

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS**

**RESPOSTA DIFERENCIAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO
SANGUE PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS EPILÉTICOS E NÃO EPILÉTICOS
A ESTÍMULO INFLAMATÓRIO**

FLÁVIA MENDES AMARAL MARTINS

BELO HORIZONTE, 2015

FLÁVIA MENDES AMARAL MARTINS

**RESPOSTA DIFERENCIAL DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE
PERIFÉRICO DE INDIVÍDUOS EPILÉTICOS E NÃO EPILÉTICOS A ESTÍMULO
INFLAMATÓRIO**

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

ORIENTADOR: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira
CO-ORIENTADORA: Dra. Érica Leandro Marciano Vieira

BELO HORIZONTE, 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA UFMG
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

REITOR:

PROF. JAIME ARTURO RAMIREZ

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO:

PROF. RODRIGO ANTÔNIO DE PAIVA DUARTE

DIRETOR DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

PROFA. ANDRÉA MARA MACEDO

COORDENADORA DA PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS:

PROFA. CARMEN ELVIRA FLORES-MENDOZA PRADO

SUB-COORDENADORA:

PROFA. JULIANA CARVALHO TAVARES

MEMBROS DO COLEGIADO:

PROFA. ÂNGELA MARIA RIBEIRO

PROF. HELTON JOSÉ DOS REIS

PROF. ANDRÉ RICARDO MASSENSINI

PROF. FABRÍCIO DE ARAÚJO MOREIRA

MEMBRO DISCENTE:

POLLIANA TOLEDO NUNES

- 043 Martins, Flávia Mendes Amaral.
 Resposta diferencial de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos epiléticos e não epiléticos a estímulo inflamatório [manuscrito] / Flávia Mendes Amaral Martins. – 2015.
 80 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira. Co-orientadora: Dra. Érica Leandro Marciano Vieira.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.
1. Epilepsia - Teses. 2. Inflamação - Teses. 3. Citocinas - Teses. 4. Imunidade - Teses. 5. Neurociências - Teses. I. Oliveira, Antônio Carlos Pinheiro de. II. Vieira, Érica Leandro Marciano. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 612.8

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Márcia, que sempre me incentivou a estudar e aprender e que com certeza está torcendo pelo meu sucesso de onde ela estiver. Essa conquista também é sua mãe!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que permitiu mais uma conquista em minha vida e que renova minhas energias a cada dia.

Ao professor Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira, por ter me dado a oportunidade de aprender em seu laboratório e por ter acreditado em mim, mesmo nos momentos de adversidade, quando me senti perdida e encontrei orientação, calma e confiança.

À Dra. Érica Leandro Marciano Vieira, pela paciência, por ter me compreendido sempre, por ter me ensinado tanto, pela enorme simpatia e disponibilidade em me ajudar. Você foi mais do que minha co-orientadora!

À amiga do Laboratório de Neurofarmacologia, Isabel Vieira, que desde a Iniciação Científica me apoiou e me ensinou muito, tendo um papel fundamental na minha decisão de fazer o mestrado. Obrigada pelos ótimos momentos que passamos!

À amiga do Laboratório de Neurofarmacologia Paula Bellozi, pela amizade e pelo apoio que recebi desde a Iniciação Científica.

Ao professor Dr. Antônio Lúcio Teixeira, por me permitir utilizar o seu laboratório para a realização dos experimentos.

Ao meu marido Hermano, que sempre me apoiou, inclusive financeiramente e esteve presente em todos os momentos em que precisei de compreensão e que tive dúvidas. Obrigada por acreditar na minha capacidade, muitas vezes mais do que eu mesma!

Ao meu pai Adair, pelo incentivo ao estudo, por ter me proporcionado condições de estudar durante toda a vida e por ter me dado liberdade de seguir o caminho que eu escolhi.

À minha professora de Inglês Sirlene, que sempre encontrou um horário para me ensinar e por sua boa vontade em me ajudar.

Ao meu bebê Heitor, que apesar de não ter nascido ainda, já ajudou a mamãe, ficando

sempre bonzinho, permitindo que eu escrevesse e concluísse a dissertação.

E à banca examinadora, por investir tempo avaliando esse trabalho, contribuindo para o meu conhecimento com suas sugestões.

RESUMO

Introdução: Epilepsia é considerada uma predisposição permanente para geração de crises convulsivas, com a presença de disfunção cognitiva e emocional do indivíduo, sendo uma das desordens neurológicas mais comuns em todo o mundo, afetando 1% da população mundial. O papel da inflamação na epilepsia humana foi primeiramente investigado através do tratamento com esteroides e outros anti-inflamatórios, que mostraram uma ação anticonvulsivante em alguns casos de epilepsia resistente ao tratamento convencional. Evidências sugerem a ativação da imunidade inata e adaptativa na epilepsia humana, sugerindo também que a inflamação pode contribuir para geração e recorrência de crises e dano neuronal, por outro lado, as crises epiléticas recorrentes podem perpetuar a resposta inflamatória, o que leva a uma inflamação crônica. Apesar disso, ainda não é claro se a produção de mediadores inflamatórios por células imune de pacientes portadores de epilepsia diferem das de indivíduos saudáveis. Desta forma, o presente estudo pretendeu testar a hipótese de que existe uma desregulação em vias de sinalização de células mononucleares periféricas de pacientes com ELT, o que contribui para um padrão de resposta diferencial em relação aos indivíduos controles frente a um estímulo inflamatório. **Métodos:** Os experimentos foram realizados em indivíduos com Epilepsia do Lobo Temporal com e em indivíduos saudáveis, entre 18 e 65 anos, que aceitaram participar da pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE). Os indivíduos que aceitaram participar do estudo e que preenchiam os critérios estabelecidos pela pesquisa foram submetidos a uma breve anamnese e coleta de dados sócio-demográficos, aferição de peso e altura, aplicação do questionário para avaliação de sintomas ansiosos e depressivos (HAD) e coleta do material biológico (sangue periférico). O sangue periférico foi recolhido em tubos a vácuo contendo heparina sódica e foi realizado o protocolo de Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP). Após a contagem das células, foi realizado o plaqueamento e as células foram submetidas à cultura na presença ou ausência dos bloqueadores das enzimas PI3K, PI3K γ , mTOR e GSK3 β por uma hora, em estufa de CO₂ (37°C). Após essa breve incubação, adicionou-se PHA aos poços estimulados ou RPMI aos poços sem estímulos. As células foram então incubadas por 24 horas em estufa de CO₂. Após a incubação, separou-se o sobrenadante das culturas e estes foram armazenados em freezer -20°C até o momento das análises. As dosagens de citocinas e quimiocinas do sobrenadante das culturas e plasma dos indivíduos com ELT e controles foram realizadas pelo método de CBA, conforme instruções do fabricante (BD Bioscience, San Diego, CA,

USA). Utilizaram-se os kits para quantificação de proteínas inflamatórias (*Human Inflammation* - IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70). A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico Prisma 5.0 (GraphPad, CA, USA) e os dados foram apresentados como média \pm erro-padrão da média (E.P.M.). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. **Resultados:** A inibição de todas as isoformas de PI3K ou a inibição seletiva de PI3K γ , assim como a inibição de mTOR aumentou os níveis de, IL-6 e IL-8 apenas em células de controles não estimuladas. Por outro lado, os inibidores não alteraram significativamente os níveis das células estimuladas com PHA. A inibição de todas as isoformas de PI3K ou a inibição seletiva de PI3K γ , assim como a inibição de mTOR e GSK3 β resultou em uma diminuição nos níveis de TNF e IL-10 em células de pacientes com ELT estimuladas com PHA, com exceção da inibição de GSK3 β para IL-10. Demonstramos ainda que PHA aumentou os níveis de IL-12p70 somente em células de pacientes e a inibição de PI3K e mTOR exacerbou o efeito de PHA somente nas células dos pacientes. A inibição seletiva da isoforma da PI3K não alterou os níveis de IL-12p70. **Conclusão:** No presente estudo demonstramos que a produção de citocinas por células imunes de pacientes com ELT é controlada de maneira diferenciada das células de controles saudáveis. Essa regulação diferencial pode ser dependente da atividade de diferentes moléculas intracelulares, tais como a via PI3K, mTOR e GSK-3. Esta diferente resposta a estímulos inflamatórios e uma alteração nas vias que controlam a produção de mediadores inflamatórios pode contribuir para a fisiopatogênese das epilepsias.

Palavras-chave: Epilepsia. Inflamação. Citocinas. Imunidade.

ABSTRACT

Introduction: Epilepsy is considered a strong predisposition for the generation of seizures, in the presence of cognitive and emotional dysfunction and is one of the most common neurological disorders worldwide, affecting 1% of the population. The role of inflammation in human epilepsy was first investigated by treatment with steroids and other anti-inflammatories, which showed an anticonvulsant effect in some epilepsy cases resistant to conventional treatment. Evidence suggests the activation of innate and adaptive immunity in human epilepsy, also suggesting that inflammation might contribute to the generation and recurrence of seizures and neuronal damage, on the other hand, recurring seizures may perpetuate the inflammatory response, leading to inflammation chronic. However, it is not clear whether the production of the inflammatory mediators by immune cells of patients with epilepsy and healthy subjects differ. Thus, in the present hypothesis, we aimed to test the hypothesis that there is a deregulation in the intracellular signaling pathways in the peripheral mononuclear cells of patients with epilepsy, which contributes to a differential pattern in comparison with healthy subjects in response to an inflammatory stimulus. **Methods:** Experiments were performed in patients with Temporal Lobe Epilepsy and in healthy subjects, between 18 and 65 years old, who agreed to participate by signing the Informed Consent (IC). Individuals who agreed to participate in the study and who met the criteria established by the research underwent a brief medical history and collecting sociodemographic data, weight measurement and height, the questionnaire application for assessment of anxiety and depressive symptoms (HAD) and collection the biological material (peripheral blood). Peripheral blood was collected in vacuum tubes containing sodium heparin and was performed Obtaining Mononuclear Cells Peripheral Blood protocol (PBMC). After counting cells, plating was performed and the cells were subjected to culture in the presence or absence of blocker of the enzymes PI3K, PI3K γ , mTOR and GSK3 β for one hour in the CO₂ incubator (37°C). After this brief incubation, PHA was added to stimulated wells or RPMI to wells without stimuli. The cells were then incubated for 24 hours in the CO₂ incubator. After incubation, the supernatant was separated from these cultures and were stored in a freezer at -20°C until the time of analysis. Dosages of cytokines and chemokines in the culture supernatant and plasma of patients with ELT and controls were performed by CBA method, according to manufacturer's instructions (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Kits were used for quantification of inflammatory proteins (Human Inflammation - IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF and IL-12p70). Statistical analysis was performed using the statistical software Prism 5.0

(GraphPad, CA, USA) and data were presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). The level of significance was set at $p < 0.05$. **Results:** Inhibition of all isoforms of PI3K or the selective inhibition PI3K γ , as mTOR inhibition increased levels of IL-6 and IL-8 only in unstimulated cell controls. Furthermore, the inhibitors do not significantly alter the levels of cells stimulated with PHA. Inhibition of all isoforms of PI3K or the selective inhibition PI3K γ , as well as inhibition of GSK3 β and mTOR, resulted in a decrease in the levels of TNF and IL-10 in epileptic patients cells, stimulated with PHA, with the exception of inhibition for GSK3 β in IL-10. PHA also demonstrated an increased IL-12p70 levels only in cells of epileptic patients and inhibition of PI3K and mTOR exacerbated the PHA effect only in the cells of patients. The selective inhibition of PI3K isoform did not affect the IL-12p70 levels. **Conclusion:** In this study was demonstrated that cytokine production by immune cells from patients with ELT is controlled differently in cells from healthy controls. This differential regulation may be dependent on the activity of different intracellular molecules such as PI3K, mTOR and GSK-3. This different response to inflammatory stimuli and the alteration in the intracellular signaling pathways could contribute to the physiopathogenesis of epilepsies.

Keywords: Epilepsy. Inflammation. Cytokines. Immunity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 As epilepsias	17
1.1.2 Epilepsia do Lobo Temporal.....	18
1.2 Sistema Imune e sua Relação com o Sistema Nervoso Central	20
1.3 Epilepsia e Inflamação	22
1.4 Via de Sinalização PI3K/Akt/GSK3 β /mTOR e sua Relação com Neuroinflamação e Epilepsia.....	24
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Indivíduos.....	30
3.2 Drogas.....	31
3.3 Obtenção da Cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico.....	32
3.4 Quantificação das Citocinas e Quimiocinas por microesferas (Cytometric Bead Array – CBA).....	33
3.5 Análise Estatística.....	33
4. RESULTADOS	34
4.1 Quantificação de IL-12p70.....	34
4.1.1 Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K sobre a produção de IL-12p70 por CMSP de pacientes com ELT e controles.....	34
4.1.2 Avaliação do efeito do inibidor de mTOR sobre a produção de IL-12p70 por CMSP de pacientes com ELT e controles.....	35
4.1.3 Avaliação do efeito do inibidor de GSK3 β sobre a produção de IL-12p70 por CMSP de pacientes com ELT e controles.....	36
4.2 Quantificação de TNF	37
4.2.1 Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K sobre a produção de TNF por CMSP de pacientes com ELT e controles.....	37
4.2.2 Avaliação do efeito do inibidor de mTOR sobre a produção de TNF por CMSP de pacientes com ELT e controles.....	39
4.2.3 Avaliação do efeito do inibidor de GSK3 β sobre a produção de TNF por CMSP de pacientes com ELT e controles.....	40
4.3 Quantificação de IL-10	41

4.3.1 Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K sobre a produção de IL-10 por CMSP de pacientes com ELT e controles.....	41
4.3.2 Avaliação do efeito do inibidor de mTOR sobre a produção de IL-10 por CMSP de pacientes com ELT e controles.....	43
4.3.3 Avaliação do efeito do inibidor de GSK3 β sobre a produção de IL-10 por CMSP de pacientes com ELT e controles.....	44
4.4 Quantificação de IL-6	45
4.4.1 Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K sobre a produção de IL-6 por CMSP de pacientes com ELT e controles.....	45
4.4.2 Avaliação do efeito do inibidor de mTOR sobre a produção de IL-6 por CMSP de pacientes com ELT e controles.....	47
4.4.3 Avaliação do efeito do inibidor de GSK3 β sobre a produção de IL-6 por CMSP de pacientes com ELT e controles.....	48
4.5 Quantificação de IL-1 β	49
4.5.1 Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K sobre a produção de IL-1 β por CMSP de pacientes com ELT e controles.....	49
4.5.2 Avaliação do efeito do inibidor de mTOR sobre a produção de IL-1 β por CMSP de pacientes com ELT e controles.....	51
4.5.3 Avaliação do efeito do inibidor de GSK3 β sobre a produção de IL-1 β por CMSP de pacientes com ELT e controles.....	52
4.6 Quantificação de IL-8.....	53
4.6.1 Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K sobre a produção de IL-8 por CMSP de pacientes com ELT e controles.....	53
4.6.2 Avaliação do efeito do inibidor de mTOR sobre a produção de IL-8 por CMSP de pacientes com ELT e controles.....	55
4.6.3 Avaliação do efeito do inibidor de GSK3 β sobre a produção de IL-8 por CMSP de pacientes com ELT e controles.....	56
4.7 Quantificação sérica das citocinas	57
5. DISCUSSÃO.....	60
5.1 IL-12p70, IL-10 e suas Relações com a Epilepsia do Lobo Temporal	60
5.2 TNF e sua Relação com a Epilepsia do Lobo Temporal	62
5.3 IL-6 e sua Relação com a Epilepsia do Lobo Temporal	63
5.4 IL-1 β e sua Relação com a Epilepsia do Lobo Temporal	65
5.5 IL-8 e sua Relação com a Epilepsia do Lobo Temporal	66
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

ANEXOS.....79
Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características demográficas e clínicas da amostra estudada.....	31
Tabela 2: Comparação dos resultados das diferentes condições de cultura com as drogas estimulada com PHA em relação a mesma condição sem PHA nos indivíduos com ELT.....	58
Tabela 3: Comparação dos resultados das diferentes condições de cultura com as drogas em relação a cultura estimulada apenas com PHA nos indivíduos com ELT.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da via PI3K/Akt/GSK3 β /mTOR.....	26
Figura 2: Avaliação do efeito de um inibidor de PI3K (LY294002) sobre a produção de IL-12p70 em cultura de CMSP.	34
Figura 3: Avaliação do efeito de um inibidor de PI3K γ (AS605240) sobre a produção de IL-12p70 em cultura de CMSP.....	35
Figura 4: Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de IL-12p70 em cultura de CMSP.	36
Figura 5: Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 (CHIR99021) sobre a produção de IL-12p70 em cultura de CMSP.	37
Figura 6: Avaliação do efeito de um inibidor de PI3K (LY294002) sobre a produção de TNF em cultura de CMSP.....	38
Figura 7: Avaliação do efeito de um inibidor de PI3K γ (AS605240) sobre a produção de TNF em cultura de CMSP.....	39
Figura 8: Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de TNF em cultura de CMSP.....	40
Figura 9: Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 (CHIR99021) sobre a produção de TNF em cultura de CMSP..	41
Figura 10: Avaliação do efeito de um inibidor de PI3K (LY294002) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP.	42
Figura 11: Avaliação do efeito de um inibidor de PI3K γ (AS605240) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP.	43
Figura 12: Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP.....	44
Figura 13: Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 (CHIR99021) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP.....	45
Figura 14: Avaliação do efeito de um inibidor de PI3K (LY294002) sobre a produção de IL-6 em cultura de CMSP.	46
Figura 15: Avaliação do efeito de um inibidor de PI3K γ (AS605240) sobre a produção de IL-6 em cultura de CMSP.....	47
Figura 16: Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de IL-6 em cultura de CMSP.....	48
Figura 17: Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 (CHIR99021) sobre a produção de	

IL-6 em cultura de CMSP.....	49
Figura 18: Avaliação do efeito de um inibidor de PI3K (LY294002) sobre a produção de IL-1 β em cultura de CMSP.....	49
Figura 19: Avaliação do efeito de um inibidor de PI3K γ (AS605240) sobre a produção de IL- 1 β em cultura de CMSP.....	51
Figura 20: Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de IL- 1 β em cultura de CMSP.....	52
Figura 21: Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 (CHIR99021) sobre a produção de IL- 1 β em cultura de CMSP.....	53
Figura 22: Avaliação do efeito de um inibidor de PI3K (LY294002) sobre a produção de IL- 8 em cultura de CMSP.....	54
Figura 23: Avaliação do efeito de um inibidor de PI3K γ (AS605240) sobre a produção de IL- 8 em cultura de CMSP.....	55
Figura 24: Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de IL- 8 em cultura de CMSP.....	56
Figura 25: Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 (CHIR99021) sobre a produção de IL- 8 em cultura de CMSP.....	57
Figura 26: Quantificação das citocinas IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-8 no soro de indivíduos controles e pacientes com ELT	58

1. INTRODUÇÃO

1.1 As epilepsias

Epilepsia é considerada uma predisposição permanente para geração de crises convulsivas, com a presença de disfunção cognitiva e emocional do indivíduo (VEZZANI *et al.*, 2011). A epilepsia é uma das desordens neurológicas mais comuns em todo o mundo (VEZZANI *et al.*, 2011), afetando 1% da população mundial (BEDNER *et al.*, 2015). Os comportamentos alterados por uma crise convulsiva são dependentes das funções realizadas pela região cortical onde se originou a convulsão (BERTRAM, 2009; ENGEL, 1996; GUERREIRO *et al.*, 2000).

Pessoas com epilepsia têm maior risco de mortalidade precoce e de apresentarem comorbidades, tais como doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias, dores de cabeça, enxaqueca e vários outros tipos de dor, em relação a pessoas saudáveis (CDC, 2013). Nesse contexto, pessoas que apresentam essa desordem neurológica podem sofrer desvantagens sociais, como desemprego e estigma (CDC, 2013).

Com relação ao tipo de convulsão que esses indivíduos podem apresentar, podem-se considerar as convulsões parciais, em que ocorre um disparo desordenado temporário de um conjunto de neurônios de determinada parte do encéfalo; e as convulsões generalizadas em que ocorre um disparo desordenado em uma área mais ampla do Sistema Nervoso Central (SNC), envolvendo simultaneamente os dois hemisférios cerebrais. Nas convulsões parciais simples a consciência é preservada, já nas convulsões parciais complexas e generalizadas ocorre à perda da consciência (GUERREIRO *et al.*, 2000).

A crise epilética tem uma natureza temporária e geralmente as crises parciais complexas originadas no neocórtex, particularmente as do lobo frontal, apresentam uma duração mais curta, assim como um período pós-ictal mais breve em relação às crises de origem mesial temporal (AFRA *et al.*, 2008).

Os efeitos das crises epiléticas não se limitam apenas ao córtex cerebral, uma vez que existe comunicação do SNC com a periferia do organismo. As crises podem afetar a função autonômica e neuroendócrina, da mesma forma que estímulos químicos ou nervosos podem afetar a fisiologia cerebral, interferindo no limiar das crises. O estresse, por exemplo, pode levar a ativação de leucócitos através do sistema de inervação simpática dos órgãos linfóides, o que pode ocorrer no momento ou após a ocorrência da crise convulsiva (MARCHI *et al.*, 2007).

Os anticonvulsivantes não alteram a progressão da doença, apenas bloqueiam ou minimizam a ocorrência de crises, por meio da redução de estímulos excitatórios e correntes iônicas ou estimulação da atividade inibitória de interneurônios (VEZZANI *et al.*, 2011; BEDNER *et al.*, 2015). Esses fármacos podem reduzir correntes iônicas mediadas por sódio, cálcio ou glutamato ou aumentar a inibição gabaérgica (MARCHI *et al.*, 2007). O fármaco valproato atua sobre as correntes de Na⁺ e Ca²⁺, possuindo também um componente imunomodulador, inibindo NFκ-B (ICHIYAMA *et al.*, 2000). A fenitoína também atua sobre as correntes de Na⁺ e como componente imunomodulador diminui a quantidade de células T, tendo um efeito imunossupressor (HASHIBA *et al.*, 2011). Já a Carbamazepina atua sobre as correntes de Na⁺ (BEGHI & SHORVON, 2011), estabilizando os canais de sódio dependentes de voltagem, resultando na diminuição na quantidade de canais disponíveis, reduzindo a propagação das crises. Esse último medicamento é uma das drogas mais utilizadas no tratamento de crises parciais e generalizadas. O uso dos anticonvulsivantes envolve características individuais do paciente, considerando cada tipo e frequência da crise epilética e os diversos efeitos colaterais apresentados (SETHI *et al.*, 2007).

Ao longo das últimas décadas os fármacos anticonvulsivantes vêm oferecendo uma farmacocinética mais favorável, melhor tolerabilidade e menor potencial para apresentar interações medicamentosas. No entanto, cerca de 30% dos pacientes com epilepsia ainda apresentam crises epiléticas apesar do tratamento farmacológico (BIALER, 2012).

Para um número significativo de pacientes com epilepsia resistente ao tratamento medicamentoso é necessária a realização da cirurgia para a ressecção do foco epileptogênico (KOSSOFF & HARTMAN, 2012).

1.1.2 Epilepsia do Lobo Temporal

A Epilepsia do lobo temporal (ELT) é a forma de epilepsia mais comum em adultos e se caracteriza por um foco epilético localizado no lobo temporal. Alguns pacientes com ELT não respondem ao tratamento farmacológico tradicional e são encaminhados para o tratamento cirúrgico (DAS *et al.*, 2012).

Os distúrbios funcionais relacionados à ELT normalmente se iniciam na infância após um evento iniciador, tais como convulsão febril, encefalite ou trauma (PERNOT *et al.*, 2011). A crise inicial é seguida por um período de latência, sem ocorrência de crises epiléticas, que recomeçam anos mais tarde. O período de latência está associado com processos

moleculares e celulares diversos que desencadeiam uma cascata de circuitos neuronais chamada epileptogênese (DE LANEROLLE & LEE, 2005; VEZZANI & GRANATA, 2005; RAVIZZA et al., 2008). O processo de epileptogênese ocorre em três etapas: primeiramente há um evento ou lesão precipitante seguido de um período "latente", durante o qual o cérebro com funcionamento normal passa por transformações que o levam a ser considerado epilético, para posteriormente ocorrer o estabelecimento da epilepsia (GOLDBERG & COULTER, 2013). Dentre as transformações que ocorrem durante a epileptogênese está a hiperexcitabilidade neuronal associada com a ativação de sistemas oxidantes intracelulares, que ocorrem de maneira cálcio-dependente. O desequilíbrio excitatório/inibitório e os eventos oxidativos podem ser determinantes no processo de alteração das redes neuronais e estabelecimento da epilepsia crônica. Os neurônios podem apresentar mudanças na sensibilidade a neurotransmissão gabaérgica, via receptor GABBA, agravando o desequilíbrio excitatório/inibitório neuronal. As alterações do receptor GABAA podem ser causadas por alterações na expressão de proteínas envolvidas no tráfego e ancoragem dos receptores, impactando diretamente a estabilidade das sinapses gabaérgicas, promovendo o comprometimento da resposta neuronal (DI MAIO, R., 2014).

Outra transformação observada na epileptogênese é na atividade dopaminérgica, que devido a projeções para o sistema límbico compromete o equilíbrio neuronal. A atividade dopaminérgica modula a neurotransmissão, principalmente via receptores D1 e D2 e o comprometimento no equilíbrio de dopamina pode contribuir para o agravamento das crises (BOZZI & BORRELLI, 2013).

No lobo temporal, o hipocampo e o córtex entorrinal estão intimamente relacionados. Em condições normais, o giro denteado do hipocampo recebe projeções do córtex entorrinal, transmitindo apenas um pequeno componente da entrada, de forma sincronizada, a seu alvo em CA3. Um mecanismo observado na epileptogênese, conhecido como brotamento das fibras musgosas, resulta na formação de uma rede sináptica assimétrica. As fibras musgosas (axônios das células granulares do giro denteado) desenvolvem colaterais para a camada molecular interna e interneurônios inibitórios, formando um novo circuito recorrente excitatório entre células granulares (SCHARFMAN et al., 2003).

A amígdala e o hipocampo são regiões de grande importância epileptogênica, sendo estruturas danificadas, apresentando perda neuronal e gliose (YANG et al., 2010).

Na maior parte dos casos de ELT a causa é identificada como sendo a esclerose hipocampal (ENGEL, 1996), que se caracteriza pela perda neuronal no hipocampo, atrofia e gliose (BERTRAM, 2009). É bem estabelecido que crises epiléticas recorrentes possam

causar lesões no hipocampo de animais, levando a perda neuronal (ENGEL, 1996). A perda de neurônios hipocampais ocorre principalmente na região do Corno de Amon 1 (CA 1) e na região do hilo do giro denteado (GD), com a existência de algumas variações (BERTRAM, 2009). Esse padrão foi observado durante cirurgias para o tratamento de ELT e em estudos *post-mortem* de cérebros de pacientes com ELT. Outras regiões também apresentam alterações como perda neuronal, atrofia e gliose, sendo essas áreas a amígdala e o córtex entorrinal (JUHÁSZ *et al.*, 1999).

