grupo (Figura 17) (DE SOUZA BERNARDINO et al., 2015).

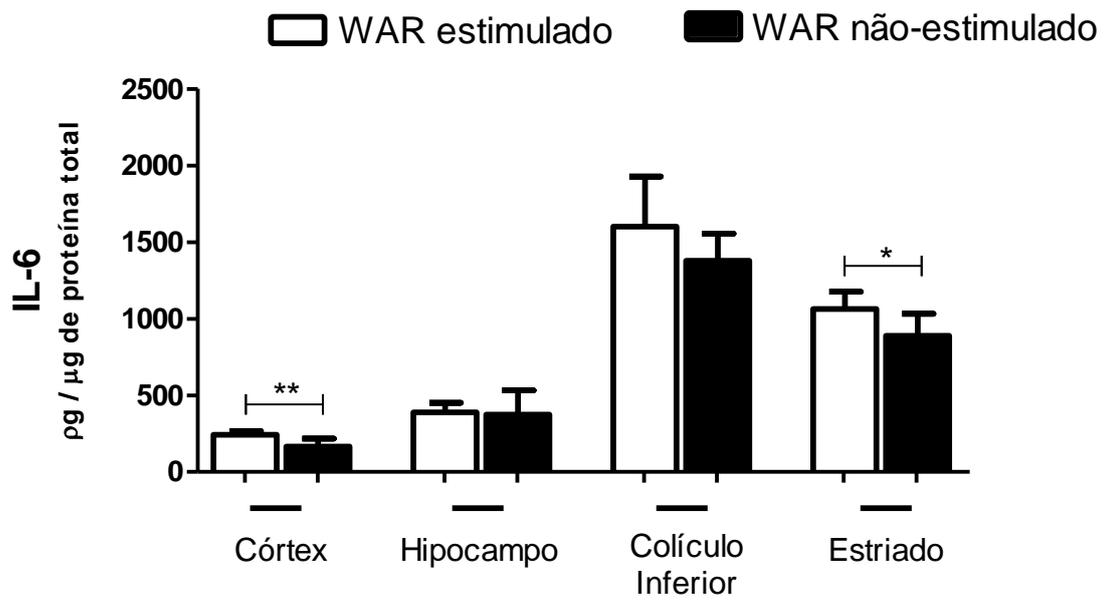


Figura 17: Níveis de IL-6 em córtex, hipocampo, colículo inferior e estriado 4 horas após o estímulo audiogênico. Foram utilizados 5 ratos WAR estimulados e 6 ratos WAR não estimulados [$p < 0,01$ (**), $p < 0,05$ (*)].

4.2. Avaliação da expressão de NCS-1 e de DARPP-32

A análise da expressão de NCS-1 revelou que nos WARs o nível dessa proteína encontrava-se aumentado em hipocampo em relação aos Wistar não audiogênicos, mas não foram observadas diferenças em córtex e cerebelo (Figura 18).

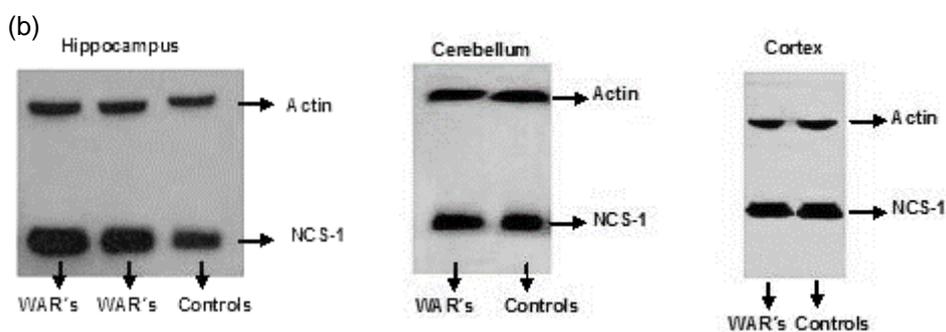
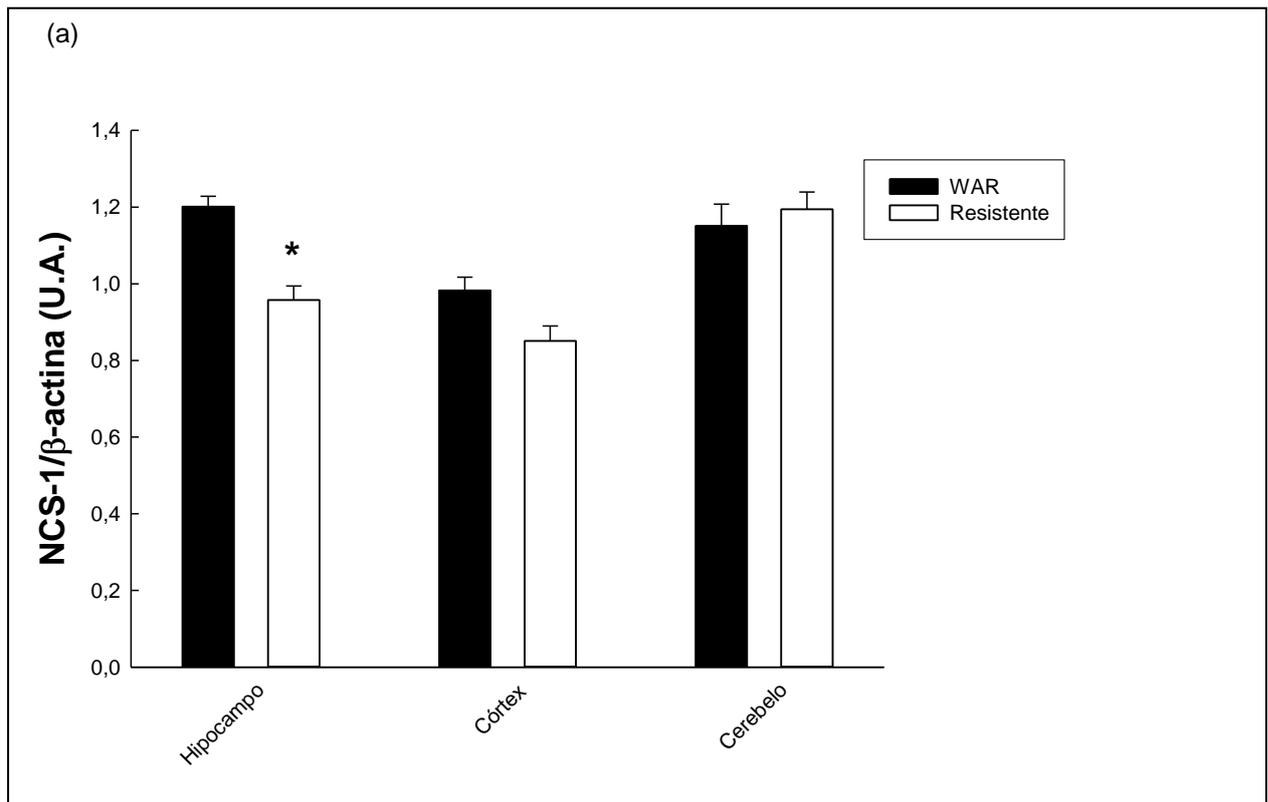


Figura 18: Expressão de NCS-1 no cerebelo, córtex e hipocampo de ratos Wistar controles e de ratos WAR. (a) Análise densitométrica dos Western Blots. Os níveis de NCS-1 foram normalizados pela expressão da proteína estrutural, a actina 42kDa. (b) Amostras dos filmes de Western Blots referente às análises dos níveis de NCS-1 em hipocampo, córtex e cerebelo dos ratos WARs e controles. Experimentos em triplicata. Foram utilizados 5 animais WAR e 3 Wistar não susceptível à convulsão audiogênica [$p < 0,05$ (*)].

Os níveis de DARPP-32 foram avaliados após 1 semana do *screening* e, os WARs apresentaram elevação no nível de DARPP-32 em hipocampo, menor expressão em cerebelo e nenhuma diferença em córtex (Figura 19).

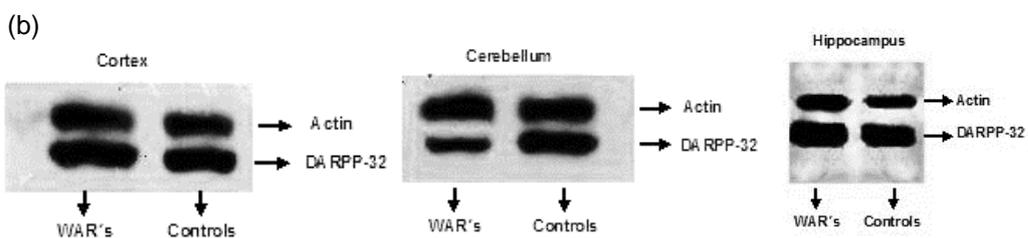
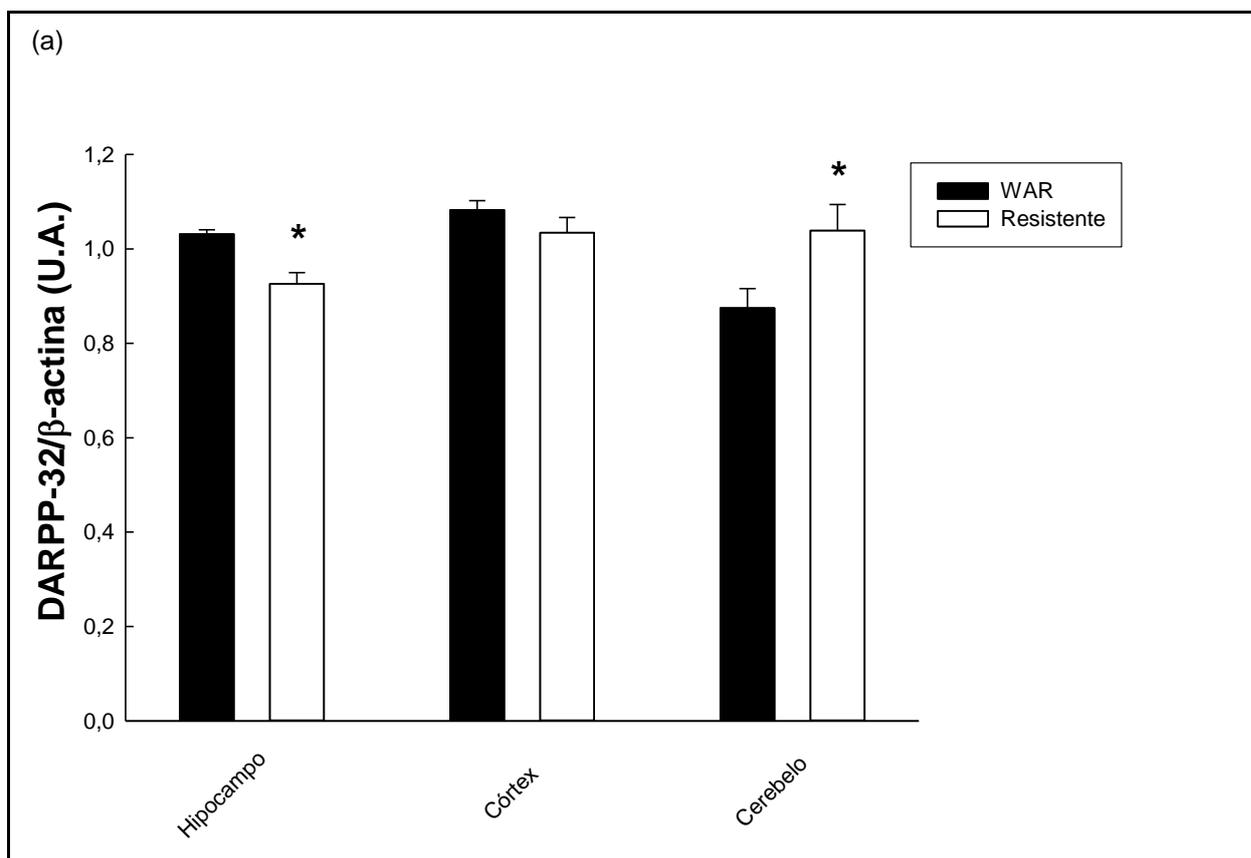


Figura 19: Expressão de DARPP-32 no cerebelo, córtex e hipocampo de ratos Wistar controles e de ratos WAR. (a) Análise densitométrica dos Western Blots. Os níveis de DARPP-32 foram normalizados pela expressão da proteína estrutural, a actina 42kDa. (b) Amostras dos filmes de Western Blots referente às análises dos níveis de DARPP-32 em hipocampo, córtex e cerebelo dos ratos WARs e controles Experimentos em triplicata. Foram utilizados 5 animais WAR e 3 Wistar não susceptível à convulsão audiogênica [$p < 0,05$ (*)].

4.3. Avaliação da expressão de BDNF

Avaliamos a repercussão do estímulo audiogênico na expressão de BDNF em três análises distintas. Após um estímulo audiogênico, induzido uma semana após o *screening*, comparamos os níveis de BDNF nos animais WAR passados 30 minutos, 4 e 24 horas pós crise. Houve redução da expressão de BDNF no estriado no tempo de 24 horas, comparado ao grupo de 4 horas; não foram encontradas diferenças estatisticamente relevantes nessa análise para as regiões estudadas (Figura 20).

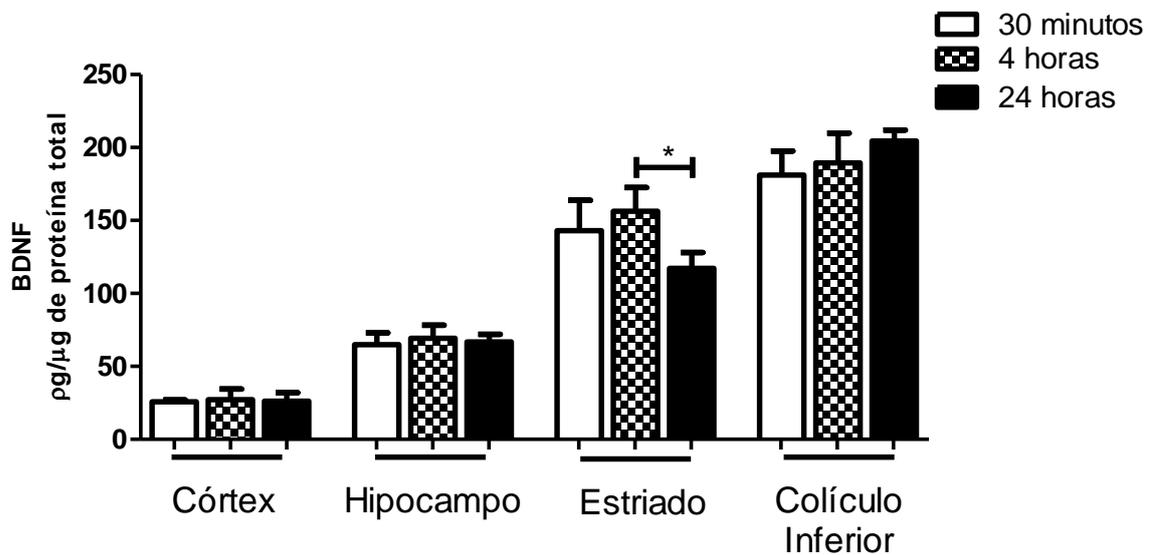


Figura 20: Comparação entre os níveis de BDNF em cada região estudada após o estímulo audiogênico em WAR. Resultado expresso em pg de BDNF/ μg de proteínas totais. Há redução na expressão de BDNF em estriado em 24 horas pós estímulo comparado com 4 horas. Foram utilizados 7, 6 e 8 ratos para os grupos de 30 minutos, 4 e 24 horas respectivamente [$p < 0,05$ (*)].

Avaliamos também a diferença na expressão de BDNF nos intervalos de tempo pós-estímulo dos animais Wistar não susceptíveis ao desenvolvimento de convulsão audiogênica. Observamos que o estímulo sonoro de alta intensidade foi capaz de aumentar o nível de expressão de BDNF após 24 horas do estímulo em córtex, hipocampo, estriado e colículo inferior, conforme apresentado em figura abaixo (Figura 21).

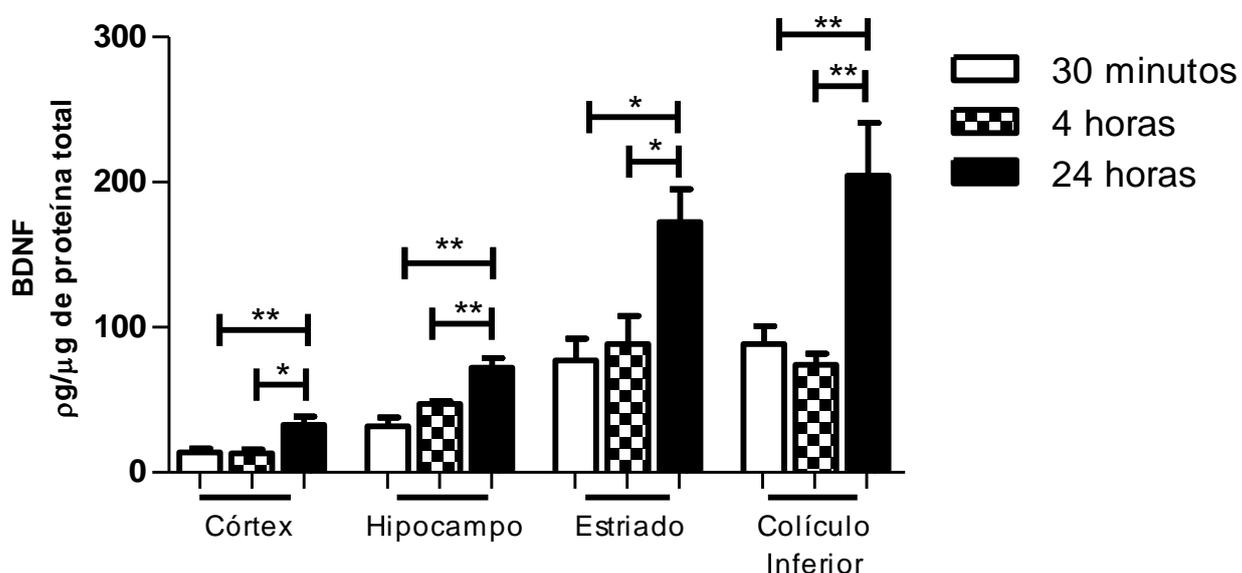


Figura 21: Comparação entre os níveis de BDNF em cada região estudada após o estímulo audiogênico em ratos Wistar não susceptíveis à convulsão audiogênica. Resultado expresso em pg de BDNF/ μg de proteínas totais. Há maior expressão de BDNF todas as quatro regiões estudadas 24 horas após o estímulo em comparação com os níveis após 30 minutos e 4 horas. Foram utilizados 4, 5 e 5 ratos para os grupos de 30 minutos, 4 e 24 horas respectivamente [$p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**)].

Um estímulo audiogênico, realizado uma semana após o *screening*, resultou em diferenças dos níveis de BDNF nos animais WAR e em animais Wistar não susceptíveis à convulsão audiogênica. Houve maior expressão de BDNF em todas as regiões estudadas dos animais WAR em relação aos Wistar controles. Em colículo inferior e em hipocampo, os níveis de BDNF permaneceram elevados por pelo menos 4 horas nos animais WAR em relação aos Wistar controles. Em córtex, houve maior expressão de tal fator neurotrófico apenas 30 minutos pós-estímulo, com tendência a diferença em 4 horas após estímulo. E em estriado, os níveis encontraram elevados por pelo menos 30 minutos nos animais WAR e houve inversão do padrão em 24

horas, sendo níveis maiores encontrados nos animais Wistar controles (Figura 22). Em todas as regiões percebe-se certa manutenção dos níveis dos animais WAR nos períodos avaliados com gradativo aumento dos níveis dos animais Wistar.

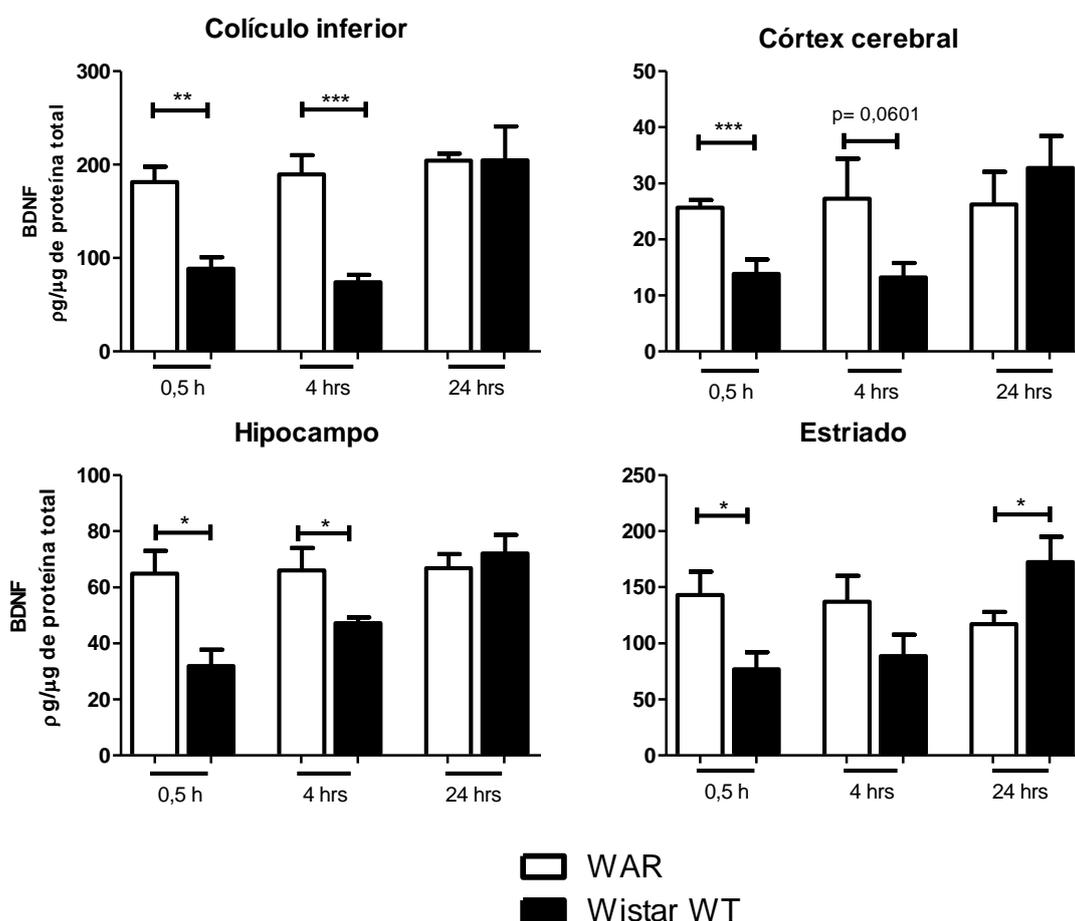


Figura 22: Comparação dos níveis de BDNF entre os animais WAR e controles em 30 minutos, 4 horas e 24 horas pós-estimulação. As análises foram feitas em colículo inferior, córtex, hipocampo e estriado. Foram observados aumento na expressão de BDNF em todas as regiões dos animais WAR comparados aos animais controles. Resultado expresso em pg de BDNF/ μg de proteínas totais. No grupo WAR foram utilizados 7 animais para cada tempo e no grupo Wistar 5 animais [p<0,05 (*), p<0,01 (**), p<0,001 (***)].

