



Universidade Federal do Pará

Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento

Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS E NEURÔNIOS MADUROS EM RATOS
QUE SOFRERAM *STATUS EPILEPTICUS* INDUZIDO POR PILOCARPINA

Bruno Ponciano da Silva

Fevereiro/2023

Belém – PA



Universidade Federal do Pará

Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento

Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS E NEURÔNIOS MADUROS EM RATOS
QUE SOFRERAM *STATUS EPILEPTICUS* INDUZIDO POR PILOCARPINA

Bruno Ponciano da Silva

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Silene Maria Araújo de Lima

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Roney Kilpp Goulart

Fevereiro/2023

Belém – PA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

UFPA/Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento/Biblioteca

- S586a Silva, Bruno Ponciano da, 1988-
Análise da expressão de citocinas e neurônios maduros em ratos que sofreram *status epilepticus* induzido por pilocarpina / Bruno Ponciano da Silva. — 2023.
75 f.: il.
- Orientadora: Silene Maria Araújo de Lima
Coorientador: Paulo Roney Kilpp Goulart
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento, Programa de Pós- Graduação em Neurociência e Comportamento, Belém, 2023.
1. Medicina Experimental. 2. Epilepsia (ratos adultos). 3. Pilocarpina (droga). 4. Citocina. 5. Hipocampo. I. Título.

CDD - 23. ed. — 619

Catalogação na fonte: Maria Célia Santana da Silva – CRB2/780

Bruno Ponciano da Silva

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE CITOCINAS E NEURÔNIOS MADUROS EM RATOS
QUE SOFRERAM *STATUS EPILEPTICUS* INDUZIDO POR PILOCARPINA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Comportamento da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Candidato: Bruno Ponciano da Silva

Data da defesa: 24 de fevereiro de 2023

Resultado:

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Silene Maria Araújo de Lima – Orientadora
Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Paulo Roney Kilpp Goulart Co-orientador
Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Edna Cristina Santos Franco – Membro titular
Instituto Evandro Chagas

Profa. Dra. Aline Priscila Pansani – Membro titular
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Fernando Allan de Farias Rocha– Suplente
Universidade Federal do Pará

Fevereiro/2023

Belém – PA

Agradecimentos

Antes de mais nada, eu gostaria de agradecer a Deus por me conceder a oportunidade de estudar e por me proporcionar saúde, motivação, uma família amorosa que me deu o melhor que se pode ter, influências positivas e condições para estudar. Durante os momentos difíceis que enfrentei durante o mestrado, como a pandemia e a vontade de desistir, o Senhor esteve sempre ao meu lado, me encorajando a continuar, dizendo que o que fazemos hoje é apenas uma semente que precisa ser cuidada e que leva tempo para dar frutos, mas com paciência e determinação poderemos colhê-los.

Agradeço à minha mãe, Fátima Abdon, por sempre acreditar em mim e me apoiar, independentemente do custo, como por exemplo quando iniciei o curso de Sistema de Informação, mas mudei de curso e ela aceitou minha decisão e me apoiou incondicionalmente. Ao término deste mestrado, posso dizer que sou quem sou graças ao seu apoio constante. Agradeço também ao meu pai, Luiz Ponciano (in memoriam), que me deu o suporte necessário para me concentrar nos estudos. Obrigado também ao meu segundo pai, Iramar Soares, por me dar o apoio financeiro e cuidado de que precisava e acreditar em mim. Não consigo imaginar minha vida hoje sem o amor e apoio incondicional da minha família.

Agradeço também a minha esposa Bárbara Ponciano, que sempre esteve ao meu lado nos momentos bons e ruins. Eu não posso deixar de agradecer a ela por todo o apoio, amor e compaixão que você me ofereceu durante esse período. Você foi minha fonte constante de motivação e inspiração, sempre acreditando em mim mesmo quando eu duvidava de mim mesmo. Sua paciência é incansável e seu amor é incondicional. Eu nunca esquecerei o quanto você se esforçou para me dar todo o suporte de que eu. Você preparou minhas refeições, cuidou da nossa casa e ainda me incentivou a continuar meus estudos mesmo nas noites mais cansativas. Sem dúvida, esta conquista é tanto sua quanto minha.

Gostaria de agradecer a minha orientadora, Profa. Dra. Silene Lima, que é um espelho para mim na minha carreira profissional e interpessoal. Me defendendo em vários momentos durante o curso, acreditando em mim desde o primeiro contato que tivemos na entrevista. Tive a oportunidade de conhecer uma pessoa doce, experiente e com bagagem, que me tratou com dignidade desde o primeiro contato, tudo isso em um ambiente que uma boa quantidade de professores são o contrário disso. Ainda hoje, ela me incentiva e me dá forças para continuar. Se um dia chegar ao mesmo patamar que ela, com certeza tratarei meus alunos como ela me tratou, sendo doce, paciente e sempre incentivando a melhorar.

Gostaria de agradecer também a Profa. Dra. Edna Franco, que me acolheu como aluno e me ajudou em tudo no seu laboratório no Evandro Chagas. Quando iniciamos a parte laboratorial da pesquisa, estava sem saber por onde começar. Ela teve muita paciência em ensinar os protocolos, orientar e corrigir falhas sempre com cuidado e paciência.

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo Goulart, meu co-orientador, que me permitiu desempenhar a parte comportamental da pesquisa da melhor forma possível. Obrigado por suas reuniões esclarecedoras e por sua orientação na defesa dos pontos de vista do meu projeto. Sem sua ajuda, nossa dissertação não teria a mesma qualidade.

Também agradeço ao professor Dr. Wallace Gomes-Leal, que sempre esteve disposto a colaborar com a pesquisa, disponibilizando seu laboratório insumos, livros, esclarecendo dúvidas e disponibilizando seus alunos para ajudar.

Agradeço a Professora Dra. Elane Magno e ao professor Dr. Moisés Hamoy por disponibilizarem seu tempo para ajudar a entender o modelo experimental da nossa pesquisa. Sem a sua contribuição, não teríamos conseguido utilizar o modelo corretamente.

Gostaria de expressar minha gratidão aos meus colegas de laboratório, Jéssica Gama e Giuliana Modesto, por seu apoio constante e disposição em me ajudar na pesquisa. Agradeço também a Igor Tagore por nossas conversas enriquecedoras e compartilhamento de conhecimento ao longo dos anos.

Agradeço ao CNPq e a FAPESPA pelo auxílio parcial a essa pesquisa através da concessão de bolsa de estudos e verba para apresentação da nossa pesquisa em congressos. Obrigada a todos que, de alguma maneira, apoiaram, incentivaram e/ou viabilizaram a realização deste projeto.

“Porque eu bem sei os pensamentos que tenho a vosso respeito, diz o Senhor; pensamentos de paz, e não de mal, para vos dar o fim que esperais.”

Jeremias 29:11

Resumo

Este trabalho teve como objetivo examinar a ação de citocinas envolvidas no processo inflamatório e o padrão de perda neuronal em ratos adultos com epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) na região CA2 hipocampal, induzido através da utilização da droga pilocarpina. Foram utilizados 11 ratos adultos da raça Wistar, onde 6 deles receberam tratamento com Pilocarpina e foram sacrificados em 1 e 7 dia pós *status epilepticus* respectivamente, 5 deles receberam tratamento com solução salina. O modelo experimental de pilocarpina foi bem sucedido em reproduzir os efeitos prejudiciais da ELTM em ratos, causando *status epilepticus*, danos localizados nos subcampos hipocampais e morte neuronal, utilizando a escala de Racine (1972) para avaliação do comportamento das crises. O anticorpo anti-PCP4 permitiu a localização precisa e análise das características oculares da região CA2 hipocampal. Não foi encontrada uma relação clara entre a citocina anti-inflamatória IL-10 e a proteção neurológica da região CA2, mas a presença da citocina inflamatória IL-1 β em CA2 e CA3 no grupo de 1 dia, bem como a diminuição dessa citocina na região CA2 do grupo 7 dias, sugere uma possível migração da inflamação ao longo do tempo, impulsada por fatores neuroprotetores, tais como a rede Perineuronal, receptor EP2 e outras citocinas anti-inflamatórias.

Palavras Chave: CA2; Hipocampo; Epilepsia; Inflamação; Citocinas

Abstract

The aim of this work was to examine the action of cytokines involved in the inflammatory process and the pattern of neuronal loss in adult rats with mesial temporal lobe epilepsy (MTLE) induced by using the drug pilocarpine. 11 adult Wistar rats were used, where 6 of them received Pilocarpine treatment and were sacrificed at 1 and 7 days post status epilepticus, respectively, while 5 of them received saline solution treatment. The pilocarpine experimental model was successful in reproducing the harmful effects of MTLE in rats, causing status epilepticus, localized damage in the hippocampus subfields and neuronal death, using the Racine scale (1972) for evaluating the behavior of seizures. The anti-PCP4 antibody allowed precise localization and analysis of the ocular characteristics of the CA2 hippocampal region. No clear relationship between the anti-inflammatory cytokine IL-10 and neurological protection of the CA2 region was found, but the presence of the inflammatory cytokine IL-1 β in CA2 and CA3 in the 1 day group, as well as the decrease of this cytokine in the CA2 region of the 7 day group, suggests a possible migration of inflammation over time driven by neuroprotective factors such as the Perineuronal network, EP2 receptor, and other anti-inflammatory cytokines.

Keywords: CA2; Hippocampus; Epilepsy; Inflammation; Cytokine

Lista de Siglas e Abreviaturas

Anti-IL1 β	Anticorpo que marca a citocina inflamatória interleucina 1 beta
Anti-IL10	Anticorpo que marca a citocina anti-inflamatória interleucina 10
Anti-NeuN	Anticorpo que marca neurônios maduros do SNC
Anti-PCP4	Anticorpo que marca a citocina anti-inflamatória interleucina 10
CA1/CA2/CA3/GD/Hilo	Subáreas hipocampais
CD4/CD8	Subtipos de linfócitos T
COX-2	Ciclooxigenase-2
EH	Esclerose Hipocampal
ELTM	Epilepsia do Lobo Temporal Mesial
EP1, EP2	Receptores da PGE2 que são acoplados à proteína G
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
IL (Interleucina)	Interleucina
PGE2	Prostaglandina E2
RPN	Rede Perineuronal
SE	Status epilepticus
SNC	Sistema Nervoso Central
TH1/TH2	Células <i>T helper</i>
TMT	Trimetil-estanho

Lista de figuras

- Figura 1.** Representação ilustrativa tridimensional do hipocampo, evidenciando as áreas hipocâmpais CA1, CA2, CA3, Giro Dentado, Córtex Entorrinal, Pré-Subículo e Para-Subículo. Fonte: The Hippocampus Book (2007)17
- Figura 2.** Ilustração das principais áreas cerebrais e a localização de estruturas do sistema límbico (hipocampo e amígdala). Fonte: Andersen, Morris, Amaral, Bliss, & O’Keefe, 2007; Seeley, Stephens, Tate, Eckel, & Regan, 2008.....18
- Figura 3.** Ilustração do desenvolvimento de ativação da micróglia. Fonte: Blaylock, 2013.....23
- Figura 4.** Ilustração contendo os dois estados de ativação da micróglia (M1 pró-inflamatório e M2 anti-inflamatório) e as citocinas que são liberadas. Fonte: R. Pacheco, Contreras, & Prado, 2012.....27
- Figura 5.** Fotomicrografia do tecido hipocâmpal marcado com anti-NeuN para visualização da estrutura e integridade hipocâmpal.....39
- Figura 6.** Fotomicrografia com marcação de NeuN para visualização de morte neuronal hipocampo de ratos com sobrevivência de 1 dia.....40
- Figura 7.** Fotomicrografia com marcação de NeuN para visualização de morte neuronal hipocampo de ratos com sobrevivência de 7 dias.....41
- Figura 8.** Fotomicrografia com marcação do anticorpo anti-PCP4 para visualização de neurônios piramidais da região de CA2.....42
- Figura 9.** Dados da literatura indicando que a imunomarcação de PCP4 revela a região CA2 hipocâmpal.....44

Figura 10. Fotomicrografias com marcação do anticorpo anti-IL10 pra visualização de citocinas anti-inflamatórias no hipocampo.....	45
Figura 11. Fotomicrografias com marcação do anticorpo anti-IL1 β pra visualização de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo.....	46

Lista de Tabelas

Tabela 1. Representação detalhada da Escala de Racine.....	31
Tabela 2. Delineamento dos grupos estudados. Contendo quantidade de animais em cada grupo, substância administrada e sobrevida do animal.....	32
Tabela 3. Dados relativos aos anticorpos primários que serão usados neste estudo, contendo informações a cerca do anticorpo, fabricante, diluição usada e a marcação específica de cada anticorpo.....	36

Sumário

Lista de Siglas e Abreviaturas	9
Objetivo Geral	32
Objetivos específicos	32
Método	33
Animais	33
Indução ao <i>Status Epilepticus</i>	33
Perfusão e Processamento Histológico	35
Coloração de Nissl	36
Análise Imunohistoquímica	36
Anticorpos Utilizados	38
Análise Qualitativa	40
Resultados	40
Discussão	40
Referências	61

A Epilepsia é uma condição que tem como principais características um conjunto de sinais e sintomas que geralmente ocorrem juntos (crises, etiologia, severidade, cronicidade, prognóstico dentre outros) e padrão de excitabilidade neuronal aumentado, levando a repetidas crises. O aumento de excitabilidade neuronal foi demonstrado na região do Hipocampo (ILAE, Blümcke, I e at; 2013), excetuando-se a área CA2 (San Antonio, et Al, 2014; Carstens et AL, 2016) o que nos levou a pesquisar, de maneira mais específica, como essa sub-área reage a epilepsia experimental induzida por pilocarpina. Para isso, utilizamos anticorpos para verificar como os neurônios são afetados assim como reagem a um processo inflamatório adjacente a lesão.

Segundo Fisher et al., 2005, a Epilepsia é um distúrbio do cérebro caracterizado por uma predisposição duradoura para gerar crises epiléticas pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais dessa condição. A definição de epilepsia requer a ocorrência de pelo menos uma crise epilética. Uma crise epilética é uma ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devido à atividade neuronal excessiva ou síncrona anormal no cérebro.

Para uma melhor compreensão, mais precisa e completa da condição, Fisher et al., 2014 criaram a definição clínica prática da Epilepsia baseada em várias características distintas, incluindo a ocorrência de pelo menos dois episódios inesperados de convulsões não provocadas, a presença de anormalidades eletroencefalográficas (EEG) e fatores de risco específicos. Essa definição enfatiza a importância de avaliar cuidadosamente as características individuais de cada paciente para fornecer um diagnóstico preciso e específico, já que o tratamento para a epilepsia pode variar dependendo da causa subjacente da condição e da gravidade dos sintomas. Além disso, a definição clínica ajuda a garantir que as pessoas com epilepsia recebam o tratamento adequado e que sua condição seja monitorada regularmente, uma vez que a epilepsia pode ser uma condição debilitante e potencialmente fatal se não for tratada adequadamente.

Uma nova classificação das epilepsias foi criada segundo Scheffer et al., 2017, com múltiplos níveis de classificação para atender às necessidades de diferentes ambientes clínicos. Essa classificação reconhece que os recursos disponíveis para os profissionais de saúde que faz o diagnóstico variam amplamente em diferentes partes do mundo, e diferentes níveis de classificação podem ser possíveis, dependendo dos recursos disponíveis. Quando possível, é recomendado que seja procurado um diagnóstico em todos os três níveis, bem como a etiologia específica da epilepsia de cada indivíduo.

O ponto de partida da classificação da epilepsia é o tipo de crise convulsiva. Essa classificação pressupõe que um diagnóstico definitivo de convulsão epiléptica já tenha sido feito. Os tipos de convulsões são classificados em focais, generalizadas e de início desconhecido. Em algumas situações, a classificação de acordo com o tipo de convulsão pode ser o máximo possível diagnóstico, pois pode não haver acesso ao EEG e exames de vídeo e imagem. Em outros casos, pode simplesmente haver pouca informação disponível para fazer um diagnóstico de nível mais alto, como quando um paciente teve apenas uma única crise convulsiva (Scheffer et al., 2017).

Seguindo o diagnóstico da epilepsia de três níveis, o segundo nível é responsável por definir o tipo de epilepsia do paciente, seguindo a classificação de 2014. Nessa etapa, há a inclusão de uma nova categoria, a "Epilepsia Combinada Generalizada e Focal", além das já conhecidas epilepsias generalizadas e focais. Também há uma categoria para casos em que não é possível determinar o tipo de epilepsia, denominada "Desconhecido". Vale ressaltar que muitas epilepsias apresentam diferentes tipos de crises epiléticas (Scheffer et al., 2017).

O diagnóstico de epilepsia generalizada é baseado na presença de atividade elétrica generalizada no EEG. Os pacientes com epilepsias generalizadas podem experimentar diferentes tipos de crises, incluindo crises de ausência, mioclônicas, atônicas, tônicas e tônico-

clônicas. O diagnóstico de epilepsia generalizada é feito principalmente através de avaliação clínica, apoiada pela presença de descargas típicas no EEG ajuda a confirmar o diagnóstico. No entanto, é importante ter cautela com pacientes que apresentam crises tônico-clônicas generalizadas e EEG normal, pois pode ser necessário buscar evidências adicionais, como contrações mioelétricas ou histórico familiar, para confirmar o diagnóstico de epilepsia generalizada (Scheffer et al., 2017).

As definições de epilepsias focais incluem desordens unifocais e multifocais, assim como crises que envolvem apenas um hemisfério cerebral. Diferentes tipos de crises podem ocorrer, incluindo crises focais conscientes, crises focais inconscientes, crises focais motoras, crises focais não motoras e crises focais que evoluem para crises tônico-clônicas bilaterais. O EEG tipicamente apresenta descargas epiléticas focais, mas o diagnóstico é baseado em achados clínicos, apoiados por achados no EEG (Scheffer et al., 2017).

O grupo de Epilepsias Combinadas Generalizadas e Focais foi criado para pacientes que apresentam ambos os tipos de crises epiléticas. O diagnóstico é feito clinicamente com base em resultados de EEG. Embora o EEG possa mostrar descargas epiléticas tanto focais quanto generalizadas, a presença dessas atividades não é obrigatória para o diagnóstico. Algumas síndromes epiléticas comuns que se enquadram nessa categoria incluem a síndrome de Dravet e a síndrome de Lennox-Gastaut (Scheffer et al., 2017).

O tipo de epilepsia pode ser o diagnóstico final quando o médico não consegue identificar uma síndrome epilética específica. Isso pode acontecer em casos como epilepsia temporal sem lesões em adultos ou crianças, crises tônico-clônicas generalizadas com atividade generalizada no EEG sem uma síndrome epilética definida. Em casos raros, uma pessoa pode apresentar uma combinação de crises focais e de ausências, com atividade focal e generalizada no EEG, sem anormalidades visíveis na ressonância magnética. Nesses casos, o diagnóstico seria Epilepsia Combinada Generalizada e Focal (Scheffer et al., 2017).