As crises do lobo mesial temporal usualmente possuem duração média de 106 segundos, No entanto, esses breves eventos podem produzir alteração da consciência e ter um impacto grave sobre a qualidade de vida dos pacientes com epilepsia refratária, ou seja, resistente ao tratamento medicamentoso (AFRA *et al.*, 2008).

1.2 Sistema Imune e sua Relação com o Sistema Nervoso Central

A inflamação pode ser caracterizada pela produção de uma cascata de mediadores inflamatórios e moléculas anti-inflamatórias em resposta a um estímulo nocivo ou estímulo imune, com o objetivo de garantir a homeostasia do indivíduo através da resolução da inflamação (VEZZANI *et al.*, 2011).

Embora existam estímulos inflamatórios que se tornem benéficos ao organismo resultando na eliminação dos indutores da inflamação e esta esteja relacionada à reparação de tecidos danificados, a persistência desses processos pode resultar em danos tissulares devido a uma falha dos mecanismos usuais de resolução da inflamação (GLASS *et al.*, 2010; SONNENBERG & ARTIS, 2015). O estímulo inflamatório persistente pode resultar de fatores ambientais ou endógenos, como por exemplo, a formação de agregados proteicos, o que no SNC, leva a produção de fatores neurotóxicos, agravando processos neurodegenerativos. O envolvimento de processos inflamatórios já foi descrito para as doenças de Alzheimer, Parkinson, Esclerose Lateral Amiotrófica e Esclerose Múltipla (GLASS *et al.*, 2010). As vias inflamatórias são reconhecidas por contribuir com a patogênese dessas doenças (WALKER & SILLS, 2012) e apesar de cada uma delas possuir características inflamatórias próprias parece haver uma característica em comum entre elas: as respostas efectoras resultam na amplificação da resposta inflamatória, neurotoxicidade e morte neuronal (GLASS *et al.*, 2010).

Mediadores da inflamação, principalmente as citocinas, polipeptídios que atuam como mediadores inflamatórios solúveis mediam a ativação da imunidade inata e a transição

para imunidade adaptativa. Entre essas moléculas estão incluídas interleucinas (IL), fator de necrose tumoral (TNF), interferons (IFNs) e fatores de transformação de crescimento (TGF β). As citocinas são secretadas por células endoteliais e por leucócitos e permitem a comunicação entre células efetoras e de destino durante uma resposta imune (VEZZANI *et al.*, 2011).

As citocinas administradas periféricamente podem sinalizar através da Barreira Hematoencefálica (BHE), como é demonstrado quando ocorre a administração de IL-1 periféricamente e a anorexia resultante é interrompida pelo bloqueio do receptor pelo seu antagonista ou bloqueando diretamente a IL-1 no cérebro via anticorpo (BANKS & ERICKSON, 2010). As citocinas também podem alcançar o cérebro via órgãos circumventriculares (BANKS & ERICKSON, 2010).

Um componente importante do sistema imune inato no SNC é a micróglia, célula de origem mielóide (AGUZZI *et al.*, 2013) que contribuem para a resposta inflamatória no cérebro (TREMBLAY *et al.*, 2010). A ativação da micróglia no SNC é um dos componentes universais da neuroinflamação (GLASS *et al.*, 2010). Nessa situação, ocorre proliferação exacerbada da micróglia ativada, que pode ser prejudicial, liberando persistentemente citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e proteases, tais como catepsinas e metaloproteinases, contribuindo para o dano neuronal (WOOD, 2003).

Foi observado que o lipopolisacarídeo (LPS), uma endotoxina muito utilizada para indução da resposta imune central e periférica, induziu ativação microglial no cérebro levando a um aumento na proliferação e migração das células microgliais, bem como alterações nos níveis de mediadores inflamatórios (NGUYEN *et al.*, 2002).

Sabe-se que em condições fisiológicas ocorre a presença de um baixo número de células T no cérebro como parte da função cerebral normal (SCHWARTZ & KIPNIS, 2011). Atualmente é bem estabelecido que as células da imunidade periférica respondam prontamente e sejam recrutadas para o SNC, extravasando para o parênquima cerebral na presença de patógenos, auto antígenos ou lesão tecidual (RANSOHOFF *et al.*, 2003; VEZZANI *et al.*, 2011). Dessa forma, o recrutamento de células da imunidade periférica para o SNC está associado a várias condições neurológicas que podem ser benéficas ou patogênicas (WILSON *et al.*, 2010).

A infiltração de células imunes no SNC pode alterar a população residente, como micróglia e astrócitos, amplificando a resposta inflamatória causando danos que alteram a sobrevivência e função neuronal (PERRY *et al.*, 2010). O infiltrado celular pode ocorrer em vários locais, incluindo a BHE ao longo dos capilares no parênquima cerebral, plexo coroide, vasos e vênulas (WILSON *et al.*, 2010). A neuroinflamação induz alterações

nesses locais que se tornam mais permeáveis a passagem de células imunes periféricas (TAKESHITA & RANSOHOFF, 2012).

De acordo com Ransohoff (2003) há três vias de migração de leucócitos da periferia para o SNC: seguindo a secreção do Fluido Cerebrospinal (FCE) que é produzido por células do plexo coróide e que seria uma via de relevância fisiológica. Os leucócitos extravasariam do sangue pelo endotélio fenestrado do plexo coróide, migrando para o estroma central, interagindo com células do endotélio do plexo coróide, que expressam selectinas, como P-selectina, moléculas de adesão intercelular e quimiocinas, e entrariam no FCE em seu local de produção. Essa interação com as células endoteliais ocorre por meio de receptores de quimiocinas, ligantes de selectinas, tais como PSGL-1, localizados na superfície do leucócito. Outra via de migração leucocitária seria a via do sangue até o espaço subaracnóideo. Os leucócitos atravessariam da artéria carótida interna, extravasando via vênulas na superfície cerebral até o espaço subaracnóideo. A terceira via de migração seria a via do sangue até o espaço perivascular parenquimal. Nessa via os leucócitos alcançariam o parênquima diretamente, deixando a carótida interna através da ramificação vascular de arteríolas e capilares, extravasando por vênulas. Por esse trajeto os leucócitos seriam recrutados a atravessar a BHE e a lâmina endotelial basal (RANSOHOFF *et al.*, 2003).

1.3 Epilepsia e Inflamação

A correlação bidirecional existente entre o SNC e o sistema imune é mediada principalmente pelas citocinas, o que evidencia que a resposta inflamatória está envolvida na epilepsia ou que crises epiléticas podem desencadear respostas inflamatórias (SONMEZ *et al.*, 2013). A alta incidência de crises epiléticas em doenças autoimunes e a descoberta da encefalite límbica como causa de epilepsia, evidenciam essa conexão entre mecanismos imunes e inflamatórios em algumas formas de epilepsia (VEZZANI & GRANATA, 2005; VINCENT & BIEN, 2008).

Infecções e doenças que acometem o SNC, além de traumas no cérebro, são fatores de risco comuns para o desenvolvimento de epilepsia. Esses eventos são acompanhados por respostas inflamatórias em diferentes níveis e disfunção cerebrovascular, o que possivelmente é um desencadeador para crises convulsivas (MARCHI *et al.*, 2007).

O papel da inflamação na epilepsia humana foi primeiramente investigado através do tratamento com esteroides e outros anti-inflamatórios, que mostraram uma ação

anticonvulsivante em alguns casos de epilepsia resistente ao tratamento convencional (RIIKONEN, 2004; WHELESS *et al.*, 2007; WIRRELL *et al.*, 2005).

Evidências sugerem a ativação da imunidade inata e adaptativa na epilepsia humana, sugerindo também que a inflamação pode contribuir para geração e recorrência de crises e dano neuronal (ARONICA & CRINO, 2011). Por outro lado, as crises epiléticas recorrentes podem perpetuar a resposta inflamatória, o que leva a uma inflamação crônica (VEZZANI *et al.*, 2011).

Lehtimaki e colaboradores (2004) demonstraram que os níveis da citocina pró-inflamatória IL-6 no FCE e no soro de pacientes com epilepsia crônica aumentam 24 horas após as crises tônico-clônicas. O nível mais alto de IL-6 foi encontrado em pacientes com crises tônico-clônicas recorrentes, tanto no FCE quanto no plasma, em relação a pacientes que apresentaram crises tônico-clônicas únicas ou crises parciais (LEHTIMAKI *et al.*, 2004). Níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-2, TNF, INF- γ e IL-6, estavam notavelmente aumentados em pacientes com epilepsia, durante o período pós-ictal (SINHA *et al.*, 2008).

Outras evidências clínicas demonstraram o envolvimento do sistema imune e da inflamação na epilepsia, entre 10% e 20% dos pacientes com Lúpus desenvolvem crises epiléticas em algum estágio de desenvolvimento da doença (AARLI *et al.*, 2000). Choi e colaboradores (2011) também demonstraram um aumento nos níveis de IL-1 β no soro de pacientes com epilepsia refratária.

Em pacientes com ELT houve ativação microglial no hipocampo, sugerindo a ocorrência de resposta imune relacionada à doença (RAVIZZA *et al.*, 2008). Em um estudo com eletroencefalograma, pacientes com o mesmo tipo de epilepsia refratária mostraram um aumento nos níveis de IL-6 plasmático em relação aos indivíduos controle (ALAPIRTTI *et al.*, 2009).

Prayson e Frater (2002) analisaram o infiltrado de natureza linfóide de sete pacientes com epilepsia, sendo que na maioria dos pacientes foi evidenciada a predominância de células T no parênquima cerebral. Fabene e colaboradores (2008) demonstraram uma quantidade significativamente maior de linfócitos T no parênquima cerebral em relação aos indivíduos controles em amostras de córtex de pacientes com epilepsia.

Vieira e colaboradores (2015) encontraram uma frequência elevada de células T ativadas em indivíduos com ELT em relação aos controles. Foram vistos também elevados níveis intracelulares de IFN- γ , IL-6 e TNF em células T CD4⁺, além de IL-10 em células T CD8⁺. A frequência de células Treg foi semelhante entre indivíduos com ELT e controles, porém nos pacientes com ELT foi observado um aumento de três vezes nos níveis intracelulares

de IL-10. Indivíduos com ELT também exibiram maior ativação de células da imunidade inata, em monócitos, foi encontrado alta frequência de IL-6 e TNF, o que indica um estado pró-inflamatório.

A abertura da BHE utilizando choque osmótico se mostrou suficiente para provocar crises motoras focais em seres humanos, porcos e ratos, demonstrando a importância desse fenômeno para a ocorrência de crises epiléticas (MARCHI *et al.*, 2007). É possível que o extravasamento de proteínas através da BHE estimule a liberação de glutamato pelos neurônios durante as crises, sendo que esse evento estimularia a transcrição de citocinas nas células gliais (ESPINOSA & BERMUDEZ-RATTONI, 2001; KUBERA *et al.*, 2001).

Terapias baseadas em citocinas, com o uso de anticorpos monoclonais, receptores solúveis ou moléculas inibidoras configuram uma alternativa promissora de tratamento para pacientes com resistência ao tratamento com drogas convencionais (STRIZ *et al.*, 2014).

1.4 Via de sinalização PI3K/Akt/GSK3 β /mTOR e sua relação com neuroinflamação e epilepsia

Várias doenças do SNC se caracterizam por mudanças ou distúrbios em vias de sinalização resultando em alteração da plasticidade cerebral e inclusive em neurodegeneração. Embora numerosas vias controlem a função celular, uma via que tem se mostrado muito importante para a vida da célula é a via Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/ proteína quinase B (Akt)/ proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). Essa via é conhecida por regular o metabolismo e o crescimento celular (BENJAMIN *et al.*, 2011; CHONG *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2010).

A PI3K está envolvida na produção de mediadores inflamatórios por células do Sistema Nervoso Central (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008, 2012). Essa quinase é encontrada em mamíferos e dividida em três classes: I, II e III. As diferentes classes possuem funções distintas na célula, acarretando na ativação de diferentes vias sinalizadoras, que regulam o metabolismo, sobrevivência, crescimento, diferenciação celular e transporte de vesículas intracelulares (ORCY *et al.*, 2008).

A ativação de PI3K pode ocorrer por diferentes estímulos e leva a ativação da Akt e de mTOR. Fatores de crescimento ou citocinas podem estimular o recrutamento da PI3K para a membrana plasmática e após a sua ativação a PI3K fosforila lipídeos de membrana e regula a transição de Akt do citosol para a membrana, promovendo a ligação da Akt ao PIP2 e PIP3. A Akt participa de variadas vias de sinalização que promovem a

sobrevivência e previnem o dano celular (CHONG *et al.*, 2005). Três tipos de Akt foram identificados em mamíferos: Akt 1 (Akt- α), Akt 2 (Akt- β) e Akt 3 (Akt- γ) (CHENG & WHITE, 2011). Outra enzima de grande importância é a fosfatase homóloga a tensina (PTEN), que metaboliza o PIP3, reduzindo a ativação da Akt (LAINE *et al.*, 2002).

A ativação de Akt culmina na fosforilação da enzima Glicogênio sintase quinase-3 (GSK3) β e mTOR. Na célula em repouso, a GSK3 β se encontra ativa e é inativada através de sua fosforilação. Portanto a ativação de Akt resulta na inibição de GSK3 β , a qual tem sido relacionada à regulação de fatores de transcrição, tais como β -catenina, NF- κ B e CREB (TAKAHASHI *et al.*, 2000).

mTOR é uma proteína quinase que regula a transcrição, organização do citoesqueleto e sobrevivência celular (CHONG *et al.*, 2012), é evolutivamente conservada e desempenha um papel fundamental no controle do crescimento celular. Essa proteína é expressa em muitos tecidos, incluindo o cérebro, onde a sua ativação é controlada por vários sinais extracelulares e pela PI3K (XIAO *et al.*, 2015). Sabe-se que uma das funções de mTOR é inibir a apoptose (DORMOND *et al.*, 2007), sendo que quando Akt e mTOR são inibidas, pode ocorrer injúria celular apoptótica durante um estresse oxidativo (SHANG *et al.*, 2012). Por outro lado, pode-se bloquear a morte celular apoptótica de neurônios dopaminérgicos com a aplicação de agentes que aumentam a atividade de Akt e mTOR (CHOI *et al.*, 2010; CHONG *et al.*, 2012).

Existem dois tipos de GSK3, frequentemente referidos como isoformas (GSK3 α e GSK3 β) uma vez que possuem sequências e funções similares, porém são derivados de genes diferentes e possuem ações diferentes (KAIDANOVICH-BEILIN & WOODGETT, 2011). Estudos sugerem que essa enzima esteja envolvida na sinalização dopaminérgica (BEAULIEU *et al.*, 2009). A GSK3 pode ser fosforilada por várias quinases, tais como Akt, proteína quinase A, proteína quinase C e outras. Sendo assim, a atividade de GSK3 é regulada por mais de uma via (KING *et al.*, 2014).

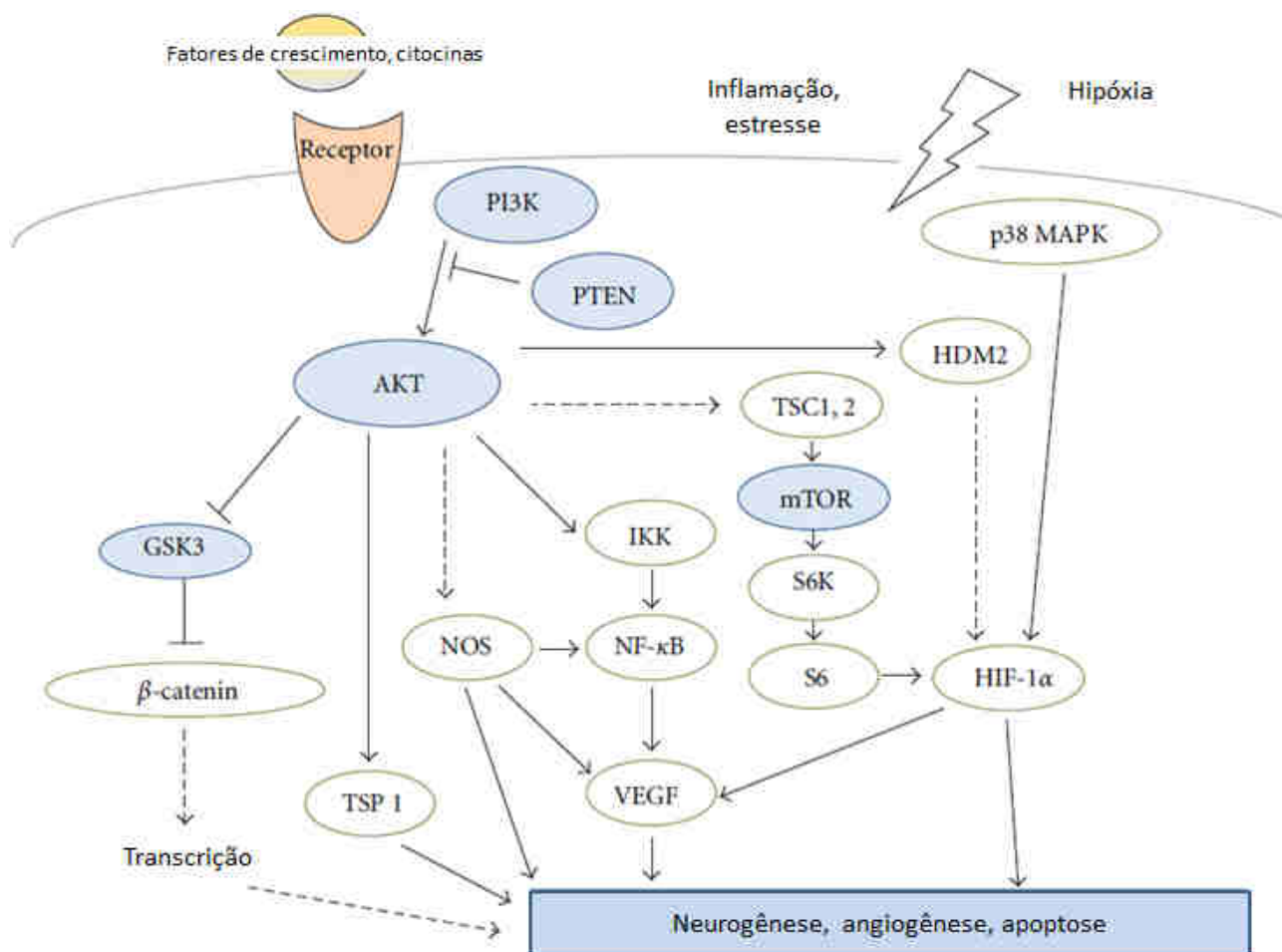


Figura 1: Esquema da via PI3K/Akt/GSK3β/mTOR. Modificado de Kitagishi (2012)

Entre as isoformas conhecidas a PI3K γ é expressa principalmente no SNC, sistema imune e cardiomiócitos (KIM *et al.*, 2011). A ativação de PI3K também resulta na inibição de citocinas pró-inflamatórias como IL-12 e TNF (CHONG *et al.*, 2012). Tem sido demonstrado que a PI3K e as enzimas por ela reguladas, estão envolvidas em processos inflamatórios. PI3K e mTOR parecem aumentar os níveis de citocinas anti-inflamatórias, enquanto inibem as citocinas pró-inflamatórias (LEONARD & MAES, 2012). A inibição farmacológica de PI3K, Akt e mTOR aumentou a produção de mediadores inflamatórios em cultura de células microgliais incubadas com estímulo inflamatório, por outro lado, a inibição de GSK-3 β inibiu a produção desses mediadores (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008, 2012).

O envolvimento de mTOR em um mecanismo importante na esclerose tuberosa tem sido relatado, sendo esse um distúrbio no qual mais de 80% dos pacientes desenvolvem epilepsia (HOLMES & STAFSTROM, 2007), diminuindo a frequência de crises epiléticas desses pacientes quando inibida (MUNCY *et al.*, 2009). Essa inibição resulta no atenuamento dos efeitos neuropatológicos induzidos por estímulos epiléticos, tais como

neurodegeneração e brotamento de fibras musgosas (HUANG *et al.*, 2010; ZENG *et al.*, 2009). Mutações que culminam na hiperativação de mTOR desencadeiam um alto índice de epilepsia em modelos experimentais (WALTEREIT *et al.*, 2006). A inibição dessa proteína com rapamicina em modelos animais de epilepsia previne a astrogliose, desorganização neuronal e crises epiléticas. Esses resultados demonstram que a ativação da mTOR aberrante pode levar ao desenvolvimento de epilepsia (ZENG *et al.*, 2008). Essa proteína vem sendo encontrada ativada em variados modelos de epilepsia (ZENG *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2010; ZHANG & WONG, 2012), enquanto o bloqueador de mTOR, possui propriedades antiepileptogênicas (HUANG *et al.*, 2010). A inibição de mTOR no modelo de epilepsia induzido por cainato também resultou na redução das crises, diminuição da morte neuronal e brotamento de fibras musgosas (ZENG *et al.*, 2009), sugerindo a alteração dessa proteína na epilepsia.

A deleção de PTEN acarreta no aumento da fosforilação do efetor de mTOR, S6. Kwon e colaboradores (2003) observaram que em animais *knockout* para PTEN, tratados com rapamicina, não houve brotamento de fibras musgosas, sugerindo que a ativação excessiva da via mTOR pode ter relação com a epileptogênese.

A PI3K provavelmente favorece a resposta anti-inflamatória, em camundongos PI3K $\gamma^{-/-}$ tratados com pilocarpina, foi demonstrado que os níveis de IL-10 estavam aumentados no hipocampo, o que não foi observado nos animais selvagens (LIMA *et al.*, 2015).

A primeira função metabólica descrita de GSK3 estava relacionada ao metabolismo de glicogênio. A referida enzima é altamente expressa em todos os tecidos, apresentando níveis elevados no cérebro, onde se encontra a forma GSK3 β (SALCEDO-TELLO *et al.*, 2011), encontra-se na literatura evidências da alteração da regulação dessa enzima na neuroinflamação (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008, 2012).

Doença de Lafora é uma epilepsia autossômica recessiva que acomete adolescentes, se caracterizando por crises epiléticas progressivas e demência, culminando em crises contínuas e levando a morte dentro de 10 anos. Na autópsia, observam-se massas conhecidas como Corpos de Lafora nos neurônios, miócitos e hepatócitos e degeneração neuronal (CHAN *et al.*, 2005; LOHI *et al.*, 2005). Foi demonstrado em um estudo que a laforina é uma fosfatase de GSK3 (LOHI *et al.*, 2005).

A GSK3 localizada no núcleo da célula regula a expressão de diversos genes, sendo necessária a manutenção do equilíbrio entre a ativação e inibição da enzima para a manutenção do balanço apropriado entre morforegulação, proliferação e crescimento celular. A inibição prolongada está associada com um hiper crescimento celular, enquanto a ativação prolongada está associada com neurodegeneração. A deleção de GSK3 β em

camundongos se demonstrou letal, porém, os camundongos heterozigotos sobreviveram apresentando um aumento no comportamento de ansiedade e uma redução no comportamento de exploração (SALCEDO-TELLO *et al.*, 2011).

Considerando o papel de PI3K, mTOR e GSK-3 em neuroinflamação e fenômenos associados às epilepsias, é possível que esta via esteja desregulada durante a epilepsia. Desta forma, torna-se importante investigar a participação dessa via na produção de mediadores inflamatórios por células imunes de pacientes com ELT e de indivíduos saudáveis.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Testar a hipótese de que existe uma desregulação em vias de sinalização de células mononucleares periféricas de pacientes com ELT, o que contribui para um padrão de resposta diferencial em relação aos indivíduos controles frente a um estímulo inflamatório.

2.2 Objetivos Específicos

- Testar a hipótese de que a produção de IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-8 por CMSP de pacientes expostos a um estímulo inflamatório é diferente das células obtidas de controles saudáveis.
- Testar a hipótese de que a inibição farmacológica das enzimas PI3K, GSK3 e mTOR em CMSP expostas a estímulo inflamatório regula a produção de citocinas de maneira diferente das células dos controles.
- Testar a hipótese de que existe diferença na produção sérica de IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-8 em indivíduos com ELT e indivíduos controle.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Indivíduos

O recrutamento de indivíduos com ELT foi realizado no Ambulatório Bias Fortes, do Hospital das Clínicas da UFMG. Foram recrutados 7 indivíduos com esclerose mesial temporal, unilateral ou bilateral, atendidos pelo serviço de Neurologia.

Como critérios para inclusão no estudo, os indivíduos deveriam relatar ausência de crise epilética por pelo menos 72 horas (período interictal), possuir idade superior a 18 anos e inferior a 65 anos e aceitar participar da pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e esclarecido (TCLE) (Anexo A). Os indivíduos que preenchiam qualquer um dos critérios de exclusão (uso de medicamentos anti-inflamatório ou antibiótico a menos de 1 mês, presença de doença neuropsiquiátrica grave, ter sido submetido a cirurgia hipocampal), foram excluídos da pesquisa.

Os indivíduos que aceitaram participar do estudo e que preenchiam os critérios estabelecidos pela pesquisa foram submetidos a uma breve anamnese e coleta de dados sócio-demográficos, aferição de peso e altura e coleta do material biológico (sangue periférico).

Os indivíduos controles que aceitavam participar da pesquisa deveriam apresentar idade superior a 18 anos e inferior a 65 anos e ausência de epilepsia ou qualquer transtorno neuropsiquiátrico grave e assinarem o TCLE. Os critérios de exclusão eram os mesmo para esse grupo. Os indivíduos controles foram recrutados por busca ativa na Faculdade de Medicina da UFMG, e são pareados por idade e gênero com os indivíduos com ELT (Tabela 1).

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP (Nº Parecer 147543/2013).

Table 1 Características demográficas e clínicas da amostra estudada.

	Indivíduos com ELT (n=7)	Controles (n=7)	p-value
Gênero			0,711 ^a
Homens	4 (57,14%)	3 (42,85%)	
Idade média, anos (DS)	42 (13.1)	39 (9.8)	0,175 ^c
Nível educacional, anos de estudo (DS)	8,4 (4,1)	10,5 (5,7)	0,135 ^c
Estado civil			0,070 ^a
Solteiro	2 (28,57%)	2 (28,57%)	
Casado	4 (57,14%)	5 (71,42%)	
Viúvo	1 (14,28%)	0 (0,0%)	
Divorciado	0 (0,0%)	0 (0,0%)	
Situação trabalhista			p < 0.001 ^a
Desempregado	2 (28,57%)	0 (0,0%)	
Empregado	1 (14,28%)	7 (100%)	
Aposentado	4 (57,14%)	0 (0,0%)	
Tipo de crise convulsiva			
Parcial simples	1 (0,0%)		0.290 ^a
Parcial complexa	7 (100%)		-
Parcial envolvendo generalização secundária	5 (71,42%)		0.748 ^a
IRM			0.422 ^a
Direita EMT	3 (42,85%)		
Esquerda EMT	3 (42,85%)		
Bilateral EMT	0 (0,0%)		
Ausente EMT	1 (14,28%)		
Idade de início da epilepsia (anos)	3,8 (4,6)		
Tempo médio de início da crise, anos (DP)	26.8 (13,3)		
Frequência média de crise, crise/mês (DP)	2,0 (1,9)		
Livre de crise por pelo menos 6 meses	0 (0,0%)		
Uso de drogas antiepiléticos (DAEs)			
Carbamazepina	4 (57,14%)		
Lamotrigina	2 (28,57%)		
Clobazam	5 (71,42%)		
Topiramato	3 (42,85%)		
Oxcarbazepina	3 (42,85%)		
Terapia com DAEs			
Monoterapia	1 (14,28%)		
2 tipos de DAEs	2 (28,57%)		
3 tipos de DAEs	4 (57,14%)		

ELT = Epilepsia do Lobo Temporal; DP = Desvio Padrão; IRM = Imagem de Ressonância Magnética; EMT

= Esclerose Mesial Temporal.