Comparando animais WAR submetidos a um estímulo convulsivo audiogênico a WAR não submetidos a um estímulo adicional, além do *screening*, obtivemos resultado de aumento na expressão de BDNF em córtex após 4 horas da indução da crise. Tal resultado encontra-se publicado no artigo do nosso grupo de pesquisa (Figura 23) (DE SOUZA BERNARDINO et al., 2015)

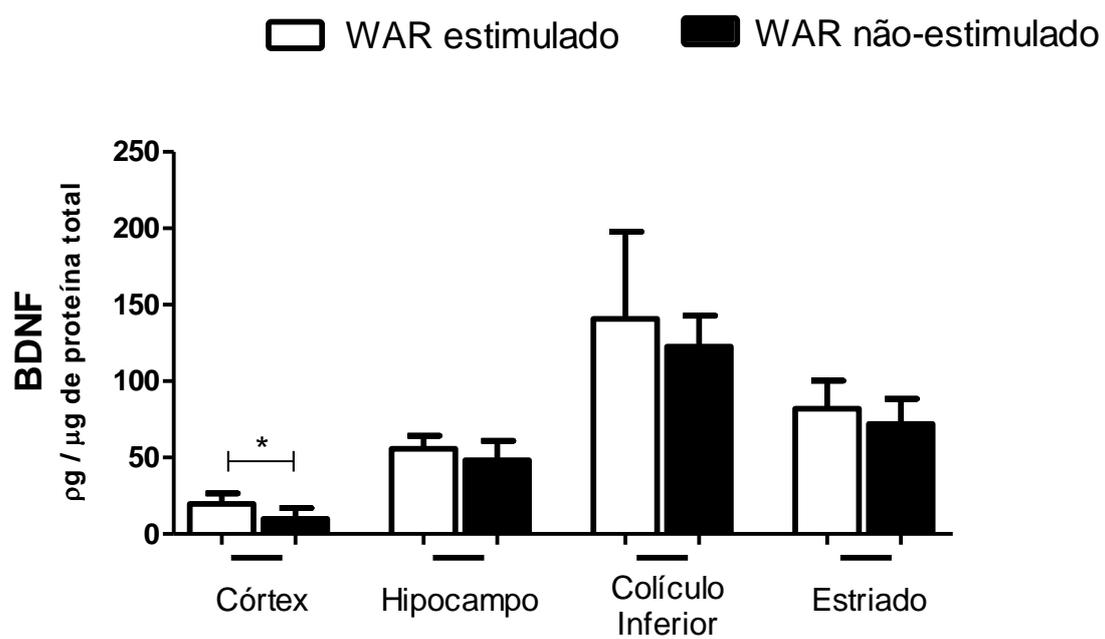


Figura 23: Níveis de BDNF em córtex, hipocampo, colículo inferior e estriado 4 horas após o estímulo audiogênico. Foram utilizados 5 ratos WAR estimulados e 6 ratos WAR não estimulados [$p < 0,05$ (*)].

5. Discussão

Os resultados obtidos endossam a hipótese investigada pelo trabalho. De fato, o estímulo audiogênico é capaz de alterar a expressão das citocinas e de BDNF nos animais WAR comparados aos Wistar não-audiogênicos. Além disso, as proteínas de neuromodulação encontravam-se com expressão alterada mesmo após uma semana do estímulo audiogênico nos animais WAR. A avaliação e a discussão pormenorizada destes resultados serão abordadas detalhadamente nos itens específicos subsequentes.

5.1. Citocinas inflamatórias

A neuroinflamação, investigada cada vez mais nas doenças neuropsiquiátricas, como em depressão, comprometimento cognitivo e Doença de Alzheimer, representam uma repercussão das células gliais no funcionamento neuronal (DE OLIVEIRA et al., 2015; SANKOWSKI; MADER; VALDES-FERRER, 2015; SINGHAL et al., 2014). Conforme já foi apresentado, a ativação das células gliais representam o gatilho para a produção das citocinas inflamatórias por essas células (RAVIZZA et al., 2005; RIZZI et al., 2003).

A participação das citocinas inflamatórias nas doenças neuropsiquiátricas, incluindo a epilepsia e convulsão, ainda não é totalmente esclarecida. Da mesma forma que o insulto neuronal resulta, em geral, em aumento na produção das citocinas inflamatórias, o aumento na atividade das citocinas, seja por modelos animais de superexpressão, seja por injeção de agonista do receptor das citocinas ou da própria citocina resulta em manifestação de características que mimetizam as doenças neurológicas (BRITES; FERNANDES, 2015; CHOI; KOH, 2008; PIZZA et al., 2011; SANDU et al., 2015; ULUDAG et al., 2013).

A encefalite de Rasmussen e a convulsão febril representam duas, dentre diversas, condições clínicas que resultam em neuroinflamação e possuem como intercorrência ou desfecho comum a susceptibilidade ao desenvolvimento de

convulsões (VEZZANI et al., 2016). Traumas e tumores que afetam o SNC, bem como as diversas infecções do SNC e dos outros sistemas podem atuar como um gatilho e/ou facilitador para o desencadeamento de atividades elétricas desordenadas e resultar em convulsões (RIAZI et al., 2008; VEZZANI et al., 2016).

É reconhecido o papel anticonvulsivo dos medicamentos anti-inflamatórios em humanos e em modelos animais (CITRARO et al., 2015; HABERLANDT et al., 2010; VEZZANI, 2015). Sabe-se que a administração de anti-inflamatórios não esteroidais é capaz de reduzir a gravidade das crises convulsivas induzidas por eletrochoque em ratos e induzidas tanto por estímulo audiogênico único quanto por estímulo após *kindling* em WAR (DORETTO et al., 1998).

Dessa forma, a neuroinflamação assume um papel indissociável com a atividade neuronal na hiperexcitabilidade vista nos eventos convulsivos. Dentre as diversas citocinas, o TNF, a IL-1 β e a IL-6 merecem destaque pela recorrência nos estudos que abordam a hiperexcitabilidade das epilepsias e, por isso, foi objeto de estudo por nosso grupo.

Apesar de ser muito bem descrito o envolvimento das citocinas inflamatórias nas epilepsias e convulsões, poucos estudos foram realizados nos modelos animais audiogênicos para avaliar a neuroinflamação. Considerando os animais da linhagem WAR, apenas um estudo é identificado na literatura para tratar deste assunto. Diante disso, é salutar reconhecer, não só as diferenças de metodologia e delineamento experimental, como também as particularidades fisiopatológicas existentes entre os diversos modelos animais.

Nesse ponto, vale ressaltar que os animais WAR, utilizados neste trabalho, foram submetidos aos estímulos audiogênicos com 70, 74 e 78 dias de vida para realização da triagem dos animais susceptíveis ao estímulo audiogênico. Os estímulos para os ensaios experimentais foram realizados com intervalo de uma semana contados a partir do último estímulo audiogênico do *screening*, isto é, com 85 dias de vida, conforme descrito na sessão de metodologia.

Dessa forma, é coerente entender que os estímulos realizados para o *screening* são rigorosamente idênticos àqueles realizados para desencadear a crise convulsiva experimental. E, portanto, a repercussão bioquímica referente aos estímulos audiogênicos induzidos durante o *screening* são capazes de interferir na resposta bioquímica avaliada no estímulo experimental, realizado uma semana após o *screening*.

Em um trabalho realizado para avaliação da susceptibilidade dos ratos WAR a outros estímulos pró-convulsivos, os autores preferiram utilizar WAR *naive* de estímulos sonoros, justamente para evitar o fenômeno de facilitação das crises convulsivas e recrutamento límbico, que são progressivamente induzidos pelos estímulos audiogênicos (SCARLATELLI-LIMA et al., 2003). Porém, sabe-se que por se tratar de um modelo genético de epilepsia, nem todos os animais provenientes do cruzamento entre ratos da linhagem WAR apresentam a característica fenotípica de ser susceptível aos estímulos sonoros.

Assim, os dados obtidos, relativos a expressão das citocinas inflamatórias apresentados neste trabalho, devem ser analisados considerando essa particularidade do modelo animal WAR. De forma semelhante, essa consideração deve ser expandida para as análises referentes aos dados de expressão de NCS-1, DARPP-32 e BDNF.

5.1.1. TNF

O TNF é uma citocina pró-inflamatória muito bem descrita no envolvimento em condições que apresentam resposta inflamatória aumentada e, nos últimos anos, o papel do TNF na modulação da atividade neuronal tem se tornado cada vez mais evidente (BALOSSO et al., 2013).

O envolvimento do TNF na hiperexcitabilidade das redes neuronais tem sido cada vez mais bem elucidado. Atualmente, sabemos que após um estímulo convulsivo a produção de TNF é feita não só pelas células gliais, como astrócito e micróglia, como também pelo endotélio vascular cerebral (DE SIMONI et al., 2000; TURRIN; RIVEST, 2004)

A ação do TNF na modulação sináptica é mediada tanto pela ativação direta dos seus receptores no neurônio, quanto pela atuação indireta nos neurônios desencadeada pela ativação dos seus receptores em células gliais (SCHAFERS; SORKIN, 2008).

A sinalização do TNF no SNC é mediada através de sua ligação com dois receptores, o receptor TNFR1 (receptor p55) e o TNFR2 (receptor p75) (BALOSSO et al., 2005). Esses receptores quando ativados desempenham funções antagônicas na hiperexcitabilidade. Ao passo que a ativação do receptor TNFR1 assume uma atividade pró-convulsiva, o receptor TNFR2 desempenha um papel anticonvulsivo (WEINBERG; BLAKE; MCCOWN, 2013).

A ativação do receptor TNFR1 resulta em modulação da atividade de vários alvos celulares. Tal receptor ativado resulta em ampliação do influxo de íons Ca^{2+} , via ativação de PI3K e AKT mediada por receptores do tipo AMPA; resulta também na ativação de receptores do tipo NMDA e na atividade da glutaminase, enzima chave na síntese de glutamato. A endocitose do receptor $GABA_A$ é resultado da ativação do TNFR1, o que repercute na redução das correntes inibitórias. Todas essas ações mediadas pelo receptor TNFR1 resultam em aumento na susceptibilidade à convulsão (para revisão consultar (IORI; FRIGERIO; VEZZANI, 2016)).

Por outro lado, a ação do receptor TNFR2 é exatamente oposta. A ativação de tais receptores resulta em redução da resposta ao glutamato e consequentemente

redução da susceptibilidade à convulsão. O receptor TNFR2 modula negativamente a atividade dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos: AMPA, NMDA e KA (IORI et al., 2016).

Diante das funções exercidas pelo TNF na hiperexcitabilidade das redes neuronais, torna-se relevante endossar a relação entre tal citocina e modelos de epilepsia através de resultados apresentados na literatura. Diversos trabalhos associam TNF à atividade epileptiforme em modelos animais e em humanos e, dessa forma, é salutar apresentá-los para que os resultados que obtivemos sejam contextualizados.

Riazi e colaboradores (2008) induziram inflamação periférica em ratos com intuito de avaliar a susceptibilidade ao PTZ e a neuroinflamação associada. Obtiveram como resultado maior susceptibilidade à crise convulsiva induzida pelo PTZ e ativação microglial com conseqüente produção de TNF. A administração de anticorpo anti-TNF resultou em inibição da maior susceptibilidade à convulsão induzida pelo PTZ. Além disso, a micro-injeção intraventricular crônica de TNF em animais virgens de tratamento resultou em aumento de susceptibilidade à convulsão induzida pelo PTZ de forma semelhante à observada na inflamação periférica (RIAZI et al., 2008).

Tal resultado representa uma evidência robusta da importância da ativação glial e da produção de TNF no contexto da hiperexcitabilidade vista na epilepsia. Sabe-se também que, em culturas de neurônios hipocâmpais de rato, há aumento na produção de TNF com a adição, de forma individual, de glutamato, de ácido caínico, de AMPA e de NMDA (DE BOCK; DORNAND; RONDOUIN, 1996).

Convulsões límbicas são capazes de ampliar a expressão de RNAm para TNF, que atingem o pico de expressão em 6 horas após o evento convulsivo e retornando ao nível basal em três dias (DE SIMONI et al., 2000; LEHTIMAKI et al., 2003). A indução de crises límbicas por adição de ácido caínico na região da amígdala de ratos, resulta em um aumento significativo de receptores TNFR1 e uma concomitante redução dos receptores TNFR2 (WEINBERG et al., 2013).

É importante considerar também que dois dias após a indução de SE em ratos, através da injeção hipocâmpal de ácido caínico, há um aumento significativo dos níveis de TNF nas fatias hipocâmpais, que persiste por, no mínimo, 7 dias (DE BOCK et al., 1996).

Nos animais WAR, obtivemos de fato, aumento na expressão de TNF a partir de 4 horas após a indução da crise audiogênica em hipocampo, resultado que persistiu pelo menos até 24 horas pós estímulo. Em colículo inferior, o aumento dos níveis de TNF só foram observados a partir de 24 horas do estímulo. Nas demais regiões não houve aumento de expressão em níveis significativos até 24 horas pós estímulo (Figura 1).

Esses resultados são coincidentes com aqueles descritos na literatura. Os animais expressam níveis aumentados de TNF após a indução das crises convulsivas e isso ocorre mesmo em modelos genéticos, como os WARs. Para endossar esse fato, avaliamos a repercussão que um estímulo audiogênico tem sobre a expressão de TNF em WAR quando comparado com animais WAR não submetidos ao estímulo. Obtivemos aumento na expressão de TNF em córtex, colículo inferior e em estriado após 4 horas da indução convulsiva audiogênica nos animais submetidos ao estímulo (DE SOUZA BERNARDINO et al., 2015).

O resultado comparativo com os animais Wistar não susceptíveis aos estímulos audiogênicos evidenciou que os animais WAR apresentam expressão elevada de TNF em todas as regiões estudadas após o estímulo audiogênico. A expressão de TNF ocorre, de maneira mais intensa nos animais WAR, já com 30 minutos pós indução audiogênica em colículo inferior, córtex e estriado (Figura 2).

Esse resultado nos remete a uma análise em relação aos testes de triagem realizados em WAR, isso porque, a indução de crise convulsiva nos animais WAR durante o *screening* pode, também, representar estímulo capaz de propiciar a elevação dos níveis proteicos de TNF. Tal análise é coerente diante da persistência de níveis elevados de TNF por pelo menos uma semana pós estímulo, conforme apresentado por de Bock e colaboradores (1996) (DE BOCK et al., 1996).

Outro ponto que merece destaque é a persistência de níveis de TNF elevados por pelo menos 24 horas na região do colículo inferior, que é a região crucial para ocorrência do estímulo audiogênico. Provavelmente, nesta região, a hiperexcitabilidade ao estímulo audiogênico, vista nos animais WAR, está associada intrinsecamente à neuroinflamação e aumento nos níveis de TNF.

Outro dado interessante é a repercussão dos estímulos audiogênicos naqueles ratos que não tinham tendência à convulsão audiogênica. Nesses animais houve um

progressivo aumento na expressão de TNF em praticamente todas as regiões estudadas. Após 24 horas do estímulo audiogênico houve aumento dos níveis de TNF em córtex, estriado e colículo inferior (Figura 3).

A repercussão do estímulo sonoro observada nos ratos não susceptíveis à convulsão audiogênica é coerente diante de dados da literatura. Alguns estudos apresentam alterações na atividade e funcionamento hipocampal de animais submetidos a estímulos sonoros repetitivos ou estímulo sonoro traumático (CUNHA et al., 2015; GOBLE; MOLLER; THOMPSON, 2009). Sabe-se que o estímulo sonoro de alta intensidade e de curta duração é capaz de causar lesão neuronal irreversível por desequilíbrio metabólico (KOJIMA; MATSUMOTO; ITO, 2007).

Além disso, ratos submetidos a estímulos sonoro de alta intensidade por 4 horas apresentam atividade neuronal espontânea, com redução de limiar de excitação e hiperexcitabilidade em algumas regiões do SNC (ZHANG; KALTENBACH, 1998).

Dessa forma, não representa surpresa o aumento na expressão de citocinas inflamatórias em ratos Wistar não susceptíveis à crise convulsiva audiogênica após 4 estímulos sonoros de elevada intensidade, sendo que três desses estímulos foram realizados durante o *screening* e um estímulo para análise experimental.

Diferentemente dos animais WAR, os animais não susceptíveis atingiram níveis máximos em 24 horas pós-estímulo, fato que coincide com a cinética de produção proteica descrita na maioria dos trabalhos já descritos. Curioso é que, em córtex às 24 horas pós estímulo, há uma tendência dos níveis de TNF serem maiores nos animais Wistar comparado aos WAR.

Dada a pouca quantidade de estudos abordando essa linhagem genética de animais, a caracterização da expressão proteica de TNF neste modelo é extremamente relevante. Assim como em outros modelos animais, a expressão de TNF encontra-se elevada em todas as regiões estudadas já com 24 horas pós estímulo nos animais WAR. Tal citocina é capaz de fazer parte do arsenal bioquímico envolvido nas crises audiogênicas deste modelo animal.

5.1.2. IL-1 β

A IL-1 β é outra citocina pró-inflamatória com atividade relevante na epilepsia e é membro da família da IL-1, que tem como outros componentes a IL-1 α , o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) e o receptor de IL-1 (IL-1R) (YOUN; SUNG; LEE, 2013).

Dentre os membros da família da IL-1, os mais estudados em contexto de convulsão e epilepsia são a IL-1 β , como efetora das ações, o receptor IL-1R1 e o IL-1Ra. A IL-1 α é uma proteína predominantemente associada à membrana celular, não sendo extensivamente secretada como a IL-1 β , isso faz da IL-1 α ser um membro da família da IL-1 consideravelmente menos estudada que os demais (LI et al., 2011; YOUN et al., 2013).

Constitutivamente, a IL-1 β é muito pouco expressa no SNC, porém, a indução de crise convulsiva resulta em aumento dos níveis de IL-1 β , IL-1Ra e IL-1R1 em vários modelos animais e em pessoas epiléticas (ULUDAG et al., 2015; YOUN et al., 2013).

O IL-1Ra atua como um antagonista do receptor IL-1 do tipo 1 (IL-1R1), limitando a ação da IL-1 β sobre o IL-1R1 e, por causa disso assume funções opostas às aquelas desempenhadas pela IL-1 β nas redes neuronais (LI et al., 2011).

A ação desencadeada pela interação IL-1 β /IL-1R1 ocorre sobre vários alvos celulares e resulta em potencialização da excitabilidade da rede neuronal. Um alvo extremamente relevante para desempenhar tal função são os receptores NMDA que contém a subunidade NR2B. A ativação de IL-1R1 resulta em ativação da Src-quinase que fosforila a subunidade NR2B do receptor NMDA. Este receptor glutamatérgico ativado, permite o influxo de íons Ca²⁺, ampliando a excitabilidade e susceptibilidade ao desenvolvimento de convulsão (IORI et al., 2016).

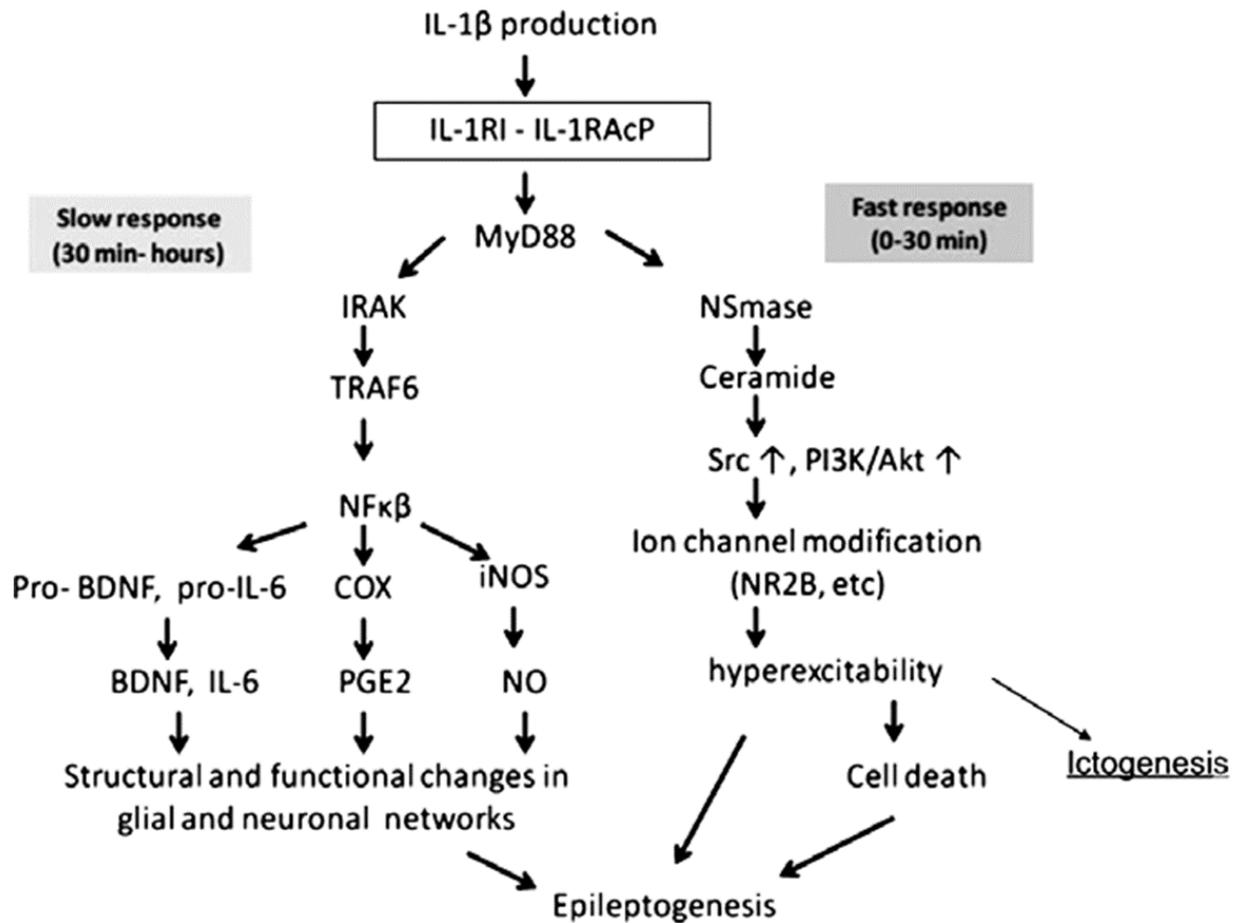


Figura 24. Desenho esquemático representando os dois padrões de resposta desencadeados através da interação IL-1 β /IL-1R1. Figura retirada da referência Vezzani, 2008.