O termo "desconhecido" é utilizado para descrever pacientes com epilepsia cujo tipo não pode ser determinado devido à falta de informações disponíveis. Isso pode ocorrer devido a uma variedade de fatores, como acesso limitado ao EEG ou resultados inconclusivos. Se o tipo de crise é desconhecido, o tipo de epilepsia pode ser indeterminado, embora nem sempre estejam correlacionados. Por exemplo, um paciente pode apresentar várias crises tônico-clônicas simétricas sem características focais e com EEG normal. Nesse caso, o início das crises é desconhecido e a pessoa é diagnosticada com epilepsia de tipo indeterminado (Scheffer et al., 2017).

O terceiro nível de diagnóstico é o Síndrome Epiléptica. Uma síndrome epiléptica se refere a um conjunto de características que envolvem tipos de convulsões, EEG e características de imagem que tendem a ocorrer juntas. A síndrome epiléptica costuma apresentar características que variam com a idade, como a idade de início e remissão (quando aplicável), gatilhos para convulsões, variação diurna e, às vezes, prognóstico. Além disso, ela pode estar associada a comorbidades distintas, como disfunção intelectual e psiquiátrica, bem como achados específicos em exames de EEG e imagem. As implicações etiológicas, prognósticas e de tratamento podem estar associadas à síndrome. É importante destacar que a síndrome epiléptica não está necessariamente relacionada a um diagnóstico etiológico específico e tem como objetivo orientar o tratamento da doença. Existem várias síndromes bem estabelecidas, como a epilepsia de ausência na infância, a síndrome de West e a síndrome de Dravet, embora a ILAE nunca tenha formalmente classificado as síndromes (Scheffer et al., 2017).

Dentro das Epilepsias Generalizadas, existe um conjunto de síndromes conhecido como Epilepsias Generalizadas Idiopáticas (EGIs), que incluem quatro síndromes bem definidas: Epilepsia de Ausência da Infância, Epilepsia de Ausência Juvenil, Epilepsia Mioclônica Juvenil e Convulsões Tônico-Clônicas Generalizadas Isoladas. No entanto, o termo "idiopático" tem sido questionado porque não reflete com precisão as descobertas atuais sobre as causas

genéticas dessas síndromes. Em vez disso, é mais adequado usar o termo Epilepsias Generalizadas Genéticas (GGEs) quando há evidências suficientes para justificar essa classificação. Essas evidências vêm de estudos clínicos cuidadosos da herança dessas síndromes em famílias e gêmeos, e não necessariamente da identificação de mutações genéticas específicas. Embora haja um desejo de manter o termo IGE, ele só deve ser usado para se referir aos quatro subtipos específicos de síndromes de epilepsia. Em casos individuais, o termo Epilepsia Generalizada Genética pode ser mais apropriado quando há suspeita de uma causa genética subjacente (Scheffer et al., 2017).

A pessoa com Epilepsia, em função das alterações realizadas no cérebro, se torna permanentemente predisponente a gerar crises epiléticas espontâneas, recorrentes, adquirindo também consequências neurobiológicas, cognitivas e sociais. (Fisher et al., 2005a).

É importante salientar as diferenças entre Epilepsia e crises epiléticas. Uma crise epilética é um evento temporário de sintomas causados por uma atividade neuronal excessiva ou sincrônica anormal no cérebro. Epilepsia é um distúrbio do cérebro caracterizado por uma predisposição duradoura a gerar crises epiléticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais dessa condição (Fisher et al., 2005a). Para definir epilepsia, é necessário que ocorra pelo menos uma crise epilética. As crises epiléticas são caracterizadas por apresentarem várias condições anormais do corpo, podendo afetar as funções autonômicas, sensitivas e motoras, ocasionando frequentemente alterações da consciência, sensações anormais, excessiva atividade muscular ou perda dela, eventos esses disparados devido as excessivas descargas neuronais excitatórias (Fisher et al., 2005a, 2017).

As descargas neuronais podem acontecer em um pequeno local do cérebro, em função de uma lesão focal do tecido, que são chamadas de crises focais, ou podem surgir secundariamente a crise focal anterior, de uma pequena área e se espalhar pelo cérebro inteiro ou então surgir repentinamente por todo o encéfalo, chamadas de crises generalizadas. As crises

podem variar tanto de extensão da descarga excitatória no cérebro, gravidade da lesão focal, quanto pelos sintomas que podem ser apresentados (Fisher et al., 2005b).

As crises geralmente são acompanhadas de diversos outros eventos que afetam o indivíduo, como por exemplo, alterações comportamentais. A pessoa com epilepsia pode apresentar, em um período de poucas horas até dias antes da crise mais atual, dores de cabeça, irritabilidade, insônia, depressão, mau humor e/ou hiperatividade. Em um período de segundos a poucos minutos antes da crise, o indivíduo apresenta sintomas bem característicos de quem apresenta Epilepsia, chamado de Auras (Dupont et al., 2015; Fernandes, 2013; Taylor & Lochery, 1987).

Por acontecerem em um momento anterior e muito próximo às crises, essas Auras acabam se tornando para o indivíduo um sinal de que a crise epiléptica se aproxima. As Auras são sensações específicas dependentes da localização do foco epiléptico, e por essa característica, podem apresentar as mais variadas sensações, algumas vezes indescritíveis e vagas, por exemplo sentimentos de medo ou de prazer no indivíduo. Sensações epigástricas (fome, dor, ardor de estômago dentre outras), cheiros desagradáveis, experiências oníricas (alucinações, sonhar acordado) são algumas sensações que podem acontecer nas Auras (Dupont et al., 2015; Fernandes, 2013; Taylor & Lochery, 1987).

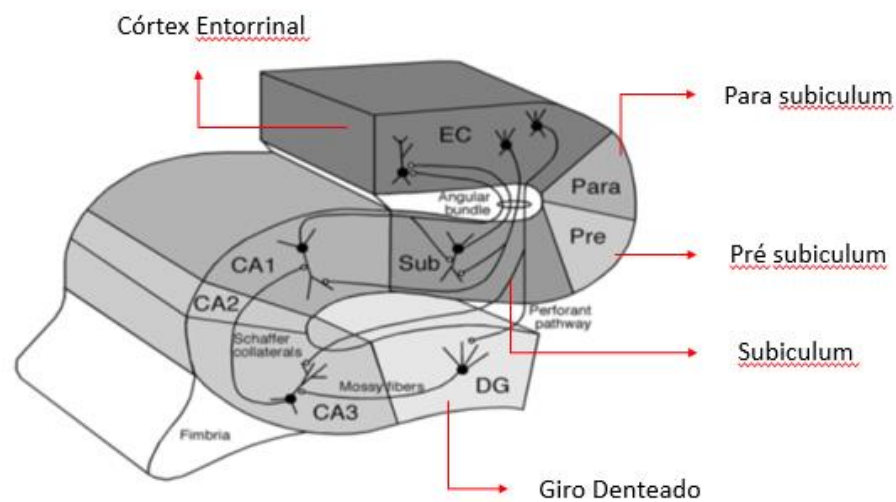
O indivíduo que as tem, pode recordar-se ou não conseguir lembrar de como foi sua Aura, não conseguir descrevê-la, porém consegue recordar e relatar que teve. Após as Auras e as crises epilépticas, o indivíduo pode apresentar também, dentro de um período de tempo de horas, podendo durar dias, sono profundo, dores de cabeça, cansaço, irritabilidade, vômitos, confusão mental, dores musculares, paralisia de uma parte do corpo, afasias, comportamentos violentos, alterações emocionais (Dupont et al., 2015; Fernandes, 2013; Taylor & Lochery, 1987).

Além das alterações neurobiológicas das crises e de todos os outros fatores que são encontrados em pessoas com epilepsia, outras consequências relacionadas são encontradas em comum. Uma delas são as consequências adquiridas pelas crises epiléticas persistentes ao longo do tempo, em alguns casos com o tratamento medicamentoso surtindo pouco efeito, tendo que sofrer com os efeitos secundários das medicações (Devinsky, 1993; Devinsky et al., 1995; Murillo-Rodriguez et al., 2019). Essa característica persistente da epilepsia faz com que os indivíduos adquiram sequelas psicossociais, como depressão e ansiedade, ocasionando consequentemente a queda da qualidade de vida desses indivíduos (J. A. Cramer et al., 2003; J. a Cramer et al., 2005; Devinsky, 1993; Devinsky et al., 1995; Murillo-Rodriguez et al., 2019).

Voltando para as questões neurobiológicas, na epilepsia como foi dito anteriormente, o indivíduo pode apresentar diversas estruturas do encéfalo lesionadas, e em consequência disso, ter o funcionamento dessas regiões alteradas (Fisher et al., 2005b). Uma das principais estruturas que são acometidas na epilepsia de característica focal é o hipocampo. O hipocampo é uma estrutura que faz parte do sistema límbico, participando principalmente dos mecanismos de retenção de memória e aprendizagem. A formação hipocampal, uma estrutura que é encontrada no lobo temporal, é subdividida em três regiões distintas: Córtex Entorrinal, Complexo Subicular e a estrutura que é mais acometida na epilepsia como dita anteriormente: Hipocampo. Dentro do hipocampo são encontrados os subcampos CA1, CA2, CA3 e estruturas associadas (Hilo e Giro Denteado), ilustrado na figura 1 abaixo (The Hippocampus Book, 2007).

Figura 1

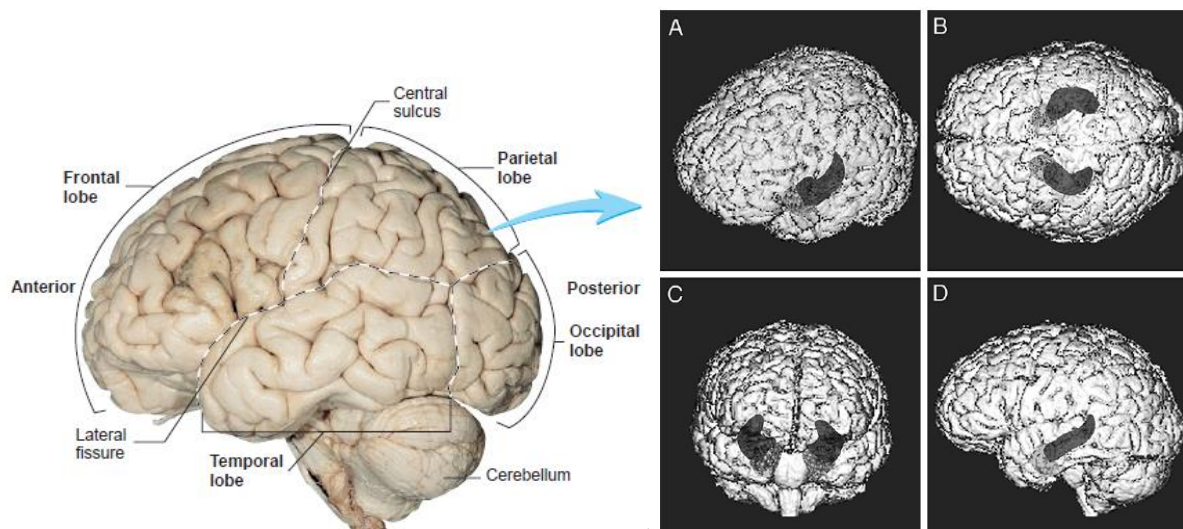
Representação esquemática da formação hipocampal, ilustrando as camadas CA1, CA2, CA3 e Giro Denteado. Fonte: The Hippocampus Book, 2007



Já conhecendo a estrutura encefálica mais acometida em indivíduos com epilepsia, podemos falar sobre um dos tipos de epilepsia mais encontradas, apresentando grande incidência e gravidade de acordo com a localização do foco epiléptico: a Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM) (Maizuliana et al., 2020). Podendo gerar crises focais e generalizadas, originadas de estruturas localizadas na região mesial do lobo temporal como o hipocampo e a amígdala (Fernandes, 2013; Maizuliana et al., 2020), representado na Figura 2.

Figura 2

Ilustração das principais áreas cerebrais e a localização do hipocampo. Fonte: Andersen, Morris, Amaral, Bliss, & O'Keefe, 2007; Seeley, Stephens, Tate, Eckel, & Regan, 2008



O achado patológico mais comum que é associado a indivíduos com ELTM é a Esclerose Hipocampal (EH), sendo reconhecido como um dentre os principais fatores que contribui para a progressão da epilepsia nos indivíduos (Babb et al., 1984; Blümcke, 2009). De acordo com a *International League Against Epilepsy* (ILAE), a EH é classificada de acordo com o padrão de perda neuronal encontrado no hipocampo, caracterizada por extensa lesão e perda neuronal em áreas do hipocampo denominadas de subcampos hipocâmpais CA1, CA2, CA3 e Hilo do Giro Denteado (Blümcke et al., 2013; Thom, 2014). Outros achados e alterações à nível celular na epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM) que já foram relatados são

neurodegeneração, gliose, neurogênese, dispersão de células granulares, brotamento axonal e alteração na matriz extracelular (Thom, 2014).

Uma das alterações encontradas na ELTM é a gliose hipocampal (Grote et al., 2023), que pode ser definida como alterações da micróglia no SNC, como por exemplo hipertrofia, crescimento anormal ou hiperplasia das células da glia. O hipocampo logo após sofrer dano tecidual pode ter como resultado grande número de astrócitos com aumento de tamanho, com prolongamentos maiores e mais grossos (Toscano et al., 2020).

A ativação exacerbada astrogliar e microglial acarreta grandes consequências danosas ao hipocampo, levando a um processo inflamatório carregado de citocinas inflamatórias, aumento da permeabilidade da barreira hemato-encefálica e consequentemente aumento da excitabilidade neuronal (Devinsky et al., 2012; Rouach & Glenn, 2016; Walker & Sills, 2012). Alterações morfológicas de astrócitos e de micróglia como citadas anteriormente, levam também a alterações funcionais que prejudicam as interações entre células da glia e neurônios, influenciando o equilíbrio de neurotransmissores e plasticidade, levando à excitotoxicidade e por fim, morte neuronal (Pasti et al., 1997; Sajja et al., 2016).

Um estudo foi realizado por Bernardino et al., (2005) utilizando cultura organotípica de cortes hipocampais de roedor. Citocinas microglicais, que são glicoproteínas reconhecidas em promover processo inflamatório no tecido, como a Interleucina 1 beta (IL-1 β) e o Fator de necrose tumoral alfa (TNF α) eram colocados no tecido hipocampal e posteriormente observado os efeitos das citocinas na função neuronal. Foi concluído que dependendo da quantidade e do tempo de exposição do tecido às citocinas, elas podem gerar tanto efeito excitotóxico quanto efeito protetor no neurônio. Os pesquisadores observaram que grandes concentrações de TNF α acarretam em efeitos neurotóxicos no hipocampo enquanto que quando reduziām a quantidade da citocina e o tempo de exposição do tecido, produzia efeito neuroprotetor nas células

neuronal do hipocampo, ou seja, a citocina TNF α se torna no SNC um agente que contribui para o aumento da resposta inflamatória e consequente lesão tecidual.

Vários estudos utilizando ratos indicaram o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo em processos inflamatórios (Feng et al., 2016; Maroso et al., 2011; Pan et al., 2021; Vezzani et al., 2002), levando a crer que isso pode influenciar na fisiopatologia e no início da epilepsia. A ativação microglial e astrogliar no hipocampo aumenta a produção de citocinas pró inflamatórias, que por sua vez estimula mais ativação microglial e de astrócitos, levando a mais alterações da homeostase tecidual como à deposição de mais citocinas e desequilíbrio de canais iônicos para sódio/potássio, levando ao aumento da resposta inflamatória, como em um ciclo (Ho et al., 2015; Wetherington et al., 2008).

Para entender melhor o desequilíbrio que é gerado pelo aumento das citocinas pró-inflamatórias, precisamos citar um tipo específico de célula, que quando ativadas, liberam as citocinas no tecido. Os monócitos e macrófagos são as principais células de defesa do nosso corpo humano, participando da homeostase tecidual e imunidade inata do organismo, desenvolvendo funções no nosso corpo como a fagocitose de partículas estranhas no hospedeiro, apresentação de antígenos, ação microbicida, capacidade de produzir mediadores que interferem na função imunológica e elevada capacidade biossintética, permitindo a promoção de uma grande quantidade de citocinas e podendo levar a citotoxicidade (De La Torre et al., 2008; Elomaa et al., 1998; Geissmann et al., 2010).

Os monócitos, ou micróglia no SNC, são as células de defesa do sistema imunológico precursoras dos macrófagos, que circulam temporariamente na corrente sanguínea após processos inflamatórios, mediando a defesa do organismo contra patógenos, antígenos estranhos ou dano tecidual, migrando para os tecidos onde ocorre a diferenciação em macrófagos (Geissmann et al., 2010; Hume, 2015).

Foi possível identificar conjuntos de genes que são corregulados por fatores de transcrição, utilizando dados sobre a expressão gênica de diversos tipos celulares. Nos macrófagos, esses conjuntos de genes incluem genes específicos da linhagem, responsivos ao interferon, genes inflamatórios precoces e genes necessários para a endocitose e funcionamento do lisossomo (Hoeksema & De Winther, 2016; Hume, 2015).

Os macrófagos, que são oriundos do sistema hematopoiético, são ativados e se diferenciam no tecido alvo, alterando sua função para lidar com uma grande quantidade de tarefas relacionadas à lesão tecidual, desenvolvimento, organogênese e malignidade. Recebendo estímulos provenientes de respostas inflamatórias estéreis ou patogênicas, desempenha um papel importante no controle dos processos inflamatórios, podendo aumentá-los em sua função efetora ou diminuí-los, participando no desenvolvimento de tecidos e cicatrização.(De La Torre et al., 2008; Hume, 2015). Todas as funções desempenhadas pelos macrófagos são dependentes de sinais específicos, como por exemplos certos lipídeos e citocinas(Woods et al., 2000). Esses estímulos conseguem mudar a expressão gênica e fazer como que os macrófagos se tornem ativos, se tornando mais eficientes para desempenhar a função para que foram recrutados (Hume, 2015; Solinas et al., 2009). Muitas vezes macrófagos e monócitos são considerados erroneamente como mesmo tipo celular devido as suas muitas semelhanças. Na verdade são células diferentes, destacando a potência da atividade fagocítica e o tamanho, sendo o macrófago tendo uma atividade de fagocitose mais elevada e uma proporção maior (F. C. Pacheco & Cardoso, 2012).