^aQui-Quadrado de Pearson

^bTeste Exato de Fisher

^cTeste Kruskal-Walis

3.2 Drogas

Para os bloqueios das vias de sinalização foram utilizadas as drogas que inibem as enzimas PI3K γ , PI3K (todas as isoformas), mTOR e GSK3 β . Desta forma, foram utilizadas

as seguintes drogas: LY294002 (1 e 10 μM), AS605240 (0,1 e 1 μM), Rapamicina (0,5 e 2,5 nM), e CHIR99021 (1 e 3 μM), respectivamente.

3.3 Obtenção da Cultura de Células Mononucleares do Sangue Periférico

Foi recolhido 15 mL de sangue periférico em tubos a vácuo contendo heparina sódica. Ao sangue foram acrescentados solução fisiológica contendo fosfato (PBS) (Sigma Aldrich Chemicals, St Louis, MO, USA) no mesmo volume que o do sangue a ser analisado. O sangue acrescido de PBS foi vertido lentamente sob o Ficoll-Paque (GE Healthcare, Piscataway, USA) contido em tubos plásticos. O volume de Ficoll-Paque utilizado foi o mesmo que o do sangue original. Os tubos com o gradiente de Ficoll foram centrifugados a 1200 rpm, por 40 minutos a temperatura ambiente (entre 18 – 23 °C).

Após a centrifugação, coletou-se o plasma, que foi armazenado em freezer -20°C. O anel de CMSP presente na interface do plasma e o Ficoll-Paque foi coletado com o auxílio de uma pipeta e transferido para outro tubo, sucedendo dois ciclos de lavagens em PBS a 4°C para remoção de resíduos de Ficoll-Paque (1200 rpm, por 10 minutos a 4°C). Após a segunda centrifugação o sobrenadante foi descartado e o precipitado celular ressuspenso em meio RPMI-1640 suplementado com antibióticos (penicilina 200U/mL e estreptomicina 0.1mg/mL), 1mM L-glutamina e 10% de soro humano masculino inativado AB Rh⁺, na concentração final de 1×10^7 células por mL. Todos os reagentes e soluções utilizados para cultura celular foram provenientes da empresa de biotecnologia Sigma Aldrich Chemicals (St Louis, MO, USA). A viabilidade celular foi avaliada pelo corante intravital azul de Tripán (diluição das células em corante 1:20 v/v) seguido de contagem em câmara de Neubauer.

Após contagem, as células foram plaqueadas ($2,0 \times 10^5$ células/poço) e submetidas à cultura na presença ou ausência dos bloqueadores das vias de ativação PI3K, PI3K α , mTOR e GSK3 β por uma hora, em estufa de CO₂ (37°C). Após essa breve incubação, adicionou-se o PHA a 1% (Sigma Aldrich Chemicals) aos poços estimulados ou RPMI aos poços sem estímulos. As células foram então incubadas por 24 horas em estufa de CO₂. Após a incubação, separou-se o sobrenadante das culturas e estes foram armazenados em freezer -20°C até o momento das análises no Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica da Faculdade de Medicina da UFMG.

3.4 Quantificação das Citocinas e Quimiocinas por microesferas (Cytometric Bead Array – CBA)

As dosagens de citocinas e quimiocinas do sobrenadante das culturas e plasma dos indivíduos com ELT e controles foram realizadas pelo método de CBA, conforme instruções do fabricante (BD Bioscience, San Diego, CA, USA). Utilizaram-se os kits para quantificação de proteínas inflamatórias (*Human Inflammation* - IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF e IL-12p70). Brevemente, as amostras de sobrenadante e plasma foram incubadas com as microesferas de captura recobertas por anticorpos específicos para as respectivas citocinas e quimiocinas, assim como as proteínas da curva padrão. Adicionou-se em seguida o reagente de cor (Ficoeritrina - PE) e as amostras foram incubadas por 3 horas. Após a incubação, as amostras foram lavadas (Wash buffer®) e centrifugadas (200 rpm, 5 minutos, temperatura ambiente). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado contendo as microesferas foi ressuspendido com 300 μ L de Wash buffer. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton & Dickinson, San Jose, CA, USA). Os resultados foram analisados pelo software FCAP (BD Bioscience) e representados em pg/mL.

3.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico Prisma 5.0 (GraphPad, CA, USA). Os dados foram analisados pela análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA), seguidos pelo teste de Bonferroni. Os dados foram apresentados como média \pm erro-padrão da média (E.P.M.). O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

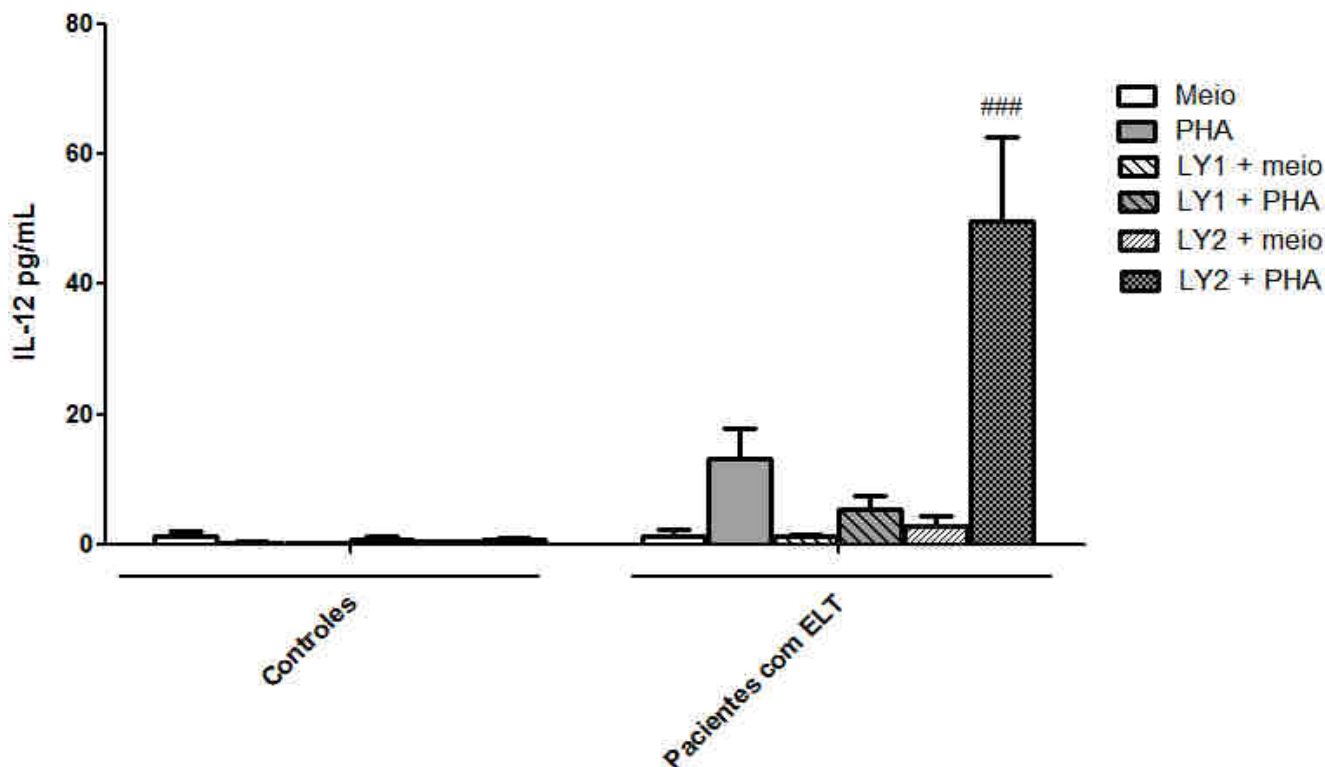
4.1 Quantificação de IL-12p70

4.1.1 Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K sobre a produção de IL-12p70 por CMSP de pacientes com ELT e controles

Inicialmente foi avaliada a produção de IL-12p70 em células de pacientes com ELT e controles estimuladas com PHA (1%). Observa-se que os níveis basais de IL-12p70 no sobrenadante das culturas de células de pacientes e controles não diferem estatisticamente ($P > 0,05$; Fig. 2). Porém, a estimulação com PHA aumenta os níveis de IL-12p70 apenas nos pacientes com ELT (Fig. 2).

A seguir, foi avaliada se a inibição de vias intracelulares alteraria de modo diferencial a produção de mediadores inflamatórios por células de pacientes e controles estimuladas com PHA.

A exposição de células não estimuladas ao LY294002, um inibidor não seletivo de PI3K, não alterou a produção de IL-12p70. Porém, LY294002 (10 μM) aumentou a produção de IL-12p70 apenas em CMSP obtidas dos pacientes estimuladas com PHA ($P < 0,001$; Fig.



2).

Figura 2: Avaliação do efeito de um inibidor de PI3K (LY294002) sobre a produção de IL-12p70 em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com LY294002 (1 ou 10 μM , -1h) e

estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. ### $p < 0,001$ em relação ao grupo PHA + veículo de CMSP de pacientes.

Com o objetivo de se investigar o efeito da inibição apenas da isoforma γ da PI3K, utilizou-se o inibidor seletivo AS605240. De modo semelhante ao inibidor não seletivo, o AS605240 não alterou os níveis de IL-12p70 em CMSP não tratadas com estímulo inflamatório. Por outro lado, apesar de uma tendência para aumento ser observada com a menor concentração, a inibição seletiva de PI3K γ não alterou os níveis de IL-12p70 no sobrenadante de células incubadas com PHA (Fig. 3, $P > 0,05$).

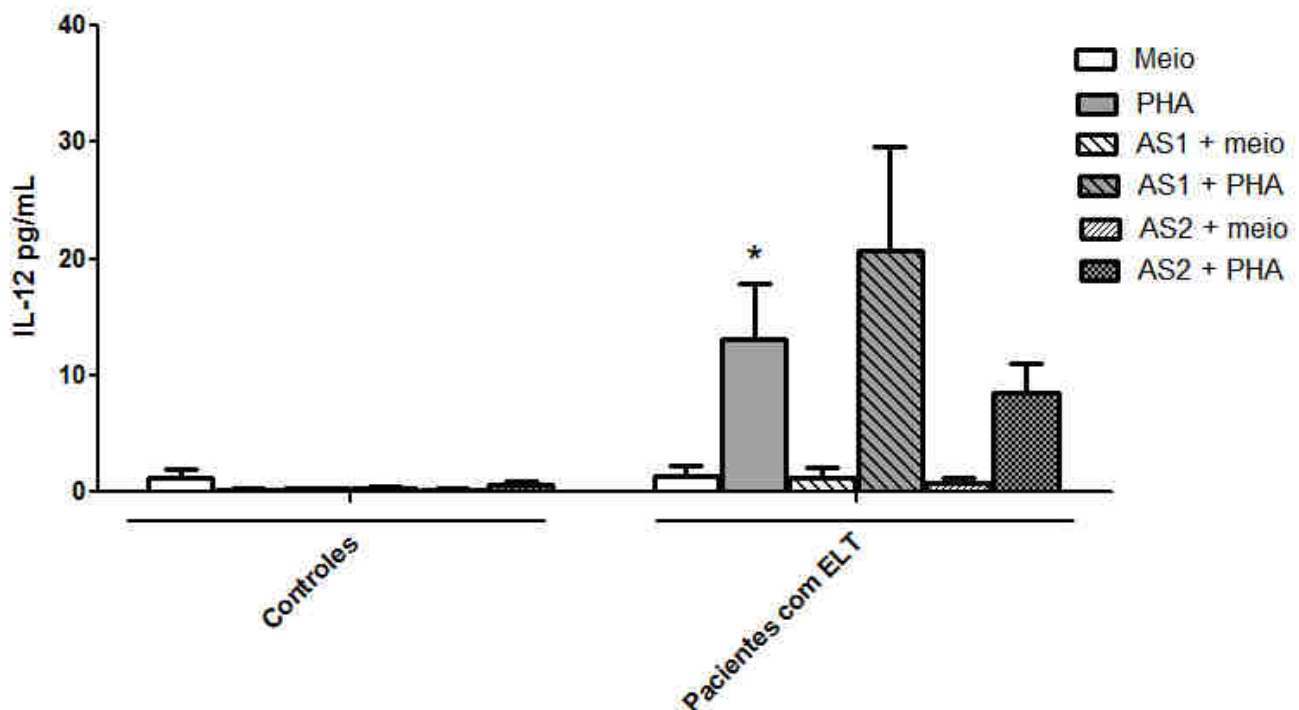


Figura 3: Avaliação do efeito de um inibidor seletivo de PI3K γ (AS605240) sobre a produção de IL-12p70 em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com LY294002 (0,1 ou 1 μ M, - 1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. * $p < 0,05$ em relação ao meio de cultura de CMSP de pacientes.

4.1.2 Avaliação do efeito do inibidor de mTOR sobre a produção de IL-12p70 por CMSP de pacientes com ELT e controles

A seguir foi avaliado se a inibição de mTOR, via rapamicina, alteraria de modo diferencial a produção de IL-12p70 por células de pacientes com ELT e controles estimuladas com PHA.

A exposição de células não estimuladas a rapamicina não alterou a produção de IL-12p70. Porém, rapamicina (0,5 e 2,5 nM) aumentou a produção de IL-12p70 apenas em CMSP obtidas dos pacientes estimuladas com PHA ($P < 0,001$ para concentração 0,5 nM e $P < 0,01$ para concentração 2,5 nM; Fig. 4).

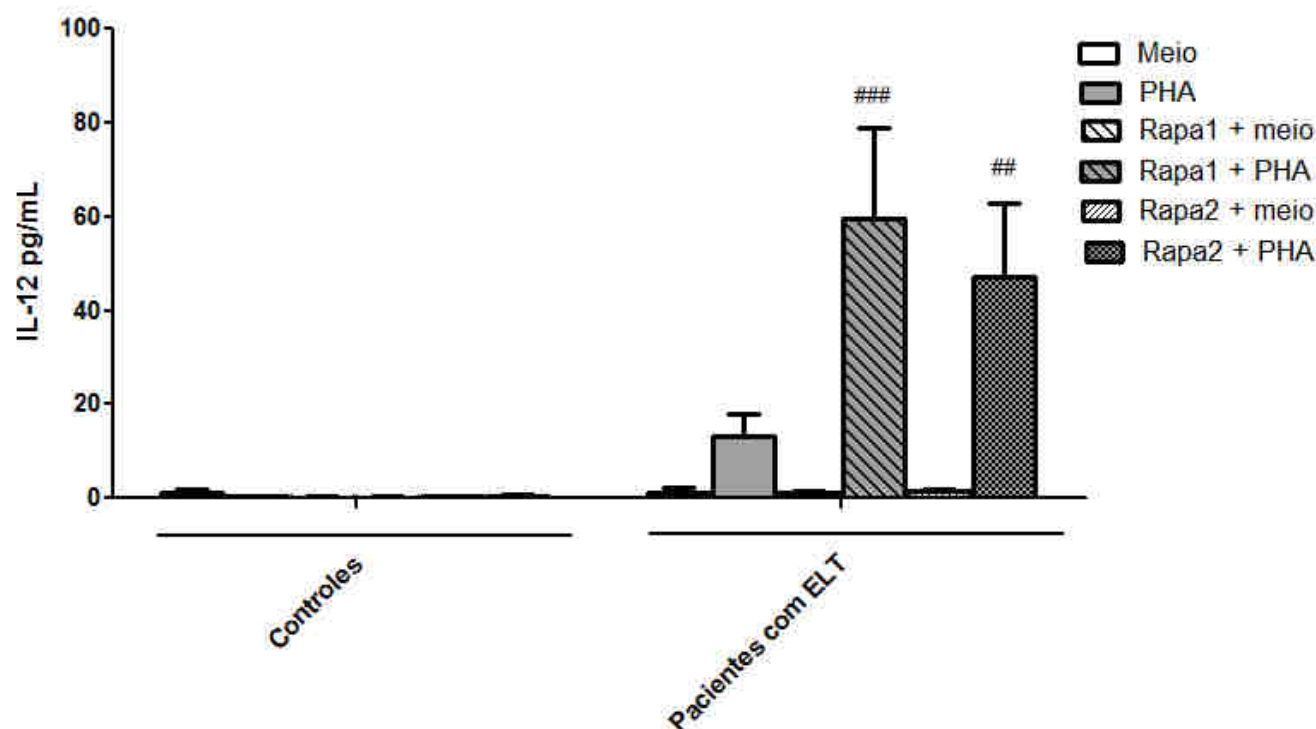


Figura 4: Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de IL-12p70 em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com rapamicina (0,5 ou 2,5 nM, -1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ em relação ao grupo PHA + veículo de CMSP de pacientes.

4.1.3 Avaliação do efeito do inibidor de GSK3 β sobre a produção de IL-12p70 por CMSP de pacientes com ELT e controles

Por fim foi avaliado se a inibição seletiva de GSK3 β , via CHIR99021, alteraria de modo diferencial a produção de IL-12p70 por células de pacientes com ELT e controles estimuladas com PHA.

A exposição de células não estimuladas a CHIR99021 não alterou a produção de IL-12p70. Porém, houve grande produção da citocina na CMSP incubada com PHA em relação a incubação com o meio de cultura em CMSP de pacientes com ELT. CHIR99021 (1 μ M) diminuiu a produção de IL-12p70 apenas em CMSP obtidas dos pacientes estimuladas com

PHA ($P < 0,001$; Fig. 5).

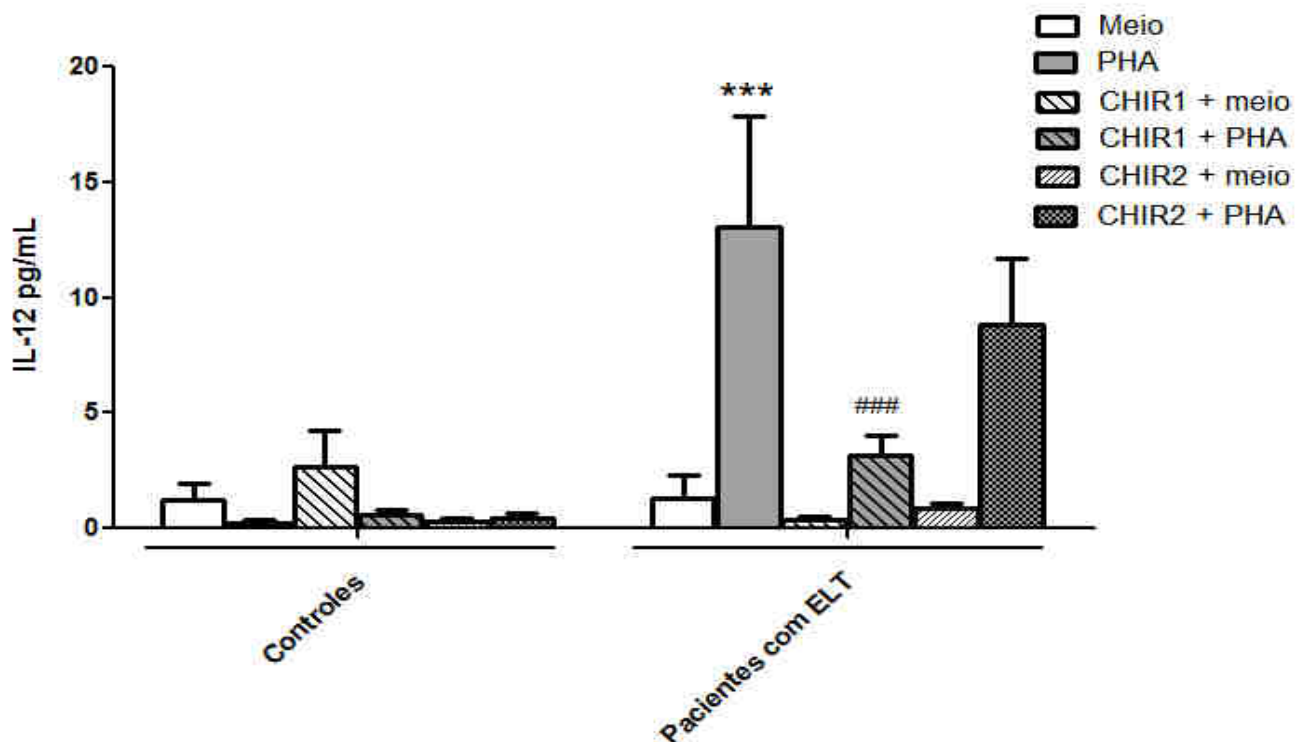


Figura 5: Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 β (CHIR99021) sobre a produção de IL-12p70 em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com rapamicina (1 ou 3 μM -1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo meio de controle de CMSP de pacientes. ### $p < 0,001$ em relação ao grupo PHA + veículo de CMSP de pacientes.

4.2 Quantificação de TNF

4.2.1 Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K sobre a produção de TNF por CMSP de pacientes com ELT e controles

Observa-se que os níveis basais de TNF no sobrenadante das culturas de células de pacientes com ELT e controles são diferentes. Porém, a estimulação com PHA aumenta os níveis de TNF apenas nos pacientes ($P < 0,001$; Fig. 6).

A exposição de células não estimuladas ao LY294002 (1 μM ; $P < 0,001$) não alterou significativamente a produção de TNF. Porém, LY294002 (1 ou 10 μM) diminuiu a produção de TNF, em ambas as concentrações apenas em CMSP obtidas dos pacientes com ELT estimuladas com PHA ($P < 0,001$; Fig. 6).

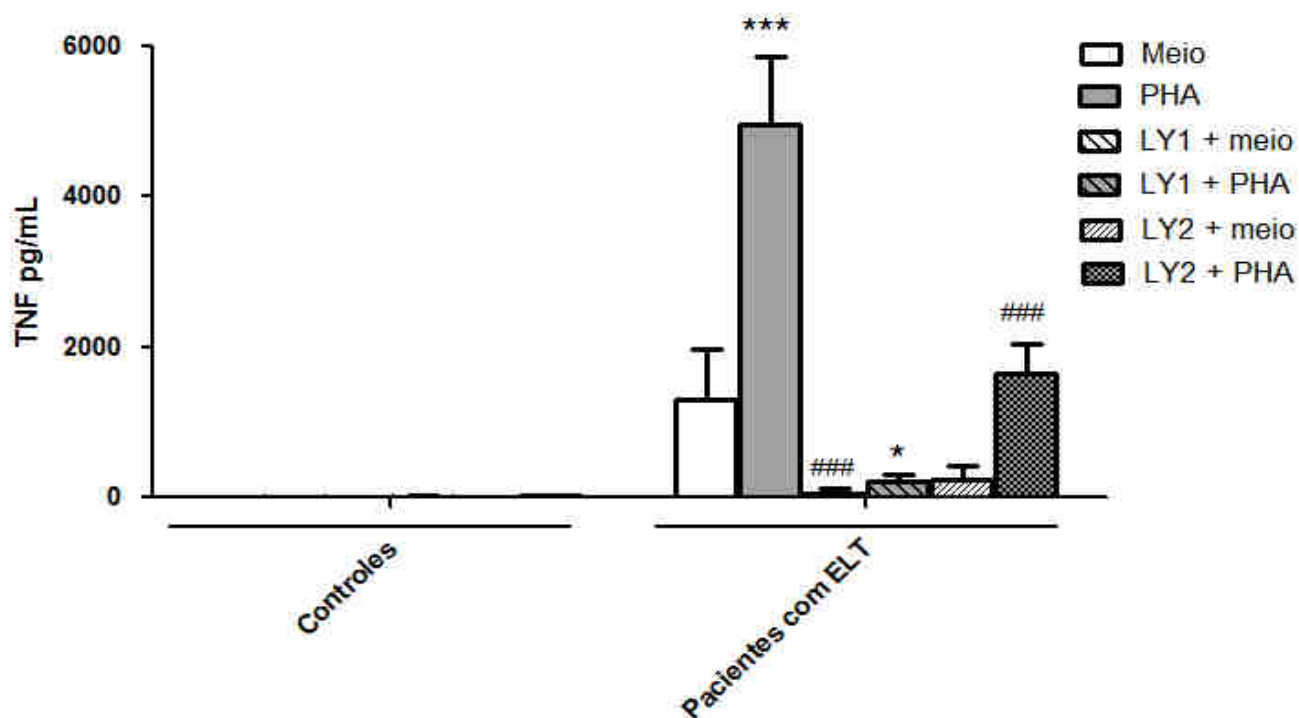


Figura 6: Avaliação do efeito de um inibidor de PI3K (LY294002) sobre a produção de TNF em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com LY294002 (1 ou 10 μ M, -1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo meio de cultura de CMSP de pacientes. ### $p < 0,001$ em relação ao grupo PHA + veículo de CMSP de pacientes.

De modo semelhante ao inibidor não seletivo, o AS605240 não alterou significativamente os níveis de TNF em CMSP não tratadas com estímulo inflamatório. Por outro lado, a inibição seletiva de PI3K γ (0,1 ou 1 μ M) diminuiu os níveis de TNF no sobrenadante de células incubadas com PHA, apenas na CMSP de pacientes com ELT (Fig. 7, $P < 0,001$).