O receptor IL-1R1 está co-localizado e encontra-se fisicamente associado à subunidade NR2B do receptor NMDA em neurônios hipocâmpais pós-sinápticos de rato. A estimulação do receptor NMDA resulta em aumento da interação entre o IL-1R1 e a sub-unidade NR2B. Tal associação é fundamental para resultar na fosforilação dessa sub-unidade desencadeada pela interação IL-1 β /IL-1R1 (VEZZANI; VIVIANI, 2014).

Sabe-se também que a atividade da interação IL-1 β /IL-1R1 resulta em níveis aumentados de glutamato na fenda sináptica, não só por estimular a liberação de glutamato pelas células da glia ou via NMDA neuronal, como também por inibir a recaptação de glutamato pela glia. Ambas ações resultam também em redução do limiar excitatório (IORI et al., 2016).

Outra ação desencadeada pela ativação do receptor IL-1R1 é a redução da atividade do receptor GABA_A, que favorece a redução das correntes inibitórias GABAérgicas e a consequente ampliação da excitação neuronal (IORI et al., 2016).

O resultado da interação IL-1 β /IL-1R1 é claramente pró-convulsivo por resultar na ativação de vias excitatórias e na redução da atividade das vias inibitórias, conforme explicitado acima. O antagonismo exercido pelo IL-1Ra sobre as ações da IL-1 β tem função protetora da hiperexcitabilidade. Os modelos animais são importantes para constatar a participação desses membros da família da IL-1 na convulsão e ajudar compreender como de fato atuam.

A administração intra-hipocampal de IL-1 β em animais tratados com ácido caínico resulta em piora e prolongamento da atividade convulsiva (VEZZANI et al., 1999). De forma oposta, a administração de algumas doses intra-hipocampais de IL-1Ra reduz significativamente a atividade epileptiforme induzida pela administração de ácido caínico (VEZZANI et al., 1999), porém, o efeito somente ocorre na presença do receptor IL-1 do tipo 1. Isso porque em animais que não expressam tal receptor, a injeção de IL-1Ra não é capaz de interferir na susceptibilidade à crise convulsiva (VEZZANI et al., 2002).

Minami e colaboradores (1991) apresentaram um dos primeiros trabalhos que verificou a produção de citocinas inflamatórias após crise convulsiva. Neste estudo, os níveis de RNAm para IL-1 β , IL-6 e TNF estavam elevados após algumas horas do estímulo com ácido caínico em diversas regiões do SNC de ratos. Segundo Minami e colaboradores (1991) após 2 horas da administração de ácido caínico em ratos, os níveis de IL-1 β encontram-se marcadamente aumentados em córtex cerebral, tálamo, hipotálamo e, a IL-1 β foi pouco expressa em outras regiões como o hipocampo. Apesar de elevados, esses níveis aumentados não se sustentam por mais de 4 horas após a administração do agente pró-convulsivo (MINAMI; KURAISHI; SATOH, 1991).

O aumento na expressão de RNAm para IL-1 β após as crises convulsivas através da indução com ácido caínico ou PTZ foi endossado por outros grupos anos depois dos primeiros trabalhos (JANKOWSKY; PATTERSON, 2001; LEE et al., 2012; VEZZANI et al., 1999). O aumento da expressão de IL-1 β é rápido, atingindo o pico em uma hora e meia após a injeção (JANKOWSKY; PATTERSON, 2001).

Um fato relevante associado à produção dos componentes da família da IL-1 deve ser considerado para as convulsões. Sabe-se que a inflamação periférica induz a produção concomitante de IL-1 β e de IL-1Ra pelo SNC e que o IL-1Ra é produzido em níveis muito superiores comparados a IL-1 β . Dessa forma, a ação da IL-1 β sobre o receptor IL-1R1 é rapidamente bloqueada. Por outro lado, após a crise convulsiva, há uma grande produção de IL-1 β não concomitante com a produção de IL-1Ra, que ocorre em menor quantidade e algumas horas após a convulsão (VEZZANI; BARAM, 2007).

É importante considerar a curva de expressão, obtida através da relação entre os níveis de expressão em função o tempo após o estímulo convulsivo, de IL-1 β e do antagonista do receptor IL-1R1. Em 2005, Vezzani e colaboradores apresentaram uma curva de expressão de RNAm para IL-1 β e para IL-1Ra em hipocampo de ratos após indução elétrica de SE (VEZZANI; GRANATA, 2005). Dentre os dados apresentados, os níveis de RNAm para IL-1 β mantiveram elevados no período compreendido entre as 2 horas pós estimulação elétrica até 60 dias pós estímulo, alcançando o pico de expressão 6 horas após o estímulo elétrico hipocampal (DE SIMONI et al., 2000).

A indução de *kindling*, através da estimulação elétrica via eletrodos na amígdala de ratos, resulta em ampliação dos níveis de transcrito de IL-1 β em 2 horas após o estímulo, mas não após 3 semanas do estímulo (PLATA-SALAMAN et al., 2000). O receptor IL-1R1 apresenta mesmo padrão de expressão ao descrito para IL-1 β . Tal fato, é uma evidencia que reforça o *turnover* celular existente após a produção de IL-1 β desencadeada pelo insulto celular.

Um estudo conduzido por Pereira e colaboradores (2008) tinha como objetivo avaliar diferença na expressão de IL-1 β entre animais WAR submetidos ao *kindling* audiogênico ou submetidos a uma indução audiogênica apenas. Não foram divulgados no trabalho o tempo decorrente entre a última crise convulsiva e a eutanásia dos animais, nem se os animais foram submetidos ao *screening*. No entanto, os dados apresentados neste trabalho apontam para ausência de diferenças na expressão de IL-1 β entre tais grupos (PEREIRA et al., 2008).

Obtivemos um resultado bastante semelhante ao descrito por Pereira e colaboradores (2008), apesar da diferença de delineamento experimental. Avaliando

o nível de expressão de IL-1 β após indução de convulsão audiogênica em animais WAR, não houve diferença entre os animais sacrificados em 30 minutos, 4 e 24 horas (Figura 4).

Avaliamos também os níveis de IL-1 β entre WAR submetidos à convulsão audiogênica e WAR não estimulados. Percebemos que após 4 horas do estímulo convulsivo, houve aumento na expressão de IL-1 β apenas em córtex (DE SOUZA BERNARDINO et al., 2015).

Porém, ao comparar os níveis de expressão de IL-1 β dos animais WAR em relação aos animais Wistar não susceptíveis à convulsão audiogênica, percebemos que há maior quantidade de IL-1 β após 4 horas dos estímulos nas quatro regiões estudadas, sendo que em cóliculo inferior e em estriado esse aumento pôde ser observado já com 30 minutos pós indução da crise (Figura 5).

Desse modo, a indução de crise audiogênica garante um aumento na expressão de IL-1 β nos animais WAR, conforme seria esperado comparando com os resultados descritos na literatura. Diante disso, pode-se concluir que há alteração nos níveis de tradução proteica para IL-1 β nos animais WAR.

O fato de não ter sido observadas diferenças entre os intervalos de tempo pós crise nos animais WAR, nos suscita, ao menos algumas hipóteses: 1) A indução de crise convulsiva audiogênica em WAR resulta em aumento nos níveis de IL-1 β em picos diferentes daqueles descritos na literatura para outros modelos animais; 2) A realização do *screening* para triagem dos animais WAR altera o padrão de expressão das citocinas no estímulo adicional, realizado uma semana após os testes de triagem; 3) A indução de crise convulsiva audiogênica é capaz de modular as respostas desencadeadas pela interação da IL-1 β com seu receptor, com aumento de sinalização celular apesar de níveis semelhantes da citocina.

Essas hipóteses levantadas merecem investigações adicionais para que sejam endossadas ou refutadas. As duas primeiras hipóteses têm como base a diferença fisiopatológica e metodológica consistente entre os modelos de epilepsia e convulsão mais frequentemente utilizados na literatura, induzidos por drogas, e os modelos audiogênicos.

Um estudo para investigar a expressão de IL-1 α em modelos de convulsão audiogênica em camundongo revelou que os níveis de expressão de RNAm para essa citocina apresentam uma curva de expressão em padrão diferente do observado em outros modelos de convulsão. Não só o tempo de expressão da IL-1 α é diferente nos modelos audiogênicos avaliados, como também, a topografia onde ocorre a expressão da citocina. Enquanto nos modelos audiogênicos a expressão de IL-1 α em hipocampo não foi observada, na maioria dos outros modelos de convulsão o hipocampo é uma das regiões com maior expressão das citocinas inflamatórias como a IL-1 α (GAHRING et al., 1997).

A luz dos dados obtidos, percebemos que, não foram observadas diferenças ao comparar os níveis de IL-1 β nos animais WAR nos períodos avaliados, mas os resultados entre WAR e Wistar revelam perda de diferença estatística entre esses grupos em 24 horas pós estímulo (Figura 4 e 5). Tal resultado é semelhante ao aumento dos níveis de TNF nos animais Wistar após o estímulo, conforme já abordado. Diante disso, é importante caracterizar qual a repercussão de um estímulo sonoro de elevada intensidade em animais sadios nos níveis de expressão de IL-1 β .

Avaliamos esses níveis e percebemos que a indução dos estímulos audiogênicos em Wistar não susceptível resultou em aumento nos níveis de IL-1 β em estriado e em colículo inferior 24 horas após o estímulo, em comparação com os níveis após 30 minutos e 4 horas (Figura 6).

Diante de todos esses dados apresentados, percebe-se que de fato existem vias fisiopatológicas distintas que sustentam a apresentação de convulsão entre o modelo animal utilizado em nosso trabalho e os demais modelos para estudo de epilepsia. Além disso, há necessidade de estudos adicionais para compreender o efeito do estímulo sonoro de alta intensidade na lesão neuronal e neuroinflamação, até mesmo na sua relação com as vias de sinalização das citocinas inflamatórias. Conforme aventado por nosso grupo, a hipótese de modulação das vias de sinalização de IL-1 β após o estímulo audiogênico é plausível, mas necessita de investigação adicional.

A importância deste trabalho consiste exatamente na proposta de caracterizar a neuroinflamação induzida no modelo WAR após o estímulo audiogênico.

A participação da IL-1 β nos eventos convulsivos é bem marcante e, provavelmente, desempenha uma função essencial na hiperexcitabilidade das redes neuronais do foco epiléptico. Além das funções intrínsecas atribuídas à IL-1 β , sabe-se que essa citocina é capaz de alterar a expressão de outras citocinas e fatores neurotróficos, tais como TNF, IL-6 e BDNF. Ao passo que a IL-1 β regula a expressão de dessas outras citocinas positivamente, a atuação sobre os níveis de BDNF é negativa (SCHOBITZ; DE KLOET; HOLSBOER, 1994; VEZZANI et al., 1999; VEZZANI et al., 2002).

Outro efeito bem documentado da ação da IL-1 β sobre o BDNF é a supressão da neuroproteção realizada por essa neurotrofina, fato que favorece a neurodegeneração em neurônios submetidos a insulto, como é visto na convulsão. IL-1 β afeta algumas vias de sinalização celular ativadas pelo BDNF, provavelmente, a principal delas é a da MAP quinase, e, dessa forma, é capaz de modular a neuroplasticidade orquestrada pelo BDNF (TONG et al., 2008; TONG et al., 2012)

5.1.3. IL-6

Assim como as demais proteínas já apresentadas neste trabalho, a IL-6 é uma citocina inflamatória que merece destaque na neuroinflamação associada a convulsão.

Tal citocina é majoritariamente produzida por astrócitos e micróglia, mas pode ser produzida por neurônios sob injúria ou durante atividade neuronal robusta. A produção de IL-6 por astrócitos e neurônios pode ser induzida por diversos fatores, dentre eles a IL-1 β , conforme já mencionado neste trabalho (GRUOL, 2015).

Além da IL-1 β , TNF é capaz de induzir a produção de IL-6 em neurônios corticais e em astrócitos (BENVENISTE et al., 1990). A ativação de vias de transdução de sinal que envolvem NF κ B, PKC, PKA-AMPC também induzem produção de IL-6 pelos astrócitos (NORRIS et al., 1994).

IL-6 exerce seus efeitos no SNC através da interação com seu receptor multi-subunidades. Este receptor é constituído de duas subunidades: o IL-6R α , porção específica à IL-6, e a glicoproteína 130 (gp130), porção inespecífica. A sinalização celular é desencadeada através da interação entre dois complexos IL-6/IL-6R α e dois gp130 (GRUOL, 2015).

A cascata de sinalização celular desencadeada pela interação IL-6/IL-6R α /gp130 resulta em ativação de algumas proteínas quinases como a JAK, a RAS/MAPK e a PI3K (GRUOL, 2015). Além dessas proteínas quinases, a sinalização desencadeada pela IL-6 é capaz de ativar o STAT3, um fator de transdução e transcrição ativo em neurônios (GRUOL, 2015).

O evento convulsivo é capaz de estimular a expressão de IL-6 tanto em modelos animais quanto em epilepsia humana. Já foi demonstrado que a indução de crise convulsiva em rato utilizando a administração intraperitoneal de ácido caínico é capaz de aumentar a expressão de RNAm para IL-6 em diversas regiões do SNC (MINAMI et al., 1991).

A administração de ácido caínico conforme realizado por Minami e colaboradores (1991) foi capaz de aumentar RNAm em hipocampo após duas horas do estímulo. Em córtex, hipocampo, tálamo e hipotálamo o aumento nos níveis de

RNA_m para IL-6 foi intenso após 4 horas do estímulo; houve aumento moderado nos níveis de IL-6 em estriado nesse mesmo tempo (MINAMI et al., 1991).

Em pacientes epiléticos que não apresentavam crises convulsivas, por pelo menos 3 dias, e tinham como doença de base a ELT e epilepsia extra temporal, os níveis plasmáticos de IL-6 encontravam-se elevados comparados aos pacientes controles (ULUDAG et al., 2015). Em outro estudo, foi verificado que os níveis plasmáticos de IL-6 de pacientes com ELT e epilepsia do lobo extra temporal atingem o pico de expressão em 12 horas pós-ictal e, estes níveis são estatisticamente maiores do que os níveis basais destes mesmos pacientes (ULUDAG et al., 2013). Dessa forma, percebe-se que em humanos com epilepsia, os níveis de IL-6 são maiores não só após o estímulo convulsivo, como também, no período inter-ictal basal.

De forma semelhante, àquela vista por Uludag e colaboradores (2013, 2015), Peltola e colaboradores (2000) haviam descrito que os níveis de IL-6 se encontravam elevados em plasma de pacientes epiléticos que desenvolveram crise convulsiva recente e, além disso, encontraram níveis ainda maiores de IL-6 no líquido destes pacientes comparados aos controles (PELTOLA et al., 2000).

Os experimentos em modelos animais com superexpressão ou *knockout* para IL-6 ou com administração de substâncias que interferem no *pool* de IL-6, como IL-6 exógena ou anticorpos anti-IL-6, são extremamente representativos para explicitar as ações da IL-6 na hiperexcitabilidade neural. Alguns desses trabalhos merecem ser destacados para contextualizar os dados obtidos por nosso grupo.

Camundongos que super expressam a IL-6 no SNC apresentam convulsões espontâneas, aumento na excitabilidade hipocampal e maior susceptibilidade às convulsões induzidas por glutamato (KALUEFF et al., 2004). O modelo animal que super expressa IL-6 associado a atividade de astrócitos (camundongo GFAP-IL-6) apresenta hiperexcitabilidade conforme descrito, porém, o camundongo NSE-IL-6, que expressa IL-6 mediante a atividade neuronal, não apresenta convulsões espontâneas (GRUOL, 2015). Segundo Gruol (2015), maiores estudos se fazem necessários para compreender as diferenças entre esses dois modelos animais para superexpressão de IL-6.

Outros trabalhos reforçam as características hiperexcitatórias do modelo GFAP-IL-6, ressaltando não só a importância da IL-6 na excitabilidade como também da relevante ação astrocitária nesse contexto (CAMPBELL, 1998; STEFFENSEN; CAMPBELL; HENRIKSEN, 1994)

Outra forma de induzir o efeito da sobrecarga de IL-6 no fenômeno da hiperexcitabilidade é a administração de IL-6 exógena. A administração intranasal de IL-6 humana em ratos aumenta a susceptibilidade desses animais à crise convulsiva induzida pelo PTZ (KALUEFF et al., 2004). Além disso, a administração de IL-6 é capaz de induzir hiperexcitabilidade mediada por canais para Na⁺ em tecido neural de rato (VEZZANI; VIVIANI, 2015).

A administração crônica de IL-6 em cultura de neurônios hipocámpais de ratos é capaz de reduzir a expressão do receptor metabotrópico mGLUR2/3, responsável por realizar regulação negativa da neurotransmissão glutamatérgica (VEREYKEN et al., 2007).

Da mesma forma que a superexpressão de IL-6 resulta em hiperexcitabilidade e maior susceptibilidade ao evento convulsivo, a ausência de expressão também resulta em hiperexcitabilidade, conforme visto em animais *knockout* para IL-6. Os camundongos *knockout* para IL-6 apresentam susceptibilidade aumentada para crises convulsivas induzidas por ácido caínico, NMDA, AMPA, PTZ entre outras drogas pró-convulsivas (DE SARRO et al., 2004; PENKOWA et al., 2001)

A dualidade de funções vista em modelos de convulsão e epilepsia pela IL-6 também é verificada em outros fenômenos do SNC. Por exemplo, a IL-6 pode assumir tanto funções neuroprotetoras quanto neurotóxicas. Nos animais GFAP-IL-6, há uma progressiva neurodegeneração em diversas regiões cerebrais que resulta em ataxia, tremores, deficiência em aprendizado e hiperexcitabilidade hipocámpal (CAMPBELL, 1998).

Em contrapartida, D'Arcangelo e colaboradores (2000) demonstraram uma função neuroprotetora de IL-6 atuando na inibição da liberação de glutamato e na inibição da dispersão da excitabilidade neuronal *in vitro* (D'ARCANGELO et al., 2000). Além disso, em modelo animal com deficiência na produção de IL-6, a administração de ácido caínico resultou em aumento do estresse oxidativo e neurodegeneração no hipocampo destes animais, com aumento da mortalidade dos animais deficientes de IL-6 (PENKOWA et al., 2001).

Jean Harry e colaboradores (2003) avaliaram a resposta do anticorpo anti-IL-6 em camundongos submetidos à crise convulsiva induzida por TMT. A administração de anti-IL-6 resultou em aumento significativo da lesão neuronal aguda causada por TMT. O resultado da administração do anticorpo anti-IL-6 na lesão neuronal foi maior

do que o observado para o anticorpo anti-IL-1 β e anti-TNF (JEAN HARRY; BRUCCOLERI; LEFEBVRE D'HELLEN COURT, 2003).

Existe necessidade de compreender melhor a ação de IL-6 nas redes neurais submetidas a diversos insultos distintos. Apesar da ação da IL-6 em neuroproteção, atuando contra a excitotoxicidade glutamatérgica (D'ARCANGELO et al., 2000), sabe-se que a IL-6 apresenta capacidade de interferir potencializando convulsões induzidas via excitação da via glutamatérgica, mas não naquelas que tem como substrato principal a via colinérgica (SAMLAND et al., 2003).

Diante disso, percebe-se que é importante avaliar os efeitos de IL-6 individualmente em cada modelo animal. Nesse ponto, nosso trabalho procura apresentar alguns dados sobre a expressão de IL-6 nos animais WAR, procurando compreender a repercussão da expressão de IL-6 na convulsão audiogênica.

A indução de uma crise convulsiva audiogênica nos animais WAR não resultou em diferença na expressão de IL-6 nas quatro regiões estudadas nos três tempos de análise. No entanto, em hipocampo, houve uma tendência a maior expressão de IL-6 no período de 4 horas pós estímulo, comparado com 30 minutos pós estímulo (Figura 7).

Apesar de não terem sido verificadas diferenças na expressão de IL-6 entre os tempos avaliados, sabe-se que um estímulo audiogênico realizado uma semana após o *screening* é capaz de induzir aumento na expressão de IL-6 em córtex e estriado em animais WAR 4 horas pós estímulo audiogênico, conforme publicado por nosso grupo (DE SOUZA BERNARDINO et al., 2015).

A ausência de diferenças entre os níveis de IL-6 após a indução audiogênica em animais WAR (Figura 7), não representa, necessariamente, que não há alteração dos níveis de IL-6 pós crise convulsiva. Isso porque, conforme verificado por nosso grupo, após 4 horas do estímulo audiogênico, há aumento dos níveis de IL-6 nos animais WAR.

Assim, a curva de expressão de IL-6 em função do tempo não se faz representativa ao comparar os três pontos escolhidos para análise (30 minutos, 4 horas e 24 horas). Provavelmente, se outros pontos fossem avaliados, conforme executado por Vezzani e colaboradores (2005) conseguiríamos endossar, com melhor refinamento técnico, a maior expressão de IL-6 em animais WAR.

Apesar disso, conseguimos reforçar a maior expressão de IL-6 nos animais WAR em outro experimento. Os animais WAR apresentam maiores níveis de

expressão de IL-6 após a indução do estímulo audiogênico comparados aos ratos Wistar não susceptíveis em todas as regiões avaliadas. Assim como foi observado para a IL-1 β e TNF, na região do colículo inferior houve maior expressão de IL-6 em todos os tempos observados (Figura 8).

Considerando as demais regiões estudadas, a expressão de IL-6 foi maior em 30 minutos em estriado e córtex, sendo que em córtex esses níveis se mantiveram mais altos até as 4 horas pós estímulo. Em hipocampo, os níveis elevados foram observados apenas às 4 horas pós estímulo (Figura 8).