Atualmente, são conhecido dois estágios de ativação dos macrófagos, chamado de vias “clássica” e “alternativa”, ou M1 e M2 respectivamente(Solinas et al., 2009). Essas duas vias dão origem a macrófagos com diferentes finalidades, havendo a necessidade do equilíbrio entre as duas vias de ativação para que ocorra a homeostase do sistema imunológico e o seu correto

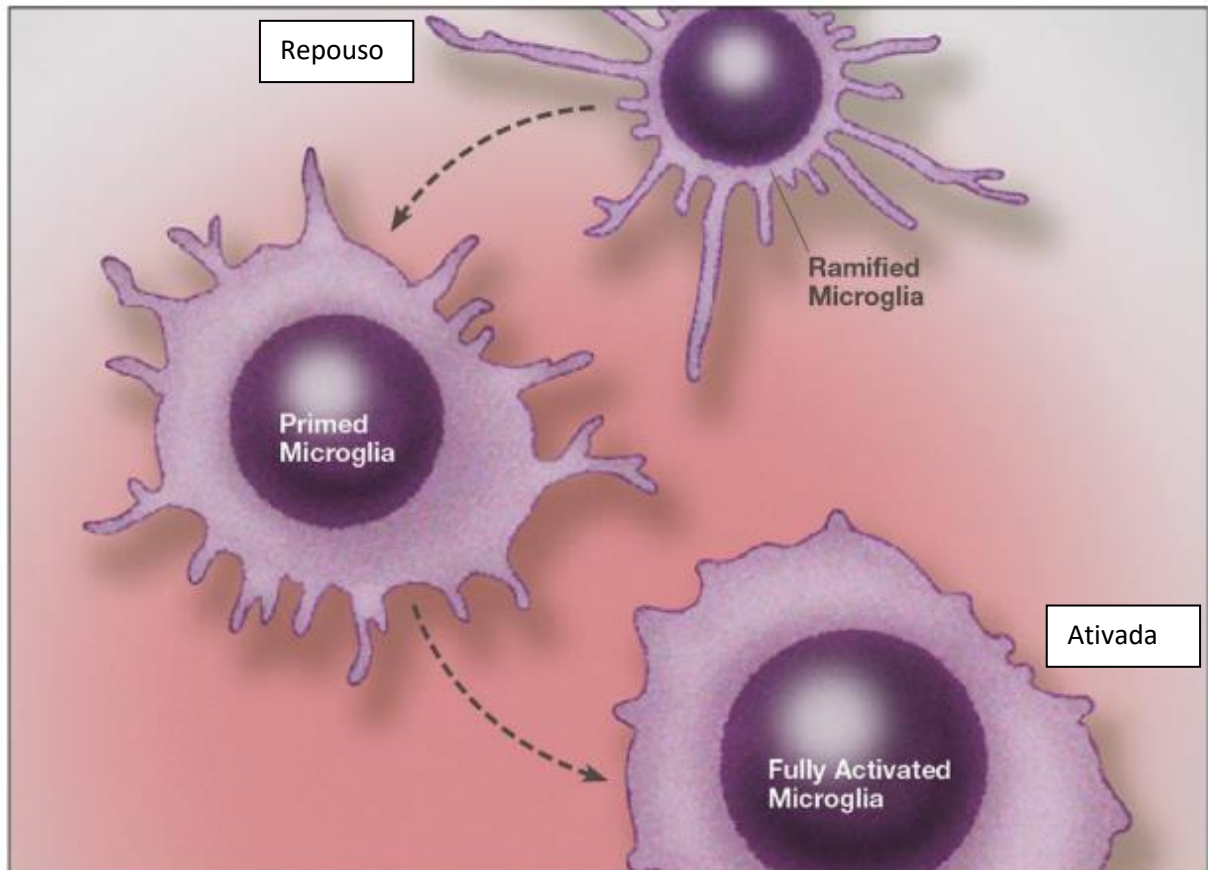
funcionamento. O estágio M1 ou clássico corresponde ao fenótipo pró inflamatório, tendo como característica a liberação de citocinas como fator de necrose tumoral α (TNF α), interleucina 1 β (IL1- β), e radicais livres, que estimulam a inflamação tecidual. O segundo estágio de ativação chamado de alternativo ou M2 é atualmente relacionado à reparação tecidual, devido a liberação de citocinas consideradas anti-inflamatórias, como a interleucina 10 (IL-10), liberação de fatores de transcrição como o fator de transformação de crescimento β (TGF β), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e aumento da expressão da arginase 1 (ARG1) (Geissmann et al., 2010; Mosser & Edwards, 2008).

As micróglias, lembrando que são como os monócitos são chamados no Sistema Nervoso Central, como dito anteriormente também fazem parte da família de células que desempenham a função fagocítica, se diferenciando das demais células fagocíticas do organismo (Davalos et al., 2005). Em mamíferos na fase adulta, quando há ausência de situações patológicas do SNC, as micróglias permanecem no estado de repouso e apresentam corpo celular picnótico, citoplasma perinuclear reduzido e processos celulares finos e alongados (Nimmerjahn et al., 2005). Foram mostrados em estudos *In Vivo* que as micróglias em repouso realizam um monitoramento constante da saúde atual do Sistema Nervoso Central (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005).

Quando há eventos no organismo que promovem mudanças, como por exemplo a aparição de algum elemento estranho que pode ser uma ameaça, as micróglias podem responder rapidamente. Essa resposta microglial tem como consequência alterações morfológicas de sua estrutura, mudando sua conformidade espacial, aparentando aspecto amebóide (Figura 1), tornando-se capaz de se proliferar intensamente e realizar fagocitose para neutralizar a ameaça encontrada. Esse processo é acompanhado de liberação de citocinas inflamatórias que sinalizam para outras células, como astrócitos e linfócitos T, sobre a ameaça estranha no organismo, acarretando em eventos inflamatórios posteriores (Aboud et al., 2014; Jeong et al., 2013).

Figura 3.

Ilustração da micróglia em repouso e em processo de mudança para o estado ativado. Fonte: Blaylock, 2013.



De acordo com o seu estado de ativação, além do seu papel protetor contra agentes patológicos, a micróglia consegue desempenhar diversas funções importantes no SNC saudável. Interagindo fisicamente com neurônios próximos, a micróglia participa na modulação de neurotransmissores e conseqüentemente contribui na homeostase sináptica (Ji et al., 2013), participa na *clearance neuronal*, ou seja, na remoção de neurônios apoptóticos (Marín-Teva et al., 2004), participa na regulação da neurogênese e oligodendrogênese (Shigemoto-Mogami et al., 2014), participa no desenvolvimento de células precursoras neuronais (Arnò et al., 2014), e

é essencial na sobrevivência de neurônios que estão formando circuitos neurais no desenvolvimento pós natal (Ueno et al., 2013). Micróglias distróficas e a diminuição quantitativa das mesmas podem ser notadas em encéfalos senis ou que possuem alguma patologia neurodegenerativa, como por exemplo na doença de Alzheimer, também influenciando na saúde do SNC podendo contribuir para o início da degeneração neuronal (Monasor et al., 2020; Streit et al., 2009, 2020). Em resumo, as células microgliais podem desempenhar papéis tanto neuroprotetores quanto neurotóxicos no SNC, se diferenciando principalmente nos aspectos agudos da ativação microglial e aspectos neurodegenerativos tardios(Gomes-Leal, 2012).

Como dito em parágrafos anteriores, concomitantemente à ativação microglial temos a liberação de várias citocinas no meio extracelular, podendo influenciar tanto no aumento quanto na diminuição do processo inflamatório (Devinsky et al., 2012; Walker & Sills, 2012). As citocinas são um grupo de proteínas que desempenham diversas funções no organismo, como por exemplo ajudar a coordenar o sistema imune inato, sendo produzidas pelas células do sistema imune e por diversos outros tipos celulares. Inicialmente, citocinas específicas eram denominadas de acordo com a sua relação e comunicação com leucócitos, chamadas de interleucinas, seguidas de um numeral (por exemplo: interleucina 6 ou IL-6). Outras citocinas eram denominadas de acordo com a descoberta do seu papel desempenhado (por exemplo: fator de necrose tumoral ou TNF) (Abbas et al., 2015; de Oliveira et al., 2011).

Molecularmente, as citocinas são grupos de pequenos polipeptídeos que participam do processo inflamatório, imunológico e está ligado a diversas funções e disfunções no SNC. São classificadas de acordo com sua base molecular e ação fisiológica, divididas em interleucinas (IL), fator de necrose tumoral (TNF), interferons (IFN), fatores de crescimento e quimiocinas(Turner et al., 2014).Sua produção acontece por vários tipos celulares no local da

lesão e por células do sistema imunológico, como por exemplo das linfocinas (produzidas por linfócitos), monocinas (produzidas por monócitos), quimiocinas (com atividades quimiotáticas) e interleucinas (produzidas por leucócitos). Uma única citocina pode ser produzida e secretada por vários tipos de célula, e também uma única citocina pode conseguir agir em diferentes tipos celulares (Helmut et al., 2011). Pelas características semelhantes encontradas, ações em comum podem ser desencadeadas por diferentes citocinas. Elas atuam no local por mecanismos parácrinos (sinalização em células próximas) e autócrinos (auto-sinalização celular), geralmente funcionando em cascata, ou seja, várias citocinas podem ser secretadas pelo estímulo de uma célula alvo ativada por citocina anterior. Dessa maneira, as citocinas tem a capacidade de regular a produção e atividade de outras citocinas, podendo aumentar ou diminuir o processo inflamatório dependendo da produção e ativação de citocinas pró-inflamatórias e/ou anti-inflamatórias (Helmut et al., 2011; Lin et al., 2000; Zhang & An, 2009).

Como podemos ver, as citocinas participam e regulam diversos mecanismos celulares. Importantes papéis estão diretamente relacionados com a liberação de citocinas no nosso organismo, como no caso do nosso sistema imunológico. As citocinas influenciam na atividade, proliferação, diferenciação e sobrevivência das células imunológicas, regulando também a ativação e produção de outras citocinas que podem aumentar ou diminuir a resposta inflamatória face a situações patológicas (de Oliveira et al., 2011; Zhang & An, 2009).

Funcionalmente falando, as citocinas podem ser divididas em dois grupos: as que promovem reação inflamatória e anti-inflamatória, sendo os linfócitos T as principais células liberadoras destas citocinas. Os linfócitos T possuem receptores específicos na sua membrana celular que reconhece patógenos estranhos e também reconhecem a normalidade do tecido quando há alguma resposta autoimune. Existem dois principais subtipos de linfócitos T, se diferenciando pela presença de moléculas em sua superfície chamadas de CD4 e CD8. Os

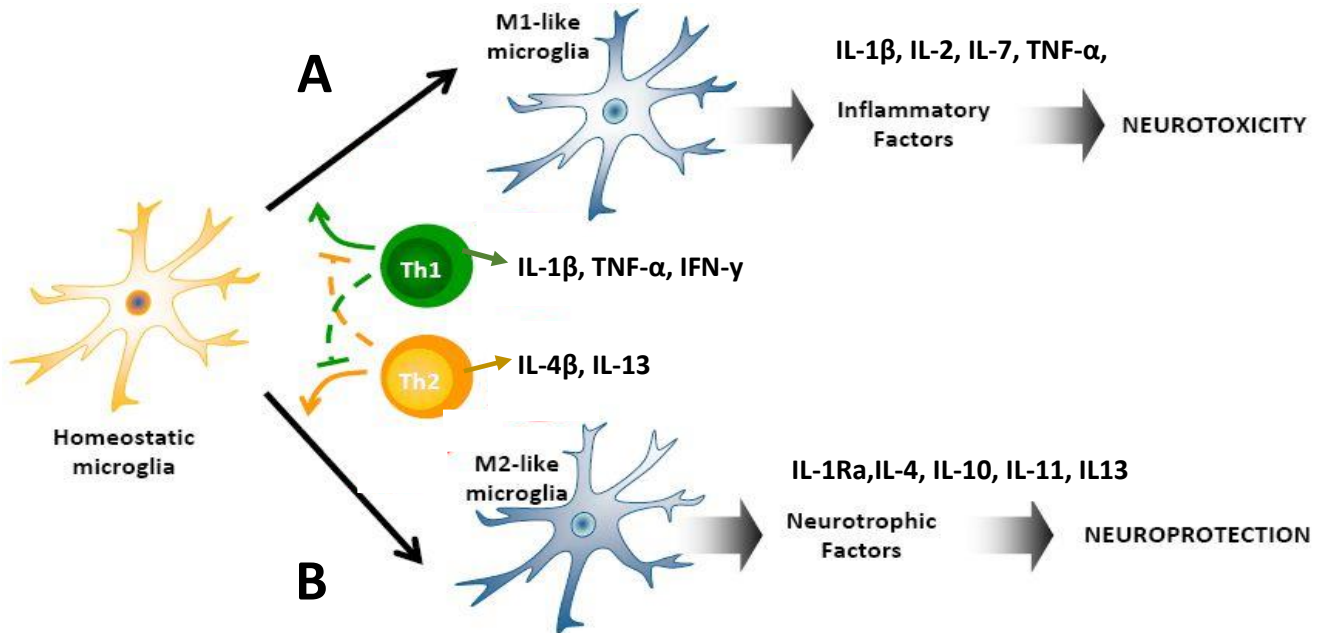
linfócitos T que expressam em sua membrana celular as moléculas CD4 são também conhecidos como células “*T helper*”(Th), sendo estas consideradas as que mais produzem citocinas. Esse subtipo específico celular (células “*T helper*”) podem ser subdivididos em Th1 e Th2, e as citocinas produzidas por essas células são conhecidas por citocinas Th tipo 1 e citocinas Th tipo 2 (Berger, 2000; Romagnani, 1999).

As citocinas Th1 produzem repostas pró-inflamatórias no organismo, tendo a responsabilidade de exterminar agentes estranhos e perpetuar respostas autoimunes, tudo com o objetivo de restaurar a saúde tecidual. Porém, já é conhecido que respostas inflamatórias excessivas podem levar à incontroláveis danos teciduais, mesmo após o extermínio de agentes patológicos, havendo assim a necessidade de uma contraresposta que diminua o processo inflamatório instalado e devolva a homeostase tecidual. As citocinas Th2 quando são liberadas produzem uma resposta anti-inflamatória tecidual, diminuindo assim a ativação das citocinas Th1 mediadas por ação microbiana e restaurando o equilíbrio no local e evitando danos. Portanto, o ideal para o organismo humano seria o equilíbrio entre as respostas das citocinas Th1 e Th2 mediante aos desafios imunológicos que podem surgir (Berger, 2000; Romagnani, 1999). As citocinas que são consideradas pró-inflamatórias são as interleucinas IL-1 β , IL-2, IL-7 e TNF- α (fator de necrose tumoral alfa). As que são consideradas anti-inflamatórias são receptor antagonista da IL-1, IL-4, IL-10, IL-11 IL-13. Fator inibidor da leucemia, interferon alfa, IL-6 e TGF- β (fator transformador de crescimento beta) são considerados ambos como citocinas pró e anti-inflamatórias, sob circunstâncias específicas (Curfs et al., 1997; de Oliveira et al., 2011; Romagnani, 1999; Zhang & An, 2009).

Figura 4.

Estado M1 (pró-inflamatório) ou M2 (anti-inflamatório) microglial, dependendo da natureza do estímulo. A: Após reconhecer lesões ou agentes patológicos no organismo, a micróglia se torna ativa no estado M1, produzindo metabólitos oxidativos, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas para induzir a infiltração de leucócitos periféricos que irão combater e eliminar o insulto ou lesão. B: No estado ativado M2, a micróglia se torna a contrarespostapara a

subpopulação M1 ao secretar citocinas anti-inflamatórias para evitar a exacerbação do processo inflamatório ao ponto de gerar danos ao tecido, facilitar a fagocitose dos restos celulares, promover a reconstrução da matriz extracelular e o reparo tecidual. Fonte: R. Pacheco, Contreras, & Prado, 2012.



As citocinas desempenham outros papéis além da sua função no sistema imune. Participam da regulação da neurogênese, que é o surgimento de novos neurônios, sendo importante para a manutenção das funções do hipocampo como aprendizado e memória (Borsini et al., 2015).

Voltando para as estruturas encefálicas que sofrem dano na ELTM, o hipocampo é uma estrutura encefálica relacionada à várias funções vitais do organismo, como a aprendizagem e memória. Essa estrutura permite que o nosso cérebro consiga captar, identificar, classificar e processar diferentes tipos de estímulos (visuais, olfativos, proprioceptivos, dentre outros), tanto

externos quanto internos ao corpo. E a epilepsia do lobo temporal mesial é uma das formas mais comuns de epilepsia, onde o hipocampo é a estrutura que é mais acometida neste tipo específico de epilepsia (Fernandes, 2013).

Dados recentes da literatura sugerem que após o início do período chamado epileptogênese, sucede a primeira crise epiléptica, na qual ocorre morte neuronal e consequentemente redução da quantidade neuronal nas áreas hipocampais, alteração da circuitaria neuronal, alterações na dinâmica fisiológica das sinapses, dispersão das células granulares, brotamento axonal, alterações da matriz extracelular e gliose (Thom, 2014). Acredita-se que o processo inflamatório ocorra no período da epileptogênese e contribua para o aparecimento e aumento das alterações hipocampais já citadas (Vezzani et al., 2013; Vinet et al., 2016).

Inserido no mecanismo da inflamação, está a micróglia ativada. Estudos em ratos pós em crise epiléptica (*Status Epilepticus*) tem mostrado a relação entre a micróglia ativada e o aumento de citocinas inflamatórias, podendo essas serem uma das responsáveis pelo aumento da excitabilidade neuronal, excitotoxicidade e o desenvolvimento da epilepsia no indivíduo. Dados mostram que a degeneração neuronal pode ocorrer após a atividade microglial e liberação de citocinas inflamatórias, evidenciando que essas podem ter um papel importante no desenvolvimento da epilepsia (Devinsky et al., 2012; Vezzani et al., 2011, 2013; Vezzani & Granata, 2005; L. Wu et al., 2018).

Dada a complexidade dos mecanismos presentes no processo inflamatório, inclusive pela quantidade de citocinas envolvidas, área atingida, ativação microglial e as muitas possibilidades de interações entre elas e outras células, há poucos dados na literatura que evidenciam a complexidade e totalidade dos mecanismos envolvidos no processo inflamatório que ocorre no encéfalo de indivíduos com epilepsia. Como por exemplo a área CA2

hipocampal, que sendo uma área de transição dentre áreas CA1 e CA3, tem por característica morfológica maior dificuldade para delimitação de seus limites e exata localização no hipocampo. Foi usado nesta pesquisa o anticorpo anti-PCP4, que evidencia neuronios maduros da área CA2 hipocampal, visando contribuir com novos dados dentre os já existentes sobre processos neuroinflamatórios no hipocampo. Uma demonstração de aumento de excitabilidade neuronal foi evidenciada no Hipocampo, com exceção da área CA2, levantando a hipótese do subcampo CA2 ser protegido por exemplo da alta excitabilidade neuronal e dano epiléptico (Kilias et al., 2023; Steve et al., 2014). Essa descoberta motivou uma investigação mais específica sobre a reação da subárea CA2 à epilepsia experimental induzida por pilocarpina. Nesse contexto, foram utilizados anticorpos para avaliar a forma como os neurônios são afetados e como respondem a um processo inflamatório próximo à lesão. Nessa dissertação, também foi investigados padrões gerais da esclerose hipocampal e influência de citocinas pró e anti-inflamatórias em ratos submetidos a *Status Epilepticus* pós indução por pilocarpina, com diferentes tempos de sobrevida.