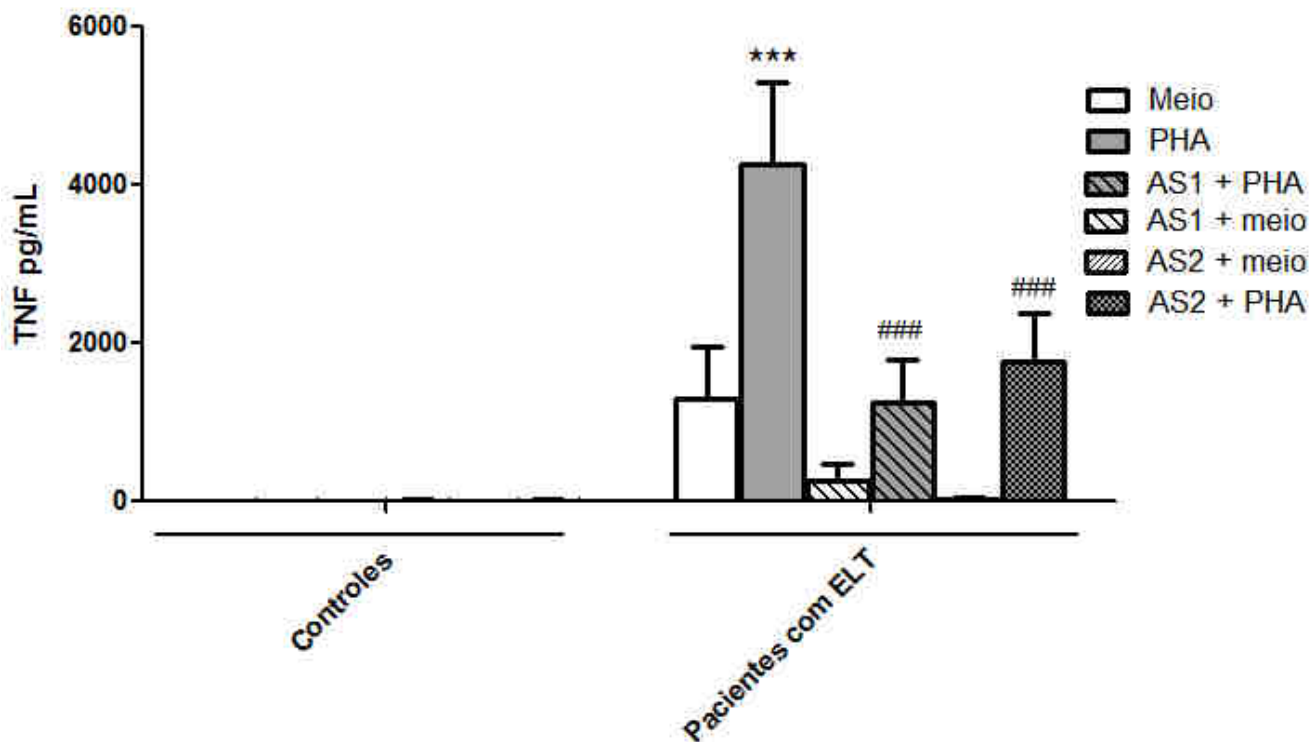


Figura 7: Avaliação do efeito de um inibidor seletivo de PI3K γ (AS605240) sobre a produção de TNF em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com LY294002 (0,1 ou 1 μ M, - 1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. *** $p < 0,001$ em relação ao meio de cultura de CMSP de pacientes. ### $p < 0,001$ em relação ao grupo PHA + veículo de CMSP de pacientes.

4.2.2 Avaliação do efeito do inibidor de mTOR sobre a produção de TNF por CMSP de pacientes com ELT e controles

A exposição de células não estimuladas a rapamicina não alterou a produção de TNF. Porém, rapamicina (0,5 e 2,5 nM) diminuiu a produção de TNF apenas em CMSP obtidas dos pacientes com ELT estimuladas com PHA ($P < 0,001$; Fig. 8).

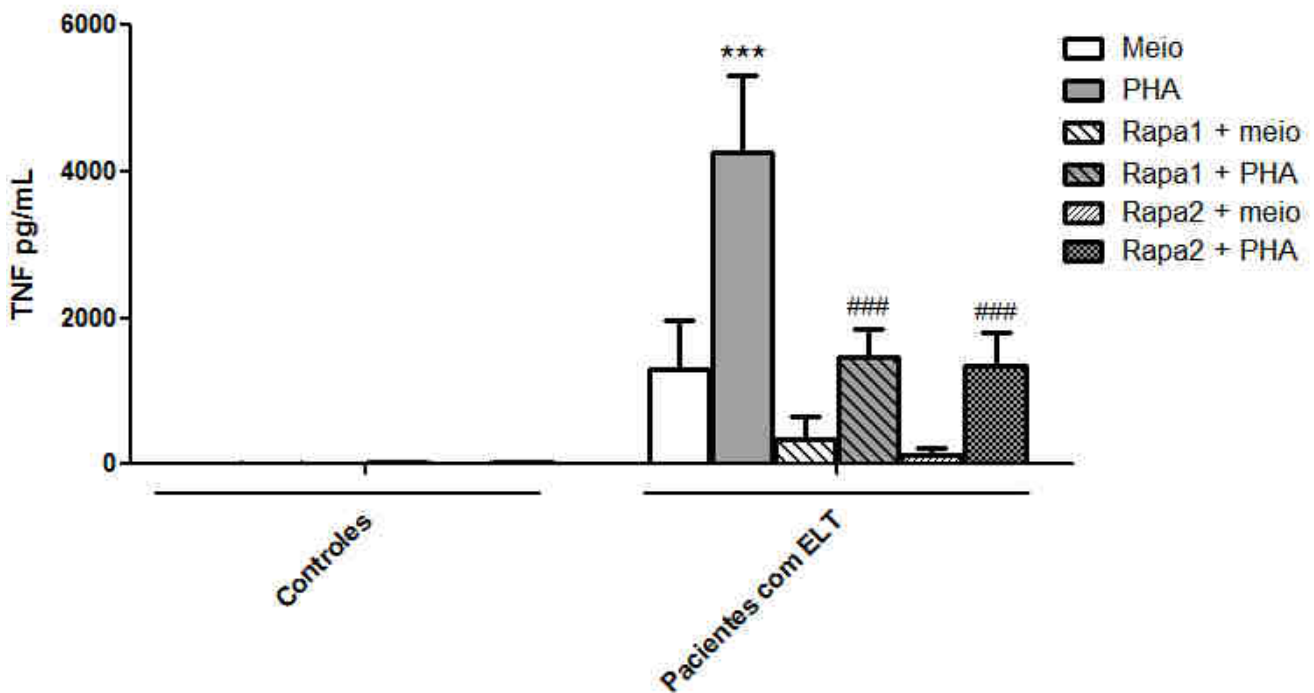


Figura 8: Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de TNF em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com rapamicina (0,5 ou 2,5 nM, -1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo meio de controle em CMSP de pacientes. ### $p < 0,001$ em relação ao grupo PHA + veículo de CMSP de pacientes.

4.2.3 Avaliação do efeito do inibidor de GSK3 β sobre a produção de TNF por CMSP de pacientes com ELT e controles

A exposição de células não estimuladas a CHIR99021 não alterou a produção de TNF. Porém, CHIR99021 (1 ou 3 μ M) diminuiu a produção de TNF apenas em CMSP obtidas dos pacientes com ELT estimuladas com PHA ($P < 0,001$ para a concentração 1 μ M e $P < 0,01$ para a concentração 3 μ M ; Fig. 9).

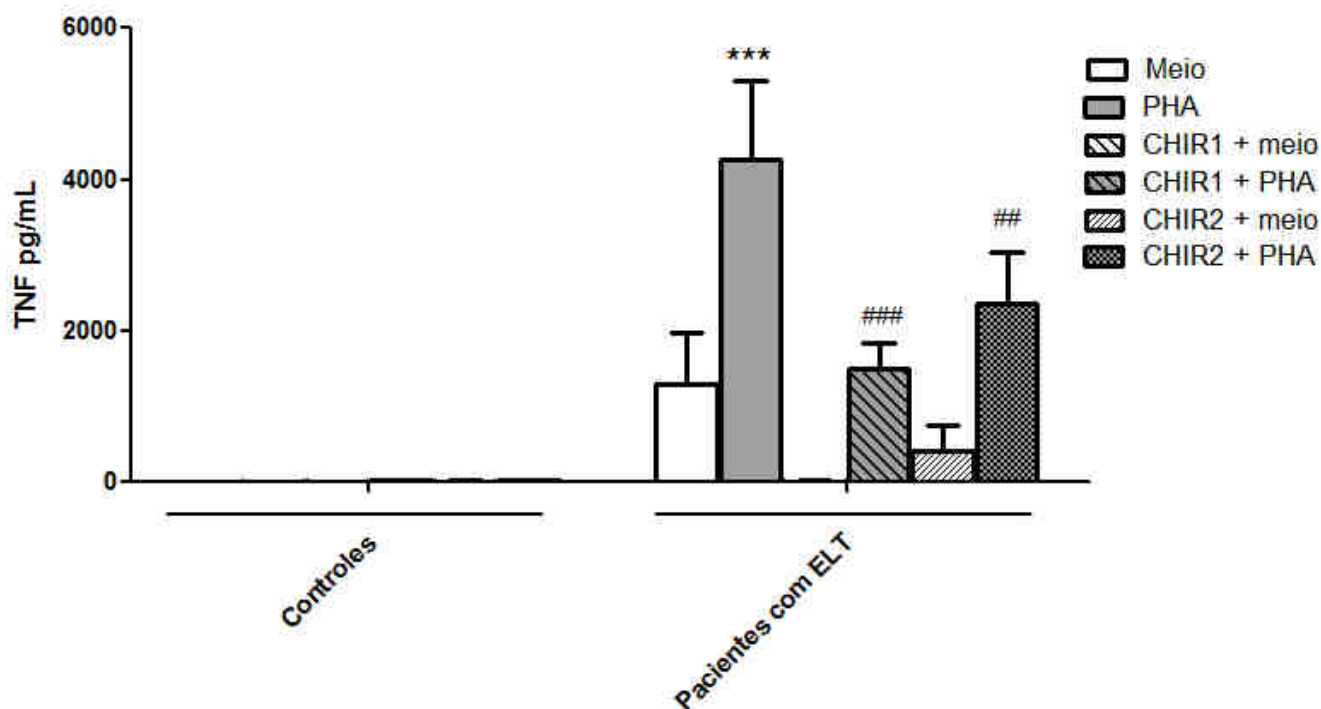


Figura 9: Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 β (CHIR99021) sobre a produção de TNF em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com rapamicina (1 ou 3 μ M -1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo meio de controle de CMSP de pacientes. ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ em relação ao grupo PHA + veículo de CMSP de pacientes.

4.3 Quantificação de IL-10

4.3.1 Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K sobre a produção de IL-10 por CMSP de pacientes com ELT e controles

Observa-se que os níveis basais de IL-10 no sobrenadante das culturas de células de pacientes com ELT e controles não diferem estatisticamente ($P \geq 0,05$; Fig. 10). Porém, a estimulação com PHA aumenta os níveis de IL-10 apenas nos pacientes ($P < 0,001$; Fig. 10). A exposição de células não estimuladas ao LY294002 não alterou a produção de IL-10. Porém, LY294002 (1 ou 10 μ M) diminuiu a produção de IL-10 apenas em CMSP obtidas dos pacientes estimuladas com PHA ($P < 0,01$; Fig. 10).

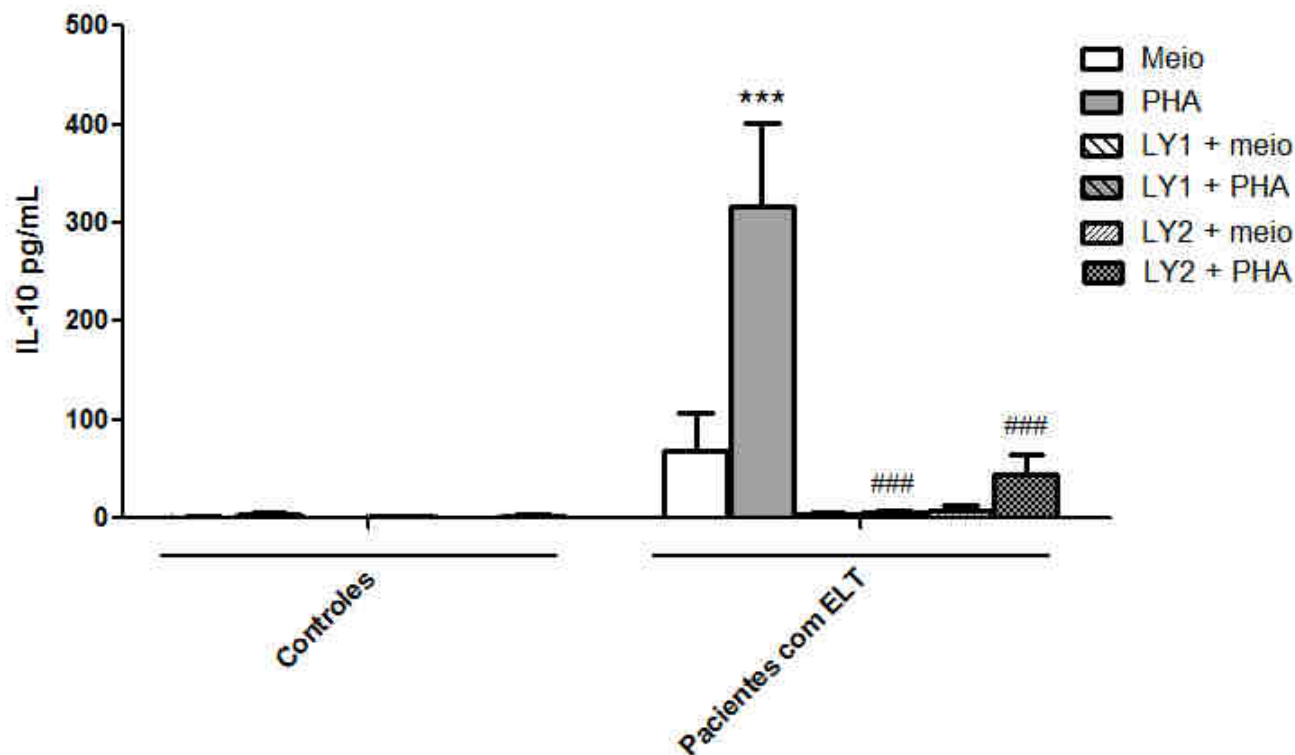


Figura 10: Avaliação do efeito de um inibidor de PI3K (LY294002) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com LY294002 (1 ou 10 μ M, -1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo meio de cultura de CMSP de pacientes. ### $p < 0,001$ em relação ao grupo PHA + veículo de CMSP de pacientes.

De modo semelhante ao inibidor não seletivo, o AS605240 não alterou significativamente os níveis de IL-10 em CMSP não tratadas com estímulo inflamatório. Por outro lado, a inibição seletiva de PI3K γ (0,1 ou 1 μ M) diminuiu os níveis de IL-10 no sobrenadante de células incubadas com PHA, apenas na CMSP de pacientes com ELT (Fig. 11, $P < 0,001$).

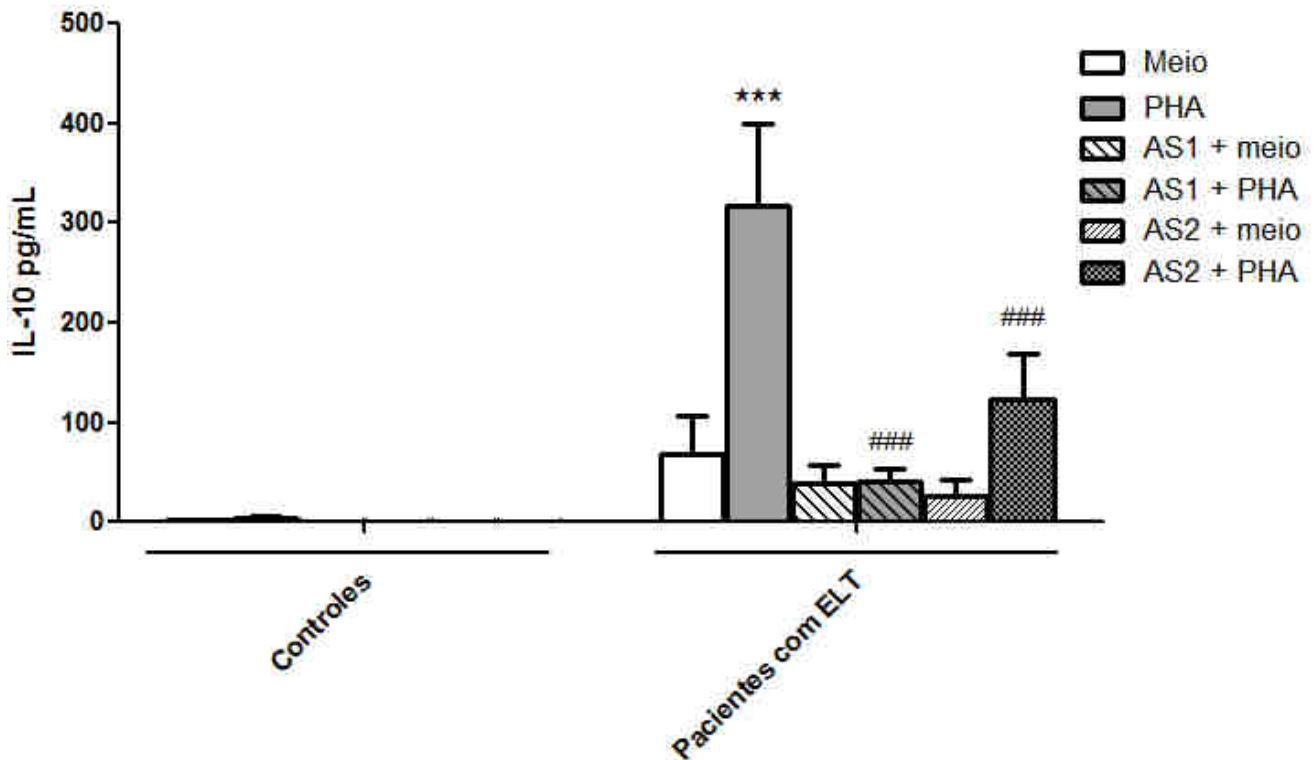


Figura 11: Avaliação do efeito de um inibidor seletivo de PI3K γ (AS605240) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com LY294002 (0,1 ou 1 μ M, - 1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. *** $p < 0,001$ em relação ao meio de cultura de CMSP de pacientes. ### $p < 0,001$ em relação ao grupo PHA + veículo de CMSP de pacientes.

4.3.2 Avaliação do efeito do inibidor de mTOR sobre a produção de IL-10 por CMSP de pacientes com ELT e controles

A exposição de células não estimuladas a rapamicina não alterou a produção de IL-10. Porém, rapamicina (0,5 ou 2,5 nM) diminuiu a produção de IL-10 apenas em CMSP obtidas dos pacientes com ELT estimuladas com PHA ($P < 0,001$; Fig. 12).

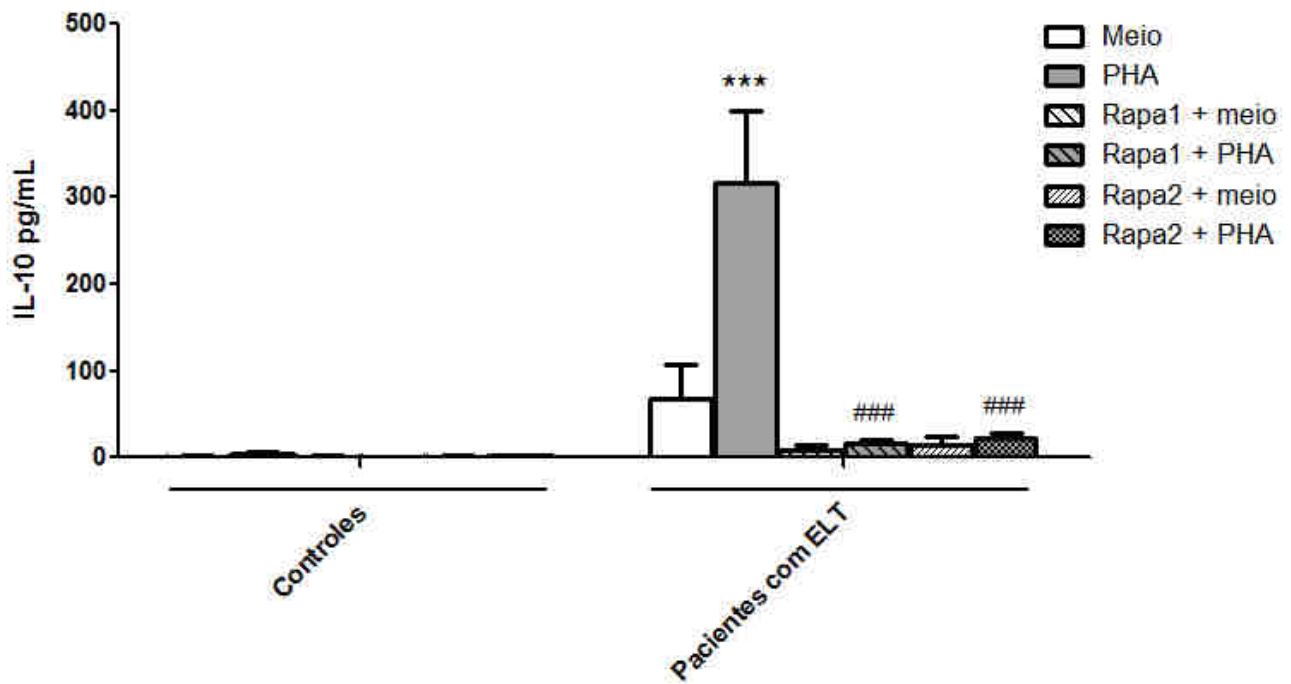


Figura 12: Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com rapamicina (0,5 ou 2,5 nM, -1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo meio de controle em CMSP de pacientes. ### $p < 0,001$ em relação ao grupo PHA + veículo de CMSP de pacientes.

4.3.3 Avaliação do efeito do inibidor de GSK3 β sobre a produção de IL-10 por CMSP de pacientes com ELT e controles

A exposição de células não estimuladas a CHIR99021 não alterou a produção de IL-10. De forma semelhante CHIR99021 não alterou a produção de IL-10 em CMSP estimuladas com PHA ($P > 0,05$; Fig. 13).

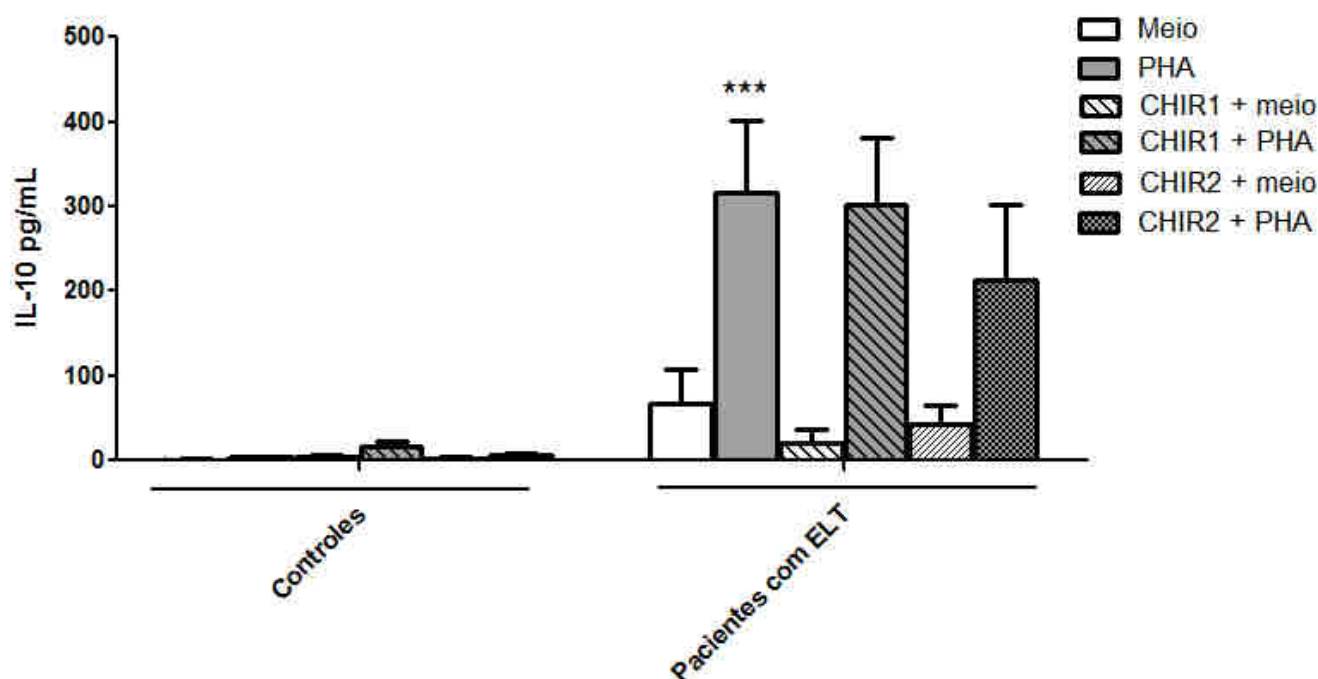


Figura 13: Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 β (CHIR99021) sobre a produção de IL-10 em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com rapamicina (1 ou 3 μ M -1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo meio de controle de CMSP de pacientes.

4.4 Quantificação de IL-6

4.4.1 Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K sobre a produção de IL-6 por CMSP de pacientes com ELT e controles

Observa-se que os níveis basais de IL-6 no sobrenadante das culturas de células de pacientes com ELT e controles são diferentes (Fig. 14). A estimulação com PHA aumenta os níveis de IL-6 apenas nos indivíduos controles ($P < 0,05$; Fig. 14), uma vez que os níveis de IL-6 já estavam aumentados na CMSP de pacientes.

A exposição de células não estimuladas ao LY294002 (1 ou 10 μ M) aumentou a produção de IL-6 na CMSP de indivíduos controles em relação ao meio de cultura ($P < 0,05$). Porém, LY294002 não alterou a produção de IL-6 em CMSP obtidas dos pacientes com ELT ($P > 0,05$; Fig. 14).

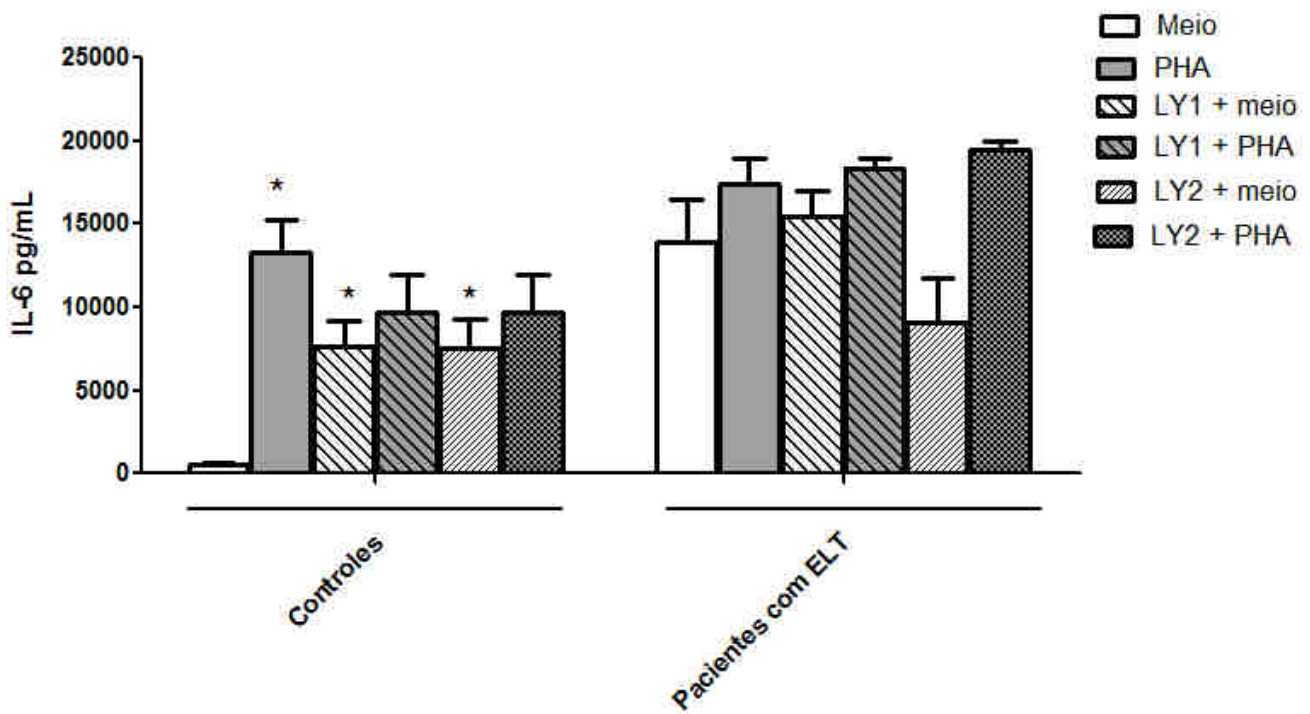


Figura 14: Avaliação do efeito de um inibidor de PI3K (LY294002) sobre a produção de IL-6 em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com LY294002 (1 ou 10 μ M, -1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. * $p < 0,05$ em relação ao grupo meio de cultura de CMSP de controles.