Os resultados obtidos endossam a participação da IL-6 em um modelo genético de convulsão audiogênica. O estímulo audiogênico é capaz de reforçar a expressão de IL-6, que pode estar envolvida na hiperexcitabilidade apresentada pelos animais WAR, assim como ocorre em modelos animais de epilepsia e na epilepsia do lobo temporal humana, por exemplo.

Vale também ressaltar que foram realizadas análises comparativas dos níveis de IL-6 nos animais Wistar não susceptíveis à convulsão audiogênica. Obtivemos ausência de diferenças estatísticas nas quatro regiões estudadas nos três tempos de análise (Figura 9). O estímulo audiogênico parece ter menor impacto nos animais não susceptíveis comparados com o grupo WAR, reforçando um possível papel na condição de limiar convulsivo reduzido dos WAR.

5.2. NCS-1 e DARPP-32

5.2.1. NCS-1

As vias de sinalização celular desempenham função crítica na coordenação e integração das variadas respostas celulares que são desencadeadas frente a estímulos. As proteínas neuronais sensoras de cálcio (NCS) são constituintes da sinalização celular para cálcio e desempenham função crucial em diversos eventos celulares.

Dentre essa família de proteínas, a proteína NCS-1 é considerada um protótipo das NCS, representa a proteína mais estudada da família. NCS-1 é capaz de responder a pequenas flutuações na concentração de íons Ca^{2+} e encontra-se tanto ancorada a membranas quanto em *pool* citoplasmático (DASON et al., 2012; MCCUE; HAYNES; BURGOYNE, 2010).

A liberação de neurotransmissores, a regulação da concentração de receptores e canais iônicos na membrana, o controle da transcrição gênica e o desenvolvimento e sobrevivência celulares são funções que envolvem a participação da proteína NCS-1 (PANDALANENI et al., 2015).

Apesar de ser a proteína neuronal sensor de cálcio mais estudada, ainda há necessidade de elucidar os mecanismos funcionais da NCS-1 nas diversas vias de sinalização que participa.

Vários estudos procuram avaliar as funções de NCS-1 através de organismos vivos com expressão alterada para esta proteína. Sabe-se que a superexpressão de NCS-1 está relacionada a facilitação na liberação de neurotransmissores, a um aumento na transmissão espontânea e induzida em placa motora, a melhora na capacidade de aprendizado e memória (para revisão veja (MCCUE et al., 2010).

Roedores *knockouts* para NCS-1 ou com expressão de NCS-1 instável estão começando a ser estudados com maior propriedade, mas já é descrito que esses animais apresentam alteração no comportamento exploratório, no comportamento associado a doenças psiquiátricas e na memória (DE REZENDE et al., 2014; MUN et al., 2015). A alteração de comportamento, de locomoção e de memória também foi verificada em moscas do gênero *Drosophila* e no nematódeo da espécie *Caenorhabditis elegans* (DASON et al., 2009; GOMEZ et al., 2001). Além disso,

moscas *knockouts* para NCS-1 apresentam prejuízo significativo do influxo de íons Ca^{2+} para neurônios (DASON et al., 2009).

NCS-1 é capaz de interagir com diversos alvos celulares e com isso participa e desempenha variadas funções. Tendo em mente a fisiopatologia do processo convulsivo, cabe ressaltar algumas funções da proteína NCS-1, que podem ter relação com hiperexcitabilidade das redes neuronais, e os respectivos alvos celulares envolvidos.

A facilitação das sinapses mediada por NCS-1 é resultante da interação dessa proteína com vários alvos celulares, um desses alvos é a subunidade α_1 do canal iônico para íons cálcio $Ca_v2.1$. Essa interação favorece a ativação deste canal, resultando em influxo de íons Ca^{2+} e a liberação de neurotransmissores (BURGOYNE; HAYNES, 2015). Outro alvo celular associado com a facilitação sináptica é a potencialização da atividade do receptor para IP_3 , que resulta em aumento da sinalização para íons Ca^{2+} (BURGOYNE; HAYNES, 2015; KASRI et al., 2004).

Além atividade em plasticidade sináptica, a proteína NCS-1 também é capaz de modular a via dopaminérgica através da interação com o receptor dopaminérgico D2. NCS-1 interage concomitantemente com o receptor D2 e com a proteína quinase de receptor acoplado à proteína G (GRK), causando a inibição da internalização do receptor D2, o que resulta em redução da dessensibilização dos receptores D2 na presença de dopamina (DRAGICEVIC et al., 2014). Tal ligação resulta em amplificação da sinalização celular desempenhada pelo receptor D2 (SOUZA et al., 2011). É extremamente relevante ressaltar que o efeito de NCS-1 ocorre também em receptores D2 pré-sinápticos, também chamados de autorreceptores D2, e essa interação pode representar um mecanismo fisiopatológico envolvido na doença de Parkinson (DRAGICEVIC et al., 2014; POETSCHKE et al., 2015).

Além desses alvos celulares já descritos, sabe-se que NCS-1 é capaz de interferir na sinalização mediada por ERK, principalmente no aumento de ERK2 no *pool* perinuclear (BAR-GILL et al., 2013). ERK pertence à família das MAPK e participa nos processos de plasticidade sináptica e epileptogênese (MERLO et al., 2004).

Apesar da associação intrínseca com a sinalização via íons Ca^{2+} e das funções na plasticidade sináptica, são raros os estudos que associam a expressão de NCS-1 ao evento convulsivo. Estudos, que apresentam essa associação, foram delineados para avaliar uma possível alteração nos níveis de NCS-1 causada pelo tratamento com ECT, como pode ocorrer naqueles pacientes que apresentam doenças associadas à

alteração na via dopaminérgica, como a esquizofrenia (GENIN et al., 2001; ROSA; SOUZA; SOUZA; MOTTA; CAETANO; JORNADA; FEIER; JEROMIN; et al., 2007).

Apesar da distinção evidente entre as doenças convulsivas e a esquizofrenia, podemos obter alguns dados destes trabalhos, uma vez que, a ECT de certa forma induz descargas elétricas semelhantes à convulsão. Segundo Rosa e colaboradores (2007), o estímulo eletroconvulsivo administrado de forma aguda ou crônica em ratos Wistar não são capazes de alterar os níveis de NCS-1 em várias áreas cerebrais, exceto no cerebelo, onde há aumento de NCS-1 após 12 horas do estímulo crônico (ROSA; SOUZA; SOUZA; MOTTA; CAETANO; JORNADA; FEIER; JEROMIN; et al., 2007). Apesar disso, o estímulo eletroconvulsivo agudo em ratos Sprague-Dawley foi capaz de elevar os níveis de RNAm para NCS-1 após 6 horas do estímulo (GENIN et al., 2001).

Contrastando com os dados apresentados nestes trabalhos, avaliamos a expressão de NCS-1 nos ratos WAR e os Wistar não susceptíveis à convulsão audiogênica e verificamos aumento na expressão de NCS-1 em hipocampo dos WAR. As outras duas regiões estudadas, córtex e cerebelo, não apresentaram diferenças na expressão de NCS-1 entre os dois grupos (Figura 10).

Cunha e colaboradores (2015) avaliaram a repercussão de estímulos sonoros repetitivos de alta intensidade sobre a “potenciação” de longa duração (LTP) em hipocampo de ratos Wistar e de ratos WAR. Os estímulos sonoros repetitivos de alta intensidade são capazes de inibir e suprimir LTP em animais Wistar não susceptíveis ao estímulo audiogênico, porém esse efeito não ocorre nos animais WAR. Nesses animais, o estímulo sonoro repetitivo de alta intensidade não é capaz de inibir LTP em hipocampo. Os autores deste trabalho aventam para uma possível alteração conectiva entre o estímulo sonoro e LTP hipocampal como possível mecanismo de susceptibilidade à crise convulsiva dos WAR (CUNHA et al., 2015).

Sabe-se que NCS-1 é capaz de regular tanto a depressão de longa duração (LTD) quanto o LTP em alvos neuronais pós-sinápticos no SNC (DASON et al., 2012). A ativação de NCS-1 via receptores glutamatérgicos do tipo NMDA é um dos estímulos responsáveis por potencializar a LTP mediada por NCS-1 (DASON et al., 2012).

O aumento dos níveis de NCS-1 em hipocampo verificado por nosso grupo (Figura 10), pode representar um possível substrato bioquímico para endossar os achados de Cunha e colaboradores (2015). Os níveis aumentados de NCS-1 encontrados em hipocampo, região notadamente envolvida em *kindling*, podem estar associados à

manutenção da LTP em WAR. Muitos estudos ainda se fazem necessários para concatenar a expressão de NCS-1 com a susceptibilidade à convulsão apresentada pelos WAR, ainda mais no sentido de realizar adequação metodológica entre estes trabalhos.

Além disso, é salutar compreender que os resultados obtidos através da indução audiogênica em WAR revelam possíveis diferenças entre as vias de sinalização celular ativas neste modelo e aquelas ativadas em modelo de ECT. Não se pode afirmar com exatidão o contraste entre o modelo audiogênico e o modelo de eletroconvulsão, pois não foram realizadas metodologias semelhantes.

5.2.2. DARPP-32

A proteína DARPP-32 desempenha papel crucial na sinalização celular mediada por dopamina, mas essencialmente, atua como elo entre a sinalização dopaminérgica e a sinalização glutamatérgica (GREENGARD, 2001). Além disso, DARPP-32 pode ser ativada por diversas outras vias de sinalização e é capaz de modular receptores GABAérgicos e canais iônicos (FERNANDEZ et al., 2006).

Devido a tamanha importância em vias de sinalização fundamentais do SNC, a DARPP-32 tem sido investigada em diversas doenças do SNC como esquizofrenia, depressão, Parkinson e até mesmo na adicção às substâncias de abuso (REIS et al., 2007).

Apesar disso, poucos estudos associam DARPP-32 à epilepsia. Sabe-se, como já descrito neste trabalho, que as vias glutamatérgica, GABAérgica e dopaminérgica assumem um papel essencial nas doenças associadas à convulsão. Assim, torna-se relevante compreender os mecanismos de ativação e a atividade de DARPP-32 nas redes neurais, para que sua ação possa ser concatenada com a hiperexcitabilidade neuronal vista na convulsão.

Sabe-se que DARPP-32 desempenha suas funções a partir de seu estado ativo, isto é, fosforilado, e que sua ativação pode ser desempenhada por, ao menos quatro proteínas quinases distintas (FERNANDEZ et al., 2006).

A sua forma fosforilada D34, resultante da ação da PKA, é um potente inibidor da PP-1, fosfatase com importante função neuronal. PP-1 é envolvida em várias vias de sinalização associadas aos receptores glutamatérgicos do tipo AMPA e NMDA, aos receptores GABAérgicos, como o GABA_A, aos canais iônicos sensíveis a voltagem, a calmodulina quinase II, aos fatores de transcrição como CREB, entre outros (ALBERT et al., 2002; FERNANDEZ et al., 2006; GREENGARD, 2001).

Sabe-se que a inibição de PP-1 pela DARPP-32 resulta em ativação de ERK 1 e 2, quinase membro da família das MAPK, que estão envolvidas em diversos processos biológicos, incluindo plasticidade sináptica e epileptogênese (MERLO et al., 2004).

A DARPP-32 pode ser fosforilada em outros resíduos de aminoácidos e atuar de maneira diferente da forma D34. Sob ação da CKD5, a DARPP-32 é fosforilada no

resíduo Tre75 e atua como inibidor da PKA, diminuindo a formação de pDARPP-32-D34 (FERNANDEZ et al., 2006).

Sob influxo de cálcio, mediado por exemplo através da ação dos receptores AMPA e NMDA, a proteína fosfatase 2B (PP-2B, conhecida também como calcineurina) é ativada causando a desfosforilação da forma D34 (FERNANDEZ et al., 2006).

O'Sullivan e colaboradores (2008) investigaram a relação entre DARPP-32 e a indução de convulsão mediada pelo receptor D1 em camundongos. Os resultados obtidos neste estudo revelam a relevante função do receptor D1, especificamente na transdução de sinal mediada pela adenilato ciclase, na indução de convulsão. A adenilato ciclase é uma enzima que amplia os níveis de AMPc, que participa da ativação de PKA (Yger, 2011).

A utilização de uma droga agonista do receptor D1 com estímulo específico na via da adenilato ciclase foi capaz não só de induzir crise convulsiva como também de ampliar fosforilação de DARPP-32 no sítio Tre34 e de ERK 1/2 (O'SULLIVAN et al., 2008). A pDARPP-32-D34 foi encontrada em níveis significativamente elevados em fatias de estriado durante a evolução e a manifestação da crise convulsiva, porém a fosforilação da DARPP-32 era inibida no período pós-ictal (O'SULLIVAN et al., 2008).

Além disso, foi verificada redução significativa, em frequência e em intensidade, de convulsão ao tratar animais *knockout* para DARPP-32 com a droga capaz de ativar o receptor D1 via adenilato ciclase. Esse estudo sugere a participação de DARPP-32 na redução do limiar excitatório neuronal em crises convulsivas induzidas por agonista em receptor D1 (O'SULLIVAN et al., 2008).

O'Sullivan e colaboradores (2008) também verificaram que a ativação da via de sinalização celular da PLC acoplada a ativação de receptor D1 com uma droga específica não resulta em crise convulsiva e é capaz de inibir a produção de pDARPP-32-D34.

Outro estudo que avalia a relação de DARPP-32 com convulsão foi conduzido por Rosa e colaboradores (2007). Esse estudo avaliou os níveis de DARPP-32 após estímulos eletroconvulsivos agudos e crônicos em estriado, córtex, hipocampo e cerebelo de ratos Wistar.

O estímulo eletroconvulsivo agudo foi capaz de elevar os níveis de DARPP-32 em córtex, mas não em estriado, hipocampo e cerebelo (ROSA; SOUZA; SOUZA; MOTTA; CAETANO; JORNADA; FEIER; GOMEZ; et al., 2007). Por outro lado, o estímulo crônico resultou em aumento dos níveis de DARPP-32 em estriado e

hipocampo, mas não em córtex e cerebelo (ROSA; SOUZA; SOUZA; MOTTA; CAETANO; JORNADA; FEIER; GOMEZ; et al., 2007). Os níveis de DARPP-32 voltaram ao valor basal após 48 horas do último estímulo eletroconvulsivo tanto no protocolo de indução convulsiva aguda quanto na indução crônica.

Segundo Wang e colaboradores (2014), a indução de SE em rato decorrente da administração de PTZ é capaz de aumentar a fosforilação de DARPP-32 em córtex, hipocampo e estriado. Os níveis de p-DARPP-32 atingem o pico entre 1 hora a 6 horas após a manifestação do SE e permanecem elevados por até 24 horas. Segundo os autores, a fosforilação de DARPP-32 pode desempenhar uma função central no desencadeamento do SE (WANG, W. et al., 2014).

Diante disso, avaliamos a expressão de DARPP-32 em animais WAR e os Wistar não susceptíveis à convulsão audiogênica, seguindo mesma metodologia adotada para avaliação da NCS-1 e verificamos aumento na expressão de DARPP-32 no hipocampo dos WAR. Obtivemos níveis menores de DARPP-32 em cerebelo dos animais WAR comparados aos controles e não houve diferença em córtex entre os dois grupos avaliados (Figura 11).

Tal resultado nos evidencia que a via de sinalização responsável pelos níveis de DARPP-32 se encontra com atividade alterada em hipocampo e cerebelo dos WAR. E, além disso, os resultados obtidos com o modelo de convulsão audiogênica diferem dos resultados obtidos através da estimulação eletroconvulsiva. Assim, os animais WAR, apresentam expressão de DARPP-32 diferenciada em relação aos animais Wistar estimulados por choque.

Vale ressaltar que nosso resultado consiste em níveis de DARPP-32 total, uma vez que não foi avaliado o estado fosforilado dessa proteína. Dessa forma, estes resultados não traduzem diretamente a atividade de DARPP-32, apenas a expressão quantitativa de tal proteína no momento de estudo.

Porém, a expressão aumentada de DARPP-32 sugere que estímulos convulsivos audiogênicos são capazes de interferir na expressão de DARPP-32 provavelmente por mecanismos distintos daqueles observados em estímulo eletroconvulsivo.

5.3. BDNF

Sabe-se da literatura que BDNF está envolvido no processo da epileptogênese e, desta forma, torna-se relevante compreender como a atividade neuronal regula a expressão e liberação de BDNF pelo neurônio.

A transcrição de BDNF nos neurônios é ampliada mediante a diversos estímulos, dentre eles, merece destaque, a despolarização de membrana induzida por disparo convulsivo e a ativação dos receptores glutamatérgicos como o NMDA (ADACHI et al., 2014). O evento regulatório para transcrição do BDNF é a elevação do íon cálcio no meio intracelular seja via receptor NMDA ou via canais para cálcio sensíveis a voltagem, como o do tipo L (MARTINEZ-LEVY; CRUZ-FUENTES, 2014).

O influxo de íons Ca^{2+} decorrente da despolarização da membrana é capaz de induzir a ativação transcricional do gene do BDNF. A interação com o fator de transcrição CREB com a região promotora do gene e a fosforilação do mesmo resulta na transcrição do BDNF (TAO et al., 1998). A fosforilação do CREB, na posição Ser-133, evento crítico para resultar em transcrição de BDNF, é mediada por algumas quinases, dentre elas a MAPKAP, a RSK 1-3 e duas quinases dependentes de Ca^{2+} /calmodulina (CaMK II e IV) (MAROSI; MATTSON, 2014; TAO et al., 1998). Assim, é possível compreender como a atividade neuronal é capaz de regular a expressão de BDNF, através de influxo de íons Ca^{2+} e de ativação de CREB.

O BDNF é transcrito na forma de pré-pró-BDNF e pela ação de proteases é convertido em uma isoforma imatura, o pró-BDNF, que é ativo e armazenado dentro de vesículas. Ainda permanece controverso se a clivagem de pró-BDNF a BDNF ocorre apenas em meio intracelular ou também ocorre em meio extracelular. Evidências sugerem que a secreção pode ocorrer na forma de pró-BDNF e/ou BDNF (ADACHI et al., 2014; LEAL et al., 2015).

O BDNF armazenado em vesículas é transportado por complexos de proteínas motoras para os axônios e dendritos, fato demonstrado em hipocampo transfectado com BDNF fluorescente. O transporte de BDNF pode ocorrer tanto de forma retrógrada, quando capturado por um neurônio pós-sináptico e levado ao seu corpo celular, quanto de forma anterógrada, quando o BDNF é levado do corpo celular até

dendritos e axônios (LEAL et al., 2015; TAPIA-ARANCIBIA et al., 2004). Dessa forma, o BDNF é capaz de atuar modulando tanto no input quanto output de estímulos.

O processo de secreção de BDNF também é dependente de influxo de Ca^{2+} através dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos e/ou dos canais para Cálcio sensíveis a voltagem do tipo L. Há necessidade de amplificação da concentração de íons Ca^{2+} no meio intracelular, liberado dos estoques intracelulares, para que haja a secreção de BDNF para o meio extracelular (ADACHI et al., 2014). A ativação de CaMKII e de PKA é fundamental para que a secreção de BDNF ocorra (ADACHI et al., 2014).

O BDNF exerce sua função quando ligado aos seus receptores: o inespecífico, p75NTR, que é receptor comum com outras neurotrofinas e tem maior afinidade pela forma de pró-BDNF, e o receptor específico, Trk-B com especificidade ao BDNF (ADACHI et al., 2014).

Os eventos intracelulares desencadeados pela interação BDNF/Trk-B são diversos e, dentre eles, vale destacar algumas das vias ativadas por essa interação que possuem relevância dentro do contexto deste trabalho. A sinalização decorrente da interação do BDNF com seu receptor de alta afinidade, o Trk-B, é considerada um fator preponderante para coordenação e modulação da epileptogênese (KAILA et al., 2014).

A interação entre BDNF e Trk-B modula o funcionamento de várias vias de sinalização intracelular que cumprem papel relevante no contexto da epileptogênese. Uma delas é a elevação e a estabilização da atividade da PKA/AMPC, que são fundamentais na ativação de diversos reguladores como a proteína DARPP-32 (CHANDWANI et al., 2013; PEREZ-GOMEZ; TASKER, 2013). Outro evento mediado pela ativação do receptor Trk-B é a fosforilação da AKT e ativação de GSK-3, de MAPK e de PI3K (BAYDYUK; XU, 2014; PEREZ-GOMEZ; TASKER, 2013).

Sabendo que a atividade neuronal é relevante na transcrição, tradução e secreção de BDNF, é salutar reconhecer o tempo entre a estimulação do neurônio, a transcrição de RNAm para BDNF e a expressão de BDNF.

Em cultura de neurônios corticais de ratos foi constatado que a expressão de RNAm para BDNF iniciava a partir de 30 minutos, atingia o pico de expressão em 60 minutos e permanecia detectável por 3 horas depois de um estímulo único em neurônios virgens de estimulação (TAO et al., 1998). De forma coerente, a fosforilação

do CREB sob as mesmas circunstâncias, ocorreu a partir de 15 minutos do estímulo e permaneceu constante até 3 horas depois do estímulo único (TAO et al., 1998).

Em camundongos C57 machos submetidos a infusão unilateral intra hipocampal de ácido caínico, foram avaliados os níveis de expressão de BDNF no hipocampo de 7 grupos distintos, distribuídos por um período de avaliação com duração de 5 semanas. O primeiro grupo representou o 1º dia após aplicação de ácido caínico e o último grupo após 31 dias da injeção. Foram comparados os níveis de BDNF entre o hipocampo submetido à injeção de ácido caínico com o contralateral de cada animal. Foi observado que os níveis de BDNF começaram a se elevar após 24 horas da injeção e atingiram a máxima expressão no 16º dia; houve uma queda da expressão no 21º dia e um novo aumento na expressão no 31º dia (HEINRICH et al., 2011).

Além desses resultados, Heinrich e colaboradores (2011) realizaram análise de expressão de RNAm para BDNF através de hibridização *in-situ* em fatias hipocampais. O resultado deste estudo revela um aumento progressivo e significativo na expressão de RNAm para BDNF nas fatias hipocampais expostas ao ácido caínico. Os níveis de RNAm para BDNF permaneceram significativamente elevados, desde o primeiro dia de análise (2º dia pós exposição ao ácido caínico), até o último dia, quando as crises convulsivas começaram a manifestar (HEINRICH et al., 2011).

Ernfors e colaboradores (1991) também obtiveram resultados semelhantes sobre a expressão de RNAm para BDNF com a estimulação elétrica sucessiva em ratos machos. O período de 30 minutos a 1 hora após o último estímulo elétrico representou o pico de expressão do RNAm para BDNF em fatias de córtex e de hipocampo, respectivamente. Porém, após 24 horas do último estímulo, os níveis do RNAm para BDNF eram próximos aos animais controles (ERNFORS et al., 1991).