Objetivo Geral

Analisar a expressão de citocinas inflamatórias em hipocampos de ratos adultos que sofreram *Status Epilepticus*, e apresentem padrões de esclerose hipocampal, submetidos ao modelo experimental de epilepsia induzido por pilocarpina.

Objetivos específicos

Induzir *status epilepticus* em ratos adultos da raça Wistar

Identificar o padrão de marcação de Anti-NeuN em hipocampos de ratos adultos que sofreram *Status Epilepticus*,

Identificar o padrão de marcação de Anti-IL-1b em hipocampos de ratos adultos que sofreram *Status Epilepticus*

Identificar o padrão de marcação de Anti-IL10 em hipocampos de ratos adultos que sofreram *Status Epilepticus*

Identificar o padrão de marcação de Anti-PCP4 em hipocampos de ratos adultos que sofreram *Status Epilepticus*

Analisar qualitativamente o padrão de perda neuronal hipocampal em ratos submetidos a *Status Epilepticus*

Método

Animais

30 ratos foram disponibilizados para o nosso estudo, entretanto somente 11 ratos adultos machos da raça Wistar foram utilizados (VER RESULTADOS) com peso variando entre 250 e 300 gramas. Todos proveniente do Biotério Central da Universidade Federal do Pará. Foram mantidos em gaiolas individualizadas em condições controladas (22- 25 °C, ciclos 12/12 claro/escuro, comida e água a disposição, controle de ectoparasitas). Todos os procedimentos experimentais foram realizados em obediência as normas sugeridas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará. **CEUA Nº 3347221217** Os animais foram eutanasiados ao alcançarem as sobrevidas de 1 dia e 7 dias pós *Status Epilepticus*. Todos os esforços foram feitos para haver mínimo estresse e sofrimento dos animais. Durante a sobrevida, os animais foram mantidos no Biotério de Experimentação do Laboratório de Neuroproteção e Neuroregeneração Experimental o qual é credenciado pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal.

Indução ao *Status Epilepticus*

Primeiramente, os animais foram tratados com Metil-escopolamina (30 minutos antes da administração da Pilocarpina, 1mg/kg, s.c.) com o objetivo diminuir os efeitos colinérgicos provocados pela pilocarpina e evitar morte prematura dos animais (Szyndler et al., 2005).

Após a administração intraperitoneal de metil-escopolamina, todos os animais dos grupos experimentais receberam pilocarpina por via intraperitoneal com doses de 100, 200 e 360mg/kg diluída em salina estéril. Após 1h do animal alcançar o intervalo específico pré estabelecido da escala de Racine (1972), entre os estágios 3 a 5, receberam Diazepam por via intraperitoneal (10mg/kg) para a interrupção do estado de mal epilético, evitando também morte prematura dos animais (Leite & Cavalheiro, 1995; Turski et al., 1983).

Os animais que alcançaram em 1h o estágio 3 da escala de Racine (1972), onde foram evidenciados mioclônias de membros anteriores e considerados em *Status Epilepticus* e entraram no grupo experimental. (Mello et al, 1993)

A análise da severidade das crises foi realizada utilizando a escala criada por Racine, (1972), onde por uma análise comportamental é inferido as crises no *Status Epilepticus*.

Ilustrado no quadro abaixo:

Tabela 1.

Escala criada por Racine (1972) para análise comportamental de modelo de Epilepsia.

Pontuação	Estágio comportamental
0	Sem mudanças comportamentais.
1	Movimentos súbitos de face e focinho.
2	Balanceio com a cabeça.
3	Clônus de membros dianteiros.
4	Crises caracterizadas por elevação posterior.
5	Crise generalizada caracterizada por elevação posterior, perda de controle postural, pulos exacerbados incontroláveis e quedas.

Para este estudo, serão elaborados dois grupos experimentais, com dois tempos de sobrevida diferentes e um grupo controle com um tempo de sobrevida.

Os animais serão divididos em três grupos conforme descrito na tabela abaixo.

Tabela 2.

Características do grupo controle e de cada grupo experimental.

Grupos	Nº animais	Administração	Tempo de Sobrevida
Controle	5	Solução Salina	7 DIAS
Experimental 1	3	Modelo Pilocarpina	1 DIA
Experimental 2	3	Modelo Pilocarpina	7 DIAS

Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório de Neurobiologia localizado no Instituto de Ciências Biológicas da UFPa e na Seção de Patologia do Instituto Evandro Chagas.

Perfusão e Processamento Histológico

Após alcançar o tempo de sobrevida pré estabelecido, foi realizado a Perfusão e Fixação do tecido para preservação da integridade celular neuronal. Os encéfalos foram recolhidos no centro cirúrgico e imersos em solução fixadora constituída de paraformaldeído 4% em Tampão Fosfato 0,1 M. O procedimento foi finalizado nos laboratórios de Neurobiologia da Universidade Federal do Pará.

Todos os procedimentos cirúrgicos foram feitos em condições assépticas. Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (Ketalar, König) na dose de 72mg/kg e com cloridrato de xilazina (Kenzol, König), na dose de 9 mg/kg de peso corporal, ambos por via intraperitoneal. Antes do procedimento, foram testados os reflexos corneanos e o de resposta a estímulos motores. Os animais foram manipulados após a abolição completa destes reflexos.

Abolidos os reflexos corneanos e de retirada da pata, os animais foram perfundidos através do ventrículo esquerdo com 500ml de solução salina 0,9% heparinizada, seguido de 500ml de paraformaldeído a 4% em tampão fostato (PB 0,1M; pH 7,2 – 7,4). Após a obtenção

do encéfalo, foi armazenado e pós-fixado no mesmo fixador utilizado na perfusão, durante um período de 24 horas. Em seguida, o tecido foi transferido para soluções com concentrações crescentes de sacarose, diluída em uma mistura de glicerina com tampão fosfato 0,05M, pH 7,2 – 7,4 para crioproteção tecidual.

Após a crioproteção, os tecidos foram imersos no meio de inclusão Tissue-TeK OCT 4583 (SAKURA), congelado e cortado coronalmente em criostato Leica CM3050 à espessura de 30 µm. Os cortes de 30 µm foram acondicionados em solução anti-congelante na geladeira.

Coloração de Nissl

A análise histopatológica foi realizada utilizando o método de Nissl, onde detecta os corpúsculos de Nissl que estão depositados dentro do citoplasma neuronal. Esse método pode ser usado como indicador de viabilidade neuronal, pois quando há dano, esses corpúsculos podem desaparecer, fenômeno chamado de cromatólise (Scorza et al., 2005). Foi utilizado esse método para avaliar os achados patológicos nos hipocampus retirados de ratos submetidos a *Status Epilepticus*.

Análise Imunohistoquímica

Análise imunohistocitoquímica teve como objetivo detectar neurônios hipocampais e as citocinas encontradas quando há a probabilidade de processo inflamatório no tecido. Nessa técnica, poderemos avaliar tanto a presença quando característica dos neurônios hipocampais em estado normal e alterado, assim como supor a presença ou ausência de processo inflamatório tecidual. A coloração foi realizada conforme o protocolo descrito abaixo.

Foram selecionados os cortes dos tecidos de ratos dos grupos experimentais de 1 dia, 7 dias e grupo controle. Esses cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e submetidos a uma bateria de coloração (álcool 100%, 70%, 50%, 20%, Água destilada, solução de tionina

0,1%, xilol). As lâminas foram imersas nas soluções de álcool na sequência de solução com maior concentração para menor concentração (álcool 100%, 70%, 50%, 20%) com tempo de incubação de 1 minuto em cada solução.

Em seguida os cortes foram imersos em água destilada por 1 minuto seguido pela imersão na solução de tionina 0,1% durante 8 segundos. Após a tionina 0,1%, as lâminas foram novamente imersas em água destilada por 45 segundos seguido da imersão sequencial nas soluções de álcool, desta vez, na sequência da solução com menor concentração para maior concentração (Álcool 20%, 50%, 70%, 90% 100%) com tempo de incubação de 45 segundos em cada. As lâminas foram imersas em xilol durante 30 minutos e, na sequência, será realizada a montagem com Permount (Fisher Scientific) e lamínula, para proteção tecidual.

Para o procedimento imunohistoquímico, as secções foram previamente lavadas com água destilada (5 minutos) + PBS (Solução Tampão Fosfato – PH 7,4) por 5 minutos. Após essa etapa, foi realizada a recuperação antigênica com solução de ácido cítrico em banho Maria a 90° C por 20 minutos. Em seguida, as secções foram novamente lavadas com água destilada + PBS por 5 minutos. Em sequência, foi realizada a permeabilização do material com solução de Saponina durante 10 minutos. Será efetuada uma terceira bateria de lavagem com PBS (2x) durante 5 minutos cada. Posteriormente, foi realizado o bloqueio das proteínas inespecíficas com BSA (Bovine Serum Albumin) 10% por 30 minutos e a incubação com os respectivos anticorpos primários (Tabela 3) por toda a noite (*overnight*).

No dia seguinte, foi realizada duas lavagens em PBS por 5 minutos cada para remoção do excesso de anticorpo primário. Em seguida, as amostras foram incubadas em um ligante biotilado contendo IgG anti-camundongo e anti-coelho (fabricante Dako REF K0675) por 30 minutos a 37° C. Foram efetuadas outras duas lavagens em PBS por 5 minutos e a incubação em Streptavidina conjugada a peroxidase de rábano (HRP) por 30 minutos a 37° C (fabricante Dako REF K0675). Este método (LSAB-Labelled Streptavidin Biotin) consiste em usar a

biotina que se liga ao anticorpo primário e em seguida, a Streptavidina conjugada a enzima que se liga a biotina, a qual é revelada com DAB (Diaminobenzidine), como descrito abaixo.

Na etapa final, foram efetuadas mais duas lavagens em PBS com 5 minutos cada, seguida pela revelação com a solução de DAB (Diaminobenzidine), na qual o tempo de revelação variou entre 30 segundos e 2 minutos. A reação foi interrompida com a lavagem das amostras em PBS. Algumas secções foram contracoradas com Hematoxilina (1 min) para melhor visualização da formação hipocampal. A montagem final das laminas foi precedida de desidratação e diafanização do material usando a seguinte bateria: álcool 70%, 80%, 90%, 100%, 100%, xilol 1 e xilol 2 (2 minutos em cada solução). Após essa fase, foi realizada a montagem com Permount (Fisher Scientific) e lamínulas para proteção tecidual. Todos os passos apresentados nessa seção seguiram o protocolo padrão do laboratório de Imunohistoquímica da Seção de Patologia (SAPAT) do Instituto Evandro Chagas (IEC). Os anticorpos que foram utilizados e sua marcação específica se encontram no quadro 3.

Anticorpos Utilizados

Corpos neuronais do hipocampo foram marcados utilizando o anticorpo anti-NeuN (1:50, LSBio), que reconhece um epítopo específico encontrado no núcleo de neurônios maduros (Mullen et al, 1992), com objetivo de avaliar os efeitos do *Status Epilepticus* no hipocampo, diretamente ligada à quantidade de neurônios, dano tecidual e celular.

Com objetivo de identificar as citocinas que estão envolvidas no processo inflamatório hipocampal, foram utilizados os anticorpos anti-IL-1b(1:100; Abcam) e anti-IL-10(1:400 Abcam), que são sinais de ativação microglial no local do tecido danificado (Li et al, 2010; Ho et al, 2015). O anticorpo anti-IL10 marca uma citocina anti-inflamatória que atua na inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o IL1 beta. A presença desta proteína pode

indicar um papel importante na regulação da inflamação e na proteção contra doenças neurodegenerativas.

Já o anticorpo anti-IL1 beta avalia a presença de uma citocina pró-inflamatória, que pode desencadear a produção de radicais livres e danificar as células nervosas. A presença elevada desta proteína pode ser indicativa de inflamação crônica e danos neurológicos.

O marcador neuronal anti-NeuN é um anticorpo que reconhece uma proteína específica presente nas células nervosas, incluindo neurônios. A presença desta proteína é usada como um indicador da presença de células nervosas saudáveis maduras na amostra de tecido.

Para distinguir as bordas da região CA2, foi utilizado o anticorpo para proteína da célula de Purkinje 4 (anti-PCP4). O gene PCP4 é responsável pela produção da proteína PCP4, também conhecida como Pep19, que influencia a interação do cálcio com a calmodulina ao aumentar a atividade da calmodulina. O cérebro tem a maior concentração de expressão de PCP4 nas células de Purkinje do cerebelo. Estudos de expressão gênica do gene PCP4 usando hibridização *in situ* em camundongos mostram forte expressão na área CA2 hipocampal (San Antonio et al., 2014).

Os anticorpos utilizados e suas marcações específicas estão sumarizados no quadro 3.

Tabela 3

Dados relativos aos anticorpos primários que serão usados neste estudo

Anticorpos	Diluição	Fabricante	Objetivo
Anticorpo policlonal anti-IL-10 feito em coelho	1:400	Abcam (ab34843)	Marcar a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10
Anticorpo policlonal anti-IL-1 β feito em coelho	1:100	Abcam (ab9722)	Marcar a expressão da citocina pró-inflamatória IL-1 β
Anticorpo monoclonal anti-NeuN de camundongo	1:50	LSBio (LS-C312122)	Marcar Neurônios maduros

Anticorpo PCP4	1:500	Sigma (AMAB913 59)	Marcar a proteína PCP4 (proteína da célula de Purkinje 4) – um peptídeo antiapoptótico de ligação à calmodulina
----------------	-------	--------------------------	---

Análise Qualitativa

A análise e documentação fotográfica das lâminas foi realizada em um microscópio óptico e binocular (Carl Zeiss, modelo Imager.Z1) acoplado ao sistema de captura de imagem AxioCam Hrc e Axio Vision. As fotomicrografias foram analisadas qualitativamente em comparação aos dados descritos na literatura acerca da ELT.

Resultados

Dados comportamentais encontrados no Modelo Experimental de Pilocarpina e análise qualitativa

Para nossa pesquisa, foram disponibilizados 30 ratos adultos da raça Wistar com peso variando entre 250 e 300 gramas. Destes, 5 foram destinados ao grupo controle (administrado solução salina) e 25 foram destinados aos grupos que passaram pelo modelo experimental de pilocarpina, e então induzidos ao *status epilepticus*. Dentre os ratos do grupo experimental, 19 não conseguiram sobreviver no determinado tempo proposto no protocolo utilizado, que é de uma hora (1h) após alcançarem o estágio 3 da escala de Racine (1972). Seis ratos conseguiram sobreviver a todos os estágios do modelo experimental de pilocarpina (Metil escopolamina – Pilocarpina – Diazepam), se mantendo em *status epilepticus* por uma hora (1h) e após, separados em dois grupos com sobrevidas diferentes, 1 dia e 7 dias. Os 19 ratos que não conseguiram sobreviver a todos os estágios do modelo experimental vieram a óbito em diferentes momentos da execução. O tempo total de execução do modelo experimental foi aproximadamente duas horas.

A avaliação do *status epilepticus* envolveu a análise qualitativa das mudanças no comportamento de convulsão dos ratos e comparação com as mudanças comportamentais descritas na Escala de Racine (1972), que demandou observar o animal durante todo o período em que estivesse apresentando convulsão e atribuir um estágio com base no comportamento observável. Os ratos que apresentaram sinais comportamentais equivalentes a crise descrita no estágio 3 – 5 da escala de Racine foram incluídos nos grupos experimentais (Mello et al., 1993).

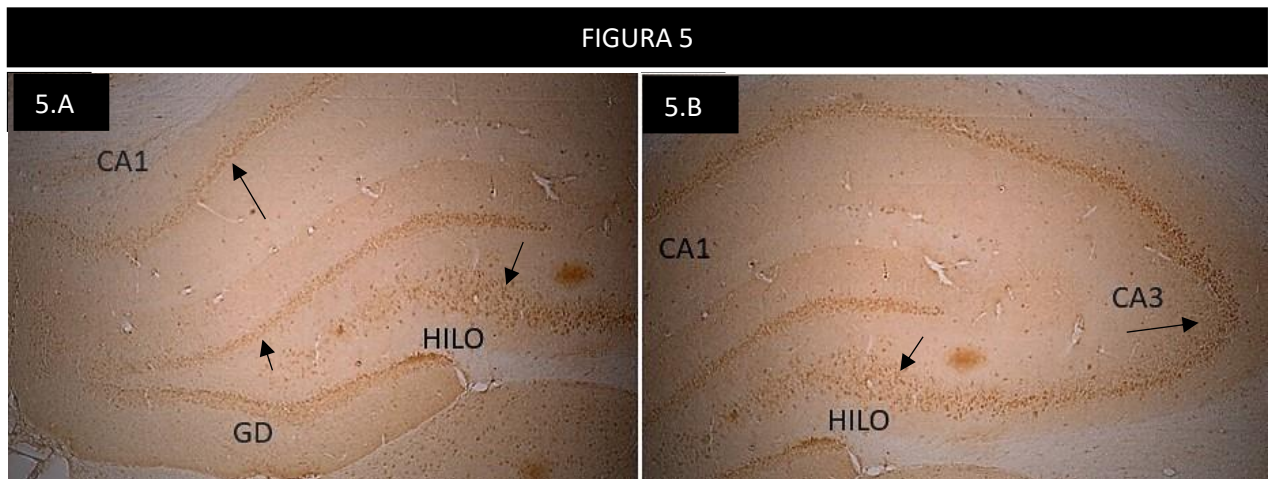
A análise qualitativa das imagens de tecido hipocampal foi realizada para avaliar a presença e a quantidade de proteínas e células específicas nas amostras do hipocampo, sendo fundamental para compreender a expressão proteica em doenças neurodegenerativas e neuroinflamatórias.

A análise foi realizada a partir de imunomarcações com diferentes anticorpos utilizados (Tabela 3), tanto no grupo controle quanto no grupo experimental: anti-IL10, anti-IL1 beta, anti-NeuN e anti-PCP4. Cada um destes anticorpos foi selecionado com o objetivo de avaliar a expressão de proteínas relevantes na regulação da inflamação e na homeostase neuronal.