De modo semelhante ao inibidor não seletivo, o AS605240 não alterou significativamente os níveis de IL-6 em CMSP estimuladas em indivíduos controles e parece aumentar as concentrações de IL-6 nas culturas de células não estimuladas (Fig. 15, $P \leq 0,05$).

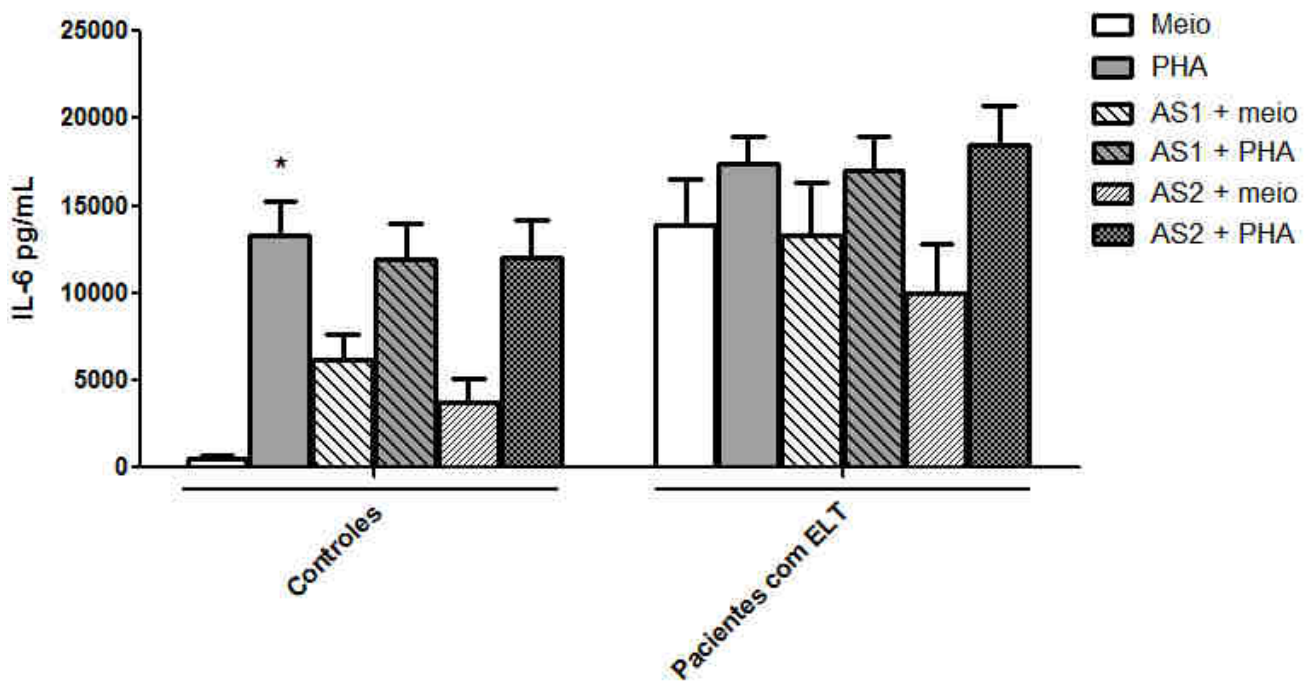


Figura 15: Avaliação do efeito de um inibidor seletivo de PI3K γ (AS605240) sobre a produção de IL-6 em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com LY294002 (0,1 ou 1 μ M, - 1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. * $p < 0,05$ em relação ao grupo meio de cultura de CMSP de controles.

4.4.2 Avaliação do efeito do inibidor de mTOR sobre a produção de IL-6 por CMSP de pacientes com ELT e controles

A exposição de células não estimuladas a rapamicina (0,5 ou 2,5 nM) aumentou a produção de IL-6 por CMSP de indivíduos controles em relação ao meio de cultura ($P < 0,05$). Porém, rapamicina não alterou a produção de IL-6 em CMSP estimuladas com PHA ($P > 0,05$); Fig. 16).

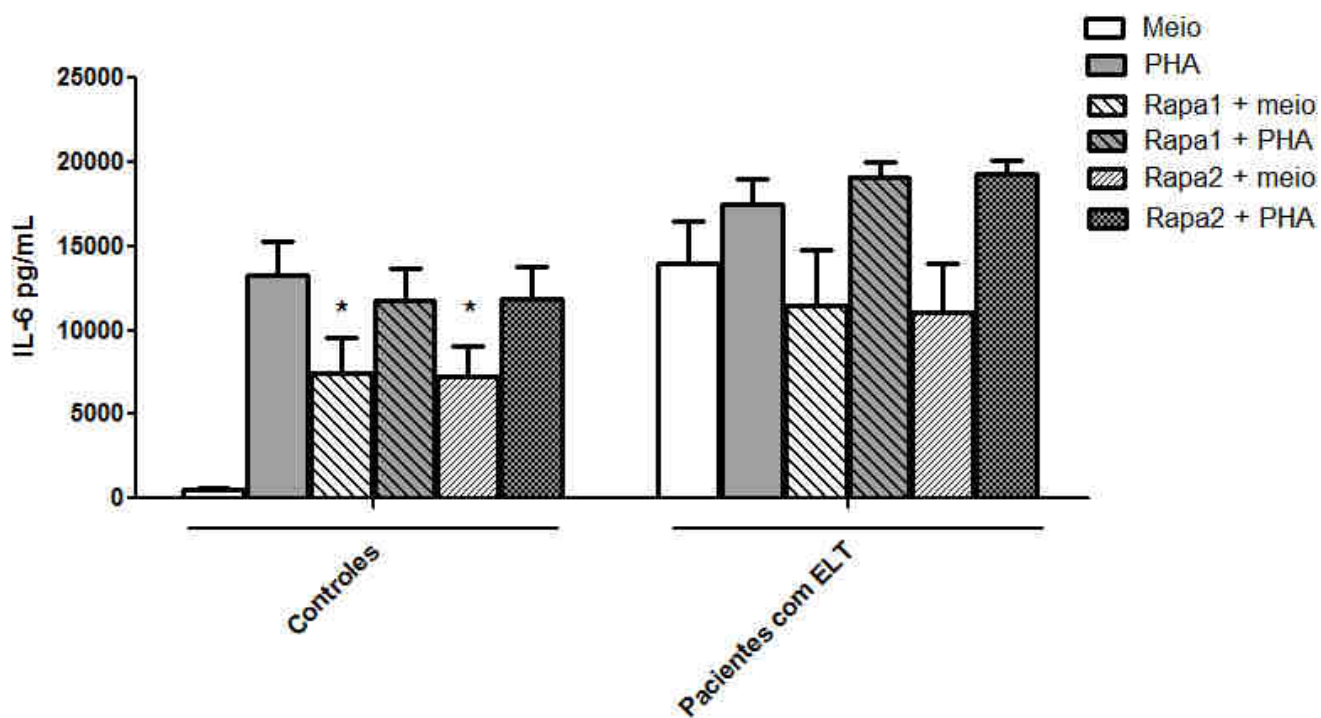


Figura 16: Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de IL-6 em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com rapamicina (0,5 ou 2,5 nM, -1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. * $p < 0,05$ em relação ao grupo meio de cultura de CMSP de controles.

4.4.3 Avaliação do efeito do inibidor de GSK3 β sobre a produção de IL-6 por CMSP de pacientes com ELT e controles

A exposição de células não estimuladas a CHIR99021 não alterou a produção de IL-6. De forma semelhante CHIR99021 não alterou a produção de IL-6 em CMSP estimuladas com PHA ($P > 0,05$; Fig. 17).

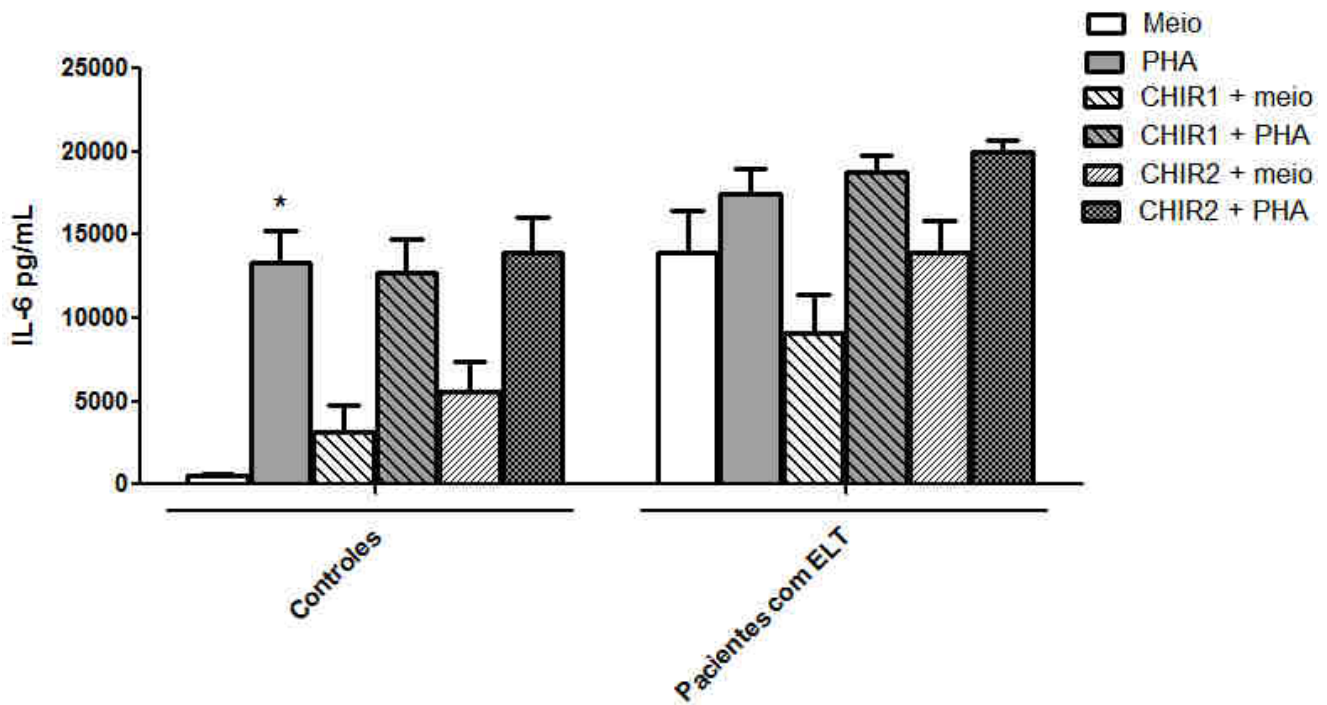


Figura 17: Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 β (CHIR99021) sobre a produção de IL-6 em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com rapamicina (1 ou 3 μ M -1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. * $p < 0,05$ em relação ao grupo meio de cultura de CMSP de controles.

4.5 Quantificação de IL-1 β

4.5.1 Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K sobre a produção de IL-1 β por CMSP de pacientes com ELT e controles

Observa-se que os níveis basais de IL-1 β no sobrenadante das culturas de células de pacientes com ELT e controles não diferem estatisticamente ($P > 0,05$; Fig. 18). Porém, a estimulação com PHA aumenta os níveis de IL-1 β apenas na CMSP de indivíduos controles ($P < 0,001$; Fig. 18).

A exposição de células não estimuladas ao LY294002 revelou uma tendência ao aumento da produção de IL-1 β em CMSP de controles em relação à incubação com o meio de cultura ($P > 0,05$). LY294002 não alterou a produção de IL-1 β em CMSP obtidas dos pacientes com ELT estimuladas com PHA ($P > 0,05$; Fig. 18).

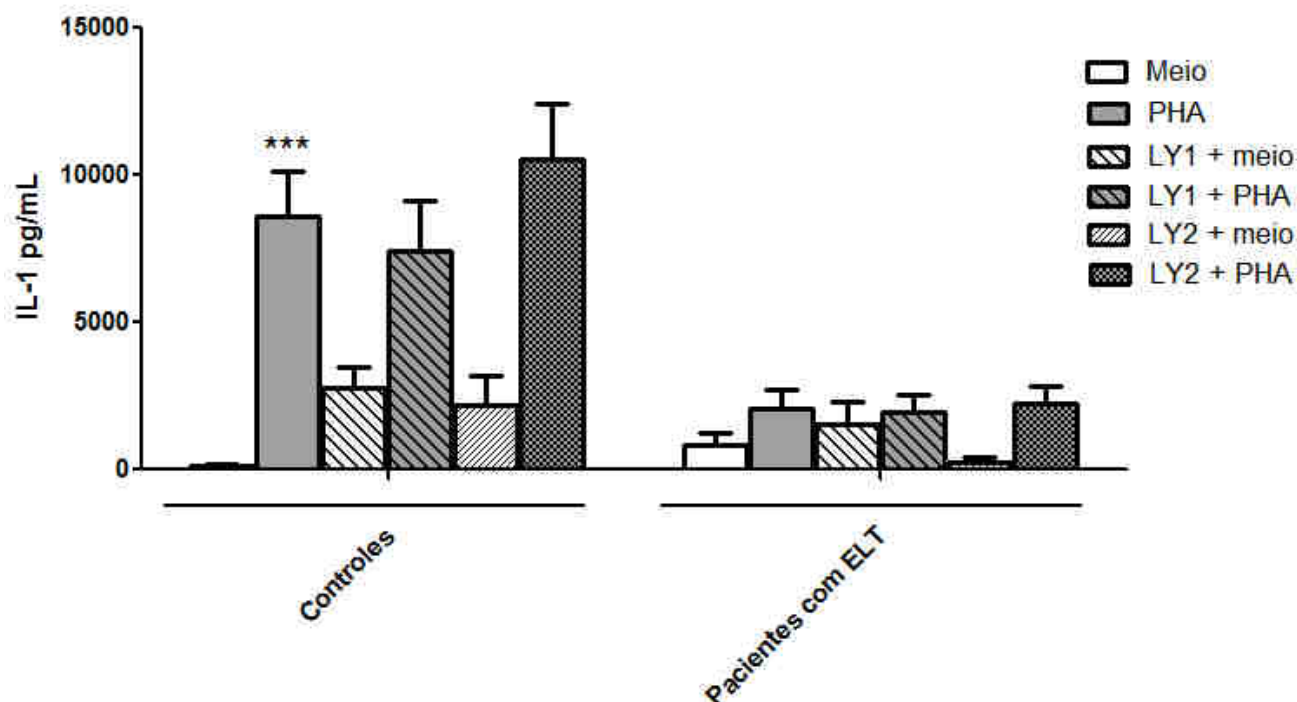


Figura 18: Avaliação do efeito de um inibidor de PI3K (LY294002) sobre a produção de IL-1 β em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com LY294002 (1 ou 10 μ M, -1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo meio de cultura de CMSP de controles.

De modo semelhante ao inibidor não seletivo, o AS605240 não alterou significativamente os níveis de IL-1 β em CMSP não tratadas com estímulo inflamatório tanto em indivíduos controles quanto em pacientes com ELT. AS605240 não alterou a produção de IL-1 β em CMSP de pacientes estimuladas com PHA ($P > 0,05$; Fig. 19).

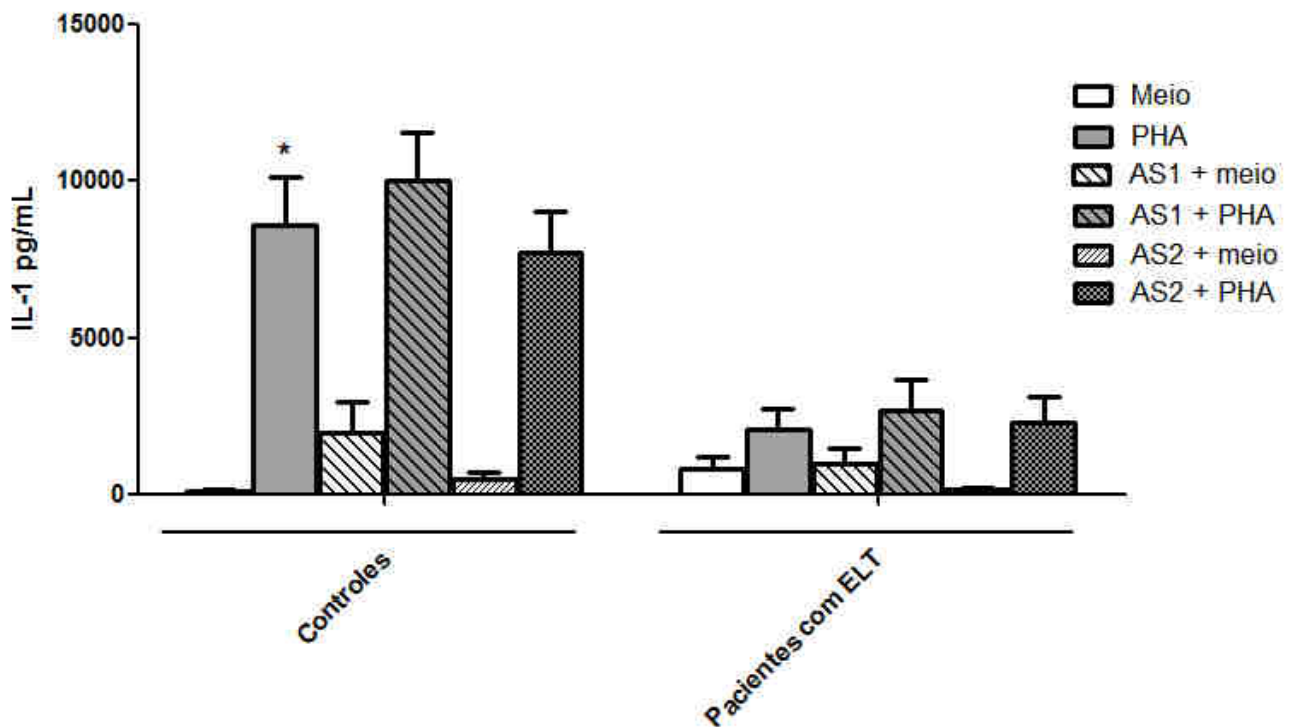


Figura 19: Avaliação do efeito de um inibidor seletivo de PI3K γ (AS605240) sobre a produção de IL-1 β em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com LY294002 (0,1 ou 1 μ M, - 1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. * $p < 0,05$ em relação ao grupo meio de cultura de CMSP de controles.

4.5.2 Avaliação do efeito do inibidor de mTOR sobre a produção de IL-1 β por CMSP de pacientes com ELT e controles

A exposição de células não estimuladas a rapamicina não alterou a produção de IL-1 β por CMSP de indivíduos controles e pacientes com ELT ($P > 0,05$). Porém, rapamicina (0,5 ou 2,5 nM) aumentou a produção de IL-1 β em CMSP não estimuladas de controles em relação a incubação com o meio de cultura ($P > 0,05$); Fig. 20).

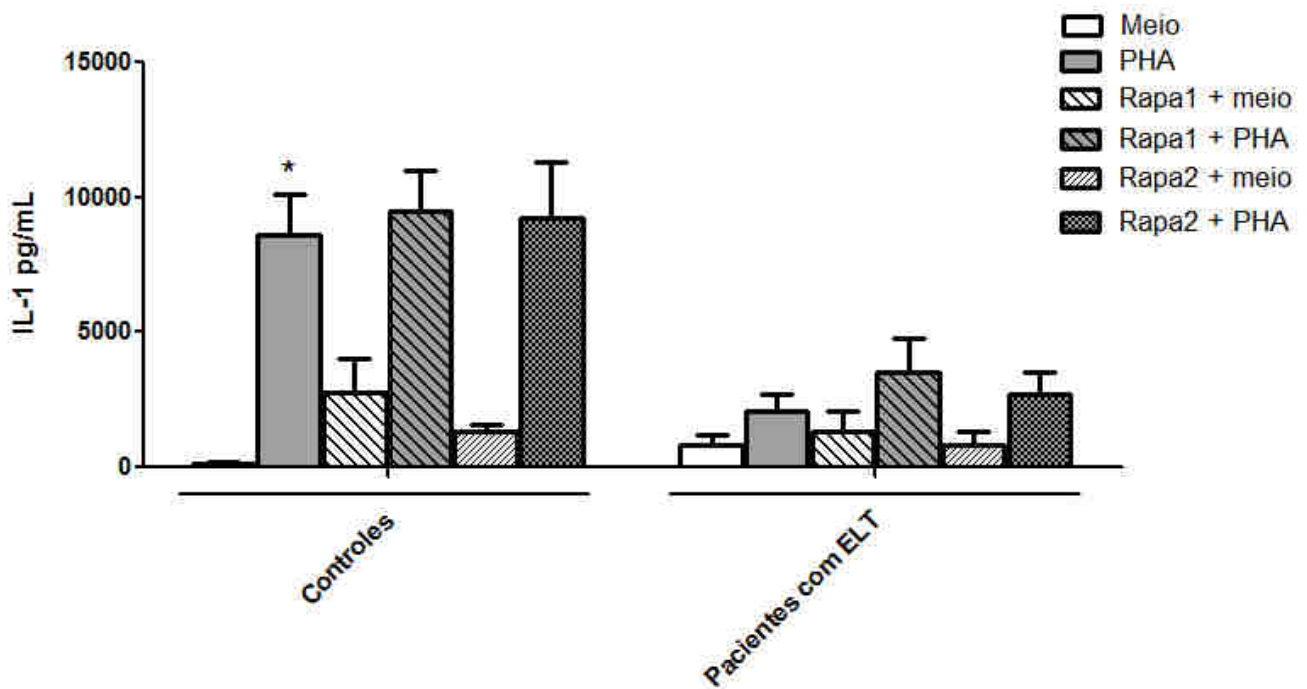


Figura 20: Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de IL-1 β em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com rapamicina (0,5 ou 2,5 nM, -1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. * $p < 0,05$ em relação ao grupo meio de controle em CMSP de controles.

4.5.3 Avaliação do efeito do inibidor de GSK3 β sobre a produção de IL-1 β por CMSP de pacientes com ELT e controles

A exposição de células não estimuladas a CHIR99021 não alterou a produção de IL-1 β ($P > 0,05$). Porém, CHIR99021 (1 μ M) diminuiu a produção de IL-1 β em CMSP de controles estimuladas com PHA em relação a incubação com PHA ($P < 0,05$; Fig.21).

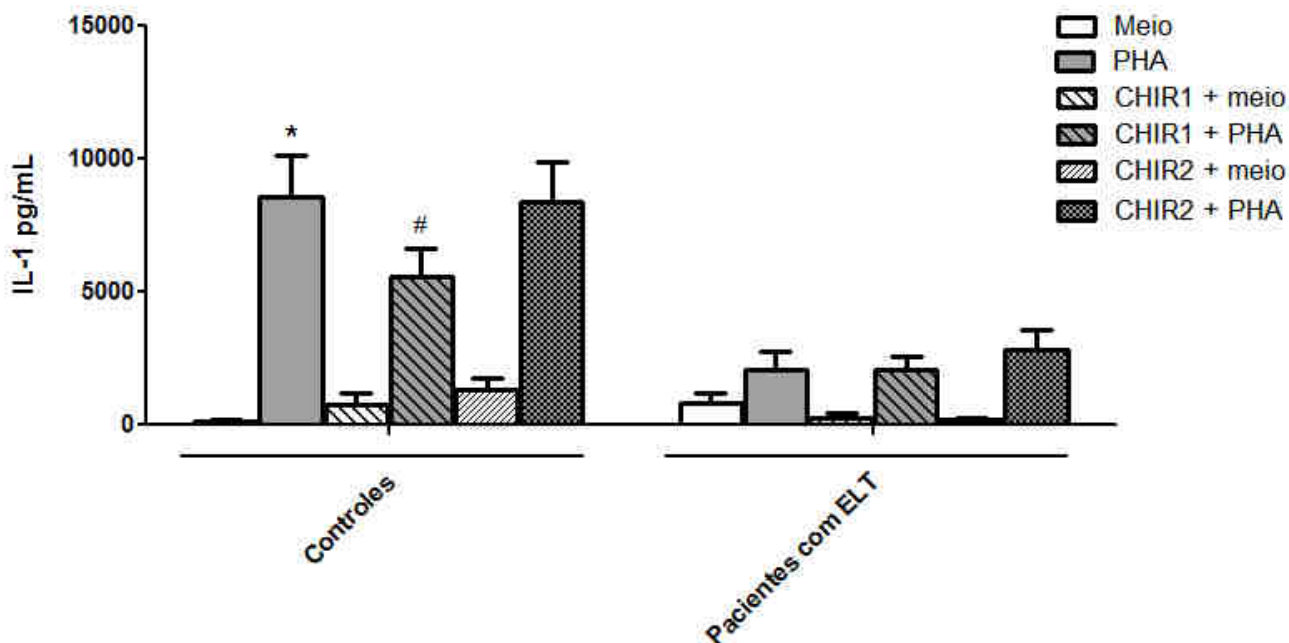


Figura 21: Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 β (CHIR99021) sobre a produção de IL-1 β em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com rapamicina (1 ou 3 μ M -1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. * $p < 0,05$ em relação ao grupo meio de controle de CMSP de controles. # $p < 0,05$ em relação ao grupo PHA + veículo de CMSP de controles.

4.6 Quantificação de IL-8

4.6.1 Avaliação do efeito dos inibidores de PI3K sobre a produção de IL-8 por CMSP de pacientes com ELT e controles

Observa-se que os níveis basais de IL-8 no sobrenadante das culturas de células de pacientes com ELT e controles não diferem estatisticamente ($P \geq 0,05$; Fig. 22). Porém, a estimulação com PHA aumenta os níveis de IL-8 apenas na CMSP de indivíduos controles ($P < 0,001$; Fig. 22).