Diante disso, é importante considerar as variabilidades intrínsecas de cada espécie animal, de cada metodologia de indução de crise convulsiva e de cada delineamento experimental.

Os animais WAR utilizados neste trabalho não devem ser considerados um modelo de epilepsia, uma vez que não foi aplicado o protocolo de *kindling* audiogênico. Dessa forma, os resultados obtidos sobre a expressão de BDNF não devem ser rigorosamente contrastados com aquele apresentado por Heinrich e colaboradores (2011), uma vez que a injeção de ácido caínico, mesmo que única, representa um modelo clássico para epileptogênese e ELT. Também é inegável que os resultados

em WAR não possam ser contrastados com os resultados apresentados por Tao e colaboradores (1998), uma vez que tais resultados foram obtidos através de um único estímulo.

Porém, cabe endossar que o estímulo realizado uma semana após a triagem deve ser considerado como um estímulo adicional, capaz de deflagrar uma descarga epileptiforme nas redes neuronais dos WARs, e induzir repercussões bioquímicas e estruturais adicionais àquelas já estimuladas durante o *screening*. Dessa forma, o modelo animal de estudo pode ser encarado como um modelo de transição entre o modelo de estimulação única (TAO et al., 1998) e o modelo de epilepsia (HEINRICH et al., 2011).

Conforme descrito brevemente na introdução, sabe-se que um estímulo convulsivo isolado ou uma crise epilética é suficiente para resultar em grande aumento nos níveis de RNAm para BDNF, que permanecem elevados por algumas horas e apresentam redução após 24 horas do estímulo (ISACKSON et al., 1991). O aumento na expressão de RNAm para BDNF é claramente potencializado e difundido, pelas áreas do SNC afetadas pela descarga epileptiforme, por estímulos repetitivos que causam crise convulsiva generalizada (ERNFORS et al., 1991).

Avaliamos os níveis de expressão de BDNF em animais WAR após 30 minutos, 4 horas e 24 horas de um estímulo audiogênico deflagrador de crise realizado uma semana após o *screening*. Apesar dos dados da literatura endossarem o aumento nos níveis de BDNF após a convulsão, os resultados obtidos por nosso grupo não evidenciam diferenças na expressão de BDNF nos WAR após estímulo audiogênico, exceto no estriado, onde houve redução nos níveis de expressão de BDNF do grupo de 24 horas em comparação com 4 horas (Figura 12).

Porém, conforme já publicado por nosso grupo, a indução de uma convulsão audiogênica repercute na produção de BDNF no córtex do animal estimulado, comparado ao WAR não estimulado, após 4 horas do estímulo (DE SOUZA BERNARDINO et al., 2015). Outros intervalos de tempo não foram avaliados, diante disso, não é possível afirmar que apenas o córtex sofre variação na expressão de BDNF após um estímulo.

Possivelmente, para avaliação da curva de aumento na expressão de BDNF nos animais WAR após um estímulo, os pontos avaliados podem não ser tão representativos. Certamente, seria esperado uma curva com ampliação seguida de redução da expressão de BDNF; o único ponto que condiz com essa análise é a

redução de expressão na região estriatal. Nesse sentido, há necessidade de investigações adicionais, para que a via de expressão das neurotrofinas seja melhor compreendida e descrita nos WAR.

Por outro lado, obtivemos resultados que evidenciam a maior expressão de BDNF em animais WAR comparados aos Wistar não susceptíveis, algo que já seria esperado pelos resultados encontrados na literatura descritos acima. De fato, a indução de crise convulsiva nos animais WAR resulta em expressão aumentada de BDNF em todas as regiões estudadas (Figura 13). Estes resultados apontam para uma maior ativação da via de transcrição e tradução de BDNF em animais WAR, algo que poderia estar relacionado com a maior susceptibilidade dessa linhagem genética em desenvolver as crises audiogênicas.

A participação do BDNF na hiperexcitabilidade das redes neuronais desses animais fica ainda mais evidente pelo fato do BDNF encontrar-se em níveis elevados por pelo menos 24 horas no colículo inferior dos WAR. Sabe-se que essa é a região primordial para deflagrar a convulsão audiogênica nestes animais (GARCIA-CAIRASCO, 2002).

É interessante ressaltar que com 30 minutos pós-estímulo já pôde ser observado elevação na expressão da proteína BDNF em todas as regiões avaliadas. O processo de transcrição e tradução nestes animais ocorreu de forma mais rápida do que relatada por Tao e colaboradores (1998), que avaliaram neurônios corticais virgens de estimulação (TAO et al., 1998).

Provavelmente, essa maior agilidade da maquinaria celular em produzir BDNF pode ter sido desencadeada pelos estímulos induzidos durante o *screening*. Os três estímulos necessários para a triagem dos animais susceptíveis podem ter produzido um ambiente intracelular favorável para a produção de BDNF, como, por exemplo, maiores níveis de íons Ca^{2+} , maior expressão de proteínas sensoras de cálcio. Essa hipótese justificaria os maiores níveis de BDNF já com 30 minutos pós estímulo em todas as regiões estudadas.

Além disso, é documentado que os níveis de expressão da proteína BDNF permanecem elevados e atingem o pico máximo em até 24 horas após o estímulo convulsivo; posteriormente, há um decaimento da expressão da proteína até os valores dos animais controles (ELMER et al., 1998; HEINRICH et al., 2011). Cada região do SNC atinge o pico de expressão de BDNF em um tempo diferente após a indução da crise epiléptica (ELMER et al., 1998).

De fato, comparado com os animais Wistar, os animais WAR apresentaram aumento de expressão em todas as regiões avaliadas, porém quando comparado aos animais WAR não estimulados em 4 horas, só houve alteração em córtex. Diante disso, torna-se coerente considerar que os estímulos realizados durante o *screening* são capazes de manter um nível aumentado de expressão de BDNF em animais WAR e, que esse aumento é capaz de persistir por pelo menos 7 dias.

Provavelmente, a curva de expressão de BDNF em WAR assume uma forma bimodal com duas fases de aumento dos níveis de BDNF: um deles de forma aguda pós estímulo, que tem duração de até 24 horas, e outro que ocorre após esse período. Esse padrão bimodal de expressão já havia sido relatado por Heinrich e colaboradores (2011).

Avaliamos também a repercussão do estímulo audiogênico nos níveis de BDNF dos animais Wistar não susceptíveis à convulsão audiogênica. Constatamos que há maior expressão de BDNF todas as quatro regiões estudadas 24 horas após o estímulo em comparação com os níveis após 30 minutos e 4 horas nesses ratos não susceptíveis (Figura 14). O aumento de BDNF observado nesses animais pode ser considerado como um dos motivos responsáveis pela perda de diferença estatística comparado aos dados obtidos nos WAR.

Certamente, investigações adicionais são necessárias, inclusive para delinear as ações do BDNF no contexto da hiperexcitabilidade observada na convulsão e epilepsia. Apesar de ser evidente o aumento dos níveis de BDNF no contexto de epileptogênese e de convulsão, percebe-se que ainda não é estabelecido um claro delineamento fisiológico. Da mesma forma em que apresenta papel funcional evidente para hiperexcitar a rede neural, o BDNF atua como um regulador negativo para a rede hiperexcitada. Esse duplo papel desempenhado pelo BDNF ainda precisa ser melhor elucidado.

Contrariamente ao seu efeito pró-excitatório, é descrito que o BDNF modula também a eficácia das sinapses GABAérgicas tanto as pré-sinápticas, quanto pós-sinápticas. A ação do BDNF sobre a via GABAérgica ocorre notadamente sobre a modulação das funções e regulando a inserção na membrana do receptor GABA_A (ADACHI et al., 2014). O efeito nas correntes inibitórias pós-sinápticas resultante da ação do BDNF sobre os receptores GABA_A é potencializador em neurônios inibitórios e inibidor em neurônios excitatórios. Assim, o BDNF é capaz de atuar como inibidor em respostas celulares independentes da via neural alvo (WARDLE; POO, 2003).

Ainda associado às funções duais do BDNF, a interação do pró-BDNF com o receptor inespecífico p75NTR resulta em um efeito de regulação negativa sobre os receptores NMDA que é a potencialização no hipocampo de LTD dependente de NR2b (ADACHI et al., 2014). Apesar desse receptor não estar associado diretamente com o processo de epileptogênese, pois o receptor crucial vinculado ao processo é o Trk-B, é válido considerar tais aspectos para que o campo de visão seja expandido à macro-função exercida pelo BDNF/pró-BDNF no SNC.

Vale ressaltar também, que a escolha pelos animais machos se justifica, não só pelo fato do estrógeno apresentar efeito considerado excitatório, como visto na epilepsia Catamenial em humanos (FOLDVARY-SCHAEFER; FALCONE, 2003), como também pelo fato da regulação da expressão de BDNF ser alterada sob efeito de estrógeno (TAPIA-ARANCIBIA et al., 2004; TAUBOLL; SVEBERG; SVALHEIM, 2015). Além disso, é descrito variações dos níveis de BDNF em hipocampo durante o ciclo hormonal de ratas. (TAPIA-ARANCIBIA et al., 2004).

Além das vias de ação do BDNF descritas até o momento, é relevante ressaltar que tal neurotrofina ainda participa da integração das respostas celulares dos dois epifenômenos estudados por este trabalho: neuroplasticidade e neuroinflamação. A capacidade de modular e induzir a atividade de DARPP-32, bem como, no controle de influxo de íons Ca^{2+} permite ao BDNF interagir com as duas proteínas estudadas neste trabalho (CHANDWANI et al., 2013; ZAGREBELSKY; KORTE, 2014). De forma semelhante, o BDNF tem seus níveis e atividade regulados pela expressão de citocinas inflamatórias (CALABRESE et al., 2014). Podemos, então, considerar o BDNF como a proteína responsável por representar um elo entre a neuroplasticidade e a neuroinflamação.

Muitos estudos são realizados e ainda são necessários para compreender as complexas respostas fisiológicas e patológicas associada ao BDNF. Fato é que tal neurotrofina apresenta repercussão central na homeostase elétrica do SNC e seus níveis encontram-se alterados em diversas doenças distintas (TAPIA-ARANCIBIA et al., 2004). A participação em diversas vias de sinalização, a ação parácrina e autócrina e a capacidade de modulação sináptica faz do BDNF uma neurotrofina com importância crucial no contexto de epileptogênese. A ação modulatória do BDNF na epileptogênese e na atividade neuronal é bem descrita e, por isso, torna-se relevante compreender como a atividade neuronal regula a expressão e liberação de BDNF pelo neurônio.

6. Considerações finais

Os animais WAR utilizados neste trabalho representam um modelo particular, dentre os diversos modelos animais, para o estudo de epilepsia e convulsão. Conforme já abordado anteriormente em outras sessões deste trabalho, tais animais são provenientes de uma linhagem genética que apresentam susceptibilidade aumentada às crises convulsivas audioestimuladas. Diante disso, tais animais são expostos ao estímulo audiogênico durante o *screening*, e aqueles que apresentam crise convulsiva são considerados como animais audiogênicos. Os animais audiogênicos desenvolvem crise convulsiva somente após o estímulo audiogênico, além de apresentarem maior susceptibilidade a convulsão induzida por outros mecanismos, conforme também já abordado. Porém, após sucessivas exposições ao estímulo audiogênico, em um protocolo de abrasamento de crises (*kindling*), tais animais passam a apresentar episódios espontâneos de crise convulsiva, configurando como um modelo de epilepsia. Tal fato envolve alterações nas redes neurais, tanto naquelas envolvidas intrinsecamente na deflagração da crise audiogênica, como também naquelas envolvidas na epilepsia, alterações estas, que ainda não são bem elucidadas.

Os resultados obtidos por este trabalho evidenciam alterações na expressão de citocinas inflamatórias entre os grupos de animais apresentados, com alguma tendência a maior expressão ou maior facilitação na expressão de tais citocinas nos animais audiogênicos. É importante destacar que as citocinas inflamatórias atuam como importantes moduladores do SNC, conforme exhaustivamente explorado pelas referidas referências bibliográficas citadas ao longo deste texto. É inegável que existe participação efetiva do fenômeno inflamatório nas redes neuronais dos animais WAR e, que estas desempenham função tão crucial quanto aquelas desempenhadas pelos importantes neurotransmissores glutamato, GABA e dopamina.

Este trabalho demonstra que a exposição sucessiva dos animais WAR ao estímulo audiogênico, ainda que fora do protocolo de *kindling*, repercute em um remodelamento estrutural e bioquímico do SNC que tem participação sincrônica dos eventos neuroinflamatórios, neurotróficos, neuroquímicos e neuroplásticos, sendo estes indissociáveis e, por certas ocasiões, indistintos entre si. A participação das proteínas mediadoras destes processos é crucial para definir a modificação da

resposta pró-convulsiva dos WAR com o passar dos estímulos audiogênicos, sobretudo aquelas responsáveis pelo fenômeno inflamatório.

Apresenta-se então, uma proposta na tentativa de elucidar quais os mecanismos neurobiológicos estão envolvidos no episódio convulsivo audiogênico isolado, na exposição sucessiva ao estímulo audiogênico e, ampliando o escopo do trabalho, no recrutamento das redes límbicas envolvidas no *kindling*, que representam as redes neurais recrutadas na epilepsia desenvolvida pelos WAR.

A expressão em níveis alterados das citocinas inflamatórias em hipocampo e córtex cerebral e das proteínas de neuromodulação em hipocampo dos animais WAR em relação aos animais WT, representam alterações em duas das regiões do SNC que são elementares nos episódios de epilepsia dos WAR, mas que não são cruciais no episódio convulsivo isolado. A este fato, pode-se atribuir o fenômeno inicial do recrutamento neural das redes envolvidas no *kindling*, o que extrapola o escopo inicial do trabalho, mas que pode ser considerada dentro do contexto metodológico aplicado. A realização de três estímulos audiogênicos seguidos durante o *screening* e, em alguns grupos, de um estímulo adicional, representa o viés metodológico que permite extrapolar a interpretação para o recrutamento límbico com estímulos audiogênicos sucessivos.

Certamente os dados apresentados refletem uma avaliação inicial de neuroinflamação e neuroplasticidade nos *Wistar Audiogenic Rats*. Outras análises devem ser estimuladas a partir das diferenças na expressão de citocinas inflamatórias, de fator neurotrófico e de proteínas de neuromodulação obtidas neste trabalho.

Há necessidade de outros estudos explorando o modelo WAR. A utilização de animais WAR *naive*, de animais WAR submetidos ao protocolo de abrasamento de crises e de animais WAR submetidos a crises convulsivas progressivas, quantitativamente maior que o realizado por este trabalho e menor do que o realizado em protocolo de *kindling*, seria ideal para complementar, adequadamente, os dados já obtidos.

Seria interessante prosseguir a avaliação da expressão de tais citocinas durante diversos períodos pós crise audiogênica, bem como avaliar a expressão de seus respectivos receptores. A avaliação dos receptores específicos é extremamente relevante, uma vez que as modificações quantitativas e qualitativas dos receptores podem alterar as respostas das citocinas, mesmo onde níveis destas citocinas se apresentam inalterados. Essa situação é bem descrita para a interação IL-1 β /IL1-R1,

conforme apresentado na discussão deste trabalho. Além disso, os fatores neurotróficos, como o BDNF, merecem ser estudados de forma semelhante às citocinas, com caracterização da curva de expressão e da quantificação de seus receptores.

Nesse contexto, também será relevante o desenvolvimento de novas análises envolvendo NCS-1 e DARPP-32 em modelo semelhante ao proposto para as citocinas inflamatórias, bem como em outros modelos de epilepsia, com a finalidade de comparar com os resultados obtidos por nosso grupo.

Apesar de ainda não ser bem estabelecido a ação detalhada de cada mediador estudado por este trabalho, é inegável que a participação destes é extremamente relevante no ambiente pró-convulsivo do sistema nervoso central dos animais submetidos e sujeitos ao episódio de convulsão e epilepsia.

7. Apêndice

A. Cópia do artigo publicado em *Neurosciense Letters*

Wistar Audiogenic Rats (WAR) exhibit altered levels of cytokines and brain-derived neurotrophic factor following audiogenic seizures

Túlio Cezar de Souza Bernardino¹, Antonio Lúcio Teixeira², Aline Silva Miranda², Patrícia Maia Guidine³, Gustavo Rezende³, Maria Carolina Doretto³, Gabriel Perfeito Castro³, Luciana Drummond³, Márcio Flávio Dutra Moraes³, Pedro Augusto Lopes Tito¹, Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira^{1,#}, Helton José Reis^{1,#,*}

¹Department of Pharmacology, ²Department of Internal Medicine, ³Department of Biophysics and Physiology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

These authors share the same status.

* Corresponding author: Helton J. Reis, Ph.D.

Department of Pharmacology

Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antonio Carlos 6627,

31270-901,

Belo Horizonte, MG, Brazil

Tel.: +55 (31)3409-2719

Fax: +55 (31)3409-2695

E-mail: heltonjr@icb.ufmg.br

ABSTRACT

Increasing body of evidence suggests that inflammatory and neurotrophic factors might be important for epileptogenesis. Most animal studies demonstrated altered levels of these mediators in drug-induced models of seizures and epilepsy. In the present study, we investigated the production of cytokines and a neurotrophin in the brain of Wistar Audiogenic Rats (WAR), a genetic model of epilepsy, stimulated with high-intensity sound. Four hours after stimulation, animals were decapitated and the hippocampus, inferior colliculus, striatum and cortex were removed for evaluation of the levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, tumor necrosis factor (TNF) and brain derived neurotrophic factor (BDNF). All the cytokines and BDNF levels were increased in the cortex. Increased levels of TNF- α and IL-6 were also observed in the striatum. Finally, TNF- α also increased in the inferior colliculus after the seizures induced by high-intensity sound. Although different studies have demonstrated that the levels of cytokines and BDNF increase in animal models of epilepsy induced by chemical stimuli, we provided here evidence that these mediators are also increased in WAR, a genetic model of epilepsy. Thus, the observed increase in these mediators might be involved in the pathophysiology of epilepsy.

Keywords: Wistar Audiogenic Rats, seizures, inflammation, cytokines, BDNF

1 - INTRODUCTION

Epilepsy is a pathological condition that affects about 1% of the population and is characterized by recurrent seizures. Different factors might be important for the pathogenesis of epilepsy. Among them, one important seems to be inflammation. The central nervous system production of cytokines has been associated with seizures in several studies [9, 23, 32]. For instance, it has been shown that interleukin (IL-1)- β , IL-6 and tumor necrosis factor (TNF) are increased in the brain of different drug-induced animal models of epilepsy [17]. In general, the production of these inflammatory mediators has been associated with neuronal loss arising from epileptic seizures [37]. Furthermore, it is currently believed that changes in the pattern of the inflammatory and neurotrophic factors contribute to the kindling phenomenon and epileptogenesis.

Blockage of leukocyte-vascular interactions with antibodies after acute seizures has been shown to prevent the development of epilepsy [9]. Much effort has been dedicated to investigate the change of these factors after seizures in an attempt to elucidate their possible role in epilepsy.

The Wistar Audiogenic Rats (WAR) are used as a genetic animal model of epilepsy that were developed from a Wistar progenitor [7]. WAR presents severe seizures after high-intensity sound stimulation (120 dB) [7] without any chemical stimulus. Considering that the epileptogenic and convulsive drugs could per se affect the immune system and the production of neurotrophic factors, it is relevant to investigate the occurrence of an inflammatory pattern, as well as the levels of neurotrophins, after the seizures in genetic models of epilepsy. Moreover, the alterations in inflammatory and neurotrophic factors induced by audiogenic seizures in the brain of epileptic animals shortly after the seizures are poorly described. In the present study, we evaluated the pattern of production of cytokines and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) after seizures induced by auditory stimulus in WAR.

2 - MATERIALS AND METHODS

2.1 - Animals and seizure induction

Male WAR were supplied by the CEBIO-ICB-UFMG vivarium. All experiments were performed in accordance with the Brazilian Institutional Ethics Committee (CEUA), Federal University of Minas Gerais. Five to six animals were used in each group. Audiogenic seizure sensitivity and severity were evaluated using the severity index (SI) developed by [10]. This index ranges from SI=0 (no seizures) to SI=1 (generalized tonic-clonic seizures with fore and hind limb hyperextension). Animals were screened with sound from a buzzing doorbell (120 dB SPL, 60 s). Three screening trials were performed with a minimum interval of 48 h between each trial. All the animals included in the present study revealed $SI \geq 0.73$ in three trials, except for the animal number 8, which presented only one seizure with a score of 0.23 during the three trials (Table 1). One week after the last trial, animals of the audiogenic group were submitted to the same auditory stimulus previously used. On the other hand, the control group were submitted to the same conditions as audiogenic group, although

these animals were not stimulated with the auditory stimulus. Brain samples were collected for determination of the cytokines and neurotrophins protein levels by ELISA.

Rat Identification	Trial #			Severity Index	Latency for Seizure onset (s)
	1	2	3		
1	0.85	0.85	0.73	0.85	46
2	0.73	0.85	0.85	0.73	33
3	0.85	0.73	0.85	0.85	36
4	0.85	0.85	0.85	No stimulus	-
5	0.73	0.85	0.85	No stimulus	-
6	0.95	0.85	0.85	No stimulus	-
7	0.73	0.73	0.85	0.85	36
8	0.73	0,23	0.73	0.73	07
9	0.73	0.73	0.95	No stimulus	-
10	0.73	0.85	0.73	No stimulus	-
11	0.85	0.73	0.73	No stimulus	-

Table 1: Screening trials and severity index.

2.2 - ELISA

Animals were euthanized 4 h after the last auditory stimulus. Brains were dissected and hippocampus, cortex, inferior colliculus, striatum were stored at -80°C until analysis. Thereafter, the brain areas were homogenized in extraction solution (100

mg of tissue per 1 mL), containing: 0.4M NaCl, 0.05% Tween 20, 0.5% BSA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1mM benzethonium chloride, 10mM EDTA and 20KI aprotinin), using Ultra-Turrax (Ika-Werke GmbH & Co. KG, Staufen in Breisgau, Germany). Tissues homogenate were centrifuged at 3,000 g for 10 min at 4 °C and the supernatants were collected and stored at -20 °C.

The concentration of TNF- α , IL-6, IL-1 β and BDNF were determined by ELISA. The supernatants of brain extraction, at a 1:3 dilution in the 1% BSA in PBS, were assayed in a commercially available ELISA set-up according to the procedures supplied by manufacturer (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Data of the non-stimulated group was converted to 100 % and was used for comparison with the stimulated group.