Padrão geral de identificação do hipocampo

Figura 5

Fotomicrografia de hipocampos do grupo experimental de 1 dia, com marcação de anti-NeuN para visualização da estrutura e integridade hipocampal. As setas indicam corpos celulares de neurônios maduros marcados por anti-NeuN nas regiões CA1, CA3, Giro denteado (GD) e Hilo. (Figura 5A: lado esquerdo, Figura 5B: lado direito do mesmo hipocampo).



A Figura 5 exhibe, em baixo aumento (5x), a região hipocampal do grupo controle marcado com Anti-NeuN. É possível constatar a integridade tecidual do hipocampo, com todas as estruturas e características anatômicas intactas.

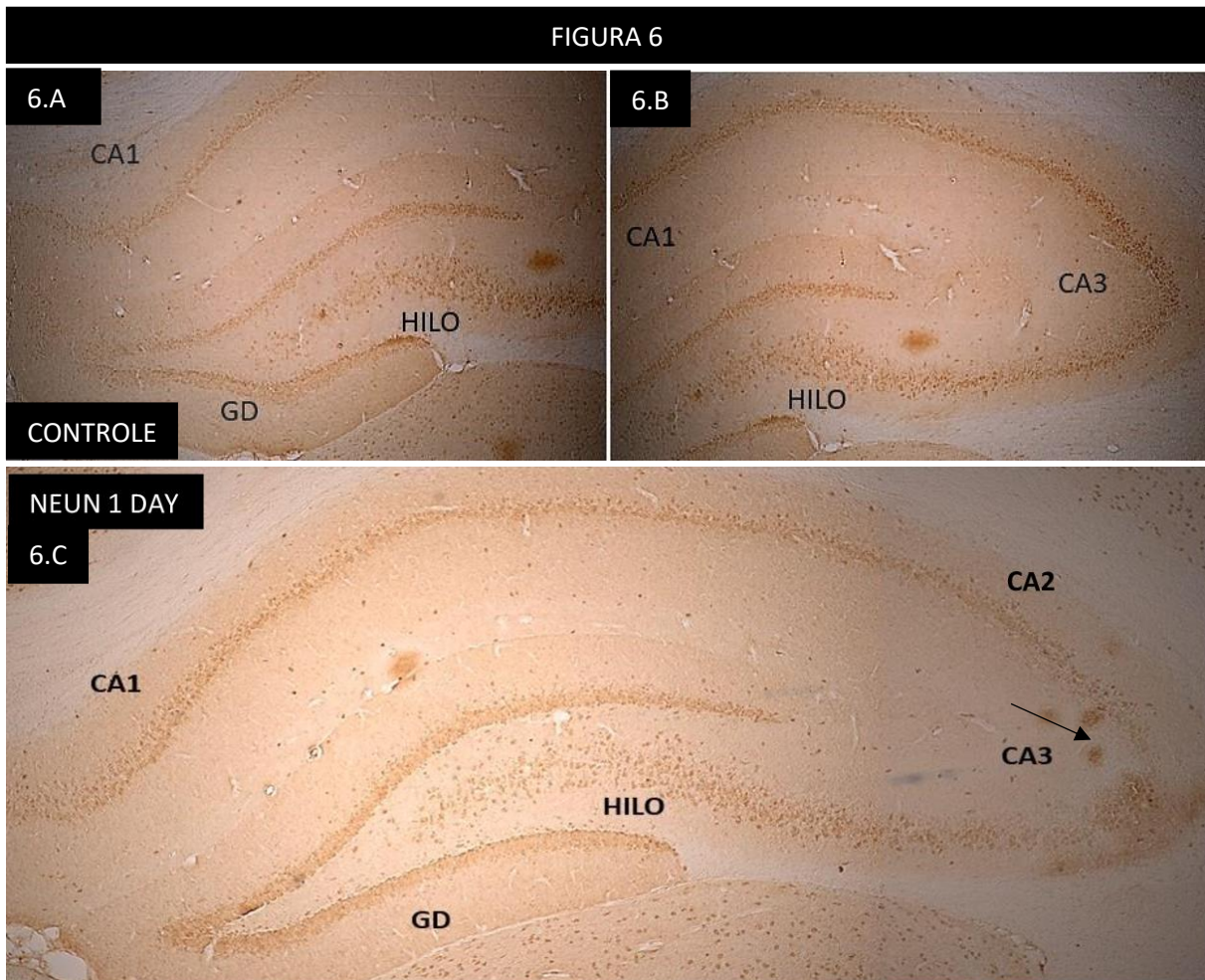
Conseguimos observar as principais características estruturais que identificam o hipocampo: Sua estrutura curva e alongada em formato em C e os subcampos hipocampais, evidenciando CA1 e CA3. Também é possível notar as camadas de neurônios maduros marcados pelo anticorpo utilizado em todas as regiões hipocampais (setas).

Padrão de morte neuronal hipocampal

A primeira abordagem experimental teve o objetivo de avaliar nos tecidos o padrão de imunomarcação de anti-NeuN no grupo controle e experimental. A figura 6 mostra que o padrão de marcação foi semelhante ao encontrado na literatura (T. Wu et al., 2017) com as células marcadas sendo evidenciadas nos campos CA1, CA2, CA3, giro denteado e Hilo nos animais controle (Figura 6.A,B) e animais experimentais (Figura 6.C). No entanto, na figura 6.C, evidencia-se qualitativamente menor imunorreatividade no padrão de anti-NeuN em CA3, o que pode estar correlacionando a morte celular ocasionada pela epilepsia induzida por pilocarpina.

Figura 6

Fotomicrografia com marcação de anti-NeuN para visualização da estrutura e integridade hipocampal. As setas indicam corpos celulares de neurônios maduros marcados por anti-NeuN nas regiões CA1, CA3, Giro denteado (GD) e Hilo. (Figura 5A: lado esquerdo, Figura 5B: lado direito do mesmo hipocampo).

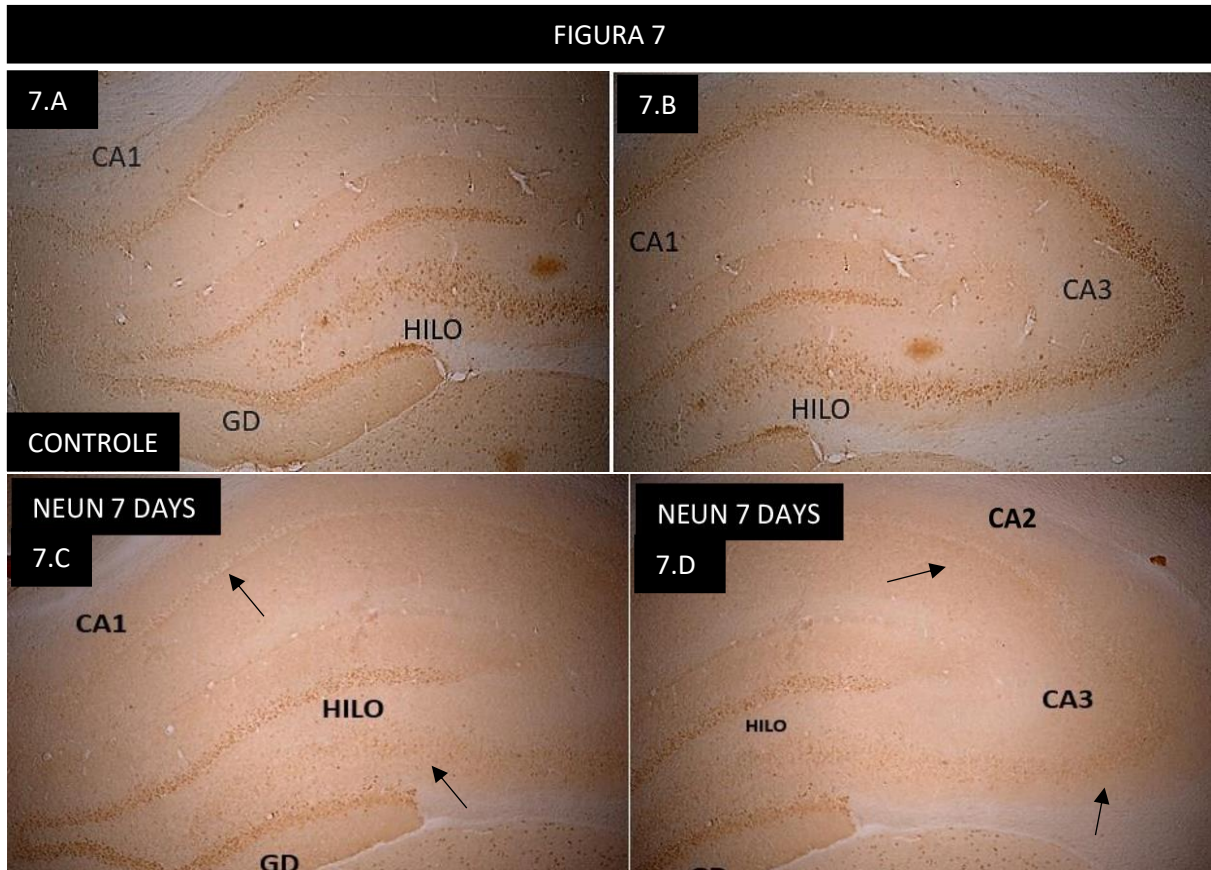


No grupo experimental de 7 dias, o padrão de imunoreatividade se mostrou alterado com uma intensa redução de padrão de marcação para NeuN nas áreas CA1, CA2, CA3 e Hilo do Giro denteado (Figura 7.C e 7.D), quando comparado ao grupo controle (Figura 7.A e 7.B).

Figura 7.

Fotomicrografia com marcação de anti-NeuN para visualização de morte neuronal. As figuras 7.A e 7.B indicam hipocampo do grupo controle, sem evidências de perda neuronal nos subcampos, Giro denteado e Hilo. As figuras 7.C e 7.D indicam hipocampo do grupo experimental por pilocarpina com sobrevivência de 7 dias após status epilepticus. As setas na

imagem 7.C e 7.D apontam que houve extensa redução da imunorreatividade para o anticorpo NeuN no subcampo CA1, CA2, CA3 e Hilo, indicando ampla morte neuronal naquelas regiões. (Figura 7A: lado esquerdo, Figura 7B: lado direito do mesmo hipocampo do grupo controle. Figura 7C: lado esquerdo, Figura 7D: lado direito do mesmo hipocampo do grupo experimental).



As Figuras 6 e 7 dos grupos experimentais inferem que o tempo pode ser determinante na progressão de morte neuronal, e conseqüentemente esclerose hipocampal, principalmente os subcampos CA1, CA2, CA3 e Hilo.

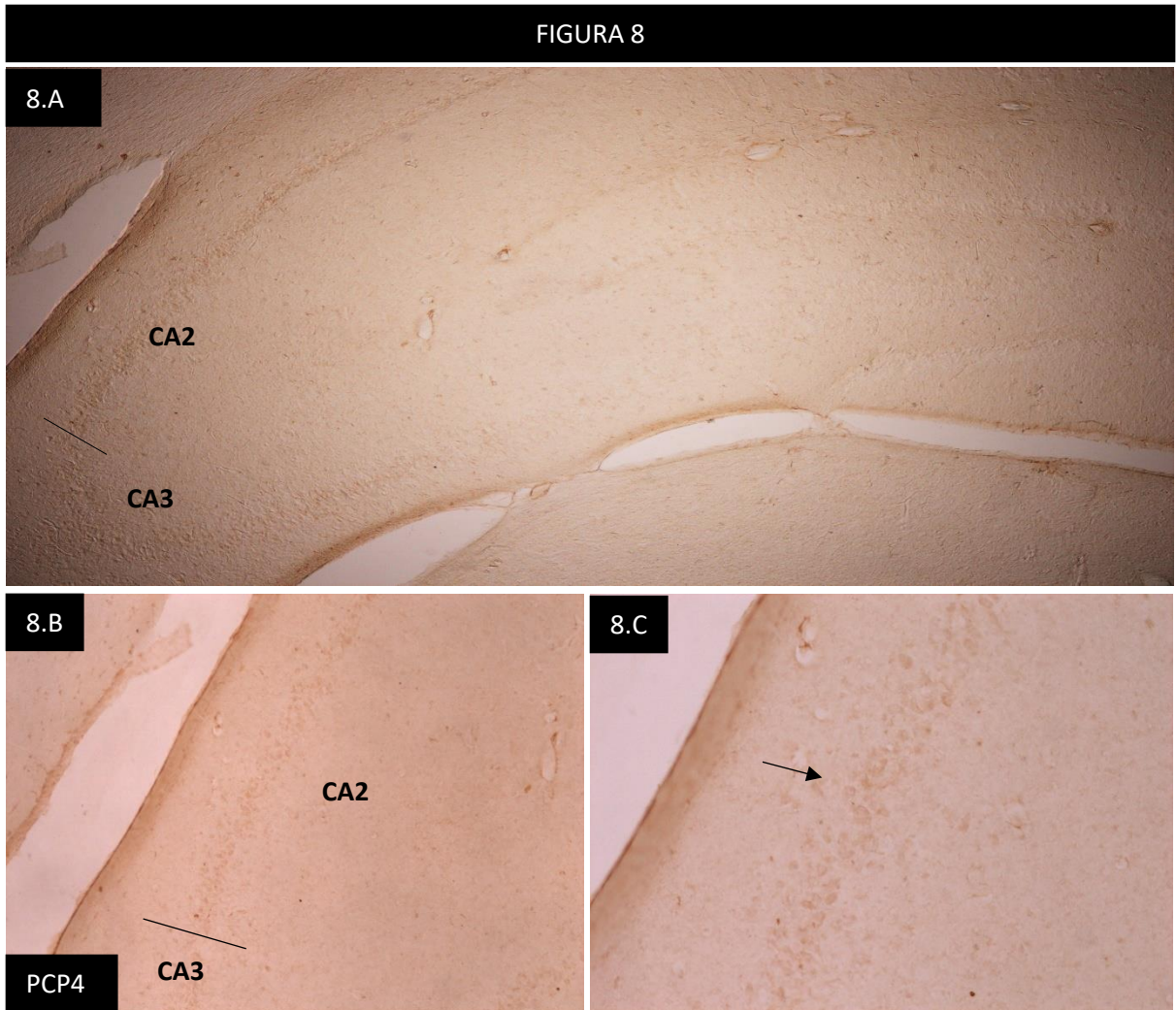
Identificação do subcampo CA2 hipocampal

As figuras 8 e 9 representam dados sobre a exata localização da região CA2 hipocampal. Na imagem 8.A conseguimos observar a estrutura do hipocampo e suas sub-regiões CA2, CA3, Giro denteado e Hilo, exibindo marcação do anticorpo anti-PCP4 na região CA2, o limite inferior de sua área (barra nas Figuras 8.A e 8.B) próximo ao subcampo CA3 e a disposição longitudinal da camada neuronal.

As figuras 8.B e 8.C sinalizam os limites horizontal, vertical e longitudinal da camada de neurônios excitatórios piramidais da região CA2. A seta na figura 8.C indica corpos celulares de neurônios piramidais, sendo possível observar seu formato e aspecto.

Figura 8.

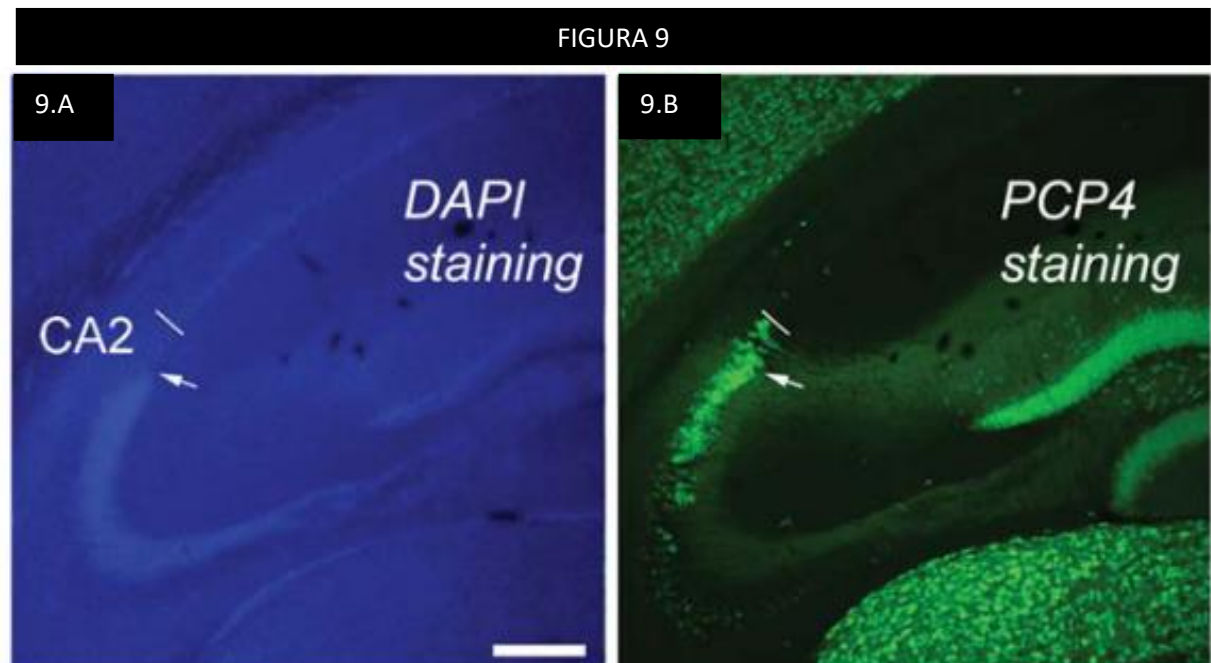
Fotomicrografia de ratos do grupo controle com marcação do anticorpo anti-PCP4 para visualização de neurônios piramidais da região de CA2. A figura 8.A corresponde ao hipocampo inteiro, exibindo sua estrutura anatômica e áreas hipocampais. A figura 8.B (barra) indica a área limítrofe entre CA2/CA3, mostrando o início da região CA2. A figura 8.C aponta para a mesma região, porém em maior aumento. A seta sinaliza a camada de corpos celulares de neurônios piramidais de CA2 hipocampal, (Objetivas - Figura 8A: 5x Figura 8B: 10x. Figura 8.C: 20x).



As figuras 9.A e 9.B representam dados encontrados na literatura que corroboram com os dados encontrados na nossa pesquisa. As imagens indicam a mesma disposição da camada de neurônios piramidais encontrados em CA2 e seus corpos celulares neuronais. Conseguimos observar na figura 9.B o limite superior (barra) e inferior da região CA2, assim como a sua disposição longitudinal no hipocampo.

Figura 9.

Dados da literatura indicando que Imunomarcção de PCP4 efetivamente delinea a região CA2 no hipocampo de camundongos adultos. (Fig 9.A: Marcação com DAPI, Fig: 9.B: Marcação com PCP4),(San Antonio et al., 2014).