A exposição de células não estimuladas ao LY294002 (1 ou 10 μ M) aumentou a produção de IL-8 em CMSP de controles em relação a incubação com o meio de cultura ($P < 0,001$). LY294002 não alterou a produção de IL-8 em CMSP estimuladas com PHA ($P > 0,05$; Fig. 22).

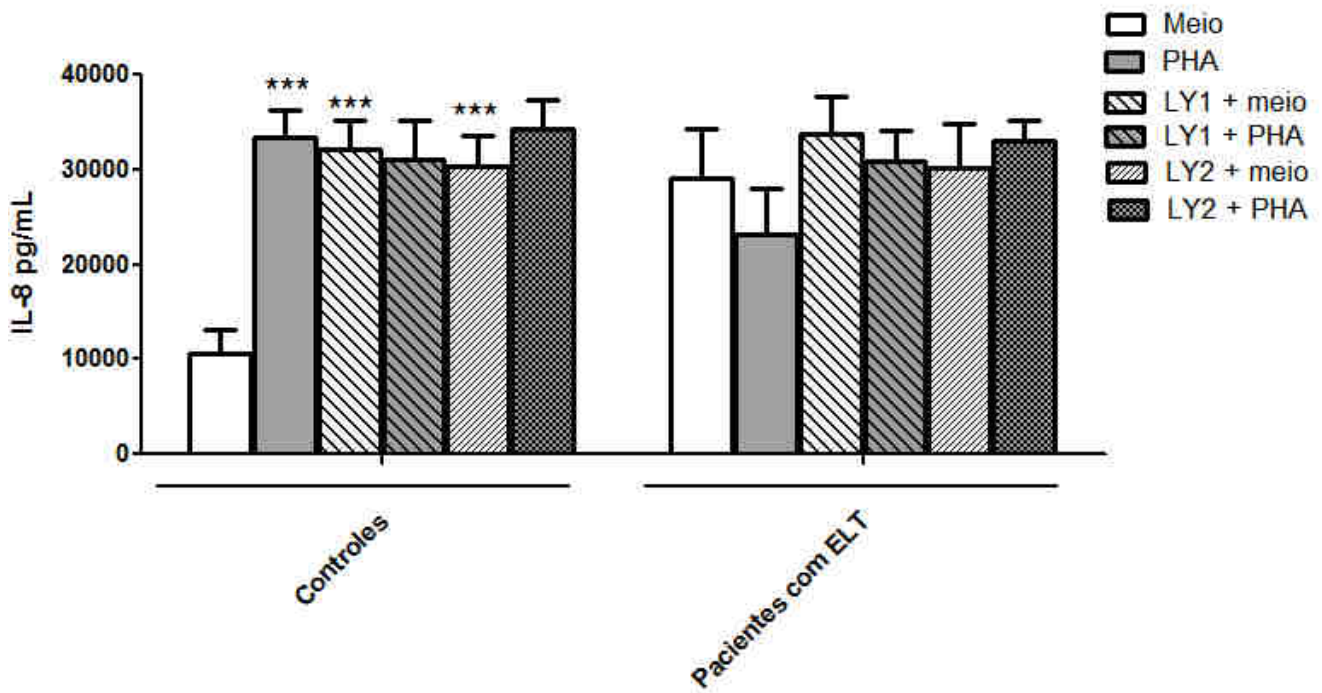


Figura 22: Avaliação do efeito de um inibidor de PI3K (LY294002) sobre a produção de IL-8 em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com LY294002 (1 ou 10 μ M, -1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo meio de cultura de CMSP de controles.

De modo semelhante ao inibidor não seletivo, o AS605240 aumentou significativamente os níveis de IL-8 em CMSP de indivíduos controles não tratadas com estímulo inflamatório ($P < 0,001$ para a concentração 0,1 μ M e $P < 0,05$ para a concentração 3 μ M; Fig. 23). AS605240 não alterou a produção de IL-8 em CMSP estimuladas com PHA ($P > 0,05$; Fig. 23).

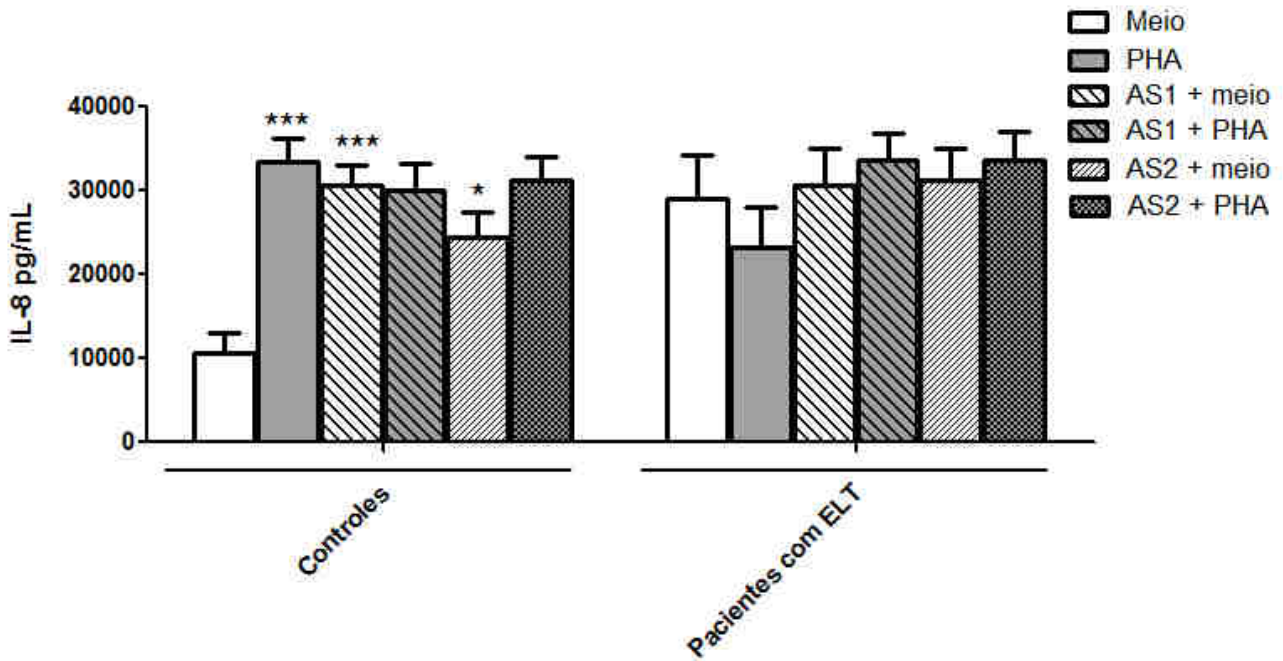


Figura 23: Avaliação do efeito de um inibidor seletivo de PI3K γ (AS605240) sobre a produção de IL-8 em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com LY294002 (0,1 ou 1 μ M, - 1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. * $p < 0,05$ em relação ao grupo meio de cultura de CMSP de controles.

4.6.2 Avaliação do efeito do inibidor de mTOR sobre a produção de IL-8 por CMSP de pacientes com ELT e controles

A exposição de células não estimuladas a rapamicina (0,5 ou 2,5 nM) aumentou a produção de IL-8 por CMSP de indivíduos controles em relação a incubação com o meio de cultura ($P < 0,001$). Rapamicina não alterou a produção de IL-8 em CMSP não estimuladas ($P > 0,05$); Fig. 24).

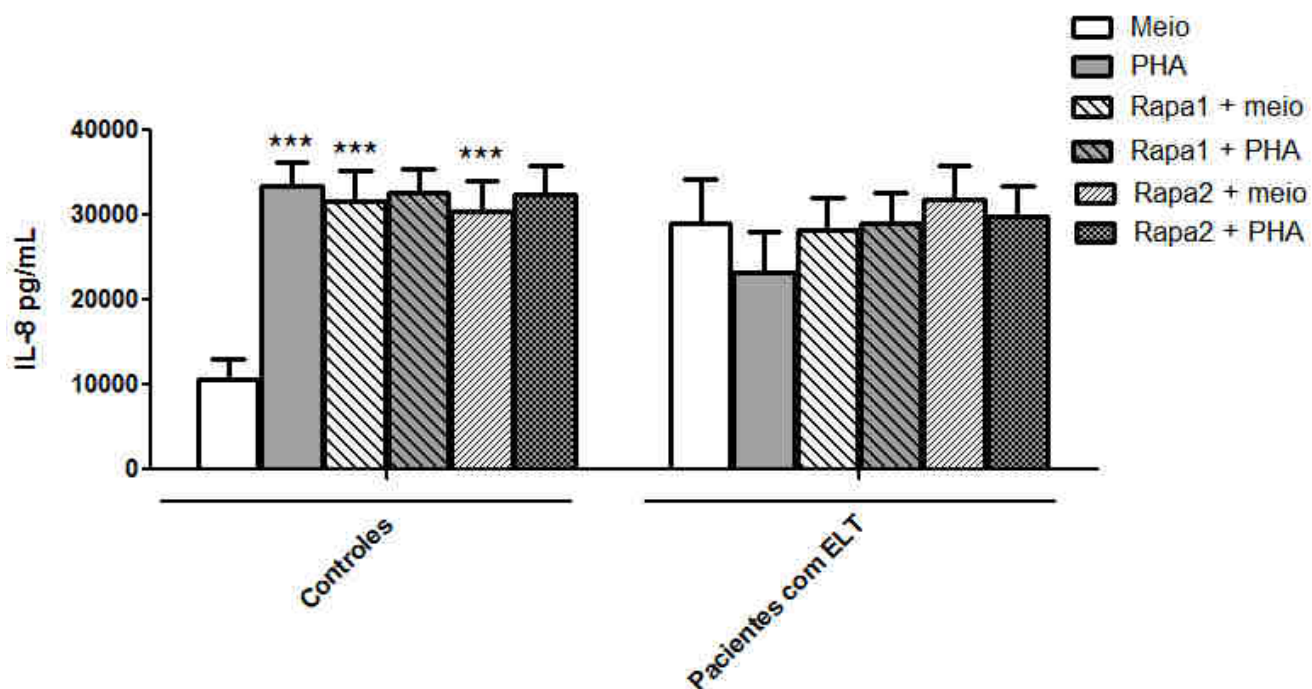


Figura 24: Avaliação do efeito de um inibidor de mTOR (rapamicina) sobre a produção de IL-8 em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com rapamicina (0,5 ou 2,5 nM, -1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo meio de cultura de CMSP de controles.

4.6.3 Avaliação do efeito do inibidor de GSK3 β sobre a produção de IL-8 por CMSP de pacientes com ELT e controles

A exposição de células não estimuladas a CHIR99021 aumentou a produção de IL-8 em CMSP de indivíduos controles em relação a incubação com o meio de cultura ($P > 0,01$ para a concentração 1 μM e $P < 0,001$ para a concentração 3 μM). CHIR99021 não alterou a produção de IL-8 em CMSP estimuladas com PHA ($P > 0,05$; Fig.25).

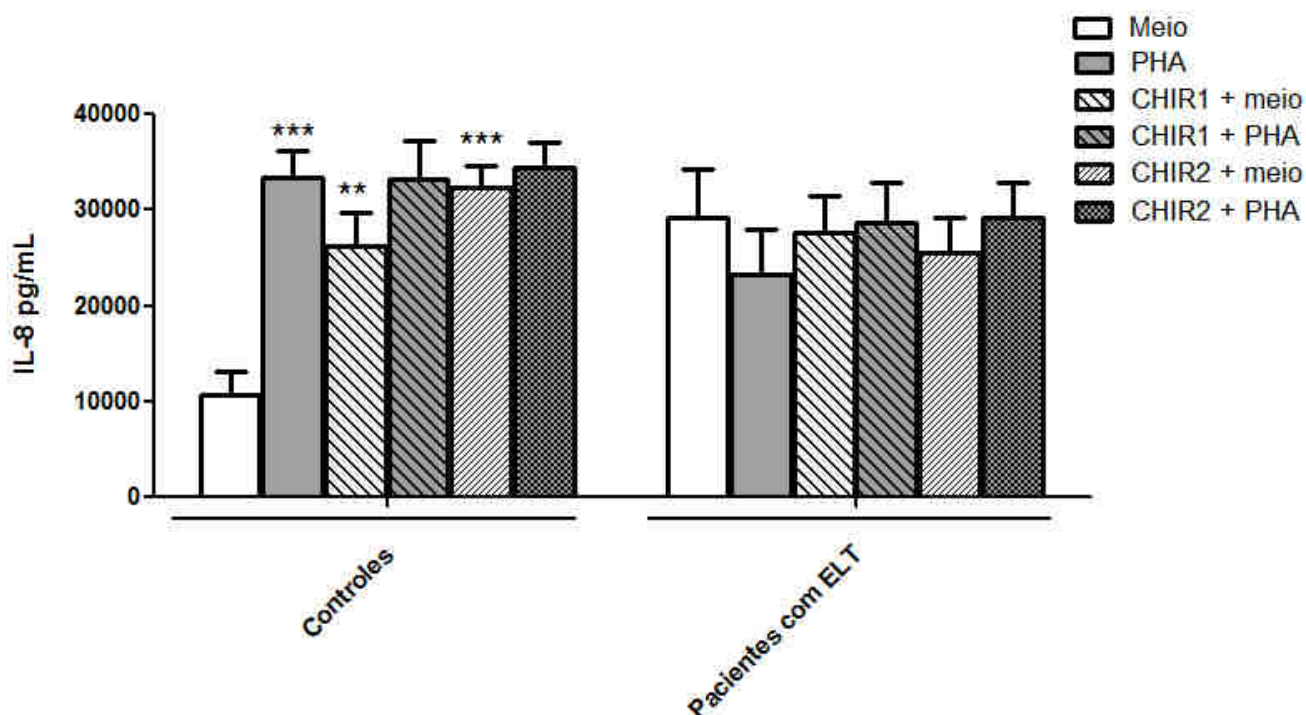


Figura 25: Avaliação do efeito de um inibidor de GSK3 β (CHIR99021) sobre a produção de IL-8 em cultura de CMSP. Células de pacientes com ELT ou controles foram incubadas com rapamicina (1 ou 3 μ M -1h) e estimuladas ou não com PHA (1%) por 24 h. *** p <0,05 em relação ao grupo meio de cultura de CMSP de controles.

4.7 Quantificação sérica das citocinas

Foi realizada a quantificação das citocinas sem a incubação das células em cultura e na ausência da inibição farmacológica, tanto em células de pacientes com ELT quanto de controles para a avaliação da produção basal das citocinas.

Observou-se um aumento nos níveis da citocina IL-10 tanto em controles quanto em pacientes, sendo que os pacientes com ELT apresentaram níveis mais elevados dessa citocina (p <0,01, Fig. 26).

Observaram-se também níveis elevados de IL-6, IL-1 e IL-8 em pacientes com ELT em relação a indivíduos controles (p <0,001, Fig. 26). A análise das demais citocinas não revelou diferença em relação a pacientes e controles, sendo que as citocinas não foram detectadas ou foram detectadas em níveis muito baixos.

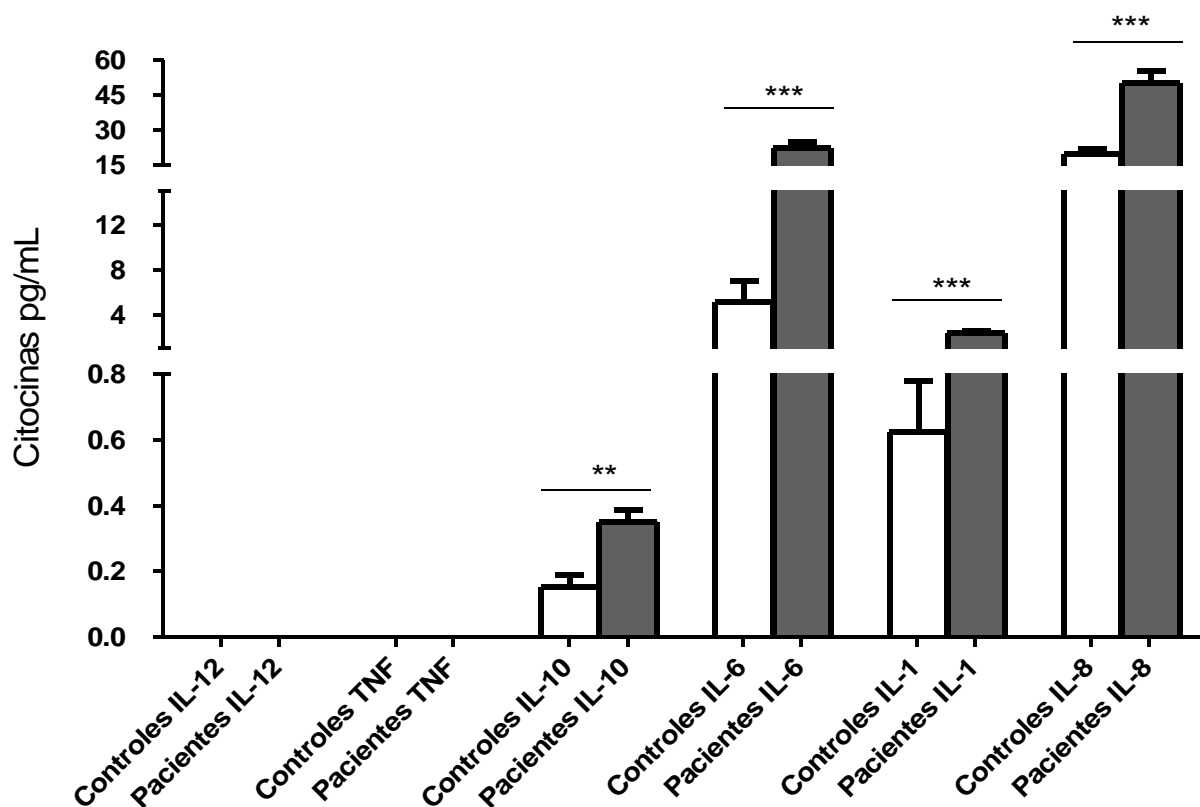


Figura 26: Quantificação das citocinas IL-12p70, TNF, IL-10, IL-6, IL-1 e IL-8 no soro de indivíduos controles e pacientes com ELT. ** p<0,01, ***p<0,001 em relação ao grupo controle.

A tabela 2 sintetiza os resultados encontrados em CMSP de pacientes com ELT, comparando as células estimuladas com PHA e não estimuladas.

Tabela 2: Comparação dos resultados das diferentes condições de cultura com as drogas estimulada com PHA em relação a mesma condição sem PHA nos indivíduos com ELT.

CONDIÇÕES DE CULTURA	IL-12p70	TNF	IL-10	IL-6	IL-1β	IL-8
CT MEIO X PT MEIO	=	↑↑	↑↑	↑↑↑	↑	↑
CT PHA X PT PHA	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑	↓	↓
LY[1]+PHA X LY[1] MEIO	↑	↑	=	=	=	=
LY[2]+PHA X LY[2] MEIO	↑↑↑	↑↑	↑	↑	↑↑	=
AS[1]+PHA X AS[1] MEIO	↑↑↑	↑↑	↑↑	=	↑	=
AS[2]+PHA X AS[2] MEIO	↑↑	↑↑	↑↑	↑	↑↑	=
RAPA[1]+PHA X RAPA[1] MEIO	↑↑↑	↑↑	=	↑	↑↑↑	=
RAPA[2]+PHA X RAPA[2] MEIO	↑↑↑	↑↑	=	↑	↑↑↑	=
CHIR[1]+PHA X CHIR[1] MEIO	↑	↑↑↑	↑↑↑	↑	↑↑↑	=
CHIR[2]+PHA X CHIR[2] MEIO	↑↑	↑↑↑	↑↑↑	↑	↑↑↑	=

= SEM ALTERAÇÃO
 ↑ = AUMENTO (LEVE)
 ↑↑ = AUMENTO (MODERADO)
 ↑↑↑ = AUMENTO (INTENSO)
 ↓ = REDUÇÃO (LEVE)
 ↓↓ = REDUÇÃO (MODERADA)
 ↓↓↓ = REDUÇÃO (INTENSA)

A tabela 3 sintetiza os resultados encontrados em CMSP de pacientes com ELT, comparando as células estimuladas com PHA, na presença ou ausência das drogas.

Tabela 3. Comparação dos resultados das diferentes condições de cultura com as drogas em relação a cultura estimulada apenas com PHA nos indivíduos com ELT.

CONDIÇÕES DE CULTURA	IL-12p70	TNF	IL-10	IL-6	IL-1 β	IL-8
LY[1]+PHA X PHA	↓	↓↓↓	↓↓↓	=	=	=
LY[2]+PHA X PHA	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	=	=	=
AS[1]+PHA X PHA	↑	↓↓↓	↓↓↓	=	=	=
AS[2]+PHA X PHA	↓	↓↓↓	↓↓↓	=	=	=
RAPA[1]+PHA X PHA	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	=	=	=
RAPA[2]+PHA X PHA	↑↑↑	↓↓↓	↓↓↓	=	=	=
CHIR[1]+PHA X PHA	↓↓↓	↓↓↓	=	=	=	=
CHIR[2]+PHA X PHA	↓↓	↓↓↓	=	=	=	=

= SEM ALTERAÇÃO

↑ = AUMENTO (LEVE)

↑↑ = AUMENTO (MODERADO)

↑↑↑ = AUMENTO (INTENSO)

↓ = REDUÇÃO (LEVE)

↓↓ = REDUÇÃO (MODERADA)

↓↓↓ = REDUÇÃO (INTENSA)

5. DISCUSSÃO

Uma crise convulsiva pode desencadear uma reação aguda do tecido neuronal relacionada à imunidade inata, incluindo a liberação de interleucinas, prostaglandinas, quimiocinas e ativação de vias de sinalização intracelular. A imunidade adaptativa está relacionada a reações mais seletivas através de células microgлияis e linfócitos T e B (LIIMATAINEN *et al.*, 2013). A ativação da imunidade inata e adaptativa na epilepsia humana pode contribuir para a geração e manutenção das crises convulsivas, além de contribuir para a ocorrência de dano neuronal (CHOI *et al.*, 2009).

Citocinas pró-inflamatórias têm sido encontradas aumentadas na epilepsia, o que pode demonstrar uma relação entre essas citocinas e a patogênese dessa desordem neurológica (DUBÉ *et al.*, 2009). O presente trabalho encontrou níveis alterados de citocinas em pacientes com ELT em relação a indivíduos controles e resposta diferencial a inibição farmacológica.

5.1 IL-12p70, IL-10 e suas Relações com a Epilepsia do Lobo Temporal

IL-12 é um importante mediador da imunidade mediada por células e pode levar a um aumento da resposta imune contra infecções, além de promover o desenvolvimento de células Th1 e suprimir a resposta de células Th2 (LANGRISH *et al.*, 2004).

Choi e colaboradores (2009) relataram acentuada ativação de micrógлия e astrócitos e morte celular difusa no tecido de pacientes com epilepsia. Também foi encontrado um aumento significativo de citocinas no córtex, tais como IL-8 e IL-12p70.

No presente estudo, demonstramos que PHA aumenta os níveis de IL-12p70 somente em células de pacientes com ELT.

Na neuroinflamação, células como micrógлия e astrócitos agem como fonte principal de mediadores inflamatórios na região envolvida com a resposta inflamatória, podendo ocorrer o recrutamento de células imunes periféricas. O evento precipitante pode ser uma crise epilética, que de forma recorrente pode culminar em inflamação crônica (VEZZANI *et al.*, 2011). Dessa forma, possivelmente os pacientes com ELT já possuem uma inflamação prévia, facilitando a produção da citocina por células do sistema imune periférico quando estimuladas por PHA, o que não ocorre em indivíduos saudáveis.

De forma interessante, a inibição de PI3K e mTOR exacerba o efeito de PHA somente nas células dos pacientes. A inibição seletiva da isoforma da PI3K não alterou os níveis de IL-

12p70. Desta forma, pode-se sugerir que este aumento na produção da citocina possa ser controlado por outras isoformas de PI3K. Além disso, é possível que o efeito induzido por LY294002 seja dependente da inibição de mTOR, tendo em vista que esta droga também pode inibir diretamente esta enzima (GHARBI *et al.*, 2007).

Esses resultados estão em conformidade com o estudo de Song e colaboradores (2012) que observaram um aumento nos níveis de IL-12p70 em culturas de células de medula óssea de camundongos estimuladas com LPS e tratadas com inibidores de PI3K. Houve um aumento nos níveis da citocina de três a quatro vezes em comparação as culturas incubadas com LPS. Saegusa e colaboradores (2007) também encontraram níveis aumentados de IL-12p70 em culturas de macrófagos de camundongos tratadas com inibidores de PI3K e estimuladas. Esse aumento, no entanto, não foi observado quando as células foram tratadas com as drogas, mas não foram estimuladas.

Camundongos deficientes para a enzima PI3K mostraram uma resposta imune associada a Th2 deficitária e resposta Th1 fortemente elevada, o que demonstra que a atividade de PI3K pode exercer um efeito indireto ou direto na resposta imune mediada por células influenciando a síntese de IL-12p70 (FUKAO & KOYASU, 2003; FUKAO *et al.*, 2002; POLUMURI *et al.*, 2007).

Ao contrário da inibição de PI3K e mTOR, a inibição de GSK3 β diminui a produção dessa citocina na menor concentração, em células de pacientes estimuladas com PHA. Martin e colaboradores (2005) correlacionaram a fosforilação de GSK3 β ao perfil de citocinas produzidas e sugeriram que GSK3 seria a chave para a regulação diferencial de IL-12 e IL-10. Polumuri e colaboradores (2007) observaram que a fosforilação de GSK3 β não foi inibida pela KY12420 e LY294002, ambos inibidores de PI3K, indicando que a PI3K não é a única responsável pela regulação de GSK3.

Virta e colaboradores (2002) relataram que não houve diferença nos níveis de IL-10 plasmático entre pacientes e indivíduos controles. No presente estudo não houve detecção de IL-10 e IL-12p70 no plasma dos pacientes ou indivíduos controles. Em cultura de células de medula óssea de camundongos estimuladas com LPS e tratadas com os inibidores da PI3K, KY12420 e LY294002, foi observado uma redução de mais de 70% nos níveis de IL-10 em comparação as culturas tratadas com LPS (SONG *et al.*, 2012). Esse resultado está de conformidade com o observado no presente estudo. Demonstramos que PHA aumenta significativamente os níveis de IL-10 apenas em células de pacientes com ELT (P<0,01), porém a inibição de PI3K e mTOR diminui fortemente os níveis da citocina nas células dos pacientes (P<0,001). Em culturas de células de macrófagos de camundongos também foi observada uma diminuição nos níveis de IL-10 após estimulação e incubação com inibidores

de PI3K. A diminuição nos níveis da citocina foi observada inclusive em culturas de macrófagos tratadas com KY12420 e LY294002 na ausência de estímulo (SAEGUSA *et al.*, 2007).

