



Universidade Federal do Pará

Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento

Programa de Pós-graduação em Neurociências e Comportamento

Análise Quantitativa de Neurônios e Interleucina - 1 beta em ratos submetidos a *Status Epilepticus* pelo Modelo de Pilocarpina

Rebeca De Melo Araujo Brasil

Outubro/2024

Belém-PA



Universidade Federal do Pará

Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento

Programa de Pós-graduação em Neurociências e Comportamento

**Análise Quantitativa de Neurônios e Interleucina - 1 beta em ratos que submetidos
Status Epilepticus pelo Modelo de Pilocarpina**

Projeto submetido ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento como requisito para obtenção do título de Mestre do Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento, UFPA.

Orientadora: Prof.^a Dra. Silene Maria Araujo De Lima

Coorientador: Prof.^a Dra. Edna Cristina Santos Franco

Outubro/2024

Belém-PA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

- B823a Brasil, Rebeca de Melo Araujo Brasil.
Análise Quantitativa de Neurônios e Interleucina - 1 beta
em ratos submetidos a Status Epilepticus pelo Modelo de
Pilocarpina / Rebeca de Melo Araujo Brasil Brasil. — 2024.
45 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof^a. Dra. Silene Maria Araujo de Lima de
Lima
Coorientação: Prof^a. Dra. Edna Cristina Santos Franco
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento, Programa
de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento,
Belém, 2024.
1. epilepsia. 2. modelo animal. 3. neuroinflamação.
4. análise quantitativa. 5. citocinas. I. Título.

CDD 570



Universidade Federal do Pará

Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento

Programa de Pós-graduação em Neurociências e Comportamento

Análise Quantitativa de Neurônios e Interleucina - 1 beta em ratos que submetidos

***Status Epilepticus* pelo Modelo de Pilocarpina**

Candidato (a): Rebeca De Melo Araujo Brasil

Data do Exame de Defesa: Outubro/ 2024

Resultado:

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Silene Maria Araujo De Lima – Orientadora

Prof.^a. Prof.^a Dra. Edna Cristina Santos Franco – Coorientadora

Prof. Dr. Fernando Allan de Farias Rocha – Membro

Prof.^a. Dra. Maria Luisa da Silva – Membro

Prof.^a. Dra. Hellen Vivianni Veloso Corrêa – Suplente

Agradecimentos

Neste trabalho agradeço a Deus pela possibilidade de iniciar e concluir este curso e este texto no PPGNC.

Aos meus pais e irmã (Francy, Brasil e Anna), que apoiaram e esperaram pelos resultados deste projeto, com paciência e alegria.

As minhas orientadoras Silene Lima e Edna Cristina que me receberam em seus laboratórios e me acompanharam durante a pesquisa.

Ao Bruno, colega de laboratório, e em muitos momentos, também um coorientador.

Aos professores Paulo Goulart, Vivianni Veloso e Rafael Picanço, os quais muito me ensinaram nas suas disciplinas sobre metodologia da pesquisa e bioestatística.

Aos colegas do curso Ana Carolina, Priscila, Yan, Bruna, Alzilene, estes me auxiliaram em vários momentos nas aulas.

E a ABC² Belém, onde pude conversar sobre a importância das técnicas de laboratório para estudar epilepsia.

Agradeço muito a Deus por tudo isso.

Resumo

A epilepsia é a predisposição de desenvolver crises epiléticas espontâneas e recorrentes. Ela é uma das doenças do sistema nervoso mais comuns na população mundial e cerca de 30% dos pacientes apresentam Epilepsia Refratária, por isso existe grande interesse em desenvolver novas formas de tratamento e estudar a fisiopatologia da doença em modelos animais. Uma das principais epilepsias refratárias é a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT), que costuma apresentar lesão na região do hipocampo denominada de Esclerose Hipocampal (EH), por isso o hipocampo é um dos focos epiléticos mais estudados. Tradicionalmente um aumento da expressão de IL - 1 beta e da ativação microglial são característicos de processo inflamatório no sistema nervoso. A resposta inflamatória é uma forma de defesa contra agressões no local, mas quando exagerada pode aumentar o dano no tecido, inclusive na epilepsia. Neste trabalho para identificar e quantificar a tendência de perda neuronal e processo inflamatório no hipocampo, após *Status epilepticus* induzido por pilocarpina foram usados 11 animais sobreviventes divididos em 3 grupos: Grupo controle (n=5), apenas solução salina sem ser induzido à crises epiléticas, com tempo de sobrevivência de 7 dias; Grupo pilocarpina 1 dia (n=3), animais com sobrevivência até 1 dia após a indução das crises; Grupo pilocarpina 7 dias (n=3), animais com sobrevivência de até 7 dias após a indução das crises. Em seguida, foi feita a extração dos encéfalos e teste imunohistoquímico com anticorpo anti-NeuN e anti-IL-1beta, para contagem celular no padrão de marcação. Todos os esforços foram aplicados para evitar o estresse excessivos dos animais durante os procedimentos. A morfologia do hipocampo e a marcação das células com o anticorpo Anti-NeuN foi observada nos três grupos, o grupo controle apresentou mais células do que os demais, já a marcação Anti-IL-1beta foi mais fraca nos grupos controle e reduzida no grupo pilocarpina 7 dias, e com maior intensidade e expressão no grupo pilocarpina 1 dia, os grupos foram comparados com o teste estatístico Kruskal-Wallis e não apresentaram diferenças significativas, porém um padrão

de acordo com o previsto em estudo anterior do nosso grupo que pode ser investigado com outras amostragens sobre o desenvolvimento do processo inflamatório e sua migração para as diferentes áreas hipocâmpais e reafirmamos a relevância da prevenção e tratamento precoce das crises.