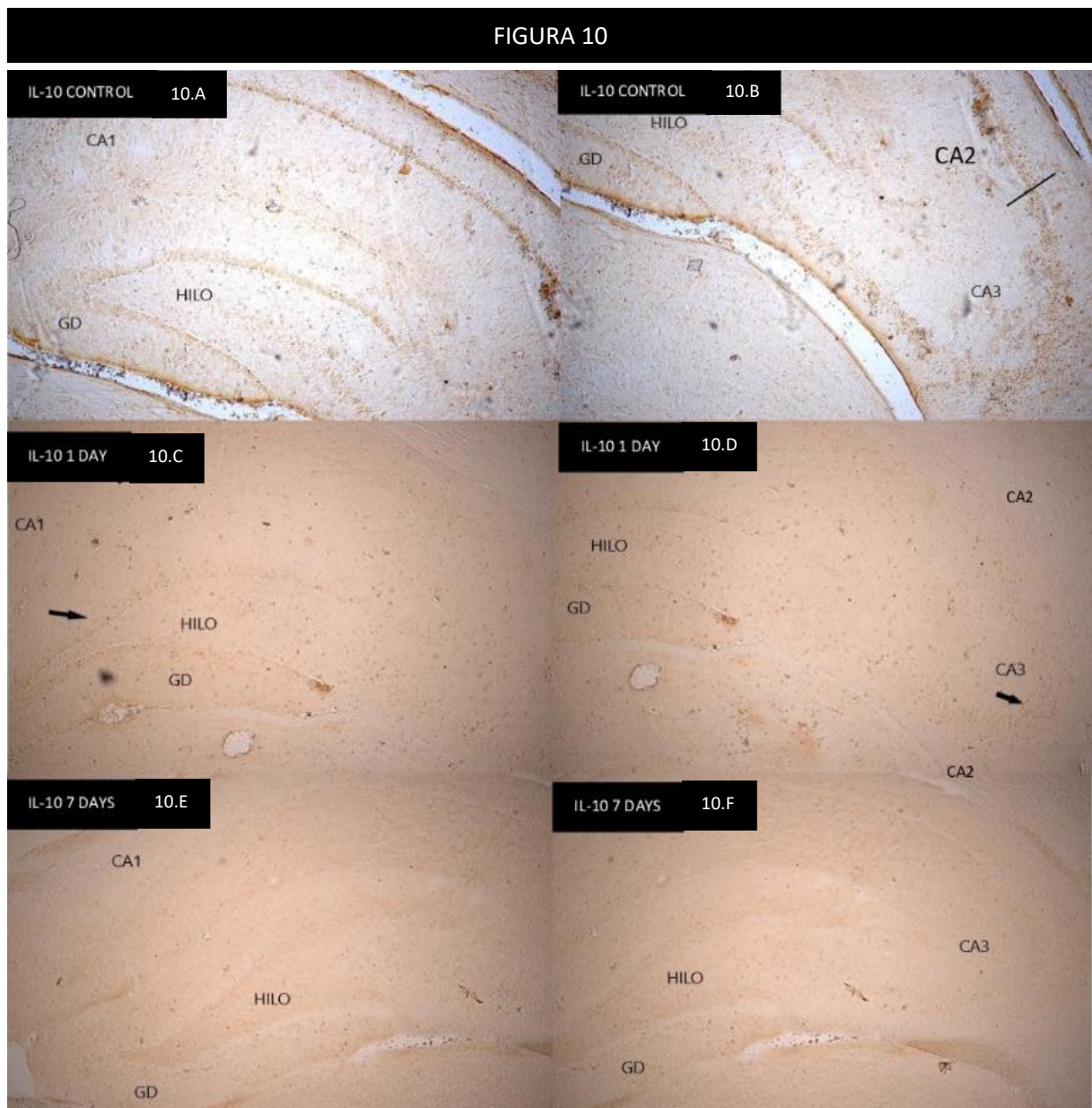


Padrão anti-inflamatório utilizando Interleucina 10 (IL-10)

A figura 10 mostra o padrão anti-inflamatório da citocina IL-10 em hipocampus pós *status epilepticus*. Podemos observar que no grupo controle (Figura 10.A e 10.B) há marcação de IL-10 em grande concentração, agindo em todo o hipocampo, indicando que esta citocina anti-inflamatória participa da homeostase neuronal em hipocampus saudáveis, desempenhando a neuroproteção basal no tecido. As figuras 10.C, D, E, F indicam que ao longo do tempo de 1 e 7 dias respectivamente, há redução da imunomarcção de IL-10 no tecido, e provável redução da proteção anti-inflamatória neuronal desempenhada por esta citocina.

Figura 10.

Fotomicrografias com marcação do anticorpo anti-IL10 pra visualização de citocinas anti-inflamatórias no hipocampo. As figuras 10.A e 10.B representam ratos do grupo controle e exibe todos os subcampos CA, Giro denteado e Hilo marcados pelo anticorpo. A barra indica a fronteira da região CA2/CA3. As figuras 10.C e 10.D representam ratos que foram sacrificados após 1 dia de status epilepticus. As setas indicam uma pequena imunorreatividade para anti-IL-10 somente em CA3 e Giro denteado. As figuras 10.E e 10.F representam ratos que foram sacrificados 7 dias pós status epilepticus. Neste grupo não foi observado marcação de anti-IL10 no hipocampo.

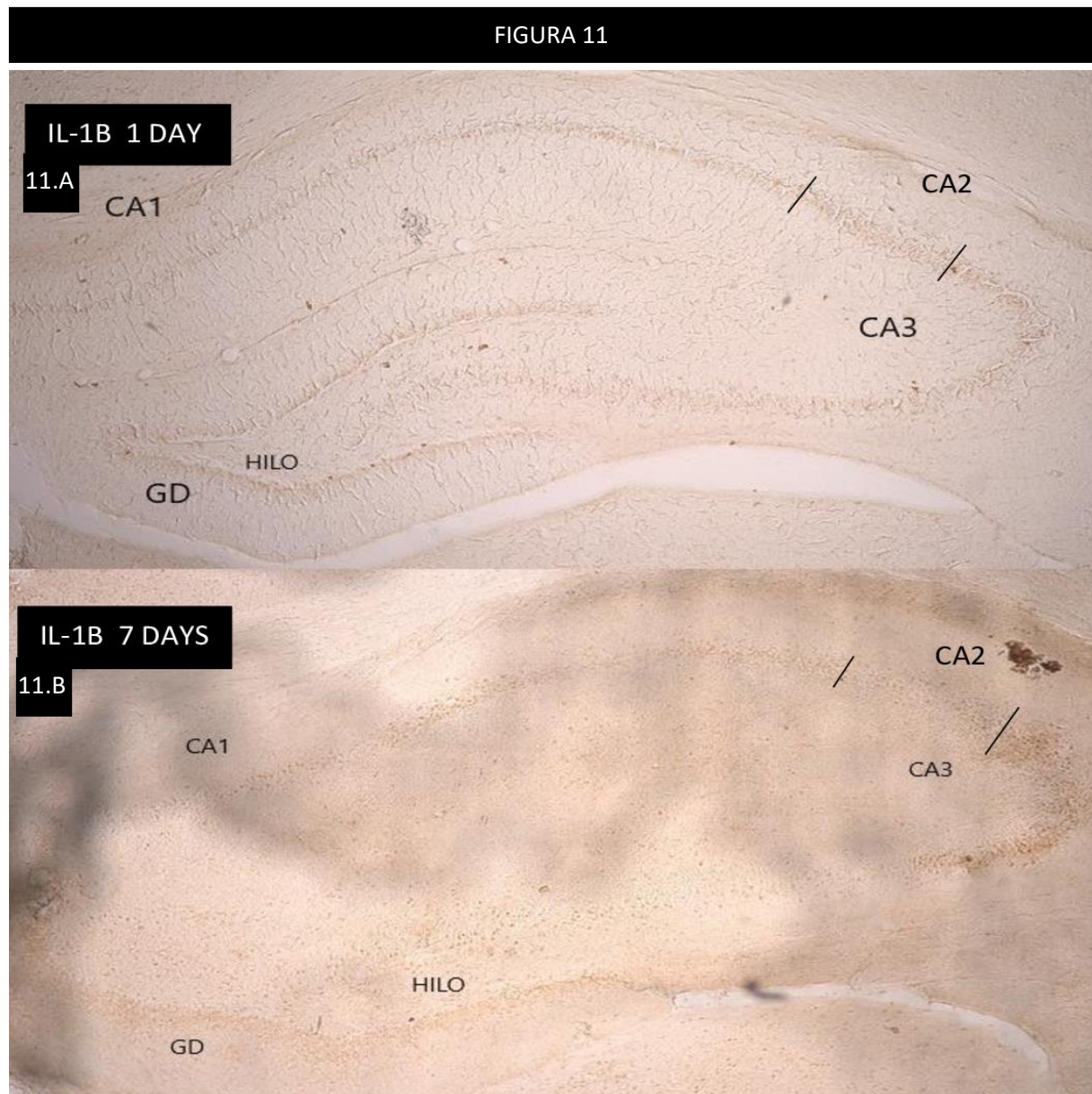


Padrão pró-inflamatório utilizando Interleucina 1 beta (IL-1 β)

A figura 11 mostra o padrão pró-inflamatório desempenhado pela citocina IL-1 β em hipocampus pós *status epilepticus*. Podemos notar na figura 11.A que após uma agressão inicial ao hipocampo, a citocina inflamatória executa seu papel nos subcampos hipocampais CA2 e CA3, indicando que há um mecanismo de processo inflamatório no local.

Figura 11.

Fotomicrografias com marcação do anticorpo anti-IL1 β pra visualização de citocinas pró-inflamatórias no hipocampo. As figuras 11.A e 11.B representam ratos do grupo experimental tratados com pilocarpina e submetidos ao status epilepticus. A figura 11.A exibe o hipocampo de ratos que foram sacrificados após 1 dia seguido de status epilepticus. É possível observar imunorreatividade de IL-1 β nas regiões CA2 e CA3. A figura 11.B exibe o hipocampo de ratos que foram sacrificados após 7 dia seguido de status epilepticus. Houve redução da expressão da citocina IL1 β na região CA2 e manutenção em CA3.



A figura 11.B aponta que, ao longo do tempo, há redução da imunorreatividade para o anticorpo anti-IL-1 β na região de CA2 e manutenção da marcação em CA3. Estes dados sugerem que o mecanismo inflamatório desempenhado pela citocina diminui na região CA2 após 7 dias, se movimentando e agindo somente na região CA3.

Discussão

Modelo experimental de Pilocarpina, preservação do tecido hipocampal e qualidade da imunohistoquímica

Este trabalho demonstrou que a indução da epilepsia do lobo temporal mesial em ratos adultos foi realizada através da utilização de pilocarpina, com o objetivo de examinar a tendência de perda neuronal e a ação de citocinas envolvidas no processo inflamatório que leva a danos no tecido hipocampal por um período pré estabelecido.

O modelo experimental de pilocarpina é amplamente utilizado para estudar o desenvolvimento e progressão de convulsões e a epilepsia do lobo temporal mesial (ELTM). A droga pilocarpina é um agonista colinérgico e, quando administrada a animais, leva à ativação de receptores muscarínicos de acetilcolina no cérebro, que resulta em uma cascata de eventos que em última análise, levam a convulsões que se originam no hipocampo (Cavalheiro et al., 2006). No entanto, uma das principais preocupações associadas a esse modelo é a alta porcentagem de morte de roedores.

Vários fatores podem contribuir para a alta taxa de mortalidade no modelo da pilocarpina. Um dos principais são as convulsões intensas e prolongadas que ocorrem, mesmo após a utilização de fármacos depressores do sistema nervoso central administrados pós *status*

epilepticus. Essas convulsões podem levar a danos cerebrais e morte neuronal, o que pode resultar na morte do animal.

Um modelo animal experimental precisa mimetizar os sintomas observados em humanos com suas principais características (Ex: convulsões, espasmos musculares, confusão mental). Também precisa estar apto para replicar os danos cerebrais encontrados em humanos (Ahmed Juvale & Che Has, 2020; Cavalheiro et al., 2006).

Em nossa pesquisa, o modelo utilizado para mimetizar os efeitos deletérios da epilepsia do lobo temporal mesial de humanos em roedores teve como objetivo promover o dano encefálico, mais especificamente no hipocampo, porém sendo capaz de manter o animal vivo na até o período de sobrevida escolhida, junto com a integridade tecidual do hipocampo.

As Figuras 6 e 7 demonstraram que o objetivo foi alcançado. Foi possível observar a integridade tecidual do hipocampo, as conformidades estruturais, sua forma em C e subcampos. A imunorreatividade positiva do anticorpo anti-NeuN nos hipocampos do grupo controle e a diminuição da marcação nos hipocampos com sobrevida de 1 e 7 dias em subcampos específicos também evidenciam que o modelo experimental foi executado corretamente, ocorrendo danos localizados, mais especificamente morte neuronal, nos subcampos hipocampais CA1, CA2 e CA3 e no Hilo do Giro denteado. Tais achados se assemelham com dados na literatura de pesquisas onde foram utilizados hipocampos íntegros estruturalmente (Botcher et al., 2014; Carstens et al., 2016; T. Wu et al., 2017).

Outro fator contribuinte para a obtenção do tecido hipocampal íntegro e preservado é a utilização de técnicas de fixação e preservação tecidual. A preservação envolve a imersão do tecido em uma solução que retarda os processos metabólicos e evita danos aos tecidos. Isso geralmente é feito usando uma solução de armazenamento a frio, como solução salina ou um crioprotetor como glicerol. A fixação, por outro lado, é o processo de reticulação química das proteínas do tecido, o que estabiliza a estrutura do tecido e evita que ele se modifique. A fixação

geralmente é feita usando um reagente químico, como paraformaldeído ou glutaraldeído, aplicado ao tecido como líquido ou gás. O tecido é deixado de molho no fixador por um período de tempo especificado, geralmente de várias horas até a noite (overnight), para permitir a penetração total e a reticulação. As Figuras 6 e 7 ratificam que o processamento histológico, preservação e fixação tecidual do encéfalo em nosso estudo foi executado com sucesso.

O processamento imunohistoquímico mostrou que conseguimos obter material histológico encefálico de qualidade. Este método de estudo do tecido oferece várias vantagens importantes que o tornam uma ferramenta valiosa na análise de amostras biológicas. Isso inclui a capacidade de visualizar e localizar proteínas e células específicas em tecidos, resultados confiáveis e reproduzíveis, oferecendo informações importantes sobre os mecanismos subjacentes da doença, como por exemplo no caso da ativação ou inibição de vias específicas (Magaki et al., 2019).

Outra vantagem de um bom processo de imunohistoquímico é sua alta sensibilidade e especificidade. Com o uso de anticorpos específicos que se ligam à proteína alvo, permite a detecção da mesma no tecido alvo. Essa alta sensibilidade permite detectar precocemente alterações de proteínas-alvo, o que pode fornecer informações importantes sobre a progressão de doenças ou a eficácia de tratamentos (Magaki et al., 2019).

Em nosso estudo, foi possível detectar com exatidão as células alvo estudadas no tecido hipocampal e alcançar os objetivos específicos propostos. As Figuras 5 - 8, 10 e 11 mostram a qualidade do processamento imunohistoquímico realizado pela clara possibilidade evidenciando a integridade das células neuronais marcadas, estrutura hipocampal e proteínas alvo.

Padrão de morte neuronal e aspectos da neuroinflamação

Para verificação de morte neuronal, usamos em nossa pesquisa o anticorpo NeuN (Neuronal Nuclear Antibody: LSBio(LS-C312122)), que é amplamente utilizado para identificar neurônios maduros no sistema nervoso central (SNC). O anticorpo é direcionado contra uma proteína expressa especificamente nos núcleos dos neurônios, tornando-o um marcador confiável para populações de células neuronais. Quando usado em procedimentos de coloração imunohistoquímica, o anticorpo NeuN se liga à proteína alvo, permitindo a visualização de células neuronais maduras. A especificidade do anticorpo permite a diferenciação de neurônios de outros tipos de células no SNC, como células gliais (Gusel'nikova & Korzhevskiy, 2015; Sarnat, 2015).

Na Figura 6 e Figura 7 foi possível observar os aspectos gerais do hipocampo marcado com anti-NeuN. A Figura 6.A-B, 7.A-B representa o hipocampo de ratos que não foram submetidos ao modelo experimental de pilocarpina e não apresentaram dano encefálico. Na figura 6.C, que por outro lado representam hipocampos de ratos que foram sacrificados 1 dia pós *status epilepticus*, conseguimos observar diminuição da marcação imunocitoquímica somente na região de CA3, sinalizando que provavelmente naquele subcampo houve redução da população de neurônios por conta da morte neuronal. Nas Figuras 7.C e Figura 7.D, representativas do hipocampo de ratos que foram sacrificados 7 dias pós *status epilepticus*, conseguimos observar densa redução da marcação do anticorpo anti-NeuN nas regiões CA1, CA2, CA3 e Hilo, que pode refletir uma provável morte neuronal naqueles subcampos específicos.

A morte neuronal é um resultado comum pós *status epilepticus*, e sua progressão ao longo do tempo pode ter um impacto significativo no resultado geral da lesão (Thom, 2014; Vezzani et al., 2013).

O foco da nossa pesquisa não permitiu quantificar o número de neurônios mortos no tecido hipocampal, porém permitiu analisar o padrão geral de imunomarcação com o passar do

tempo após a agressão inicial, quando analisamos qualitativamente a redução da densidade neuronal. Acreditamos que isso ocorra devido a uma combinação de fatores, incluindo os efeitos diretos da própria lesão e efeitos secundários do processo inflamatório instalado no hipocampo. Entretanto, será necessário que essa análise quantitativa seja feita em nossos dados para confirmação das afirmações explanadas.

Nosso estudo qualitativo corrobora com a pesquisa realizada por Dingledine em 2011, onde mostrou que após o período da agressão inicial encefálica pós *status epilepticus*, também chamada de epileptogênese, houve o aumento expressivo da citocina pró-inflamatória IL-1 β no hipocampo, em comparação com hipocampos de ratos saudáveis, relacionando este evento com o aumento das crises (Friedman & Dingledine, 2011).

Outro estudo realizado por Rojas, Gueorguieva, et al., em 2014 demonstrou o envolvimento de um receptor específico (EP1) que contribui para o aumento das crises em ratos induzidos a epilepsia quando ativado pela neuroinflamação, sendo interleucina-1 beta (IL-1 β), a ciclooxigenase 2 (COX-2), a prostaglandina E2 (PGE2) e os receptores EP1 peças-chave na cascata de eventos.

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória produzida por células imunes, como micróglia e astrócitos, em resposta a uma lesão ou infecção. Uma vez produzida, a IL-1 β atua em células imunes e neurônios para promover uma resposta imune. Isso resulta em liberação de outras citocinas pró-inflamatórias e na ativação da via da ciclooxigenase. A COX-2 é uma enzima que converte o ácido araquidônico em prostaglandinas, incluindo a PGE2. A expressão de COX-2 se torna aumentada em resposta a lesão, e sua super expressão tem sido associada à neuroinflamação crônica (Friedman & Dingledine, 2011; Rojas, Jiang, et al., 2014).