2.3 - Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Prism 5 softWARe (GraphPad, CA, USA). Values were compared using t-test (two groups). The level of statistical significance was set at a p value less than 0.05.

3 - RESULTS

3.1 - Effect of seizures on IL-1 β levels in different brain regions of WAR

An increase in IL-1 β was observed only in the cortex 4 h after the audiogenic seizures (67.1% of increase; $P < 0.01$; Fig. 1). Levels of this cytokine did not change in the other brain regions evaluated.

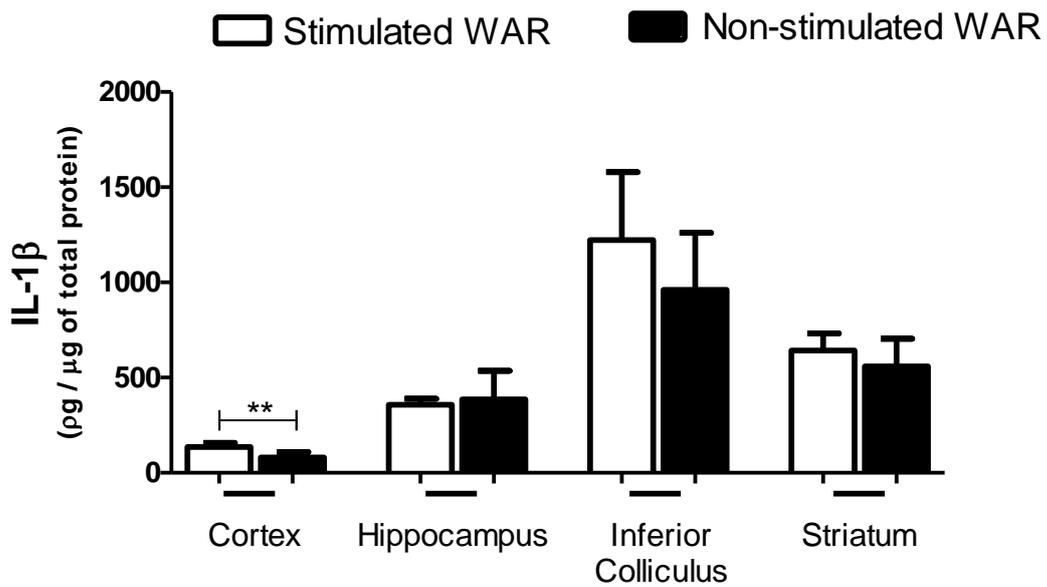


Fig. 1: Levels of IL-1 β in the inferior colliculus, striatum, cortex and hippocampus 4 h after auditory-induced seizures. **P<0.01 in comparison with non-stimulated WAR.

3.2 - Effect of seizures on IL-6 levels in different brain regions of WAR

An increase in IL-6 levels was observed in the striatum (19.7% of increase; P<0.05) and cortex (46.5% of increase; P<0.01) 4 h after the audiogenic seizures (Fig. 2). No alteration was observed in the inferior colliculus and hippocampus.

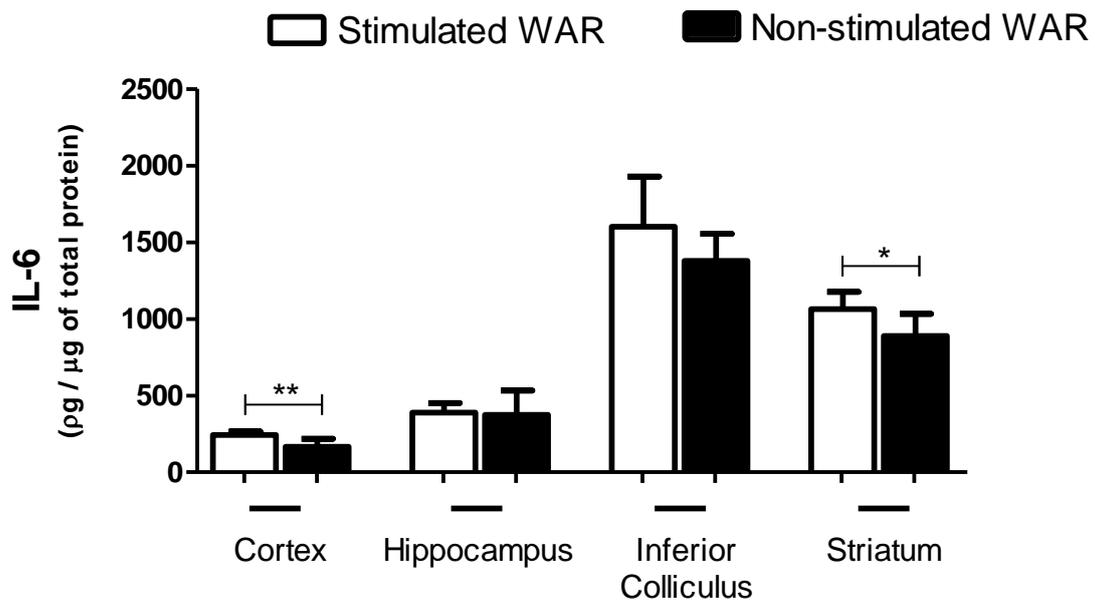


Fig. 2: Levels of IL-6 in the inferior colliculus, striatum, cortex and hippocampus 4 h after auditory-induced seizures. ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$ in comparison with non-stimulated WAR.

3.3 - Effect of seizures on TNF levels in different brain regions of WAR

TNF- α levels were increased in the cortex (164.7% of increase; $P < 0.001$), inferior colliculus (27.5% of increase; $P < 0.01$) and striatum (31.7% of increase; $P < 0.01$) 4 h after the audiogenic seizures (Fig. 3). No difference was observed in the hippocampus.

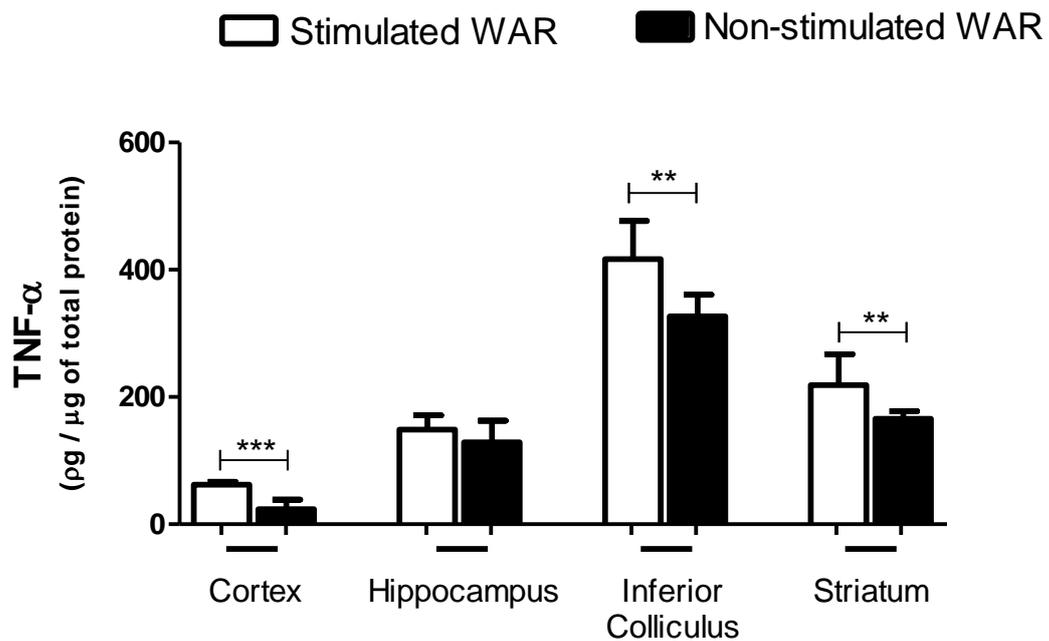


Fig. 3: Levels of TNF in the inferior colliculus, striatum, cortex and hippocampus 4 h after auditory-induced seizures. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ in comparison with non-stimulated WAR.

3.4 - Effect of seizures on BDNF levels in different brain regions of WAR

In order to investigate whether a neurotrophic factor is altered after seizures in a genetic model of epilepsy, we evaluated the levels of BDNF in the brain after the convulsions. Audiogenic seizures increased levels of BDNF only in the cerebral cortex of WAR (98.5% of increase; $P < 0.05$; Fig. 4).

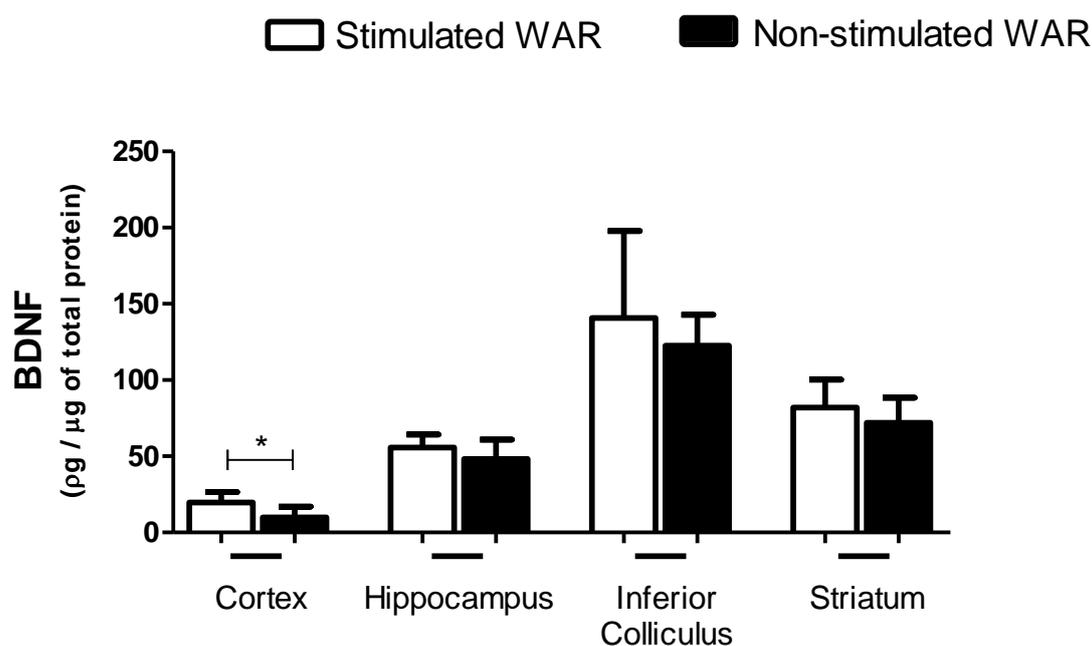


Fig. 4: Levels of BDNF in the inferior colliculus, striatum, cortex and hippocampus 4 h after auditory-induced seizures. *P<0.05 in comparison with non-stimulated WAR.

4 - DISCUSSION

There is an intricate relationship between inflammation and epilepsy. It is known that inflammation might be responsible for the initiation of seizures, such as in fever. On the other hand, seizures might also be responsible for triggering an inflammatory process in the brain, as we demonstrated, for the first time, that seizures induced by sound stimulation, increased the production of IL-1 β , IL-6, TNF and BDNF in WAR. Of note, changes in the inflammatory response could be associated with the pathological events in the postictal phase [20, 22].

Low levels of IL-1 β , IL-6 and TNF are physiologically present in the adult brain [41]. It has been suggested that these cytokines might contribute to seizure activity in epilepsy [4, 39, 42]. In the current work, we found a significant increase of IL-1 β levels in the cortex induced by audiogenic seizures. In agreement, a great body of evidence has shown that IL-1 β might be involved in epilepsy since it is enhanced in cortex, amygdala and hippocampus after convulsive stimuli [17, 24, 38]. Moreover, intrahippocampal application of recombinant IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) or its

selective endogenous overexpression in astrocytes potently inhibits seizures induced by chemical stimuli, suggesting that the balance between brain IL-1 β and IL-1Ra represents a crucial mechanism to control seizure generalization [38, 40]. Interestingly, a selective blockade or gene deletion of caspase-1, the enzyme responsible for pro-IL-1 β cleavage in its biologically active form of IL-1 β , in hippocampus of rats was able to significantly decrease seizures events induced by kainic acid injections [25]. Altogether, these studies support a role for IL-1 β in the development of seizures during epilepsy.

TNF is a cytokine with pleiotropic effects, which plays a role in CNS normal functioning. For instance, this cytokine may regulate the traffic of neurotransmitter receptors in the cortex, hippocampus and striatum [11, 16, 35]. Higher levels of TNF were found in the serum and hippocampal parenchyma of epileptic patients in comparison with healthy controls [14, 33]. In line with these previous studies, we found that TNF- α increased in all brain regions evaluated, except in the hippocampus. It has been shown that TNF mediates seizures susceptibility in a model of seizures induced by pentylentetrazole in animals with peripheral inflammation [27]. Interestingly, injection of murine recombinant TNF in the hippocampus inhibited seizures in mice [1]. A similar finding was reported in transgenic mice with TNF overexpression by astrocytes. Therefore, mice lacking the p75 receptor (or TNF receptor II) or both, p75 and p55 (TNF receptor I) receptors, showed prolonged seizures [1]. On the other hand, TNF receptor 1 (p55) signalling has been suggested to contribute to neuropathology induced by seizures [36]. Of note, mice deficient only in p55 receptor showed a significant decrease in seizures events [1].

Although IL-1 β and TNF are considered mainly pro-inflammatory cytokines, IL-6 presents both pro- and anti-inflammatory properties [31]. Here we demonstrated that IL-6 is increased in the cortex and striatum after audiogenic seizures in WAR. It has been shown that IL-6 mRNA rapidly increased in the hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine-lithium in rats [28]. IL-6-deficient mice present enhanced frequency of convulsions and neuronal injury induced by kainic acid [21]. Moreover, previous studies using mice with genetic deletion of IL-6 gene, demonstrated that the lack of IL-6 was associated with increased seizure susceptibility to chemoconvulsants, especially to glutamate receptor agonists, as well as with an enhanced propensity to develop audiogenic seizures [6, 8]. A proconvulsant effect of

IL-6 has also been described against generalized seizures induced by the GABA receptor antagonist pentylenetetrazole [12].

In EL mice, an inbred mutant strain regarded as a genetic model of idiopathic epilepsy, increased mRNA expression of IL-1 β , IL-6 and TNF was also observed 4 h after vestibular stimulation [20]. Soon after seizures, immunoreactivity of IL-1 β was enhanced in the parietal cortex, where the seizure starts, of EL mice [19]. In the hippocampus, the seizure propagation site, the levels of this cytokine gradually increased and peaked only at six days after seizures. In the present study, we demonstrated that IL-1 β , IL-6 and TNF are increased in different brain regions of WAR in comparison with non-stimulated controls 4 h after audiogenic seizures. Considering that the evaluated brain regions constitute the anatomical substrate for the WAR seizures, the increase in these inflammatory mediators may indicate their involvement in seizure facilitation.

BDNF is a neurotrophic factor that regulates neuronal survival and development, as well as it modulates synaptic function and plasticity [2]. However, this neurotrophin might also play a role in pathological conditions. After the seizures, WAR revealed increased levels of BDNF in cortex. It has been shown that the levels of this neurotrophin, as well as its receptors, are highly expressed in the brain areas involved in seizures [18].

Moreover, the impairment of BDNF signalling [e.g. in BDNF heterozygous (+/-) mutant mice or blockage of TrkB receptors] has been shown to inhibit the development of kindling in rodents [3, 13]. In agreement, mice overexpressing BDNF have increased seizure severity in response to kainic acid, as well as in vitro hyperexcitability in hippocampus and entorhinal cortex [5]. On the contrary, there is also evidence that cerebral perfusion with BDNF reduced the development of hippocampal kindling and suppressed seizures induced by rapid hippocampal kindling [15, 26]. In this scenario, it seems that BDNF could play a dual role in epilepsy, possibly in a context dependent fashion. For instance, administrating BDNF to a slice from an epileptic rat leads to spontaneous burst discharges but it also induces the synthesis of neuropeptide Y, an anticonvulsant compound [29, 30, 34]. In our model, the highest increase of BDNF was observed in the cortex, albeit currently it is not possible to speculate the role of this neurotrophin after the convulsive seizures in WAR.

5 – CONCLUSIONS

Levels of cytokines and BDNF are increased by audiogenic seizures in the WAR genetic model of epilepsy. This study strengthens the observation that inflammatory mediators and neurotrophic factors are altered shortly after the seizures and might play a key role in epilepsy.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by FAPEMIG (CBB-APQ-04389-10; CBB-APQ-04625-10; PPM-00372-13), Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq (protocol number 479254/2013-3), Brazil. HJR, MFDM and ALT are recipients of CNPq fellowship.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

- [1] S. Balosso, T. Ravizza, C. Perego, J. Peschon, I.L. Campbell, M.G. De Simoni, A. Vezzani, Tumor necrosis factor-alpha inhibits seizures in mice via p75 receptors, *Ann Neurol* 57 (2005) 804-812.
- [2] M. Baydyuk, B. Xu, BDNF signaling and survival of striatal neurons, *Front Cell Neurosci* 8 (2014) 254.
- [3] D.K. Binder, M.J. Routbort, T.E. Ryan, G.D. Yancopoulos, J.O. McNamara, Selective inhibition of kindling development by intraventricular administration of TrkB receptor body, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19 (1999) 1424-1436.
- [4] J. Choi, D.R. Nordli, Jr., T.D. Alden, A. DiPatri, Jr., L. Laux, K. Kelley, J. Rosenow, S.U. Schuele, V. Rajaram, S. Koh, Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy, *Journal of neuroinflammation* 6 (2009) 38.
- [5] S.D. Croll, C. Suri, D.L. Compton, M.V. Simmons, G.D. Yancopoulos, R.M. Lindsay, S.J. Wiegand, J.S. Rudge, H.E. Scharfman, Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex, *Neuroscience* 93 (1999) 1491-1506.
- [6] G. De Luca, R.M. Di Giorgio, S. Macaione, P.R. Calpona, S. Costantino, E.D. Di Paola, A. De Sarro, G. Ciliberto, G. De Sarro, Susceptibility to audiogenic seizure and neurotransmitter amino acid levels in different brain areas of IL-6-deficient mice, *Pharmacol Biochem Behav* 78 (2004) 75-81.
- [7] M.C. Doretto, C.G. Fonseca, R.B. Lobo, V.C. Terra, J.A. Oliveira, N. Garcia-Cairasco, Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR), *Behav Genet* 33 (2003) 33-42.
- [8] M. Erta, A. Quintana, J. Hidalgo, Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system, *Int J Biol Sci* 8 (2012) 1254-1266.

- [9] P.F. Fabene, G. Navarro Mora, M. Martinello, B. Rossi, F. Merigo, L. Ottoboni, S. Bach, S. Angiari, D. Benati, A. Chakir, L. Zanetti, F. Schio, A. Osculati, P. Marzola, E. Nicolato, J.W. Homeister, L. Xia, J.B. Lowe, R.P. McEver, F. Osculati, A. Sbarbati, E.C. Butcher, G. Constantin, A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy, *Nat Med* 14 (2008) 1377-1383.
- [10] N. Garcia-Cairasco, H. Wakamatsu, J.A. Oliveira, E.L. Gomes, E.A. Del Bel, L.E. Mello, Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats, *Epilepsy research* 26 (1996) 177-192.
- [11] P. He, Q. Liu, J. Wu, Y. Shen, Genetic deletion of TNF receptor suppresses excitatory synaptic transmission via reducing AMPA receptor synaptic localization in cortical neurons, *FASEB J* 26 (2012) 334-345.
- [12] A.V. Kalueff, K.A. Lehtimaki, A. Ylinen, J. Honkaniemi, J. Peltola, Intranasal administration of human IL-6 increases the severity of chemically induced seizures in rats, *Neuroscience letters* 365 (2004) 106-110.
- [13] M. Kokaia, P. Ernfors, Z. Kokaia, E. Elmer, R. Jaenisch, O. Lindvall, Suppressed epileptogenesis in BDNF mutant mice, *Exp Neurol* 133 (1995) 215-224.
- [14] J. Lachos, M. Zattoni, H.G. Wieser, J.M. Fritschy, T. Langmann, G. Schmitz, M. Errede, D. Virgintino, Y. Yonekawa, K. Frei, Characterization of the gene expression profile of human hippocampus in mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis, *Epilepsy Res Treat* 2011 (2011) 758407.
- [15] Y. Larmet, S. Reibel, J. Carnahan, H. Nawa, C. Marescaux, A. Depaulis, Protective effects of brain-derived neurotrophic factor on the development of hippocampal kindling in the rat, *Neuroreport* 6 (1995) 1937-1941.
- [16] G.M. Lewitus, H. Pribiag, R. Duseja, M. St-Hilaire, D. Stellwagen, An adaptive role of TNFalpha in the regulation of striatal synapses, *J Neurosci* 34 (2014) 6146-6155.
- [17] G. Li, S. Bauer, M. Nowak, B. Norwood, B. Tackenberg, F. Rosenow, S. Knake, W.H. Oertel, H.M. Hamer, Cytokines and epilepsy, *Seizure* 20 (2011) 249-256.
- [18] O. Lindvall, Z. Kokaia, J. Bengzon, E. Elmer, M. Kokaia, Neurotrophins and brain insults, *Trends Neurosci* 17 (1994) 490-496.
- [19] Y.L. Murashima, J. Suzuki, M. Yoshii, Role of cytokines during epileptogenesis and in the transition from the interictal to the ictal state in the epileptic mutant EL mouse, *Gene Regul Syst Bio* 2 (2008) 267-274.
- [20] K. Okada, U. Yamashita, S. Tsuji, Ameliorative effect of pioglitazone on seizure responses in genetically epilepsy-susceptible EL mice, *Brain Res* 1102 (2006) 175-178.
- [21] M. Penkowa, A. Molinero, J. Carrasco, J. Hidalgo, Interleukin-6 deficiency reduces the brain inflammatory response and increases oxidative stress and neurodegeneration after kainic acid-induced seizures, *Neuroscience* 102 (2001) 805-818.
- [22] M.G. Pereira, D.L. Gitai, M.L. Paco-Larson, J.B. Pesquero, N. Garcia-Cairasco, C.M. Costa-Neto, Modulation of B1 and B2 kinin receptors expression levels in the hippocampus of rats after audiogenic kindling and with limbic recruitment, a model of temporal lobe epilepsy, *Int Immunopharmacol* 8 (2008) 200-205.
- [23] F. Pernot, C. Heinrich, L. Barbier, A. Peinnequin, P. Carpentier, F. Dhote, V. Baille, C. Beaup, A. Depaulis, F. Dorandeu, Inflammatory changes during epileptogenesis and spontaneous seizures in a mouse model of mesiotemporal lobe epilepsy, *Epilepsia* 52 (2011) 2315-2325.
- [24] C.R. Plata-Salaman, S.E. Ilyin, N.P. Turrin, D. Gayle, M.C. Flynn, A.E. Romanovitch, M.E. Kelly, Y. Bureau, H. Anisman, D.C. McIntyre, Kindling modulates the IL-1beta system, TNF-alpha, TGF-beta1, and neuropeptide mRNAs in specific brain regions, *Brain Res Mol Brain Res* 75 (2000) 248-258.
- [25] T. Ravizza, S.M. Lucas, S. Balosso, L. Bernardino, G. Ku, F. Noe, J. Malva, J.C. Randle, S. Allan, A. Vezzani, Inactivation of caspase-1 in rodent brain: a novel anticonvulsive strategy, *Epilepsia* 47 (2006) 1160-1168.
- [26] S. Reibel, Y. Larmet, B.T. Le, J. Carnahan, C. Marescaux, A. Depaulis, Brain-derived neurotrophic factor delays hippocampal kindling in the rat, *Neuroscience* 100 (2000) 777-788.