Foi demonstrado em alguns trabalhos que a ativação da via PI3K induzida regula diferencialmente a produção de IL-12 e IL-10 em macrófagos humanos e de ratos (MARTIN *et al.*, 2003; GUHA & MACKMAN, 2002). Tem sido descrito que IL-10 inibe IL-12 (CHANG *et al.*, 2010), em células dendríticas IL-10^{-/-} a estimulação com LPS induziu altos níveis de IL-12, corroborando a inibição de IL-12 por IL-10 (YEN *et al.*, 2015).

5.2 TNF e sua Relação com a Epilepsia do Lobo Temporal

No SNC, TNF- α modula vias de sinalização celular através da ativação dos seus dois receptores p55 e p75. O primeiro está envolvido na ativação da morte celular programada e o segundo receptor está associado com a ativação do fator nuclear Kappa B (NF- κ B) (MUKAI *et al.*, 2009; SHENG *et al.*, 2005). Diferentes estudos demonstraram que não houve diferença significativa nos níveis de TNF- α no plasma ou FCE de pacientes 24 horas após a ocorrência de crises parciais ou tônico-clônicas generalizadas (PELTOLA *et al.*, 2000; BAUER *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2011). Esses resultados são similares aos encontrados no presente estudo, onde não foram encontradas diferenças nos níveis de TNF no plasma de pacientes com ELT que não apresentavam crises epiléticas por no mínimo três dias. Provavelmente os efeitos pró e anti-convulsivos de TNF- α ocorrem devido à ativação de seus diferentes receptores no cérebro. Foi relatado que a atividade anticonvulsivante de TNF- α em camundongos é mediada pelo receptor neuronal p75. Este estudo também demonstrou que camundongos *Knockout* para o receptor p75 apresentaram mais crises enquanto os camundongos *Knockout* para o receptor p55 apresentaram suscetibilidade a crises reduzida (BALOSSO *et al.*, 2005 ; LI *et al.*, 2011).

Um estudo com CMSP de pacientes com epilepsia refratária mensurou várias citocinas e encontrou baixos níveis de TNF- α em culturas de monócitos não estimuladas após 24 horas de cultura. Entretanto, após a estimulação com LPS, houve uma produção acentuada dessa citocina, além de IL-6 e IL-1 β . Essa produção acentuada ocorreu antes e depois de 3 semanas e 6 meses da estimulação do nervo vago dos pacientes (HERDT *et al.*, 2009).

No presente estudo observou-se uma maior produção de TNF pelas células de pacientes em todas as condições experimentais. Não houve detecção dessa citocina na CMSP dos indivíduos controles em nenhuma condição experimental. Quando estimuladas as células dos pacientes apresentaram uma produção acentuada de TNF. Esse resultado demonstra

que a produção de TNF difere entre pacientes com ELT e indivíduos saudáveis, que não produziram essa citocina frente a um estímulo inflamatório.

A inibição de todas as isoformas de PI3K ou a inibição seletiva de PI3K α , assim como a inibição de mTOR e GSK3 β resultou em uma diminuição nos níveis de TNF em células de pacientes estimuladas com PHA. Esse resultado indica que a inibição dessas enzimas poderia ser benéfica para os pacientes com ELT, uma vez que diminui significativamente os níveis dessa citocina pró-inflamatória, o que poderia reduzir a inflamação na epilepsia. Resultados semelhantes foram encontrados por Russo e colaboradores (2014) em um modelo murino de epilepsia. A administração intraventricular de rapamicina 60 minutos após a administração de LPS reduziu os níveis de TNF- α a níveis basais, no córtex, hipocampo e tálamo. O tratamento com Rapamicina administrada via intraperitoneal induziu uma diminuição de TNF- α no plasma e no cérebro de ratos (LU *et al.*, 2015).

Vários estudos mostraram que as drogas antiepiléticas alteram os níveis de citocinas em experimentos *in vivo* e *in vitro*. Foram observados níveis elevados de IL-1 β , IL-6 e TNF- α em pacientes com epilepsia que faziam o uso de Carbamazepina, Valproato e Fenitoína (ANDRZEJCZAK, 2011; BASTA-KAIM *et al.*, 2008; HIMMERICH *et al.*, 2013). Entretanto, *in vitro*, a Carbamazepina e o Valproato inibiram a produção de IL-6 e TNF- α (YANG *et al.*, 1992). Em outro estudo a produção de IL-1 β foi significativamente reduzida pela Carbamazepina, Lamotrigina e Oxicarbazepina, mas não pelo Valproato. A produção de TNF- α diminuiu significativamente com o tratamento pela Carbamazepina e Valproato (HIMMERICH *et al.*, 2013).

5.3 IL-6 e sua Relação com a Epilepsia do Lobo Temporal

IL-6 é uma citocina multifuncional que regula reações imunes e respostas inflamatórias (KISHIMOTO *et al.*, 1995). Em pacientes com TLE refratária foi relatado através de um estudo com eletroencefalograma um aumento rápido nos níveis plasmáticos pós-ictais da citocina IL-6 (ALAPIRTTI *et al.*, 2009; KHURANA *et al.*, 2014). No presente estudo foi encontrado um resultado semelhante, os níveis de IL-6 se mostraram significativamente maiores no plasma dos pacientes em relação aos controles. Diferentes estudos têm mostrado um aumento nos níveis de IL-6 no plasma e no FCE de pacientes 24 horas após apresentarem crises tônico-clônicas e crises febris (PELTOLA *et al.*, 2000, 2002; VIRTA *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2011). Após 6 horas da ocorrência da crise em pacientes com ELT também houve um aumento significativo de IL-6 plasmático (ALAPIRTTI *et al.*, 2009). Outro

estudo demonstrou que os níveis dessa citocina *in vitro*, após a estimulação de CMSP estavam aumentados em pacientes em relação aos indivíduos controles (PACIFICI *et al.*, 1995; HULKKONEN *et al.*, 2004).

O presente estudo mensurou os níveis de IL-6 nas culturas de células incubadas com a presença ou ausência das drogas LY294002, AS605240, rapamicina e CHIR99021. Observou-se que a inibição de PI3K e mTOR aumenta a produção de IL-6 na ausência do estímulo inflamatório, porém na presença do estímulo essa inibição não altera os níveis da citocina. Esses resultados indicam que a inibição dessas enzimas em condições fisiológicas poderia induzir a produção de IL-6, o que poderia induzir algum distúrbio inflamatório. No entanto, em condições inflamatórias, a inibição das enzimas não alteraria os níveis de IL-6, o que indica que existem outras vias reguladoras da expressão e síntese dessa citocina.

O efeito de concentrações patofisiológicas de IL-6 foi estudado sobre a expressão de receptores para glutamato em culturas de neurônios hipocâmpais de rato. A exposição dessas células à IL-6 reduziu a expressão de receptores metabotrópicos mGLU 2 e 3 (VEREYKEN *et al.*, 2007). A ativação de STATs, especialmente STAT3 tem se mostrado importante nas epilepsias. STATs são mediadores induzidos pela maioria das interleucinas e interferons (LI *et al.*, 2008). Wang e colaboradores (2015) avaliaram biomarcadores para epilepsias do lobo temporal, epilepsia extra-temporal e epilepsia generalizada idiopática e foi sugerido que IL-6 pode ser utilizado como um importante biomarcador para identificar epilepsia severa.

Em um estudo realizado em culturas organotípicas de hipocampo de ratos, observou-se através de registros eletrográficos que a atividade ictal estava presente em 85% das culturas tratadas com rapamicina, LY294002 e controles. Nesse mesmo trabalho foi demonstrado que houve uma diminuição no número de eventos ictais por hora de 62% para as culturas tratadas com rapamicina e de 45% nas culturas tratadas com LY294002, em relação às culturas controles (BERDICHEVSKY *et al.*, 2013).

A cultura com CHIR99021 resultou em uma menor produção de IL-6 pelas células de pacientes incubadas com a droga na concentração 1 μ M, porém não houve diferença estatística em comparação a incubação com PHA. Esses resultados sugerem que a inibição de GSK3 β não é capaz de diminuir a produção de IL-6 por CMSP em pacientes com ELT.

De forma geral, os estudos relatam que as crises epiléticas estão associadas à ativação de uma cascata de citocinas. Diferentes trabalhos demonstram que IL-6 está envolvida na patofisiologia da epilepsia do lobo temporal, relatando um aumento nos níveis plasmáticos de IL-6 (ULUDAG *et al.*, 2013, 2015).

5.4 IL-1 β e sua Relação com a Epilepsia do Lobo Temporal

Mao e colaboradores (2013) mensuraram os níveis séricos de IL-1 β em pacientes com epilepsia e compararam com indivíduos controles e observaram que os níveis séricos interictais de IL-1 β de pacientes eram mais elevados. A liberação de citocinas ocorre durante as crises epiléticas e está relacionada a gravidade das crises, perdurando por aproximadamente 24 horas após o insulto (OZKARA *et al.*, 2006; BAUER *et al.*, 2009; ULUDAG *et al.*, 2015). IL-1 β também está relacionada com a excitotoxicidade, stress oxidativo e modulação do sistema neuroendócrino (LI *et al.*, 2011).

O presente estudo avaliou os níveis de IL-1 β no plasma de pacientes com ELT que não apresentavam crises epiléticas por no mínimo três dias e indivíduos controles, não foi observado diferença estatística nos níveis dessa citocina para esses dois grupos, resultado que está de conformidade com a literatura. Similarmente Alapirtti e colaboradores (2009) e Bauer e colaboradores (2009) demonstraram que os níveis de L-1 β pós-ictal plasmático de pacientes com epilepsia após crises parciais complexas ou tônico-clônicas generalizadas não diferiram significativamente dos níveis basais. Por outro lado, Nowak e colaboradores (2009) encontraram níveis elevados de L-1 β no plasma de pacientes com epilepsia focal devido a tumores cerebrais (LI *et al.*, 2011).

Ao contrário do observado no plasma, expressão elevada de IL-1 β e seu receptor em neurônios, astrócitos e micróglia foram observados em amostras de cérebro de pacientes com TLE, com esclerose hipocampal, tratados cirurgicamente (RAVIZZA *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2011).

Observou-se que não houve diferença entre pacientes e controles nos poços que continham apenas o meio de cultura, por outro lado, quando incubadas com o estímulo inflamatório a CMSP de indivíduos controles apresentou altos níveis de IL-1 β . Diferentemente dos controles a CMSP não respondeu da mesma forma ao estímulo com PHA, apresentando baixa expressão da citocina. Esse resultado demonstra que há uma diferença na produção dessa citocina entre pacientes e indivíduos saudáveis frente a um estímulo inflamatório.

A inibição de todas as isoformas de PI3K ou a inibição seletiva de PI3K γ , assim como a inibição de mTOR aumentou os níveis de IL-1 β em células de controles não estimuladas, apesar de não ter sido encontrada diferença estatística. Por outro lado, os inibidores não alteraram os níveis das células estimuladas com PHA. O bloqueio de GSK3 pela droga CHIR99021 resultou no mesmo padrão de resposta das drogas anteriores, com exceção da CMSP estimulada com PHA e com a droga na concentração 1 μ M. Em um estudo realizado

com modelo de epilepsia em ratos, foram mensurados os níveis de IL-1 β no córtex, hipocampo e tálamo em três períodos após a administração intraventricular de rapamicina, LPS ou LPS e rapamicina (0, 60 e 120 minutos). Não foram encontradas diferenças nos níveis basais da citocina ou após a infusão de veículo, entretanto após 60 minutos da infusão de LPS houve um pico de IL-1 β no tálamo que retornou aos níveis basais após 120 minutos. No córtex e no hipocampo os níveis dessa citocina estavam elevados após 60 minutos e continuaram elevados até 120 minutos após a infusão do estímulo inflamatório. A administração de rapamicina não influenciou os níveis de IL-1 β nas três regiões do cérebro avaliadas, porém a administração de rapamicina 60 minutos após a administração de LPS alterou o padrão de resposta. A droga reduziu a concentração da citocina aos níveis basais nas três regiões do cérebro, porém houve um aumento nos níveis de IL-1 β 90 minutos após a infusão de rapamicina no córtex (RUSSO *et al.*, 2014).

Por fim, as células dos pacientes com ELT também não são responsivas à inibição de PI3K, mTOR e GSK3 β , embora a ausência de resposta às inibições farmacológicas possa ter ocorrido devido ao período de 24 horas de incubação das culturas. Um estímulo por um período maior poderia ter resultado em diferenças nas respostas às inibições da via PI3K/Akt/GSK3/mTOR.

Xiao e colaboradores (2015) sugerem que IL-1 β produzido por astrócitos induz a ativação da via PI3K/Akt/mTOR em neurônios e que a ativação dessa via desempenha um papel importante na epilepsia do lobo temporal.

5.5 IL-8 e sua Relação com a Epilepsia do Lobo Temporal

Pacientes com epilepsia refratária apresentaram aumento significativo nos níveis séricos de IL-8 após crises epiléticas, incluindo crises de ausência e tônico-clônicas generalizadas (BILLIAU *et al.*, 2007). Herdt e colaboradores (2009) também observaram níveis elevados de IL-8 e IL-10 após o tratamento dos pacientes através da estimulação do nervo vago, em CMSP estimuladas com LPS. Resultados semelhantes foram encontrados por Pollard e colaboradores (2013) no plasma de pacientes com epilepsia que apresentaram níveis elevados de IL-8. No presente estudo demonstramos que os níveis de IL-8 estavam elevados no plasma de pacientes com ELT. Demonstramos também que a inibição de PI3K, mTOR e GSK3 β aumentou os níveis de IL-8 somente nas células de controles que não foram estimuladas, mas não foi capaz de alterar os níveis da citocina nas células estimuladas e nas células de pacientes com ELT.

Ao estudar as vias que regulam a expressão de IL-8, Bancroft e colaboradores (2002) observaram que IL-1 α expressa por pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço promovia a ativação de NF κ B e IL-8 e a expressão do antagonista do receptor de IL-1 α acarretou na inibição da atividade de IL-8 em 60-80%, indicando que IL-1 α é um importante regulador de IL-8. Esses pacientes expressavam altos níveis dessa citocina. Ao contrário do observado no presente estudo inibidores de PI3K inibiram IL-8 parcialmente em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço (CHEN *et al.*, 2001). O inibidor de PI3K, LY294002, também inibiu parcialmente a produção de IL-8. No mesmo estudo, os autores demonstraram que o antagonista de tirosina quinase EGFR, PD153035, inibiu a coativação *downstream* de PI3K e da via de sinalização MEK, como foi observado através da inibição da fosforilação da Akt e dos substratos de MEK, ERK1/2. Dessa forma, a via MEK se mostrou como um importante regulador da ativação de AP-1, expressão de VEGF e coexpressão de IL-8, enquanto a via PI3K preferencialmente contribui para a ativação de Nf κ B e expressão de IL-8 (BANCROFT *et al.*, 2002).

O desenvolvimento e progressão da epilepsia está relacionado a vários fatores, incluindo inflamação persistente, dano da barreira hematoencefálica e disparos neuronais não controlados (YANG *et al.*, 2010), sendo que a liberação de citocinas é essencial para o processo inflamatório ocorrer. Os níveis de citocinas no SNC de pacientes está correlacionado com a ocorrência e duração das crises (LEHTIMAKI *et al.*, 2010). O efeito das citocinas pró-inflamatórias é frequentemente relatado como sendo convulsivante, embora a aplicação de citocinas exógenas no cérebro usualmente não desencadeie crises epiléticas por si só, mas facilite a geração das crises (BALOSSO *et al.*, 2008; VEZZANI *et al.*, 2000; GALIC *et al.*, 2012).

No presente estudo demonstramos que a produção de citocinas por células imune de pacientes com ELT é controlada de maneira diferenciada das células de controles saudáveis. Essa regulação diferencial pode ser dependente da atividade de diferentes moléculas intracelulares, tais como a via PI3K, mTOR e GSK-3. A investigação das vias envolvidas na produção de mediadores inflamatórios poderá contribuir para a elucidação do envolvimento da inflamação na patogênese das epilepsias, uma vez que existem poucos dados na literatura relacionando a via estudada com a produção de citocinas envolvidas no processo inflamatório em pacientes com ELT.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARLI, J.A. Epilepsy and the immune system. **Arch. Neurol.** v.57, p.1689–1692, 2000.
- AFRA, P.; BERGEY, J.G.K. Duration of complex partial seizures: an intracranial EEG study. **Epilepsia**, v.49, p. 677–684, 2008.
- AGUZZI, A.; BARRES, B.A.; BENNET, M.L. Microglia:scapegoat, saboteur or somethingelse? *Science*, v.339, p.156–161, 2013.
- ALAPIRTTI, T.; RINTA, S.; HULKKONEN, J. Interleukin-6, interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1beta production in patients with focal epilepsy: A video-EEG study. **J Neurol Sci.** v.280, p.94-97, 2009.
- ANDRZEJCZAK, D. Epilepsy and pro-inflammatory cytokines. Immunomodulating properties of antiepileptic drugs. **Neurologia i Neurochirurgia.** v.45, p.275-85, 2011.
- ARONICA, E.; CRINO, Y.B. Inflammation in epilepsy: Clinical observations.**Epilepsia.** v.52(Suppl. 3), p.26–32, 2011.
- BALOSSO, S.; RAVIZZA, T.; PEREGO, C.; PESCHON, J.; CAMPBELL, I.L.; DE SIMONI, M.G. Tumor necrosis factor-alpha inhibits seizures in mice via p75 receptors. **Ann Neurol.** v.57, p.804-12, 2005.
- BANCROFT, C.C.; CHEN, Z.; YEH, J.; SUNWOO, J.B.; YEH, N.T.; JACKSON, S.; JACKSON, C.; WAES, C.V. Effects of pharmacologic antagonists of epidermal growth factor receptor, pi3k and mek signal kinases on nf- b and ap-1 activation and il-8 and vegf expression in human head and neck squamous cell carcinoma lines. **J. Cancer.** v.99, p.538-548, 2002.
- BANKS, W.A.; Erickson, M.A. The blood–brain barrier and immune function and dysfunction. **Neurobiol. Dis.** v.37, p.26–32, 2010.
- BASTA-KAIM, A.; BUDZISZEWSKA, B.; LASON, W. Effects of antiepileptic drugs on immune system. **Przegląd Lekarski.** v.65, p.799-802, 2008.
- BAUER, S.; CEPOK, S.; TODOROVA-RUDOLPH, A.; NOWAK, M.; KOLLER, M.; LORENZ, R. Etiology and site of temporal lobe epilepsy influence postictal cytokine release. **Epilepsy Res.** v.86(1), p.82-8, 2009.
- BEAULIEU, J.M.; FRELAND, J. Inhibition of GSK3 by lithium, from single molecules to signaling networks. **Frontiers in Molecular Neuroscience.** Vol. 5, 2012.
- BEAULIEU, J.M.; GAINETDINOV, R.R.; CARON, M.G. Akt/GSK3 signaling in the action of psychotropic drugs. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology.** v.49, p.327-47, 2009.
- BEDNER, P.; DUPPER, A.; HUTTMANN, K.; MULLER, J.; HERDE, M., DUBLIN, P.; DESHPANDE, T.; SCHRAMM, J.; HAUSSLER, U.; HAAS, C.; HENNEBERGER,

- C.;THEIS, M.; STEINHA, C. Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. **Brain**, v.138; p.1208–12, 2015.
- BEGHI, E.; SHORVON, S. Antiepileptic drugs and the immune system. **Neuroimmunol.** v.233, p.112–119, 2011.
- BENJAMIN, D.; COLOMBI, M.; MORONI, C.; HALL, M.N. Rapamycin passes the torch: a new generation of mtor inhibitors. **Nat. Rev. Drug Discov.** v.10(11), p.868-880, 2011.
- BERDICHEVSKY, Y.; DRYER, A.M.; SAPONJIAN, Y.; MAHONEY, M.M.; PIMENTEL, C.A.; LUCINI, C.A.; USENOVIC, M.; STALEY, K.J. PI3K-Akt Signaling Activates mTOR-Mediated. Epileptogenesis in Organotypic Hippocampal Culture Model of Post-Traumatic Epilepsy. **The Journal of Neuroscience.** v.22, p.9056 -9067, 2013.
- BERTRAM, E.H. Temporal lobe epilepsy: Where do the seizures really begin? **Epilepsy & Behavior**, v.14, p.32–37, 2009.
- BIALER, M. Chemical properties of antiepileptic drugs (AEDs). **Advanced Drug Delivery Reviews.** v.64, p.887–895, 2012.
- BILLIAU, A.D.; WITTERS, P.; CEULEMANS, B.; KASRAN, A.; WOUTERS, C.; LAGAE, L. Intravenous immunoglobulins in refractory childhood-onset epilepsy: effects on seizure frequency, EEG activity, and cerebrospinal fluid cytokine profile. **Epilepsia.** v.48, p.1739-49, 2007.
- Bozzi, Y. & Borrelli, E. The role of dopamine signaling in epileptogenesis. **Front. Cell. Neurosci.** v.7, p.157, 2013.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, CDC. Morbidity and Mortality Weekly Report. v.62, 2013.
- CHANG, J.; VOORHEES, T. J.; LIU, Y.; ZHAO, Y.; CHANG, C.H. Interleukin-23 production in dendritic cells is negatively regulated by protein phosphatase 2A. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.107, p.8340-8345, 2010.
- CHAN, E.M.; ANDRADE, D.M.; FRANCESCHETTI, S; MINASSIAN, B.; Progressive myoclonus epilepsies: EPM1, EPM2A, EPM2B. **Adv. Neurol.** v.95, p.47-57, 2005.
- CHENG, Z.; WHITE, M.F. Targeting Forkhead box O1 from the concept to metabolic diseases: lessons from mouse models. **Antioxid. Redox Signal.** v.4(4), p.649-661, 2011.
- CHOI, J.H.; KIM, J.I.; LEE, H.R.; SIM, S.E.; BAEK, J.; YU, N.K; KO, H.G.; LEE, Y.S.; PARK, S.W.; KWAK, C.; AHN, S.J.; CHOI, S.Y.; KIM, H.; KIM, K.H.; BACKX, P.H.; BRADLEY, C.A.; KIM, E.; JANG, D.J.; LEE, K.; KIM, S.J.; ZHUO, M.; COLLINGRIDGE, G.L.; KAANG, B.K. PI3K γ is required for NMDA receptor-dependent long-term depression and behavioral flexibility. **Nat Neurosci.** v.14, p.447-1454, 2011.
- CHOI, J.;NORDLI, D.R.JR.; ALDEN, T.D. Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy. **J. Neuroinflammation.** v.6, 2009.
- CHOI, K.C.; KIM, S.H.; HA, J.Y.; KIM, S.T.; SON, J.H. A novel mTOR activating protein protects dopamine neurons against oxidative stress by repressing autophagy related cell death. **J.Neurochem.** v.112(2), p.366-376, 2010.

- CHONG, Z.Z.; LI, F.; MAIESE, K. Activating Akt and the brain's resources to drive cellular survival and prevent inflammatory injury. **Histol. Histopathol.** v.20(1), p.299-315, 2005.
- CHONG, Z.Z.; SHANG, Y.C.; WANG, S.; MAIESE, K.; A critical kinase cascade in neurological disorders: PI3K, Akt and mTOR. **Future Neurology.** p.733, 2012.
- CHONG, Z.Z.; SHANG, Y.C.; ZHANG, L.; WANG, S.; MAIESE, K. Mammalian target of rapamycin: hitting the bull's-eye for neurological disorders. **Oxid. Med. Cell Longev.** v.3(6), p.374-391, 2010.
- DAS, A.; WALLACE, G.C.; HOLMES, C.; MCDOWELL, M.L.; SMITH, J.A.; MARSHALL, H.J.D.; BONILHA, L.; EDWARDS, J.C.; GLAZIER, S.S.; RAY, S.K.; BANIK, N.L. Hippocampal tissue of patients with refractory Temporal lobe epilepsy is associated with astrocyte activation, inflammation, and altered expression of channels and receptors. **Neuroscience.** v.220, p.237–246, 2012.
- DE LANEROLLE, N.C.; LEE, T.S. New facets of the neuropathology and molecular profile of human temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Behav.** v.7, p.190–203, 2005.
- DE OLIVEIRA, A.C., CANDELARIO-JALIL, E., BHATIA, H.S., LIEB, K., HULL, M., FIEBICH, B.L. Regulation of prostaglandin E2 synthase expression in activated primary rat microglia: evidence for uncoupled regulation of mPGES-1 and COX-2. **Glia.** v.56, p.844–855, 2008.
- DE OLIVEIRA, A.C., CANDELARIO-JALIL, E., LANGBEIN, J., WENDEBURG, L., BHATIA, H.S., SCHLACHETZKI, J.C., BIBER, K., FIEBICH, B.L. Pharmacological inhibition of Akt and downstream pathways modulates the expression of COX-2 and mPGES-1 in activated microglia. **J. Neuroinflammation.** 2012.
- Di Maio, R. Neuronal mechanisms of epileptogenesis. **Front. Cell. Neurosci.** v. 8, p.29, 2014.
- DORMOND, O.; MADSEN, J.C.; BRISCOE, D.M. The effects of mTOR-Akt interactions on anti-apoptotic signaling in vascular endothelial cells. **J. Biol. Chem.** v.282(32), p.23679-23686, 2007.
- DUBÉ, C.M.; BREWSTER, A.L.; BARAM, T.Z. Febrile seizures: mechanisms and relationship to epilepsy. **Brain & Development.** v.31, p.366, 2009.
- ENGEL, J. Introduction to temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research.** v.26, p.141-150, 1996.
- ESPINOSA, E.; BERMUDEZ-RATTONI, F. Behaviour—immunity relationship: the role of cytokines. **Rev Invest Clin.** v.53, p.240—253, 2001.
- FABENE, P.F.; MORA, G.N.; MARTINELLO, M.; ROSSI, B.; MERIGO, F.; OTTOBONI, L.; BACH, S.; ANGIARI, S.; BENATI, D.; CHAKIR, A.; ZANETTI, L.; SCHIO, F.; OSCULATI, A.; MARZOLA, P.; NICOLATO, N.; HOMEISTER, J.W.; XIA, L.; LOWE, J.B.; MCEVER, R.P.; OSCULATI, F.; BUTCHER, E.C.; CONSTANTIN, G. A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. **Nat Med.** v.14(12), p.1377–1383, 2008.
- FUKAO, T.; Koyasu, S. PI3K and negative regulation of TLR signaling. **Trends Immunol.**

v.24, p.358-363, 2003.

FUKAO, T.; TANABE, M.Y.; TERAUCHI, T.; MATSUDA, S.; ASANO, T.; KADOWAKI, T.; TAKEUCHI, T.; KOYASU, S. PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs. **Nat. Immunol.** v.3, p.875-881, 2002.

GALIC, M.A.; RIAZI, K.; QUENTIN, PITTMAN, J. Cytokines and brain excitability. *Frontiers in Neuroendocrinology*. v.33, p.116-125, 2012.