O estudo realizado por Rojas, em 2014 demonstrou que a PGE2-EP1 participa diretamente na inflamação hipocampal. A PGE2 é um potente mediador pró-inflamatório que atua em vários tipos de células, incluindo células imunes, neurônios e células gliais e está

relacionado com a ativação de receptores EP1, levando ao impulsionamento de vias de sinalização intracelular que promovem a inflamação. Os receptores EP1 são um subtipo de receptores de prostaglandina que medeiam muitas das ações da PGE2 e atualmente está sendo relacionado como um dos principais elementos que induzem a neurodegeneração (Rojas, Gueorguieva, et al., 2014).

Especificidade da região CA2 hipocampal

O hipocampo é uma estrutura complexa e altamente diferenciada dentro do cérebro, desempenhando um papel crítico em várias funções, incluindo a formação da memória e a navegação espacial, sendo dividido em vários subcampos, cada um com uma citoarquitetura, conectividade e função únicas.

Neste contexto, o subcampo CA2 é de particular interesse devido às suas propriedades exclusivas. A região CA2 do hipocampo é uma estrutura complexa e diferenciada que desempenha um papel crítico em várias funções cerebrais. Possui citoarquitetura e função distintas das outras áreas hipocampais (San Antonio et al., 2014). Usamos neste estudo o anticorpo anti-PCP4 que indica a localização de neurônios piramidais da região de CA2, demonstrando de fato que este subcampo está localizado entre os subcampos CA1 e CA3.

A fotomicrografia em menor aumento mostrado na Figura 8.A indica a exata a localização do subcampo CA2, sendo possível comparar com as outras regiões, levando-se em consideração o hipocampo inteiro, sua disposição e diferenciação com as outras regiões. Na imagem em maior aumento (figura 8.B-C) conseguimos analisar as características morfológicas dos neurônios piramidais e características estruturais do subcampo CA2.

Nossos dados sobre a localização dos neurônios e especificações estruturais da região CA2 se assemelham com a Figura 9.A e Figura 9.B, retirado de um estudo realizado por San Antonio et al., 2014 onde também foi utilizado o anticorpo anti-PCP4 para localização da região

CA2 hipocampal. Neste estudo foi apresentado dados qualitativos mostrando que a região CA2 possui características fisiológicas distintas das outras regiões hipocampais. Os autores descobriram que o subcampo CA2 exibiu uma plasticidade sináptica mais robusta em resposta a estímulos de alta frequência em comparação com os outros subcampos. Isso sugere que as sinapses do subcampo CA2 são mais facilmente modificáveis do que em outras regiões do hipocampo. Além disso, os resultados sugerem que a plasticidade sináptica no subcampo CA2 é regulada por diferentes mecanismos moleculares do que nos outros subcampos. Isso sugere que o subcampo CA2 pode ter um papel único no processamento de informações no hipocampo.

O interesse pela investigação do subcampo CA2 surgiu em decorrência de existirem poucos dados na literatura sobre o papel dessa subregião e os neurônios envolvidos na fisiologia basal. Nossa hipótese é que esta região possa ter fatores de neuroproteção intrínsecos, que impedem o avanço da degradação tecidual na inflamação em encéfalos epiléticos.

Padrão anti-inflamatório (IL-10) hipocampal

A interleucina-10 (IL-10) é uma citocina com efeitos anti-inflamatórios no sistema imunológico. É produzido por vários tipos de células, incluindo células T, células B e monócitos, e também atuando como uma molécula imunorreguladora. Tem um impacto versátil na imunorregulação e inflamação em todo o corpo em resposta à neuroinflamação. Além dessas funções, a IL-10 também tem a capacidade de controlar a transmissão sináptica e facilitar a plasticidade neuronal. Durante a maioria das doenças que afetam o sistema nervoso central, a expressão de IL-10 é aumentada, o que leva ao controle benéfico da neuroinflamação e promove a sobrevivência de neurônios e células gliais no cérebro, contrariando os efeitos nocivos das citocinas inflamatórias (Moore et al., 2001; Nenov et al., 2019).

Nosso estudo propôs verificar o papel da IL-10 no hipocampo de ratos após sofrerem *status epilepticus* com sobrevida de 1 e 7 dias. Na Figura 10.A e Figura 10.B é possível observar

que todos os subcampos hipocampais de ratos do grupo controle foram marcados com IL-10, demonstrando que a IL-10 desempenha o papel anti-inflamatório sob condições fisiológicas normais.

Os dados apresentados corroboram com os estudos realizados por Levin & Godukhin, 2017, demonstrando que citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β 1 têm ação neuroprotetora rápida contra distúrbios da atividade funcional basal do encéfalo.

As Figuras 10.C-10.F representam hipocampos lesionados de ratos com 1 dia e 7 dias, respectivamente, de sobrevida pós *status epilepticus*. As imagens demonstraram que a imunorreatividade da interleucina 10 está reduzida em todo o hipocampo, indicando que esta citocina provavelmente não é a principal atuante neuroprotetora anti-inflamatória do hipocampo que apresentava lesão neuronal e tecidual em ratos tratados com Pilocarpina.

Estes dados obtidos se assemelham ao estudo realizado por Kamaltdinova, Pershina, Mikheeva, Bugaev-Makarovskiy, & Arkhipov em 2021, onde foi realizado um modelo neurotóxico baseado na administração de cloreto de trimetil-estanho (TMT). Uma das causas da morte neuronal neste modelo após a intoxicação por TMT é neuroinflamação excessiva, indicado pela regulação positiva do gene da ciclooxigenase-2 (COX-2). Os resultados apresentados demonstraram que as principais estruturas encefálicas atingidas foram o córtex pré-frontal e hipocampo, sendo observado também aumento significativo na quantidade de IL-10 no córtex pré-frontal e a falta de síntese proteica de IL-10 no hipocampo. Os autores relatam que a baixa expressão de IL-10 no hipocampo é uma das razões para o aumento de morte neuronal hipocampal após o tratamento com TMT.

Um ponto importante a ser comentado é que outras citocinas atuam no sistema imunológico no corpo humano e participam na regulação da anti-inflamação tecidual, como no caso das IL-4, IL-11, IL-13. Novos estudos necessitam ser realizados pois há a probabilidade das citocinas citadas estarem atuando no hipocampo como agente neuroprotetor.

Padrão inflamatório (IL-1 β) diferenciado em CA2 hipocampal

Nas Figuras 11.A e Figura 11.B podemos notar o comportamento da citocina IL-1 β no tecido hipocampal. É possível também observar desigualdades encontradas nas camadas neuronais de CA2 e CA3 que ajudaram a diferenciá-los. A Figura 11.A mostra hipocampo de ratos que foram sacrificados pós *status epilepticus* em 1 dia. Foi possível observar que a elevada expressão de IL-1 β nos subcampos CA2 e CA3 refletiu ao processo inflamatório que estava ocorrendo naquele local, no primeiro dia em que o cérebro foi exposto a uma agressão inicial causada pela Pilocarpina.

A Figura 11.B nos mostrou que ao longo do tempo, a expressão do anticorpo anti-IL-1 β diminuiu na região de CA2 e se manteve na região de CA3. Nossos dados sugerem que por um período de 7 dias, ocorreu de forma contínua o desenvolvimento dos mecanismos epileptogênicos e reorganização neuronal na região CA3 de hipocampos de ratos tratados com Pilocarpina. Por outro lado, esses mesmos mecanismos inflamatórios podem estar tendo seu desenvolvimento reduzido no subcampo CA2 por fatores ainda desconhecidos. Na literatura atual não existem dados que esclarecem o fator que interfere na redução da atividade pró-inflamatória da interleucina 1 beta na região CA2 hipocampal.

Ao que parece, existem fatores neuroprotetores intrínsecos no hipocampo que impedem a ação da IL-1 β determinada pelo tempo. Algumas hipóteses podem ser levantadas como mecanismos neuroprotetores de CA2.

Um estudo realizado por Jiang et al., 2012 analisou a família de receptores EPs, que são amplamente expressos em neurônios e células da glia e são ativados na cascata inflamatória mediada pela IL-1 β - COX-2 – PGE2. Os pesquisadores perceberam que o receptor EP2 ativado promove inflamação no tecido neural, e então desenvolveram uma molécula antagonista ao

receptor, que ao se ligar após *SE* induzido por pilocarpina, promoveu redução da neurodegeneração no hipocampo.

Outro estudo realizado pelos mesmos pesquisadores em 2013 utilizou o mesmo delineamento de estudo porém desenvolvendo um novo antagonista mais seletivo para o receptor EP2. Os pesquisadores conseguiram demonstrar que a administração sistêmica do novo antagonista e a inibição do receptor EP2 em camundongos submetidos ao *SE* pelo modelo experimental de pilocarpina promoveu redução da mortalidade tardia, recuperação da perda de peso, redução da inflamação encefálica e neuroproteção hipocampal, sem modificar o padrão das convulsões agudas (Jiang et al., 2013).

A hipótese levantada de mecanismos intrínsecos neuroprotetores atuantes na região CA2 hipocampal é sobre uma estrutura existente no hipocampo, que consiste em um tipo específico de matriz extracelular e está intimamente ligada a superfície de neurônios maduros, dendritos e axônios do SNC chamada de Rede Perineuronal (RPN) (Bitanhirwe & Woo, 2015; Brückner et al., 1993).

Ainda não está claro todas as funções que a RPN desempenha no sistema nervoso central. Os principais papéis relacionados a RPN é de estabilização e depressão sináptica, participando na homeostase iônica em volta de neurônios com alta atividade neuronal. Em função dessas características, a RPN tem sido relacionada a uma verdadeira barreira contra a plasticidade excitabilidade neuronal excessiva, características que são desenvolvidas em hipocampos expostos a epileptogênese (Alpár et al., 2006; Carstens et al., 2016).

E outra possibilidade a ser investigada é de que outras citocinas anti-inflamatórias além da IL-10 podem estar agindo na região CA2 hipocampal proporcionando efeito neuroprotetor. A capacidade das citocinas anti-inflamatórias de regular a resposta imune no SNC é crucial para manter a função adequada e prevenir inflamação excessiva e dano tecidual. As citocinas anti-inflamatórias ajudam a atenuar essa resposta, controlando a intensidade e a duração da resposta

inflamatória. Podem atuar nessa neuroproteção hipocampal as interleucinas IL-4, IL-11 e IL-13, por exemplo.

Próximos Passos

O estudo recente realizado sobre as interleucinas e a neuroproteção hipocampal foi importante para identificar possíveis mecanismos envolvidos nesse processo. Entretanto, é importante destacar que o estudo foi realizado apenas com análise qualitativa por dificuldades encontradas na jornada, como por exemplo a interrupção desta pesquisa em decorrência da pandemia do Covid-19. Isso significa que foram observados padrões e comportamentos, mas sem medições precisas ou estatísticas.

Para que possamos entender melhor a relação entre as interleucinas e a neuroproteção hipocampal, é necessário realizar uma análise quantitativa desse estudo. Dessa forma, será possível medir e quantificar o efeito das interleucinas na neuroproteção hipocampal de forma mais precisa.

Além disso, é importante destacar que outras citocinas também podem estar envolvidas no processo de neuroproteção hipocampal. Portanto, é fundamental investigar outras citocinas, além das interleucinas já identificadas no estudo, para obter uma compreensão mais completa dos mecanismos envolvidos nesse processo.

Considerações finais

Em resumo, o modelo experimental de pilocarpina utilizado foi eficaz em mimetizar os efeitos deletérios da ELTM em ratos, promovendo a indução do *status epilepticus*, dano localizado em subcampos hipocampais e morte neuronal.

A análise comportamental dos padrões encontrados no momento das crises por meio observacional foi realizada com sucesso utilizando a escala de Racine (1972).

Utilizando o anticorpo anti-PCP4, esta pesquisa conseguiu localizar com exatidão e analisar as características oculares da região CA2 hipocampal

A citocinas anti-inflamatória IL-10 não parece ser a principal citocina neuroprotetora da região de CA2, pois observamos um padrão discreto de imunorreatividade em CA1, CA3 e GD no grupo de 1 dia e ausência de imunorreatividade em todas as áreas do CA, Giro denteado e Hilo para o grupo 7 dias.

A citocina inflamatória IL-1 β observada em CA2 e CA3 no grupo de 1 dia, bem como a menor expressão dessa citocina na região CA2 do grupo com sobrevivida 7 dias, pode estar relacionada a uma possível migração da inflamação ao longo do tempo impulsionada por fatores neuroprotetores, como rede Perineuronal, receptor EP2 e outras citocinas anti-inflamatórias envolvidas no processo.

Referências

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). *Imunologia Celular e Molecular* (8ª Edição). Elsevier.

Aboud, O., Mrak, R. E., Boop, F. A., & Griffin, W. S. T. (2014). Epilepsy:

Neuroinflammation, neurodegeneration, and APOE genotype. *Acta Neuropathologica Communications*, 2(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-1-41>

Ahmed Juvale, I. I., & Che Has, A. T. (2020). The evolution of the pilocarpine animal model of status epilepticus. *Heliyon*, 6(7), e04557.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04557>

Alpár, A., Gärtner, U., Härtig, W., & Brückner, G. (2006). Distribution of pyramidal cells associated with perineuronal nets in the neocortex of rat. *Brain Research*, 1120(1), 13–

22. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.08.069>

- Andersen, P., Morris, R., Amaral, D., Bliss, T., & O'Keefe, J. (2007). *The Hippocampus Book* (1^o). Oxford University Press, Inc.
- Arnò, B., Grassivaro, F., Rossi, C., Bergamaschi, A., Castiglioni, V., Furlan, R., Greter, M., Favaro, R., Comi, G., Becher, B., Martino, G., & Muzio, L. (2014). Neural progenitor cells orchestrate microglia migration and positioning into the developing cortex. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms6611>
- Babb, T. L., Brown, W. J., Pretorius, J., Davenport, C., Lieb, J. P., & Crandall, P. H. (1984). Temporal Lobe Volumetric Cell Densities in Temporal Lobe Epilepsy. *Epilepsia*, 25(6), 729–740. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1984.tb03484.x>
- Berger, A. (2000). Science commentary: Th1 and Th2 responses: What are they? *Bmj*, 321(7258), 424. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7258.424>
- Bernardino, L., Xapelli, S., Silva, A. P., Jakobsen, B., Poulsen, F. R., Oliveira, C. R., Vezzani, A., Malva, O., & Zimmer, J. (2005). *Modulator Effects of Interleukin-1 α and Tumor Necrosis Factor- α on AMPA-Induced Excitotoxicity in Mouse Organotypic Hippocampal Slice Cultures*. 25(29), 6734–6744. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1510-05.2005>
- Bitanhirwe, B. K. Y., & Woo, T.-U. W. (2015). HHS Public Access. In *Neuroscience and biobehavioral reviews* (Vol. 45). <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.03.018>.Perineuronal
- Blaylock, R. (2013). Immunology primer for neurosurgeons and neurologists part 2: Innate brain immunity. *Surgical Neurology International*, 4(1), 118. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.118349>
- Blümcke, I. (2009). Neuropathology of focal epilepsies: A critical review. *Epilepsy and Behavior*, 15(1), 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.02.033>

- Blümcke, I., Thom, M., Aronica, E., Armstrong, D. D., Bartolomei, F., Bernasconi, A., Bernasconi, N., Bien, C. G., Cendes, F., Coras, R., Cross, J. H., Jacques, T. S., Kahane, P., Mathern, G. W., Miyata, H., Moshé, S. L., Oz, B., Özkara, Ç., Perucca, E., ... Spreafico, R. (2013). International consensus classification of hippocampal sclerosis in temporal lobe epilepsy: A Task Force report from the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*, *54*(7), 1315–1329. <https://doi.org/10.1111/epi.12220>
- Borsini, A., Zunszain, P. A., Thuret, S., & Pariante, C. M. (2015). The role of inflammatory cytokines as key modulators of neurogenesis. *Trends in Neurosciences*, *38*(3), 145–157. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.12.006>
- Botcher, N. A., Falck, J. E., Thomson, A. M., & Mercer, A. (2014). Distribution of interneurons in the CA2 region of the rat hippocampus. *Frontiers in Neuroanatomy*, *8*(September), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00104>
- Brückner, G., Brauer, K., Härtig, W., Wolff, J. R., Rickmann, M. J., Derouiche, A., Delpech, B., Girard, N., Oertel, W. H., & Reichenbach, A. (1993). Perineuronal nets provide a polyanionic, glia-associated form of microenvironment around certain neurons in many parts of the rat brain. *Glia*, *8*(3), 183–200. <https://doi.org/10.1002/glia.440080306>
- Carstens, K. E., Phillips, M. L., Pozzo-Miller, L., Weinberg, R. J., & Dudek, S. M. (2016). Perineuronal Nets Suppress Plasticity of Excitatory Synapses on CA2 Pyramidal Neurons. *Journal of Neuroscience*, *36*(23), 6312–6320. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0245-16.2016>
- Cavalheiro, E. A., Naffah-Mazzacoratti, M. G., Mello, L. E., & Leite, J. P. (2006). The Pilocarpine Model of Seizures. In *Models of Seizures and Epilepsy*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-012088554-1/50037-2>
- Cramer, J. A., Blum, D., Reed, M., & Fanning, K. (2003). The influence of comorbid

- depression on quality of life for people with epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 4(5), 515–521. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2003.07.009>
- Cramer, J. a, Brandenburg, N., & Xu, X. (2005). Differentiating anxiety and depression symptoms in patients with partial epilepsy. *Epilepsy & Behavior : E&B*, 6(4), 563–569. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2005.02.017>
- Cristina, E., Toscano, D. B., Leandro, É., Vieira, M., Carolina, A., Carvalho, D., Vidigal, M., Aparecida, J., Brant, S., Varella, A., Kimie, C., Elaine, R., Leite, P., Nitrini, R., Alvarenga, M., & Lúcio, A. (2020). Epilepsy & Behavior Microgliosis is associated with visual memory decline in patients with temporal lobe epilepsy and hippocampal sclerosis : A clinicopathologic study. *Epilepsy & Behavior*, 102, 106643. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2019.106643>
- Curfs, J. H. A. J., Meis, J. F. G. M., & Hoogkamp-Korstanje, J. A. A. (1997). A primer on cytokines: Sources, receptors, effects, and inducers. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4), 742–780. <https://doi.org/10.1128/cmr.10.4.742>
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L., & Gan, W. B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature Neuroscience*, 8(6), 752–758. <https://doi.org/10.1038/nn1472>
- De La Torre, E., Genaro, A. M., Ribeiro, M. L., Pagotto, R., Pignataro, O. P., & Sales, M. E. (2008). Proliferative actions of muscarinic receptors expressed in macrophages derived from normal and tumor bearing mice. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1782, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.11.005>
- de Oliveira, C. M. B., Sakata, R. K., Issy, A. M., Gerola, L. R., & Salomão, R. (2011). Citocinas e Dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61, 255–265. <https://doi.org/10.1590/S0034-70942011000200014>