- [27] K. Riazi, M.A. Galic, J.B. Kuzmiski, W. Ho, K.A. Sharkey, Q.J. Pittman, Microglial activation and TNF α production mediate altered CNS excitability following peripheral inflammation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (2008) 17151-17156.
- [28] D.R. Rosell, J. Nacher, K.T. Akama, B.S. McEwen, Spatiotemporal distribution of gp130 cytokines and their receptors after status epilepticus: comparison with neuronal degeneration and microglial activation, *Neuroscience* 122 (2003) 329-348.
- [29] H.E. Scharfman, J.H. Goodman, A.L. Sollas, Actions of brain-derived neurotrophic factor in slices from rats with spontaneous seizures and mossy fiber sprouting in the dentate gyrus, *J Neurosci* 19 (1999) 5619-5631.
- [30] H.E. Scharfman, N.J. MacLusky, Estrogen-growth factor interactions and their contributions to neurological disorders, *Headache* 48 Suppl 2 (2008) S77-89.
- [31] J. Scheller, A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, S. Rose-John, The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6, *Biochimica et biophysica acta* 1813 (2011) 878-888.
- [32] G. Silveira, A.C. de Oliveira, A.L. Teixeira, Insights into inflammation and epilepsy from the basic and clinical sciences, *J Clin Neurosci* 19 (2012) 1071-1075.
- [33] S. Sinha, S.A. Patil, V. Jayalekshmy, P. Satishchandra, Do cytokines have any role in epilepsy?, *Epilepsy Res* 82 (2008) 171-176.
- [34] G. Sperk, T. Hamilton, W.F. Colmers, Neuropeptide Y in the dentate gyrus, *Progress in brain research* 163 (2007) 285-297.
- [35] D. Stellwagen, R.C. Malenka, Synaptic scaling mediated by glial TNF- α , *Nature* 440 (2006) 1054-1059.
- [36] S.J. Thompson, M.D. Ashley, S. Stohr, C. Schindler, M. Li, K.A. McCarthy-Culpepper, A.N. Pearson, Z.G. Xiong, R.P. Simon, D.C. Henshall, R. Meller, Suppression of TNF receptor-1 signaling in an in vitro model of epileptic tolerance, *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 3 (2011) 120-132.
- [37] A. Vezzani, S. Balosso, E. Aronica, T. Ravizza, Basic mechanisms of status epilepticus due to infection and inflammation, *Epilepsia* 50 Suppl 12 (2009) 56-57.
- [38] A. Vezzani, M. Conti, A. De Luigi, T. Ravizza, D. Moneta, F. Marchesi, M.G. De Simoni, Interleukin-1 β immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures, *J Neurosci* 19 (1999) 5054-5065.
- [39] A. Vezzani, M. Maroso, S. Balosso, M.A. Sanchez, T. Bartfai, IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures, *Brain Behav Immun* 25 (2011) 1281-1289.
- [40] A. Vezzani, D. Moneta, M. Conti, C. Richichi, T. Ravizza, A. De Luigi, M.G. De Simoni, G. Sperk, S. Andell-Jonsson, J. Lundkvist, K. Iverfeldt, T. Bartfai, Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 11534-11539.
- [41] L. Vitkovic, J. Bockaert, C. Jacque, "Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain?, *J Neurochem* 74 (2000) 457-471.
- [42] N. Yu, H. Liu, Q. Di, Modulation of Immunity and the Inflammatory Response: A New Target for Treating Drug-resistant Epilepsy, *Curr Neuropharmacol* 11 (2013) 114-127.

8. Referências bibliográficas

- ADACHI, N. et al. New insight in expression, transport, and secretion of brain-derived neurotrophic factor: Implications in brain-related diseases. **World J Biol Chem**, v. 5, n. 4, p. 409-28, Nov 26 2014.
- ALBERT, K. A. et al. Evidence for decreased DARPP-32 in the prefrontal cortex of patients with schizophrenia. **Arch Gen Psychiatry**, v. 59, n. 8, p. 705-12, Aug 2002.
- AMMENDRUP-JOHNSEN, I. et al. Neurotrophin-3 Enhances the Synaptic Organizing Function of TrkC-Protein Tyrosine Phosphatase sigma in Rat Hippocampal Neurons. **J Neurosci**, v. 35, n. 36, p. 12425-31, Sep 9 2015.
- ARMIJO, J. A. et al. Ion channels and epilepsy. **Curr Pharm Des**, v. 11, n. 15, p. 1975-2003, 2005.
- ARONICA, E. et al. Expression and localization of voltage dependent potassium channel Kv4.2 in epilepsy associated focal lesions. **Neurobiol Dis**, v. 36, n. 1, p. 81-95, Oct 2009.
- ATAEI, N.; SABZGHABAEI, A. M.; MOVAHEDIAN, A. Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase II is a Ubiquitous Molecule in Human Long-term Memory Synaptic Plasticity: A Systematic Review. **Int J Prev Med**, v. 6, p. 88, 2015.
- AVANZINI, G.; FORCELLI, P. A.; GALE, K. Are there really "epileptogenic" mechanisms or only corruptions of "normal" plasticity? **Adv Exp Med Biol**, v. 813, p. 95-107, 2014.
- BALOSSO, S. et al. The dual role of TNF-alpha and its receptors in seizures. **Exp Neurol**, v. 247, p. 267-71, Sep 2013.
- BALOSSO, S. et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits seizures in mice via p75 receptors. **Ann Neurol**, v. 57, n. 6, p. 804-12, Jun 2005.
- BAR-GILL, A. B. et al. The extra-cellular signal regulated kinases ERK1 and ERK2 segregate displaying distinct spatiotemporal characteristics in activated mast cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1833, n. 9, p. 2070-82, Sep 2013.
- BARONE, P. et al. Expression of c-fos protein in the experimental epilepsy induced by pilocarpine. **Synapse**, v. 14, n. 1, p. 1-9, May 1993.
- BAYDYUK, M.; XU, B. BDNF signaling and survival of striatal neurons. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 254, 2014.
- BEAULIEU, J. M.; GAINETDINOV, R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. **Pharmacol Rev**, v. 63, n. 1, p. 182-217, Mar 2011.
- BEN ACHOUR, S.; PASCUAL, O. Glia: the many ways to modulate synaptic plasticity. **Neurochem Int**, v. 57, n. 4, p. 440-5, Nov 2010.
- BENVENISTE, E. N. et al. Induction and regulation of interleukin-6 gene expression in rat astrocytes. **J Neuroimmunol**, v. 30, n. 2-3, p. 201-12, Dec 1990.
- BERG, A. T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676-85, Apr 2010.
- BERTRAM, E. The relevance of kindling for human epilepsy. **Epilepsia**, v. 48 Suppl 2, p. 65-74, 2007.
- BINDER, D. K. et al. BDNF and epilepsy: too much of a good thing? **Trends Neurosci**, v. 24, n. 1, p. 47-53, Jan 2001.
- BLANK, T. et al. The phosphoprotein DARPP-32 mediates cAMP-dependent potentiation of striatal N-methyl-D-aspartate responses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 26, p. 14859-64, Dec 23 1997.
- BOZZI, Y.; BORRELLI, E. Dopamine D2 receptor signaling controls neuronal cell death induced by muscarinic and glutamatergic drugs. **Mol Cell Neurosci**, v. 19, n. 2, p. 263-71, Feb 2002.
- BOZZI, Y.; DUNLEAVY, M.; HENSHALL, D. C. Cell signaling underlying epileptic behavior. **Front Behav Neurosci**, v. 5, p. 45, 2011.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.
- BRITES, D.; FERNANDES, A. Neuroinflammation and Depression: Microglia Activation, Extracellular Microvesicles and microRNA Dysregulation. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 476, 2015.
- BRODIE, M. J. et al. Epilepsy, Antiepileptic Drugs, and Aggression: An Evidence-Based Review. **Pharmacol Rev**, v. 68, n. 3, p. 563-602, Jul 2016.
- BURGOYNE, R. D.; HAYNES, L. P. Sense and specificity in neuronal calcium signalling. **Biochim Biophys Acta**, v. 1853, n. 9, p. 1921-32, Sep 2015.
- CALABRESE, F. et al. Brain-derived neurotrophic factor: a bridge between inflammation and neuroplasticity. **Front Cell Neurosci**, v. 8, p. 430, 2014.
- CAMFIELD, P.; CAMFIELD, C. Incidence, prevalence and aetiology of seizures and epilepsy in children. **Epileptic Disord**, v. 17, n. 2, p. 117-23, Jun 2015.
- CAMPBELL, I. L. Transgenic mice and cytokine actions in the brain: bridging the gap between structural and functional neuropathology. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 26, n. 2-3, p. 327-36, May 1998.
- CEPEDA, C.; BUCHWALD, N. A.; LEVINE, M. S. Neuromodulatory actions of dopamine in the neostriatum are dependent upon the excitatory amino acid receptor subtypes activated. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 20, p. 9576-80, Oct 15 1993.
- CHANDWANI, S. et al. Induction of DARPP-32 by brain-derived neurotrophic factor in striatal neurons in vitro is modified by histone deacetylase inhibitors and Nab2. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e76842, 2013.
- CHOI, J.; KOH, S. Role of brain inflammation in epileptogenesis. **Yonsei Med J**, v. 49, n. 1, p. 1-18, Feb 29 2008.
- CITRARO, R. et al. Antiepileptogenic effects of the selective COX-2 inhibitor etoricoxib, on the development of spontaneous absence seizures in WAG/Rij rats. **Brain Res Bull**, v. 113, p. 1-7, Apr 2015.
- CROFT, W.; DOBSON, K. L.; BELLAMY, T. C. Plasticity of Neuron-Glia Transmission: Equipping Glia for Long-Term Integration of Network Activity. **Neural Plast**, v. 2015, p. 765792, 2015.
- CROLL, S. D. et al. Brain-derived neurotrophic factor transgenic mice exhibit passive avoidance deficits, increased seizure severity and in vitro hyperexcitability in the hippocampus and entorhinal cortex. **Neuroscience**, v. 93, n. 4, p. 1491-506, 1999.
- CUNHA, A. O. et al. Inhibition of long-term potentiation in the schaffer-CA1 pathway by repetitive high-intensity sound stimulation. **Neuroscience**, v. 310, p. 114-27, Dec 3 2015.
- CURIA, G. et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **J Neurosci Methods**, v. 172, n. 2, p. 143-57, Jul 30 2008.
- D'ARCANGELO, G. et al. Interleukin-6 inhibits neurotransmitter release and the spread of excitation in the rat cerebral cortex. **Eur J Neurosci**, v. 12, n. 4, p. 1241-52, Apr 2000.
- DASON, J. S. et al. Multiple roles for frequenin/NCS-1 in synaptic function and development. **Mol Neurobiol**, v. 45, n. 2, p. 388-402, Apr 2012.
- DASON, J. S. et al. Frequenin/NCS-1 and the Ca²⁺-channel alpha1-subunit co-regulate synaptic transmission and nerve-terminal growth. **J Cell Sci**, v. 122, n. Pt 22, p. 4109-21, Nov 15 2009.
- DE BOCK, F.; DORNAND, J.; RONDOUIN, G. Release of TNF alpha in the rat hippocampus following epileptic seizures and excitotoxic neuronal damage. **Neuroreport**, v. 7, n. 6, p. 1125-9, Apr 26 1996.
- DE OLIVEIRA, A. C. et al. Neuroinflammation and Neurodegeneration: Pinpointing Pathological and Pharmacological Targets. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 487241, 2015.
- DE REZENDE, V. B. et al. NCS-1 deficiency causes anxiety and depressive-like behavior with impaired non-aversive memory in mice. **Physiol Behav**, v. 130, p. 91-8, May 10 2014.
- DE SARRO, G. et al. Seizure susceptibility to various convulsant stimuli of knockout interleukin-6 mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 77, n. 4, p. 761-6, Apr 2004.

- DE SIMONI, M. G. et al. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. **Eur J Neurosci**, v. 12, n. 7, p. 2623-33, Jul 2000.
- DE SOUZA BERNARDINO, T. C. et al. Wistar Audiogenic Rats (WAR) exhibit altered levels of cytokines and brain-derived neurotrophic factor following audiogenic seizures. **Neurosci Lett**, v. 597, p. 154-158, Apr 30 2015.
- DENINNO, M. P. et al. A68930: a potent agonist selective for the dopamine D1 receptor. **Eur J Pharmacol**, v. 199, n. 2, p. 209-19, Jun 25 1991.
- DEVINSKY, O. et al. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. **Trends Neurosci**, v. 36, n. 3, p. 174-84, Mar 2013.
- DORETTO, M. C. et al. Quantitative study of the response to genetic selection of the Wistar audiogenic rat strain (WAR). **Behav Genet**, v. 33, n. 1, p. 33-42, Jan 2003.
- DORETTO, M. C. et al. Dipyrone, a novel anticonvulsant agent? Insights from three experimental epilepsy models. **Neuroreport**, v. 9, n. 10, p. 2415-21, Jul 13 1998.
- DRAGICEVIC, E. et al. Cav1.3 channels control D2-autoreceptor responses via NCS-1 in substantia nigra dopamine neurons. **Brain**, v. 137, n. Pt 8, p. 2287-302, Aug 2014.
- DUMAN, R. S.; VAIDYA, V. A. Molecular and cellular actions of chronic electroconvulsive seizures. **J ECT**, v. 14, n. 3, p. 181-93, Sep 1998.
- DUTRA MORAES, M. F.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; GARCIA-CAIRASCO, N. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. **Epilepsy Res**, v. 39, n. 3, p. 251-9, May 2000.
- ELMER, E. et al. Dynamic changes of brain-derived neurotrophic factor protein levels in the rat forebrain after single and recurring kindling-induced seizures. **Neuroscience**, v. 83, n. 2, p. 351-62, Mar 1998.
- ERNFORS, P. et al. Increased levels of messenger RNAs for neurotrophic factors in the brain during kindling epileptogenesis. **Neuron**, v. 7, n. 1, p. 165-76, Jul 1991.
- ERTA, M.; QUINTANA, A.; HIDALGO, J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. **Int J Biol Sci**, v. 8, n. 9, p. 1254-66, 2012.
- ESCOBAR, M. L.; FIGUEROA-GUZMAN, Y.; GOMEZ-PALACIO-SCHJETNAN, A. In vivo insular cortex LTP induced by brain-derived neurotrophic factor. **Brain Res**, v. 991, n. 1-2, p. 274-9, Nov 21 2003.
- FAINGOLD, C. L. The genetically epilepsy-prone rat. **Gen Pharmacol**, v. 19, n. 3, p. 331-8, 1988.
- FERNANDEZ, E. et al. DARPP-32 is a robust integrator of dopamine and glutamate signals. **PLoS Comput Biol**, v. 2, n. 12, p. e176, Dec 22 2006.
- FISHER, R. S. et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475-82, Apr 2014.
- FLORES-HERNANDEZ, J. et al. Dopamine enhancement of NMDA currents in dissociated medium-sized striatal neurons: role of D1 receptors and DARPP-32. **J Neurophysiol**, v. 88, n. 6, p. 3010-20, Dec 2002.
- FOLDVARY-SCHAEFER, N.; FALCONE, T. Catamenial epilepsy: pathophysiology, diagnosis, and management. **Neurology**, v. 61, n. 6 Suppl 2, p. S2-15, Sep 1 2003.
- FRITSCH, B. et al. Pathological alterations in GABAergic interneurons and reduced tonic inhibition in the basolateral amygdala during epileptogenesis. **Neuroscience**, v. 163, n. 1, p. 415-29, Sep 29 2009.
- FUETA, Y. et al. Down-regulation of GABA-transporter function by hippocampal translation products: its possible role in epilepsy. **Neuroscience**, v. 118, n. 2, p. 371-8, 2003.
- GAHRING, L. C. et al. Interleukin-1alpha in the brain is induced by audiogenic seizure. **Neurobiol Dis**, v. 3, n. 4, p. 263-9, 1997.
- GALANOPOULOU, A. S. Mutations affecting GABAergic signaling in seizures and epilepsy. **Pflugers Arch**, v. 460, n. 2, p. 505-23, Jul 2010.
- GALL, C. M. Seizure-induced changes in neurotrophin expression: implications for epilepsy. **Exp Neurol**, v. 124, n. 1, p. 150-66, Nov 1993.

GALLO, V.; DENEEN, B. Glial development: the crossroads of regeneration and repair in the CNS. **Neuron**, v. 83, n. 2, p. 283-308, Jul 16 2014.

GARCIA-CAIRASCO, N. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. **Hear Res**, v. 168, n. 1-2, p. 208-22, Jun 2002.

GARCIA-CAIRASCO, N.; SABBATINI, R. M. Role of the substantia nigra in audiogenic seizures: a neuroethological analysis in the rat. **Braz J Med Biol Res**, v. 16, n. 2, p. 171-83, Jul 1983.

GARCIA-CAIRASCO, N.; SABBATINI, R. M. Neuroethological evaluation of audiogenic seizures in hemidetelencephalated rats. **Behav Brain Res**, v. 33, n. 1, p. 65-77, May 1 1989.

GARCIA-CAIRASCO, N.; TERRA, V. C.; DORETTO, M. C. Midbrain substrates of audiogenic seizures in rats. **Behav Brain Res**, v. 58, n. 1-2, p. 57-67, Dec 20 1993.

GARCIA-CAIRASCO, N. et al. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. **Epilepsy Res**, v. 26, n. 1, p. 177-92, Dec 1996.

GENIN, A. et al. Regulated expression of the neuronal calcium sensor-1 gene during long-term potentiation in the dentate gyrus in vivo. **Neuroscience**, v. 106, n. 3, p. 571-7, 2001.

GILL, R. et al. Blocking brain-derived neurotrophic factor inhibits injury-induced hyperexcitability of hippocampal CA3 neurons. **Eur J Neurosci**, v. 38, n. 11, p. 3554-66, Dec 2013.

GOBLE, T. J.; MOLLER, A. R.; THOMPSON, L. T. Acute high-intensity sound exposure alters responses of place cells in hippocampus. **Hear Res**, v. 253, n. 1-2, p. 52-9, Jul 2009.

GODDARD, G. V.; MCINTYRE, D. C.; LEECH, C. K. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. **Exp Neurol**, v. 25, n. 3, p. 295-330, Nov 1969.

GOMEZ, M. et al. Ca²⁺ signaling via the neuronal calcium sensor-1 regulates associative learning and memory in *C. elegans*. **Neuron**, v. 30, n. 1, p. 241-8, Apr 2001.

GONZALEZ, M. I.; BROOKS-KAYAL, A. Altered GABA(A) receptor expression during epileptogenesis. **Neurosci Lett**, v. 497, n. 3, p. 218-22, Jun 27 2011.

GOTTSCHALK, W. et al. Presynaptic modulation of synaptic transmission and plasticity by brain-derived neurotrophic factor in the developing hippocampus. **J Neurosci**, v. 18, n. 17, p. 6830-9, Sep 1 1998.

GREENGARD, P. The neurobiology of slow synaptic transmission. **Science**, v. 294, n. 5544, p. 1024-30, Nov 2 2001.

GRUOL, D. L. IL-6 regulation of synaptic function in the CNS. **Neuropharmacology**, v. 96, n. Pt A, p. 42-54, Sep 2015.

GUERRIERO, R. M.; GIZA, C. C.; ROTENBERG, A. Glutamate and GABA imbalance following traumatic brain injury. **Curr Neurol Neurosci Rep**, v. 15, n. 5, p. 27, May 2015.

HABERLANDT, E. et al. Adrenocorticotrophic hormone versus pulsatile dexamethasone in the treatment of infantile epilepsy syndromes. **Pediatr Neurol**, v. 42, n. 1, p. 21-7, Jan 2010.

HADERA, M. G. et al. Astrocyte-neuronal interactions in epileptogenesis. **J Neurosci Res**, Mar 18 2015.

HASSEL, B.; DINGLELINE, R. Glutamate. In: SIEGEL, G. J.; ALBERS, R. W., et al (Ed.). **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**: Elsevier, 2006. cap. 15, p.267-290. ISBN 978-0-12-088397-4.

HEINRICH, C. et al. Increase in BDNF-mediated TrkB signaling promotes epileptogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. **Neurobiol Dis**, v. 42, n. 1, p. 35-47, Apr 2011.

HIROSE, S. Mutant GABA(A) receptor subunits in genetic (idiopathic) epilepsy. **Prog Brain Res**, v. 213, p. 55-85, 2014.

IORI, V.; FRIGERIO, F.; VEZZANI, A. Modulation of neuronal excitability by immune mediators in epilepsy. **Curr Opin Pharmacol**, v. 26, p. 118-123, Feb 2016.