GANG, L.I.; BAUER, S.; NOWAK, M.; NORWOOD, B.; TACKENBERG, B.; ROSENOW, F.; KNAKE, S.; OERTEL, W. H.; HAMER, H.M. Cytokines and epilepsy. *Seizure*. v.20, p.249-256, 2011

GHARBI, S.I.; ZVELEBIL, M.J.; SHUTTLEWORTH, S.J.; HANCO, T.; SAGHIR, N.; TIMMS, J.F.; WATERFIELD, M.D. Exploring the specificity of the PI3K family inhibitor LY294002. **Biochem. J.** v.404, p.15-21, 2007.

GLASS, C.K.; SAIJO, K.; WINNER, B.; MARCHETTO, M.C.; CAGE, F.H. Mechanisms Underlying Inflammation in Neurodegeneration. **Cell**. v.140, p.918–934, 2010.

GOLDBERG, E.M.; COULTER, D.A. Mechanisms of Epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. **Nat Rev Neurosci.** v 5, p.337–349, 2013.

GUHA, M.; MACKMAN, N. The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells. **J. Biol. Chem.** v.277,p.32124-32132, 2002.

GUERREIRO, C.A.M.; GUERREIRO, M.M.; CENDES, F.; LOPES-CENDES, I. Considerações Gerais. In: **Epilepsia**. 3ª Edição. São Paulo. Lemos Editorial, p. 1-10, 2000.

HASHIBA, N.; SHIN-ICH, A.; HIROYUKI, I.; YOSHIFUMI, S.; AKIO, A.; MAKOTO, M. Phenytoin at optimum doses ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis via modulation of immunoregulatory cells. **Journal of Neuroimmunology**. v.233, p.112-119, 2011.

HERDT, V.; BOGAER, S.; BRACKE, K.R.; RAEDT, R.; DE VOS, M.; VONCK, K.; BOON, P.L. Effects of vagus nerve stimulation on pro- and anti-inflammatory cytokine induction in patients with refractory epilepsy. **Journal of Neuroimmunology**. v.214, p.104-108, 2009.

HIMMERICH, H.; BARTSCH, S.; HAMER, H.; MERGL, R.; SCHÖNHERR, J.; PETERSEIN, C.; MUNZER, A.; KIRKBY, K.C.; BAUER, K.; SACK, U. Impact of mood stabilizers and antiepileptic drugs on cytokine production in-vitro. **Journal of Psychiatric Research**. v.47, p.1751-1759, 2013.

HOLMES, G.L.; STAFSTROM, C.E. Tuberos sclerosis complex and epilepsy: recent developments and future challenges. *Epilepsia*. v.48(4), p.617-630, 2007.

HUANG, X.; ZHANG, H.; YANG, J. Pharmacological inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway suppresses acquired epilepsy. **Neurobiol. Dis.** v.40(1), p.193-199, 2010.

HULKKONEN, J.; KOSKIKALLIO, E.; RAINESALO, S.; KERÄNEN, T.; HURMEA, M.; PELTOLA, J. The balance of inhibitory and excitatory cytokines is differently regulated in vivo and in vitro among therapy resistant epilepsy patients. **Epilepsy Research**. v.59, p.199-205, 2004.

ICHIYAMA, T; OKADA, K.; LIPTON, J.M.; MATSUBARA, T.; HAYASHI, T.; FURUKAWA, S. Sodium valproate inhibits production of TNF-alpha and IL-6 and activation of NF-kappaB. **Brain Res**. v.857, p.246–251, 2000.

JUHÁSZ, C.; NAGY, F.; WATSON, C. Glucose and flumazenil positron emission tomography abnormalities of thalamic nuclei in temporal lobe epilepsy. **Neurology**. v.53, p.2037–45, 1999.

KOSSOFF, E.H; HARTMAN, A.L. Ketogenic diets: new advances for metabolism-based therapies. **Curr. Opin. Neurol**. v.25, p.173–178, 2012.

KAIDANOVICH-BEILIN, O.; WOODGETT, J.R. GSK-3: Functional insights from cell biology and animal models. **Front Mol Neurosci**. v.4, p.40, 2011.

KHURANA, M.D. Immunologic and Inflammatory Mechanisms. **Pediatr Neurol**. v.21, p.207-213, 2014.

KIM, J.I.; LEE, H.R.; SIM, S.E.; BAEK, J.; YU, N.K.; CHOI, J.H.; KO, H.G.; LEE, Y.S.; PARK, S.W.; KWAK, C.; AHN, S.J.; CHOI, S.Y.; KIM, H.; KIM, K.H.; BACKX, P.H.; BRADLEY, C.A.; KIM, E.; JANG, D.J.; LEE, K.; KIM, S.J.; ZHUO, M.; COLLINGRIDGE, G.L.; KAANG, B.K. PI3Kgamma is required for NMDA receptor-dependent long-term depression and behavioral flexibility. **Nat Neurosci**. v.14, p.1447-1454, 2011.

KING, M.K.; PARDO, M.; CHENG, Y.; DOWNEY, K.; JOPE, R. S.; BEUREL, E. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors: Rescuers of cognitive impairments. **Pharmacology & Therapeutics**. v.141, p.1-12, 2014.

KISHIMOTO, T.; AKIRA, S.; NARAZAKI, M.; TAGA, T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. **Blood**. v.86, p.1243-54, 1995.

KITAGISHI, Y.; KOBAYASHI, M.; KIKUTA, K.; MATSUDA, S. Roles of PI3K/AKT/GSK3/mTOR Pathway in Cell Signaling of Mental Illnesses. **Depression Research and Treatment**. 2012.

KUBERA, M., BUDZISZEWSKA, B., BASTA-KAIM, A., ZAJICOVA, A., HOLAN, V., LASON, W. Immunoreactivity in kainite model of epilepsy. **Pol J Pharmacol**. v.53, p.541-545, 2001.

KWON, C.H., ZHU, X., ZHANG, J., BAKER, S.J. mTor is required for hypertrophy of Pten-deficient neuronal soma in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci**, p.12923-12928, 2003.

LAINE, J.; KUNSTLE, G.; OBATA, T.; NOGUCHI, M. Differential regulation of Akt kinase isoforms by the members of the TCL1 oncogene family. **J Biol Chem**, v.277, p.3743-3751, 2002.

LANGRISH, C.L.; MCKENZIE, B.S.; WILSON, N.J.; DE WAAL, M.R.; KASTELEIN, R.A.; CUA, D.J. IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. **Immunol**

Rev. v.202, p.96-105, 2004.

LEHTIMAKI, K.A.; KERANEN, T.; HUHTALA,H.; HURME, M; OLLIKAINEN, J.; HONKANIEMI, J.; PALMIO, J.; PELTOLA, J. Regulation of IL-6 system in cerebrospinal fluid and serum compartments by seizures: the effect of seizure type and duration. **J Neuroimmunol.** v.152, p.121–125, 2004.

LEHTIMAKI, K.A.; KERANEN, T.; PALMIO, J.; PELTOLA, J. Levels of IL-1beta and IL-1ra in cerebrospinal fluid of human patients after single and prolonged seizures. **Neuroimmunomodulation.** v.17, p.19-22, 2010.

LEONARD, B.; MAES, M. Mechanistic explanations how cellmediated immune activation, inflammation and oxidative and nitrosative stress pathways and their sequels and concomitants play a role in the pathophysiology of unipolar depression. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews.** vol.36, p.764-785, 2012.

LI, W.; LEWIS-ANTES, A.; HUANG, J.; BALAN, M.; KOTENKO, S.V. Regulation of apoptosis by type III interferons. **Cell Prolif.** v.41(6), p.960-79, 2008.

LIMA, I.V.A.; CAMPOS A.C; MIRANDA, A.S, VIEIRA, E.L.M., AMARAL-MARTINS, F.; VAGO, J.P.; SANTOS, R.P.M.; SOUSA, L.P.S.; VIEIRA, L.B.; TEIXEIRA, M.M.; FIEBICH, B.L.; MORAES, M.F.D.; TEIXEIRA, A.L.; DE OLIVEIRA, A.P.C. PI3K γ deficiency enhances seizures severity and associated outcomes in a mouse model of convulsions induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. **Experimental Neurology.** v.267,p.123–134, 2015.

LIIMATAINEN, S.; LEHTIMAKI, K.; PALMIO, J. Immunological perspectives of temporal lobe seizures. **J Neuroimmunol.** v.263, p.1-7, 2013.

LOHI, H.; LANZANO, L.; ZHAO, X.; CHAAN, X.; TURNBULL, J.; SCHERER, S.W.; ACKERLEY, A.; MINASSIAN, B.A. **Hum. Mol. Genet.** 14 (18), p.2727-2736, 2005.

LU, Z.; LIU, F.; CHEN, L.; ZHANG, H.; DING, Y.; LIU, J. Effect of Chronic Administration of Low Dose Rapamycin on Development and Immunity in Young Rats. **PLoS ONE.** v.10(8), 2015.

MARCHI N, ANGELOV L, MASARYK T, FAZIO V, GRANATA T, HERNANDEZ N, HALLENE K, DIGLAW T, FRANIC L, NAJM I, JANIGRO D. Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. **Epilepsia.** v.48(4), p.732–742, 2007.

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

MAO, L.Y.; DING, J.; PENG, W.F.; MA, Y.; ZHANG, Y.H.; FAN, W. Interictal interleukin- 17A levels are elevated and correlate with seizure severity of epilepsy patients. **Epilepsia.** v.54(9), p.42–5, 2013.

MARTIN, M.K; REHANI, R.S.; MICHALEK, S.M. Toll-like receptor mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3. **Nat. Immunol.** v.6, p.777-784, 2005.

MARTIN, M.; SCHIFFERLE, R.E.; CUESTA, N.; VOGEL, S.N.; KATZ, J.; MICHALEK, S.M. Role of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway in the regulation of IL-10 and IL-12 by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. **J. Immunol.** v.171, p.717-725, 2003.

MUKAI, Y.; SHIBATA, H.; NAKAMURA, T.; YOSHIOKA, Y.; ABE, Y.; NOMURA, T. Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant. **J Mol Biol.** v.385, p.1221-9, 2009.

MUNCY, J.; BUTLER, I.J.; KOENIG, M.K. Rapamycin reduces seizure frequency in tuberous sclerosis complex. **J Child Neurol.** v.24, p.477, 2009.

NGUYEN, M.D.; JULIEN, J.P.; RIVEST, S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? **Nat. Rev. Neurosci.** v.3, p.216–227, 2002.

NOWAK, M.; BAUER, S.; CEPOK, S.; TODOROVA-RUDOLPH, A.; LI, G.; TACKENBERG, B. Interictal immunological changes in patients with refractory epilepsy. **Epilepsia.** v. 50(3), p.44, 2009.

ORCY, R.B; SCHROEDER, S; MARTINS-COSTA, S.H; RAMOS, J.G; SCHECHINGER, W. Signalization of Akt/PKB em the placenta, skeletal muscle and adipose tissue of preeclampsia patients. **Gynecol Obstet Invest,** v.66, p.231-236, 2008.

OZKARA, C.; UZAN, M.; TANRIVERDI, T.; BAYKARA, O.; EKINCI, B.; YENI, N. Lack of association between IL-1beta/alpha gene polymorphisms and temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Seizure.** v.15(5), p.288-91, 2006.

PACIFICI, R., PARIS, L., DI CARLO, S., BACOSI, A., PICHINI, S., ZUCCARO, P. Cytokine production in blood mononuclear cells from epileptic patients. **Epilepsia.** v.36, p.384-387, 1995.

PELTOLA, J.; LAAKSONEN, J.; HAAPALA, A.M.; HURME, M.; RAINESALO, S.; KERANEN, T. Indicators of inflammation after recent tonic-clonic epileptic seizures correlate with plasma interleukin-6 levels. **Seizure.** v.11, p.44-6, 2012.

PELTOLA, J.; PALMIO, J.; KORHONEN, L.; SUHONEN, J.; MIETTINEN, A.; HURME, M. Interleukin-6 and Interleukin-1 receptor antagonist in cerebrospinal fluid from patients with recent tonic-clonic seizures. **Epilepsy Res.** v.41, 205-11, 2000.

PERRY, V.H; NICOLL, J.A.; HOLMES, C. Microglia in neurodegenerative disease. **Nat Rev Neurol.** v.6(4), p.193–201, 2010.

PERNOT, F.; HEINRICH, C.; BARBIER, L.; PEINNEQUIN, Z.; CARPENTIER, P.; DHOTE, F.; BAILLE, V.; BEAUP, C.; DEPAULIS, X.; DORANDEU, F. Inflammatory changes during epileptogenesis and spontaneous seizures in a mouse model of mesiotemporal lobe epilepsy. **Epilepsia,** v.52, p. 2315–2325, 2011.

POLLARD, EIDELMAN, O.; MUELLER, G.P.; DALGARD, C.L.; CRINO, P.B.; ANDERSON, C.; BRAND, E.J.; BURAKGAZI, E.; IVATURI, S.K.; POLLARD, H.B. The TARC/sICAM5 ratio in patient plasma is a candidate biomarker for drug resistant epilepsy John R. **Frontiers in Neurology**. v.3, 2013.

POLUMURI S. K.; VOGEL, S.N.; VLADIMIR, Y. Toshchakov and *IL-12 and IL-10 by Fcγ Receptor Ligation in Transcriptional Regulation of TLR-Induced. Role of Phosphatidylinositol-3 Kinase in Murine Macrophages*. **J Immunol**. v.179, p.236-246, 2007.

RANSOHOFF, R.M.; KIVISAKK, P.; KIDD, G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. **Nat. Rev. Immunol**. v.3, p.569–581, 2003.

RAVIZZA, T.; GAGLIARDI, B.; NOE, F.; BOER, K.; ARONICA, E.; VEZZANI, A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. **Neurobiol Dis**. v.29, p.142–160, 2008.

RIIKONEN, R. Infantile spasms: therapy and outcome. **J. Child Neurol**. v.19, p.401–404 2004.

RUSSO, E.; ANDREOZZI, F.; LULIANO, R.; DATTILO, V.; PROCOPIO, T.; FIUME, G.; MIMMIC, S.; PERROTTI, N.; CITRARO, R.; SESTI, G.; CONSTANTINI, A.; DE SARRO, G.; Early molecular and behavioral response to lipopolysaccharide in the WAG/Rij rat model of absence epilepsy and depressive-like behavior, involves interplay between AMPK, AKT/mTOR pathways and neuroinflammatory cytokine release. **Brain, Behavior, and Immunity** v.42, p.157-168, 2014.

SAEGUSA, K.; YOTSUMOTO, S.; KATO, S.; ARAMAKI, Y. Phosphatidylinositol 3-kinase-mediated regulation of IL-10 and IL-12 production in macrophages stimulated with CpG oligodeoxynucleotide. **Molecular Immunology**. v.44 p.1323-1330, 2007.

SALCEDO-TELLO, P. GSK3 function in the brain during development, neuronal plasticity, and neurodegeneration. **International Journal of Alzheimer's Disease**. 2011.

SCHARFMAN, H. E.; SOLLAS, A.L.; GOODMAN, J.H. Electrophysiological Evidence of Monosynaptic Excitatory Transmission between Granule Cells after Seizure-induced Mossy Fiber Sprouting. **J Neurophysiol**. v 90, p.2536-2547, 2003.

SCHWARTZ, M.; KIPNIS, J. A conceptual revolution in the relationships between the brain and immunity. **Brain Behav Immun**. v.25(5), p.817, 2011.

SETHI, N.; LABAR, D.; TORGOVNICK, J.; SETHI, P.; ARSURA, E.; SOTO, E. Treatment of Epilepsy: A Review Of Antiepileptic Drugs. **The Internet Journal of Neurology**. v.9, 2007.

SHANG, Y.C.; CHONG, Z.Z.; WANG, S.; MAIESE, K. Prevention of beta-amyloid degeneration of microglia by erythropoietin depends on Wnt1, the PI3K/mTOR pathway, Bad, and Bcl-xL. *Aging*. v.4(3), p.187-201, 2012.

SHENG WS, HU S, NI HT, ROWEN TN, LOKENSGARD JR, PETERSON PK. TNF alpha induced chemokine production and apoptosis in human neural precursor cells. **J Leukoc Biol**. v.78, p.1233-41, 2005.

SINHA, S.; PATIL, S.A.; JAYALEKSHMY, V.; SATISHCHANDRA, P. Do cytokines have any role in epilepsy? **Epilepsy Research**. v.82, p.71–6, 2008.

SONG, C.; ZHANG, Q.; LIU, X.; SHAN, Y. IL-12 and IL-10 Production are Differentially Regulated by Phosphatidylinositol 3-Kinase in Mast Cells. **Scandinavian Journal of Immunology**. v.75, p.266-272, 2012.

SONNENBERG, F.G.; ARTIS, D. Innate lymphoid cells in the initiation, regulation and resolution of inflammation. **Nature Medicine**. v.21, 698-708, 2015.

TAKAHASHI, T.; HARA, K.; INOUE, H. Carboxyl-terminal region conserved among phosphoinositide-kinase-related kinases is indispensable for mTOR function in vivo and in vitro. **Genes Cells**. v.5(9), p.765-775, 2000.

TAKESHITA, Y.; RANSOHOFF, R.M. Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models. **Immunol Rev**. v.248(1), p.228–39, 2012.

TREMBLAY, M.E.; LOWERY, R.L.; MAJEWSKA, A.K. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. **PLoS Biol**. 2010.

ULUDAG, I.F.; BILGIN, S.; ZORLU, Y.; TUNA, G.; KIRKALI, G. Interleukin-6, interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist levels in epileptic seizures. **Seizure**. v.22(6), p.457-61, 2013.

ULUDAG, I.F.; DUKSAL, T.; TIFTIKCIOGLU, B.I.; ZORLU, Y.; OZKAYA, F.; KIRKALI, G. IL-1b, IL-6 and IL1Ra levels in temporal lobe epilepsy. **European Journal of Epilepsy**. v.26, p.22-25, 2015.

VEREYKEN, E.J.; BAJOVA, H.; CHOW, S.; DE GRAAN, P.N.; GRUOL, D.L. Chronic interleukin-6 alters the level of synaptic proteins in hippocampus in culture and in vivo. **J. Neurosci**. v.25, p.3605-3616, 2007.

VEZZANI, A.; FRENCH, J.; BARTFAI, T.; BARAM, T.Z. The role of inflammation in epilepsy. **Nat Rev Neuro**, v.7, p.31-40, 2011.

VEZZANI, A.; GRANATA, T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. **Epilepsia**. v.46, p.1724–1743, 2005.

VIEIRA, E.L.M.; DE OLIVEIRA, G.N.M.; LESSA, J.M.K.; GONÇALVES, A.P.; OLIVEIRA, A.C.P.; BAUER, M.E.; SANDER, J.W.; CENDES, F.; TEIXEIRA, A.L. Peripheral leukocyte profile in people with temporal lobe epilepsy reflects the associated proinflammatory state. **Brain Behav. Immun**. p. 1-8, 2015.

- VINCENT, A.; BIEN, C.G. Anti-NMDA-receptor encephalitis: a cause of psychiatric, seizure, and movement disorders in young adults. **Lancet Neurol.** v.7, p.1074–1075, 2008.
- VIRTA, M.; HURME, M.; HELMINEN, M. Increased plasma levels of pro- and antiinflammatory cytokines in patients with febrile seizures. **Epilepsia.** v.43, p.920-3, 2002.
- XIAO, Z.A.; PENG, J.B.; YANG L.A.; KONG H.A.; YINA, F. Interleukin-1 β plays a role in the pathogenesis of mesial temporal lobe epilepsy through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in hippocampal neurons. **Journal of Neuroimmunology.** v.282, p.10–117, 2015.
- YANG, T.; ZHOU, D.; STEFAN, H. Why mesial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis is progressive: Uncontrolled inflammation drives disease progression? **Journal of the Neurological Sciences.** v.296, p.1–6, 2010.
- YANG, K.D.; LIOU, W.Y.; LEE, C.S.; CHU, M.L.; SHAIQ, M.F. Effects of phenobarbital on leukocyte activation: membrane potential, actin polymerization, chemotaxis, respiratory burst, cytokine production, and lymphocyte proliferation. **Journal of Leukocyte Biology.** v.52, p.151-6, 1992.
- YEN, J.H.; KONG, W.; HOOPER, K.M.; EMIG, F.; RAHBARI, K.M.; KUO, P.C.; SCOFIELD, B.A.; GANEA, D. Differential effects of IFN- β on IL-12, IL-23, and IL-10 expression in TLR-stimulated dendritic cells. **Journal of Leukocyte Biology.** v.98, p.689-702, 2015.
- WALKER, L.; SILLS, G.J. Inflammation and Epilepsy: The Foundations for a New Therapeutic Approach in Epilepsy? **Epilepsy Currents,** v.12, p.8–12, 2012.
- WALTERIT, R.; WELZL, H.; DICHGANS, J.; LIPP, H.P.; SCHMIDT, W.J.; WELLER, M. Enhanced episodic-like memory and kindling epilepsy in a rat model of tuberous sclerosis. **J. Neurochem.** 96(2), p.407-413, 2006.
- WANG D.; DAWEN, G. Interictal cytokine levels were correlated to seizure severity of epileptic patients: a retrospective study on 1218 epileptic patients. **J Transl Med.** v.13, p.378, 2015.
- WANG, S.; CHENG, Q.; MALIK, S.; YANG, J. Interleukin-1 β inhibits gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A) receptor current in cultured hippocampal neurons. **J Pharmacol Exp Ther.** v.292, p. 497-504, 2000
- WHELESS, J.W.; CLARKE, D.F.; ARZIMANOGLU, A.; CARPENTER, D. Treatment of pediatric epilepsy: European expert opinion. **Epileptic Disord.** v.9, p.353–412, 2007.
- WILSON, E.H.; WENINGER, W.; HUNTER, C.A. Trafficking of immune cells in the central nervous system. **J Clin Invest.** v.5, p.1368–79, 2010.
- WIRRELL, E.; FARRELL, K.; WHITING, S. The epileptic encephalopathies of infancy and childhood. **Can.J. Neurol. Sci.** v.32, p.409–418, 2005.
- WOOD, P.L. Microglia: Roles of microglia in chronic neurodegenerative diseases. In: Neuroinflammation: Mechanisms and Management. **Humana Press,** p.3–27, 2003.
- ZENG, L.H.; RENSING, N.R., WONG, M. The mammalian target of rapamycin signaling pathway mediates epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy. **J. Neurosci.**

29(21), p.6964-6972, 2009.

ZENG, L.H.; XU, L.; GUTMANN, D.H.; WONG, M. Rapamycin prevents epilepsy in a mouse model of tuberous sclerosis complex. **Ann. Neurol.** 63(4), p.444-453, 2008.

ZHANG, B., AND WONG, M. Pentylentetrazole-induced seizures cause acute, but not chronic, mTOR pathway activation in rat. **Epilepsia.** v.53, p.506-511, 2012.

ANEXOS

Anexo A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Aspectos Inflamatórios e Clínicos em Pacientes Portadores de Epilepsia

Introdução: *Você está sendo convidado a participar desta pesquisa clínica. É muito importante que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos antes de aceitar participar da mesma. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios e riscos do estudo, e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre o resultado do estudo. Estas informações estão sendo dadas para esclarecer quaisquer dúvidas sobre a pesquisa proposta, antes de obter o seu consentimento. Se ainda assim persistirem dúvidas a respeito do estudo, pergunte ao pesquisador responsável.*

Objetivo: O objetivo deste estudo é avaliar os níveis de determinadas moléculas/substâncias no plasma (citocinas/quimiocinas) e nos leucócitos/glóbulos brancos do sangue de pacientes portadores de epilepsia e em indivíduos controles. Esse estudo buscará identificar variações na quantidade de expressão dessas moléculas entre os pacientes portadores de epilepsia e indivíduos controles, o que poderá contribuir para a sua diferenciação e para o maior entendimento das epilepsias.

Resumo: A epilepsia é uma das desordens neurológicas mais comuns. A epilepsia é uma síndrome neurológica caracterizada pela recorrência de crises convulsivas não provocadas. A epilepsia é uma doença bastante complexa e resultante da combinação de fatores genéticos, ambientais e infecciosos. Recentemente, discute-se a possível contribuição de mecanismos inflamatórios nas epilepsias.

Procedimentos: Este estudo irá consistir de uma avaliação clínica padronizada realizada por profissional capacitado. Este profissional aplicará alguns questionários e testes para investigar a presença de alterações cognitivas e do comportamento. Posteriormente, será realizada coleta de 20,0mL de sangue com material descartável apropriado. Esse sangue será encaminhado para o estudo laboratorial. A coleta de sangue venoso implica em risco mínimo de acidente de punção, caracterizado por extravasamento sanguíneo para o tecido abaixo da pele, provocando uma pequena “mancha roxa” no local. Para minimizar este risco, a coleta de sangue será realizada por profissional treinado, com capacidade técnica e experiência que estará atento e tomará todas as providências necessárias.

Critérios de inclusão: Serão incluídos pacientes de ambos os sexos com o diagnóstico estabelecido de epilepsia do lobo temporal ou epilepsia extratemporal e que pretendam participar do estudo. Para fins de comparação, também serão incluídos voluntários hígidos (ver **Grupo Controle**).

Grupo Controle: Este grupo constitui-se dos voluntários que não apresentam diagnóstico para epilepsias ou qualquer outra doença neurodegenerativa ou psiquiátrica. Os dados provenientes dos participantes desse grupo serão utilizados apenas para fim de comparação com os grupos de pacientes supracitados.

Benefícios: *Não haverá compensação financeira pela sua participação, nem remuneração financeira do pesquisador, cujo interesse é apenas científico. O participante não terá nenhum benefício direto além de estar contribuindo para o desenvolvimento científico e a melhor compreensão das epilepsias. A participação no estudo também não implicará em ônus financeiro (despesas) para você.*

Confidencialidade: *Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos confidencialmente até onde é permitido por lei e todas as informações estarão restritas à equipe responsável pelo projeto. No entanto, o pesquisador e, sob certas circunstâncias, o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG, poderão verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros médicos para o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG, além da divulgação dos dados desta para o meio científico desde que não haja quebra de confidencialidade.*

Desligamento: *A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico em andamento.*

Emergência / contato com a Comissão de Ética: *É garantido seu direito a respostas a eventuais dúvidas que surgirem durante o estudo. Assim, se você tiver qualquer dúvida ou apresentar qualquer problema médico, contate o Prof. Antônio Lúcio Teixeira pelo telefone 34098073 ou o Comitê de Ética em Pesquisa (COEP/UFMG) no telefone 3409-4592. O COEP/UFMG localiza-se na Av. Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2º. Andar, Campus Pampulha da UFMG, Belo Horizonte, CEP31270-901.*

Consentimento: *Li e entendi as informações precedentes. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim, indicando o meu consentimento para participar do estudo, até que eu decida o contrário.*

TERMO DE CONSENTIMENTO

Declaro que, após convenientemente esclarecido (a) pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, autorizo a coleta de 20,0mL de sangue para ser utilizado na pesquisa descrita acima.

Nome do voluntário participante: _____

Data: ____/____/____

Assinatura do voluntário participante: _____

Nome médico responsável: _____

Data: ____/____/____

Assinatura do médico responsável: _____