- Devinsky, O. (1993). Clinical Uses of the Quality-of-Life in Epilepsy Inventory. *Epilepsia*, 34(SUPPL. 4), S34–S38.
<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed6&NEWS=N&AN=23254034>
- Devinsky, O., Vezzani, A., Najjar, S., Lanerolle, N. C. De, & Rogawski, M. A. (2012). Glia and epilepsy : excitability and inflammation. *Trends in Neurosciences*, 4, 1–11.
<https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.008>
- Devinsky, O., Vickrey, B. G., Cramer, J., Perrine, K., Hermann, B., Meador, Yk., & Hays, R. D. (1995). Lippincott-Raven Publishers. *Epilepsia*, 36(11), 1089–1090.
- Dupont, S., Samson, Y., Nguyen-Michel, V. H., Zavanone, C., Clémenceau, S., Miles, R., Baulac, M., & Adam, C. (2015). Are auras a reliable clinical indicator in medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis? *European Journal of Neurology*, 22(9), 1310–1316. <https://doi.org/10.1111/ene.12747>
- Elomaa, O., Sankala, M., Pikkarainen, T., Bergmann, U., Tuutila, A., Raatikainen-ahokas, A., Sariola, H., & Tryggvason, K. (1998). *Structure of the Human Macrophage MARCO Receptor and Characterization of Its Bacteria-binding Region* *. 273(8), 4530–4538.
- Feng, B., Tang, Y., Chen, B., Xu, C., Wang, Y., Dai, Y., Wu, D., Zhu, J., Wang, S., Zhou, Y., Shi, L., Hu, W., Zhang, X., & Chen, Z. (2016). Transient increase of interleukin-1 β after prolonged febrile seizures promotes adult epileptogenesis through long-lasting upregulating endocannabinoid signaling. *Scientific Reports*, 6(June 2015), 1–11.
<https://doi.org/10.1038/srep21931>
- Fernandes, M. J. da S. (2013). Epilepsia do lobo temporal: mecanismos e perspectivas. *Estudos Avan?Ados*, 27(77), 85–98. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142013000100007>
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J.,

- Forsgren, L., French, J. A., Glynn, M., Hesdorffer, D. C., Lee, B. I., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Perucca, E., Scheffer, I. E., Tomson, T., Watanabe, M., & Wiebe, S. (2014). ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, *55*(4), 475–482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
- Fisher, R. S., Cross, J. H., D’Souza, C., French, J. A., Haut, S. R., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshé, S. L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I. E., Schulze-Bonhage, A., Somerville, E., Sperling, M., Yacubian, E. M., & Zuberi, S. M. (2017). Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*, *58*(4), 531–542. <https://doi.org/10.1111/epi.13671>
- Fisher, R. S., Van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J. (2005a). Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, *46*(4), 470–472. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x>
- Fisher, R. S., Van Emde Boas, W., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., & Engel, J. (2005b). Response: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE) [4]. *Epilepsia*, *46*(10), 1701–1702. https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2005.00273_4.x
- Friedman, A., & Dingledine, R. (2011). Molecular cascades that mediate the influence of inflammation on epilepsy. *Epilepsia*, *52*(SUPPL. 3), 33–39. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03034.x>
- Geissmann, F., Mans, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells. *Science*, *656*(2010). <https://doi.org/10.1126/science.1178331>
- Gomes-Leal, W. (2012). Microglial physiopathology: How to explain the dual role of

microglia after acute neural disorders? *Brain and Behavior*, 2(3), 345–356.

<https://doi.org/10.1002/brb3.51>

Grote, A., Heiland, D. H., Taube, J., Helmstaedter, C., Ravi, V. M., Will, P., Hattingen, E., Schüre, J. R., Witt, J. A., Reimers, A., Elger, C., Schramm, J., Becker, A. J., & Delev, D. (2023). “Hippocampal innate inflammatory gliosis only” in pharmacoresistant temporal lobe epilepsy. *Brain : A Journal of Neurology*, 146(2), 549–560.

<https://doi.org/10.1093/brain/awac293>

Gusel’nikova, V. V., & Korzhevskiy, D. E. (2015). NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker. *Acta Naturae*, 7(2), 42–47.

<https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-2-42-47>

Helmut, K., Hanisch, U. K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia.

Physiological Reviews, 91(2), 461–553. <https://doi.org/10.1152/physrev.00011.2010>

Ho, Y., Lin, Y., Wu, C. J., Chao, Y., Chang, A. Y. W., & Chan, J. Y. H. (2015). Peripheral inflammation increases seizure susceptibility via the induction of neuroinflammation and oxidative stress in the hippocampus. *Journal of Biomedical Science*, 1–14.

<https://doi.org/10.1186/s12929-015-0157-8>

Hoeksema, M. A., & De Winther, M. P. J. (2016). Epigenetic Regulation of Monocyte and Macrophage Function. *Antioxidants and Redox Signaling*, 25(14), 758–774.

<https://doi.org/10.1089/ars.2016.6695>

Hume, D. A. (2015). The many alternative faces of macrophage activation. *Frontiers in Immunology*, 6(JUL), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00370>

Jeong, H.-K., Ji, K., Min, K., & Joe, E.-H. (2013). Brain Inflammation and Microglia: Facts and Misconceptions. *Experimental Neurobiology*, 22(2), 59.

<https://doi.org/10.5607/en.2013.22.2.59>

- Ji, K., Akgul, G., Wollmuth, L. P., & Tsirka, S. E. (2013). Microglia Actively Regulate the Number of Functional Synapses. *PLoS ONE*, 8(2).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056293>
- Jiang, J., Ganesh, T., Du, Y., Quan, Y., Serrano, G., Qui, M., Speigel, I., Rojas, A., Lelutiu, N., & Dingledine, R. (2012). Small molecule antagonist reveals seizure-induced mediation of neuronal injury by prostaglandin E2 receptor subtype EP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8), 3149–3154.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1120195109>
- Jiang, J., Quan, Y., Ganesh, T., Pouliot, W. A., Dudek, F. E., & Dingledine, R. (2013). Inhibition of the prostaglandin receptor EP2 following status epilepticus reduces delayed mortality and brain inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(9), 3591–3596.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1218498110>
- Kamaltdinova, E., Pershina, E., Mikheeva, I., Bugaev-Makarovskiy, N., & Arkhipov, V. (2021). Different Activation of IL-10 in the Hippocampus and Prefrontal Cortex During Neurodegeneration Caused by Trimethyltin Chloride. *Journal of Molecular Neuroscience*, 71(3), 613–617. <https://doi.org/10.1007/s12031-020-01682-w>
- Kilias, A., Tulke, S., Barheier, N., Ruther, P., & Häussler, U. (2023). Integration of the CA2 region in the hippocampal network during epileptogenesis. *Hippocampus*, 33(3), 223–240. <https://doi.org/10.1002/hipo.23479>
- Leite, J. P., & Cavalheiro, E. A. (1995). Effects of conventional antiepileptic drugs in a model of spontaneous recurrent seizures in rats. *Epilepsy Research*, 20(2), 93–104.
[https://doi.org/10.1016/0920-1211\(94\)00070-D](https://doi.org/10.1016/0920-1211(94)00070-D)
- Levin, S. G., & Godukhin, O. V. (2017). Modulating effect of cytokines on mechanisms of

- synaptic plasticity in the brain. *Biochemistry (Moscow)*, 82(3), 264–274.
<https://doi.org/10.1134/S000629791703004X>
- Lin, E., Calvano, S. E., & Lowry, S. F. (2000). Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*, 127(2), 117–126. <https://doi.org/10.1067/msy.2000.101584>
- Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An introduction to the performance of immunohistochemistry. *Methods in Molecular Biology*, 1897, 289–298.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25
- Maizuliana, H., Usui, N., Terada, K., Kondo, A., & Inoue, Y. (2020). Clinical, semiological, electroencephalographic, and neuropsychological features of “pure” neocortical temporal lobe epilepsy. *Epileptic Disorders*, 22(1), 55–65. <https://doi.org/10.1684/epd.2020.1132>
- Marín-Teva, J. L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., Van Rooijen, N., & Mallat, M. (2004). Microglia Promote the Death of Developing Purkinje Cells. *Neuron*, 41(4), 535–547.
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(04\)00069-8](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(04)00069-8)
- Maroso, M., Balosso, S., Ravizza, T., Liu, J., Bianchi, M. E., & Vezzani, A. (2011). Interleukin-1 type 1 receptor/Toll-like receptor signalling in epilepsy: The importance of IL-1beta and high-mobility group box 1. *Journal of Internal Medicine*, 270(4), 319–326.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2011.02431.x>
- Mello, E. A. M., Cavalheiro, Z. A., Tan, A. M., Kupfer, W. R., Pretorius, J. K., Babb, T. L., & Finch, D. M. (1993). *Circuit Mechanisms of Seizures in the Pilocarpine Model of Chronic Epilepsy: Cell Loss and Mossy Fiber Sprouting*. 34(6), 985–995.
- Monasor, L. S., Müller, S. A., Colombo, A. V., Tanriover, G., König, J., Roth, S., Liesz, A., Berghofer, A., Piechotta, A., Prestel, M., Saito, T., Saido, T. C., Herms, J., Willem, M., Haass, C., Lichtenthaler, S. F., & Tahirovic, S. (2020). Fibrillar A β triggers microglial proteome alterations and dysfunction in alzheimer mouse models. *ELife*, 9, 1–33.

<https://doi.org/10.7554/eLife.54083>

- Moore, K. W., Malefyt, R. D. W., Robert, L., & Garra, A. O. (2001). Interleukin -10 and the Interleukin -10 Receptor. *Molecular and Cellular Biology*, *1*(1), 683–765.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11244051>
- Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology*, *8*(12), 958–969. <https://doi.org/10.1038/nri2448>
- Murillo-Rodriguez, E., Pandi-Perumal, S. R., & Montii, J. M. (2019). Cannabinoids and Neuropsychiatric Disorders. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*.
<http://www.springer.com/series/5584>
- Nenov, M. N., Malkov, A. E., Konakov, M. V., & Levin, S. G. (2019). Interleukin-10 and transforming growth factor- β 1 facilitate long-term potentiation in CA1 region of hippocampus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *518*(3), 486–491. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.072>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Neuroforum*, *11*(3), 95–96.
<https://doi.org/10.1515/nf-2005-0304>
- Pacheco, F. C., & Cardoso, E. M. (2012). Imunidade e Inflamação Inata. In Lidel (Ed.), *Fundamentos de imunologia* (2^o Edição, pp. 57–102).
- Pacheco, R., Contreras, F., & Prado, C. (2012). Cells, Molecules and Mechanisms Involved in the Neuro-Immune Interaction. *Cell Interaction*. <https://doi.org/10.5772/48367>
- Pan, W., Song, X., Hu, Q., & Zhang, Y. (2021). *expression to alleviate epilepsy in cellular and rodent models*. *13*(10), 14416–14432.
- Pasti, L., Volterra, A., Pozzan, T., & Carmignoto, G. (1997). *Intracellular Calcium Oscillations in Astrocytes : A Highly Plastic , Astrocytes In Situ*. *17*(20), 7817–7830.

- Racine, R. J. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 32(3), 281–294.
[https://doi.org/10.1016/0013-4694\(72\)90177-0](https://doi.org/10.1016/0013-4694(72)90177-0)
- Rojas, A., Gueorguieva, P., Lelutiu, N., Quan, Y., Shaw, R., & Dingledine, R. (2014). The prostaglandin EP1 receptor potentiates kainate receptor activation via a protein kinase C pathway and exacerbates status epilepticus. *Neurobiology of Disease*, 70, 74–89.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2014.06.004>
- Rojas, A., Jiang, J., Ganesh, T., Yang, M. S., Lelutiu, N., Gueorguieva, P., & Dingledine, R. (2014). Cyclooxygenase-2 in epilepsy. *Epilepsia*, 55(1), 17–25.
<https://doi.org/10.1111/epi.12461>
- Romagnani, S. (1999). Th1/Th2 cells. *Inflammatory Bowel Diseases*, 5(4), 285–294.
<https://doi.org/10.1097/00054725-199911000-00009>
- Rouach, N., & Glenn, Q. (2016). *Progress in Neurobiology Astrocytes as new targets to improve cognitive functions*. 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.01.003>
- Sajja, V. S. S. S., Hlavac, N., & Vandevord, P. J. (2016). *Role of Glia in Memory Deficits Following Traumatic Brain Injury : Biomarkers of Glia Dysfunction*. 10(February).
<https://doi.org/10.3389/fnint.2016.00007>
- San Antonio, A., Liban, K., Ikrar, T., Tsyganovskiy, E., & Xu, X. (2014). Distinct physiological and developmental properties of hippocampal CA2 subfield revealed by using anti-Purkinje cell protein 4 (PCP4) immunostaining. *Journal of Comparative Neurology*, 522(6), 1333–1354. <https://doi.org/10.1002/cne.23486>
- Sarnat, H. B. (2015). Immunocytochemical markers of neuronal maturation in human diagnostic neuropathology. *Cell and Tissue Research*, 359(1), 279–294.
<https://doi.org/10.1007/s00441-014-1988-4>

- Scheffer, I. E., Berkovic, S., Capovilla, G., Connolly, M. B., French, J., Guilhoto, L., Hirsch, E., Jain, S., Mathern, G. W., Moshé, S. L., Nordli, D. R., Perucca, E., Tomson, T., Wiebe, S., Zhang, Y. H., & Zuberi, S. M. (2017). ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, *58*(4), 512–521. <https://doi.org/10.1111/epi.13709>
- Seeley, R. R., Stephens, T. D., Tate, P., Eckel, C. M., & Regan, J. L. (2008). *Anatomy Physiology Eighth Edition*. McGraw-Hill Companies Inc., 1266. www.mhhe.com
- Shigemoto-Mogami, Y., Hoshikawa, K., Goldman, J. E., Sekino, Y., & Sato, K. (2014). Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *Journal of Neuroscience*, *34*(6), 2231–2243. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1619-13.2014>
- Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., & Allavena, P. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, *86*(5), 1065–1073. <https://doi.org/10.1189/jlb.0609385>
- Steve, T. A., Jirsch, J. D., & Gross, D. W. (2014). Quantification of subfield pathology in hippocampal sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Epilepsy Research*, *108*(8), 1279–1285. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2014.07.003>
- Streit, W. J., Braak, H., Xue, Q. S., & Bechmann, I. (2009). Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, *118*(4), 475–485. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0556-6>
- Streit, W. J., Khoshbouei, H., & Bechmann, I. (2020). Dystrophic microglia in late-onset Alzheimer's disease. *Glia*, *68*(4), 845–854. <https://doi.org/10.1002/glia.23782>
- Szyndler, J., Wierzba-Bobrowicz, T., Skórzewska, A., Maciejak, P., Walkowiak, J.,

- Lechowicz, W., Turzyńska, D., Bidziński, A., & Płaźnik, A. (2005). Behavioral, biochemical and histological studies in a model of pilocarpine-induced spontaneous recurrent seizures. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *81*(1), 15–23.
<https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.01.020>
- Taylor, D. C., & Lochery, M. (1987). Temporal lobe epilepsy: Origin and significance of simple and complex auras. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, *50*(6), 673–681. <https://doi.org/10.1136/jnnp.50.6.673>
- Thom, M. (2014). Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: A neuropathology review. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, *40*(5), 520–543.
<https://doi.org/10.1111/nan.12150>
- Turner, M. D., Nedjai, B., Hurst, T., & Pennington, D. J. (2014). Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1843*(11), 2563–2582.
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.05.014>
- Turski, W. A., Cavalheiro, E. A., Schwarz, M., Czuczwar, S. J., Kleinrok, Z., & Turski, L. (1983). Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: Behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behavioural Brain Research*, *9*(3), 315–335. [https://doi.org/10.1016/0166-4328\(83\)90136-5](https://doi.org/10.1016/0166-4328(83)90136-5)
- Ueno, M., Fujita, Y., Tanaka, T., Nakamura, Y., Kikuta, J., Ishii, M., & Yamashita, T. (2013). Layer v cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nature Neuroscience*, *16*(5), 543–551. <https://doi.org/10.1038/nn.3358>
- Vezzani, A., Aronica, E., Mazarati, A., & Pittman, Q. J. (2013). Epilepsy and brain inflammation. *Experimental Neurology*, *244*, 11–21.
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.09.033>

Vezzani, A., French, J., Bartfai, T., & Baram, T. Z. (2011). The role of inflammation in epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, 7(1), 31–40.

<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2010.178>

Vezzani, A., & Granata, T. (2005). *Brain_Inflammation_Epilepsy*. 46(11), 1–20.

Vezzani, A., Moneta, D., Richichi, C., Aliprandi, M., Burrows, S. J., Ravizza, T., Perego, C., & Grazia De Simoni, M. (2002). Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia*, 43(SUPPL. 5), 30–35. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.43.s.5.14.x>

Vinet, J., Vainchtein, I. D., Spano, C., Giordano, C., Bordini, D., Curia, G., Dominici, M., Boddeke, H. W. G. M., Eggen, B. J. L., & Biagini, G. (2016). Microglia are less pro-inflammatory than myeloid infiltrates in the hippocampus of mice exposed to status epilepticus. *Glia*, 64(8), 1350–1362. <https://doi.org/10.1002/glia.23008>

Walker, L., & Sills, G. J. (2012). Inflammation and Epilepsy : The Foundations for a New Therapeutic Approach in Epilepsy ? *Epilepsy Currents*, 12(11), 8–12.

Wetherington, J., Serrano, G., & Dingledine, R. (2008). *Review Astrocytes in the Epileptic Brain*. 168–178. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.002>

Woods, J. A., Lu, Q., Ceddia, M. A., & Lowder, T. (2000). Exercise-induced modulation of macrophage function. *Immunology and Cell Biology*, 78(5), 545–553. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2000.00960.x>

Wu, L., Li, Y., Yu, M., Yang, F., Tu, M., & Xu, H. (2018). Notch signaling regulates microglial activation and inflammatory reactions in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Neurochemical Research*, 43(6), 1269–1282. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2544-5>

Wu, T., Ido, K., Osada, Y., Kotani, S., Tamaoka, A., & Hanada, T. (2017). The

neuroprotective effect of perampanel in lithium-pilocarpine rat seizure model. *Epilepsy Research*, May, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2017.06.002>

Zhang, J.-M., & An, J. (2009). Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin.*, 69(2), 482–489. <https://doi.org/10.1097/AIA.0b013e318034194e>.Cytokines