- ISACKSON, P. J. et al. BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGF. **Neuron**, v. 6, n. 6, p. 937-48, Jun 1991.
- ITO, M. et al. GABA-gated chloride ion influx in brains of epileptic El mice. **Neurochem Res**, v. 15, n. 9, p. 933-6, Sep 1990.
- JANKOWSKY, J. L.; PATTERSON, P. H. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. **Prog Neurobiol**, v. 63, n. 2, p. 125-49, Feb 2001.
- JEAN HARRY, G.; BRUCCOLERI, A.; LEFEBVRE D'HELLEN COURT, C. Differential modulation of hippocampal chemical-induced injury response by ebselen, pentoxifylline, and TNFalpha-, IL-1alpha-, and IL-6-neutralizing antibodies. **J Neurosci Res**, v. 73, n. 4, p. 526-36, Aug 15 2003.
- KAILA, K. et al. GABA actions and ionic plasticity in epilepsy. **Curr Opin Neurobiol**, v. 26, p. 34-41, Jun 2014.
- KALUEFF, A. V. et al. Intranasal administration of human IL-6 increases the severity of chemically induced seizures in rats. **Neurosci Lett**, v. 365, n. 2, p. 106-10, Jul 22 2004.
- KANASHIRO, A. L. A. N. **EPILEPSIA: prevalência, características epidemiológicas e lacuna de tratamento farmacológico**. 2006. 104 (Doutorado). Neurologia, Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- KANDRATAVICIUS, L. et al. Animal models of epilepsy: use and limitations. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 10, p. 1693-705, 2014.
- KASRI, N. N. et al. Regulation of InsP3 receptor activity by neuronal Ca²⁺-binding proteins. **EMBO J**, v. 23, n. 2, p. 312-21, Jan 28 2004.
- KOJIMA, K.; MATSUMOTO, M.; ITO, J. Severe acoustic trauma in adult rats induced by short duration high intensity sound. **Acta Otolaryngol Suppl**, n. 557, p. 26-9, Feb 2007.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, Aug 15 1970.
- LAHTEINEN, S. et al. Exacerbated status epilepticus and acute cell loss, but no changes in epileptogenesis, in mice with increased brain-derived neurotrophic factor signaling. **Neuroscience**, v. 122, n. 4, p. 1081-92, 2003.
- LARMET, Y. et al. Protective effects of brain-derived neurotrophic factor on the development of hippocampal kindling in the rat. **Neuroreport**, v. 6, n. 14, p. 1937-41, Oct 2 1995.
- LEAL, G. et al. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. **Brain Res**, v. 1621, p. 82-101, Sep 24 2015.
- LEE, S. H. et al. IL-1beta induction and IL-6 suppression are associated with aggravated neuronal damage in a lipopolysaccharide-pretreated kainic acid-induced rat pup seizure model. **Neuroimmunomodulation**, v. 19, n. 5, p. 319-25, 2012.
- LEHTIMAKI, K. A. et al. Expression of cytokines and cytokine receptors in the rat brain after kainic acid-induced seizures. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 110, n. 2, p. 253-60, Feb 20 2003.
- LESSMANN, V.; GOTTMANN, K.; HEUMANN, R. BDNF and NT-4/5 enhance glutamatergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurones. **Neuroreport**, v. 6, n. 1, p. 21-5, Dec 30 1994.
- LEVESQUE, M.; AVOLI, M. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 37, n. 10 Pt 2, p. 2887-99, Dec 2013.
- LEVESQUE, M.; AVOLI, M.; BERNARD, C. Animal models of temporal lobe epilepsy following systemic chemoconvulsant administration. **J Neurosci Methods**, Mar 10 2015.
- LI, G. et al. Cytokines and epilepsy. **Seizure**, v. 20, n. 3, p. 249-56, Apr 2011.
- LINDSKOG, M. et al. Transient calcium and dopamine increase PKA activity and DARPP-32 phosphorylation. **PLoS Comput Biol**, v. 2, n. 9, p. e119, Sep 8 2006.

- LOSCHER, W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res**, v. 50, n. 1-2, p. 105-23, Jun 2002.
- LOSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, n. 5, p. 359-68, Jun 2011.
- LOWENSTEIN, D. H.; BLECK, T.; MACDONALD, R. L. It's time to revise the definition of status epilepticus. **Epilepsia**, v. 40, n. 1, p. 120-2, Jan 1999.
- LUKASIUK, K.; BECKER, A. J. Molecular biomarkers of epileptogenesis. **Neurotherapeutics**, v. 11, n. 2, p. 319-23, Apr 2014.
- MAROSI, K.; MATTSON, M. P. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. **Trends Endocrinol Metab**, v. 25, n. 2, p. 89-98, Feb 2014.
- MARROSU, F.; DEL ZOMPO, M.; CORSINI, G. U. The role of dopamine in human epilepsy: effect of apomorphine. **Prog Clin Biol Res**, v. 124, p. 95-104, 1983.
- MARSHALL, J. F. Neural plasticity and recovery of function after brain injury. **Int Rev Neurobiol**, v. 26, p. 201-47, 1985.
- MARTINEZ-LEVY, G. A.; CRUZ-FUENTES, C. S. Genetic and epigenetic regulation of the brain-derived neurotrophic factor in the central nervous system. **Yale J Biol Med**, v. 87, n. 2, p. 173-86, Jun 2014.
- MCCUE, H. V.; HAYNES, L. P.; BURGOYNE, R. D. The diversity of calcium sensor proteins in the regulation of neuronal function. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 2, n. 8, p. a004085, Aug 2010.
- MCINTYRE, D. C.; GILBY, K. L. Mapping seizure pathways in the temporal lobe. **Epilepsia**, v. 49 Suppl 3, p. 23-30, 2008.
- MCNAMARA, J. O. Cellular and molecular basis of epilepsy. **J Neurosci**, v. 14, n. 6, p. 3413-25, Jun 1994.
- MCNAMARA, J. O. et al. The kindling model of epilepsy: a critical review. **CRC Crit Rev Clin Neurobiol**, v. 1, n. 4, p. 341-91, 1985.
- MCNAMARA, J. O. et al. The kindling model of epilepsy: a review. **Prog Neurobiol**, v. 15, n. 2, p. 139-59, 1980.
- MELDRUM, B. S. Epilepsy and gamma-aminobutyric acid-mediated inhibition. **Int Rev Neurobiol**, v. 17, p. 1-36, 1975.
- MERLO, D. et al. 4-Aminopyridine-induced epileptogenesis depends on activation of mitogen-activated protein kinase ERK. **J Neurochem**, v. 89, n. 3, p. 654-9, May 2004.
- MEYER-LINDENBERG, A. et al. Genetic evidence implicating DARPP-32 in human frontostriatal structure, function, and cognition. **J Clin Invest**, v. 117, n. 3, p. 672-82, Mar 2007.
- MINAMI, M.; KURAISHI, Y.; SATOH, M. Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 beta, IL-6, TNF alpha and LIF in the rat brain. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 176, n. 2, p. 593-8, Apr 30 1991.
- MUN, H. S. et al. Self-directed exploration provides a Ncs1-dependent learning bonus. **Sci Rep**, v. 5, p. 17697, 2015.
- NELSON, T. J.; ALKON, D. L. Molecular regulation of synaptogenesis during associative learning and memory. **Brain Res**, v. 1621, p. 239-51, Sep 24 2015.
- NETO, J. G.; MARCHETTI, R. L. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 27, n. 4, p. 323-8, 2005.
- NORRIS, J. G. et al. Signal transduction pathways mediating astrocyte IL-6 induction by IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. **J Immunol**, v. 152, n. 2, p. 841-50, Jan 15 1994.
- O'SULLIVAN, G. J. et al. Dopamine D1 vs D5 receptor-dependent induction of seizures in relation to DARPP-32, ERK1/2 and GluR1-AMPA signalling. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 7, p. 1051-61, Jun 2008.
- OLSEN, R. W.; BETZ, H. GABA and Glycine. In: SIEGEL, G. J.; ALBERS, R. W., et al (Ed.). **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**: Elsevier, 2006. cap. 16, p.291-301. ISBN 978-0-12-088397-4.

- PAL, B. Astrocytic Actions on Extrasynaptic Neuronal Currents. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 474, 2015.
- PALMA, E. et al. BDNF modulates GABAA receptors microtransplanted from the human epileptic brain to *Xenopus* oocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 5, p. 1667-72, Feb 1 2005.
- PANDALANENI, S. et al. Neuronal Calcium Sensor-1 Binds the D2 Dopamine Receptor and G-protein-coupled Receptor Kinase 1 (GRK1) Peptides Using Different Modes of Interactions. **J Biol Chem**, v. 290, n. 30, p. 18744-56, Jul 24 2015.
- PATTERSON, P. H.; NAWA, H. Neuronal differentiation factors/cytokines and synaptic plasticity. **Cell**, v. 72 Suppl, p. 123-37, Jan 1993.
- PEKKNY, M.; WILHELMSSON, U.; PEKNA, M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. **Neurosci Lett**, v. 565, p. 30-8, Apr 17 2014.
- PELTOLA, J. et al. Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in cerebrospinal fluid from patients with recent tonic-clonic seizures. **Epilepsy Res**, v. 41, n. 3, p. 205-11, Oct 2000.
- PENKOWA, M. et al. Interleukin-6 deficiency reduces the brain inflammatory response and increases oxidative stress and neurodegeneration after kainic acid-induced seizures. **Neuroscience**, v. 102, n. 4, p. 805-18, 2001.
- PEREIRA, M. G. et al. Modulation of B1 and B2 kinin receptors expression levels in the hippocampus of rats after audiogenic kindling and with limbic recruitment, a model of temporal lobe epilepsy. **Int Immunopharmacol**, v. 8, n. 2, p. 200-5, Feb 2008.
- PEREZ-GOMEZ, A.; TASKER, R. A. Transient domoic acid excitotoxicity increases BDNF expression and activates both MEK- and PKA-dependent neurogenesis in organotypic hippocampal slices. **BMC Neurosci**, v. 14, p. 72, 2013.
- PITKANEN, A. et al. Epileptogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 5, n. 10, Oct 2015.
- PITKANEN, A. et al. Progression of neuronal damage after status epilepticus and during spontaneous seizures in a rat model of temporal lobe epilepsy. **Prog Brain Res**, v. 135, p. 67-83, 2002.
- PIZZA, V. et al. Neuroinflamm-aging and neurodegenerative diseases: an overview. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 10, n. 5, p. 621-34, Aug 2011.
- PLATA-SALAMAN, C. R. et al. Kindling modulates the IL-1beta system, TNF-alpha, TGF-beta1, and neuropeptide mRNAs in specific brain regions. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 75, n. 2, p. 248-58, Feb 22 2000.
- POETSCHKE, C. et al. Compensatory T-type Ca²⁺ channel activity alters D2-autoreceptor responses of Substantia nigra dopamine neurons from Cav1.3 L-type Ca²⁺ channel KO mice. **Sci Rep**, v. 5, p. 13688, 2015.
- RAVIZZA, T. et al. Inflammatory response and glia activation in developing rat hippocampus after status epilepticus. **Epilepsia**, v. 46 Suppl 5, p. 113-7, 2005.
- REIGEL, C. E.; DAILEY, J. W.; JOBE, P. C. The genetically epilepsy-prone rat: an overview of seizure-prone characteristics and responsiveness to anticonvulsant drugs. **Life Sci**, v. 39, n. 9, p. 763-74, Sep 1 1986.
- REIS, H. J. et al. Is DARPP-32 a potential therapeutic target? **Expert Opin Ther Targets**, v. 11, n. 12, p. 1649-61, Dec 2007.
- RIAZI, K. et al. Microglial activation and TNFalpha production mediate altered CNS excitability following peripheral inflammation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 44, p. 17151-6, Nov 4 2008.
- RIZZI, M. et al. Glia activation and cytokine increase in rat hippocampus by kainic acid-induced status epilepticus during postnatal development. **Neurobiol Dis**, v. 14, n. 3, p. 494-503, Dec 2003.
- ROBEL, S. et al. Reactive astrogliosis causes the development of spontaneous seizures. **J Neurosci**, v. 35, n. 8, p. 3330-45, Feb 25 2015.
- ROSA, D. V. et al. DARPP-32 expression in rat brain after electroconvulsive stimulation. **Brain Res**, v. 1179, p. 35-41, Nov 7 2007.
- ROSA, D. V. et al. NCS-1 expression in rat brain after electroconvulsive stimulation. **Neurochem Res**, v. 32, n. 1, p. 81-5, Jan 2007.

- ROTHSTEIN, J. D. et al. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. **Neuron**, v. 16, n. 3, p. 675-86, Mar 1996.
- SAMLAND, H. et al. Profound increase in sensitivity to glutamatergic- but not cholinergic agonist-induced seizures in transgenic mice with astrocyte production of IL-6. **J Neurosci Res**, v. 73, n. 2, p. 176-87, Jul 15 2003.
- SANDU, R. E. et al. Neuroinflammation and comorbidities are frequently ignored factors in CNS pathology. **Neural Regen Res**, v. 10, n. 9, p. 1349-55, Sep 2015.
- SANKOWSKI, R.; MADER, S.; VALDES-FERRER, S. I. Systemic inflammation and the brain: novel roles of genetic, molecular, and environmental cues as drivers of neurodegeneration. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 28, 2015.
- SARKISIAN, M. R. Overview of the Current Animal Models for Human Seizure and Epileptic Disorders. **Epilepsy Behav**, v. 2, n. 3, p. 201-216, Jun 2001.
- SCARLATELLI-LIMA, A. V. et al. Assessment of the seizure susceptibility of Wistar Audiogenic rat to electroshock, pentylenetetrazole and pilocarpine. **Brain Res**, v. 960, n. 1-2, p. 184-9, Jan 17 2003.
- SCHAFERS, M.; SORKIN, L. Effect of cytokines on neuronal excitability. **Neurosci Lett**, v. 437, n. 3, p. 188-93, Jun 6 2008.
- SCHOBITZ, B.; DE KLOET, E. R.; HOLSBOER, F. Gene expression and function of interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in the brain. **Prog Neurobiol**, v. 44, n. 4, p. 397-432, Nov 1994.
- SHONESY, B. C. et al. CaMKII: a molecular substrate for synaptic plasticity and memory. **Prog Mol Biol Transl Sci**, v. 122, p. 61-87, 2014.
- SIBLEY, D. R. New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 39, p. 313-41, 1999.
- SIMONATO, M.; TONGIORGI, E.; KOKAIA, M. Angels and demons: neurotrophic factors and epilepsy. **Trends Pharmacol Sci**, v. 27, n. 12, p. 631-8, Dec 2006.
- SINGHAL, G. et al. Inflammasomes in neuroinflammation and changes in brain function: a focused review. **Front Neurosci**, v. 8, p. 315, 2014.
- SOUZA, B. R. et al. Downregulation of the cAMP/PKA pathway in PC12 cells overexpressing NCS-1. **Cell Mol Neurobiol**, v. 31, n. 1, p. 135-43, Jan 2011.
- STARR, M. S. The role of dopamine in epilepsy. **Synapse**, v. 22, n. 2, p. 159-94, Feb 1996.
- STARR, M. S.; STARR, B. S. Glutamate-dopamine interactions in the production of pilocarpine motor seizures in the mouse. **J Neural Transm Park Dis Dement Sect**, v. 6, n. 2, p. 109-17, 1993.
- STEFFENSEN, S. C.; CAMPBELL, I. L.; HENRIKSEN, S. J. Site-specific hippocampal pathophysiology due to cerebral overexpression of interleukin-6 in transgenic mice. **Brain Res**, v. 652, n. 1, p. 149-53, Jul 25 1994.
- STEINHAUSER, C.; GRUNNET, M.; CARMIGNOTO, G. Crucial role of astrocytes in temporal lobe epilepsy. **Neuroscience**, Jan 13 2015.
- TANAKA, K. et al. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. **Science**, v. 276, n. 5319, p. 1699-702, Jun 13 1997.
- TAO, X. et al. Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. **Neuron**, v. 20, n. 4, p. 709-26, Apr 1998.
- TAPIA-ARANCIBIA, L. et al. Physiology of BDNF: focus on hypothalamic function. **Front Neuroendocrinol**, v. 25, n. 2, p. 77-107, Jul 2004.
- TAUBOLL, E.; SVEBERG, L.; SVALHEIM, S. Interactions between hormones and epilepsy. **Seizure**, v. 28, p. 3-11, May 2015.
- TONG, L. et al. Interleukin-1 beta impairs brain derived neurotrophic factor-induced signal transduction. **Neurobiol Aging**, v. 29, n. 9, p. 1380-93, Sep 2008.

- TONG, L. et al. Brain-derived neurotrophic factor-dependent synaptic plasticity is suppressed by interleukin-1beta via p38 mitogen-activated protein kinase. **J Neurosci**, v. 32, n. 49, p. 17714-24, Dec 5 2012.
- TREIMAN, D. M. GABAergic mechanisms in epilepsy. **Epilepsia**, v. 42 Suppl 3, p. 8-12, 2001.
- TSUJIMOTO, T. et al. Neuronal calcium sensor 1 and activity-dependent facilitation of P/Q-type calcium currents at presynaptic nerve terminals. **Science**, v. 295, n. 5563, p. 2276-9, Mar 22 2002.
- TURRIN, N. P.; RIVEST, S. Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy. **Neurobiol Dis**, v. 16, n. 2, p. 321-34, Jul 2004.
- TURSKI, L. et al. Dopamine-sensitive anticonvulsant site in the rat striatum. **J Neurosci**, v. 8, n. 11, p. 4027-37, Nov 1988.
- TURSKY, T. et al. Formation of glutamate and GABA in epileptogenic tissue from human hippocampus in vitro. **Acta Neurochir (Wien)**, n. 23 Suppl, p. 111-8, 1976.
- ULUDAG, I. F. et al. Interleukin-6, interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist levels in epileptic seizures. **Seizure**, v. 22, n. 6, p. 457-61, Jul 2013.
- ULUDAG, I. F. et al. IL-1beta, IL-6 and IL1Ra levels in temporal lobe epilepsy. **Seizure**, v. 26, p. 22-5, Mar 2015.
- VEREYKEN, E. J. et al. Chronic interleukin-6 alters the level of synaptic proteins in hippocampus in culture and in vivo. **Eur J Neurosci**, v. 25, n. 12, p. 3605-16, Jun 2007.
- VEZZANI, A. Anti-inflammatory drugs in epilepsy: does it impact epileptogenesis? **Expert Opin Drug Saf**, v. 14, n. 4, p. 583-92, Apr 2015.
- VEZZANI, A. et al. Epilepsy and brain inflammation. **Exp Neurol**, v. 244, p. 11-21, Jun 2013.
- VEZZANI, A. et al. Glia-neuronal interactions in ictogenesis and epileptogenesis: role of inflammatory mediators. In: NOEBELS, J. L.; AVOLI, M., et al (Ed.). **Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies**. 4th. Bethesda (MD), 2012.
- VEZZANI, A.; BALOSSO, S.; RAVIZZA, T. The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. **Brain Behav Immun**, v. 22, n. 6, p. 797-803, Aug 2008.
- VEZZANI, A.; BARAM, T. Z. New roles for interleukin-1 Beta in the mechanisms of epilepsy. **Epilepsy Curr**, v. 7, n. 2, p. 45-50, Mar-Apr 2007.
- VEZZANI, A. et al. Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. **J Neurosci**, v. 19, n. 12, p. 5054-65, Jun 15 1999.
- VEZZANI, A. et al. The role of inflammation in epilepsy. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 1, p. 31-40, Jan 2011.
- VEZZANI, A. et al. Infections, inflammation and epilepsy. **Acta Neuropathol**, v. 131, n. 2, p. 211-34, Feb 2016.
- VEZZANI, A.; GRANATA, T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. **Epilepsia**, v. 46, n. 11, p. 1724-43, Nov 2005.
- VEZZANI, A. et al. Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. **Epilepsia**, v. 43 Suppl 5, p. 30-5, 2002.
- VEZZANI, A. et al. Glia as a source of cytokines: implications for neuronal excitability and survival. **Epilepsia**, v. 49 Suppl 2, p. 24-32, 2008.
- VEZZANI, A.; VIVIANI, B. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. **Neuropharmacology**, Nov 8 2014.
- VEZZANI, A.; VIVIANI, B. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. **Neuropharmacology**, v. 96, n. Pt A, p. 70-82, Sep 2015.
- WANG, W. et al. [Research on expression and function of phosphorylated DARPP-32 on pentylenetetrazol-induced epilepsy model of rat]. **Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi**, v. 31, n. 3, p. 637-41, Jun 2014.

- WANG, Y. et al. BDNF-TrkB signaling pathway mediates the induction of epileptiform activity induced by a convulsant drug cyclothiazide. **Neuropharmacology**, v. 57, n. 1, p. 49-59, Jul 2009.
- WARDLE, R. A.; POO, M. M. Brain-derived neurotrophic factor modulation of GABAergic synapses by postsynaptic regulation of chloride transport. **J Neurosci**, v. 23, n. 25, p. 8722-32, Sep 24 2003.
- WEINBERG, M. S.; BLAKE, B. L.; MCCOWN, T. J. Opposing actions of hippocampus TNFalpha receptors on limbic seizure susceptibility. **Exp Neurol**, v. 247, p. 429-37, Sep 2013.
- WEISS, J. L.; HUI, H.; BURGOYNE, R. D. Neuronal calcium sensor-1 regulation of calcium channels, secretion, and neuronal outgrowth. **Cell Mol Neurobiol**, v. 30, n. 8, p. 1283-92, Nov 2010.
- WERNER, F. M.; COVENAS, R. Review: Classical neurotransmitters and neuropeptides involved in generalized epilepsy in a multi-neurotransmitter system: How to improve the antiepileptic effect? **Epilepsy Behav**, Mar 26 2015.
- WIEBE, S. The Epilepsies. In: (Ed.). **Goldman's Cecil Medicina**. 24: Sanders, v.1, 2012. cap. 410, p.2283-2293. ISBN 978-1-4377-1604-7.
- WILLIAMSON, L. L.; BILBO, S. D. Chemokines and the hippocampus: a new perspective on hippocampal plasticity and vulnerability. **Brain Behav Immun**, v. 30, p. 186-94, May 2013.
- XU, B. et al. The effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) administration on kindling induction, Trk expression and seizure-related morphological changes. **Neuroscience**, v. 126, n. 3, p. 521-31, 2004.
- YIN, P. et al. Neonatal immune challenge exacerbates seizure-induced hippocampus-dependent memory impairment in adult rats. **Epilepsy Behav**, v. 27, n. 1, p. 9-17, Apr 2013.
- YOUN, Y.; SUNG, I. K.; LEE, I. G. The role of cytokines in seizures: interleukin (IL)-1beta, IL-1Ra, IL-8, and IL-10. **Korean J Pediatr**, v. 56, n. 7, p. 271-4, Jul 2013.
- ZAGREBELSKY, M.; KORTE, M. Form follows function: BDNF and its involvement in sculpting the function and structure of synapses. **Neuropharmacology**, v. 76 Pt C, p. 628-38, Jan 2014.
- ZHANG, J. S.; KALTENBACH, J. A. Increases in spontaneous activity in the dorsal cochlear nucleus of the rat following exposure to high-intensity sound. **Neurosci Lett**, v. 250, n. 3, p. 197-200, Jul 10 1998.