Palavras-chaves: epilepsia; modelo animal; neuroinflamação; análise quantitativa; citocinas.

Abstract

Epilepsy is the predisposition to develop spontaneous and recurrent epileptic seizures. It is one of the most common diseases of the nervous system in the world population and around 30% of patients have Refractory Epilepsy, which is why there is great interest in developing new forms of treatment and studying the pathophysiology of the disease in animal models. One of the main refractory epilepsies is Temporal Lobe Epilepsy (TLE), which usually presents a lesion in the hippocampal region called Hippocampal Sclerosis (HS), which is why the hippocampus is one of the most studied epileptic foci. Traditionally, an increase in IL-1 beta expression and microglial activation are characteristic of an inflammatory process in the nervous system. The inflammatory response is a form of defense against local aggression, but when exaggerated it can increase tissue damage, including in epilepsy. In this study, to identify and quantify the tendency of neuronal loss and inflammatory process in the hippocampus after Status epilepticus induced by pilocarpine, 11 surviving animals were divided into 3 groups: Control group (n=5), only saline solution without being induced to epileptic seizures, with a survival time of 7 days; Pilocarpine group 1 day (n=3), animals surviving up to 1 day after seizure induction; Pilocarpine 7-day group (n=3), animals surviving up to 7 days after seizure induction. Then, the brains were extracted and immunohistochemical testing was performed with anti-NeuN and anti-IL-1beta antibodies to count cells in the marking pattern. Every effort was made to avoid excessive stress to the animals during the procedures. The morphology of the hippocampus and the labeling of cells with the Anti-NeuN antibody was observed in the three groups, the control group presented more cells than the others, Anti-IL-1beta marking was weaker in the control groups and reduced in the 7-day pilocarpine group, and with greater intensity and expression in the 1-day pilocarpine group, the groups were compared using the Kruskal-Wallis statistical test and did not show significant differences, but a pattern was observed in accordance with that predicted in a previous study that can be investigated with other samples about the development of the

inflammatory process and its migration to the different hippocampal areas and we reaffirm the relevance of prevention and early treatment of crises.

Keywords: epilepsy, animal model, neuroinflammation, quantitative analysis, cytokines

Lista de Siglas e Abreviaturas

ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BSA	Bovine Serum Albumin
DAB	Diaminobenzidine
EEG	Eletroencefalograma
EH	Esclerose Hipocampal
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
ELTM	Epilepsia do Lobo Temporal Mesial
HRP	Horseradish Peroxidase
IL-1beta, IL-1β, IL-1b	Interleucina - 1 beta
ILAE	International League Against Epilepsy
KA	Ácido Caínico
LSAB	Labelled Streptavidin Biotin
NeuN	Anticorpo NeuN
PBS	Solução Tampão Fosfato
PILO	Pilocarpina
SE	<i>Status Epilepticus</i>
WHO	World Health Organization

Lista de Figuras

Figura 1 <i>Representação do hipocampo.</i>	15
Figura 2 <i>Indicação dos Subcampos do Hipocampo.</i>	16
Figura 3 <i>Perda celular nos Subcampos do Hipocampo</i>	16
Figura 4 <i>Componentes das respostas inflamatórias.</i>	21
Figura 5 <i>Representação das etapas da Metodologia.</i>	28
Figura 6 <i>Representação do retículo de contagem.</i>	29
Figura 7 <i>Fotomicrografias do Hipocampo.</i>	30
Figura 8 <i>Quantificação de neurônios e expressão de interleucinas-1b.</i>	33
Figura 9 <i>Expressão de interleucinas-1b.</i>	35

Lista de Tabelas

Tabela 1 <i>Comportamento na Escala de Racine.</i>	19
Tabela 2 <i>Papel atribuído a interleucina - 1 beta.</i>	22
Tabela 3 <i>Anticorpos Primários Utilizados.</i>	27
Tabela 4 <i>Quantidade de células marcadas por indivíduo/rato.</i>	31
Tabela 5 <i>Quantidade de células marcadas por grupo.</i>	31
Tabela 6 <i>Estatística Descritiva NeuN.</i>	32
Tabela 7 <i>Estatística Descritiva IL-1b</i>	32

Sumário

Lista de Siglas e Abreviaturas	10
Lista de Figuras	11
Lista de Tabelas	12
Introdução	14
Objetivo Geral	23
<i>Objetivos específicos:</i>	23
Método	23
Animais	24
Procedimentos de Indução das crises por modelo de pilocarpina de <i>Status Epilepticus</i> (SE).	24
<i>Perfusão e craniotomia</i>	25
<i>Imunohistoquímica</i>	26
Análise quantitativa	28
Análise estatística	29
Resultados	30
Discussão	34
Considerações finais	37
Referências	38

O termo "Epilepsia" identifica um conjunto de condições neurológicas crônicas caracterizadas por crises convulsivas periódicas e imprevisíveis (Engel, 1995). Na epilepsia há um desequilíbrio na excitabilidade neuronal, de forma que as células estão constantemente excitadas, despolarizando, o que provoca os sintomas das crises epiléticas. A terminologia para a Epilepsia é constantemente atualizada pela Liga Internacional Contra Epilepsia (ILAE).

Crises epiléticas são sinais e sintomas, motores ou não, que evidenciam uma função anormal do encéfalo devido à atividade excitatória excessiva e síncrona dos neurônios. Convulsão é um termo mais utilizado para crises epilética com envolvimento motor e o *Status epilepticus* (SE) se refere às crises de longas durações (Blume et al., 2001; Fisher et al., 2014; Fisher et al., 2017a; Fisher et al., 2017b). Neste último, as crises podem durar mais de trinta minutos, o que aumenta o risco de lesões no tecido nervoso. Por isso, orienta-se observar os pacientes no local das crises até 5 minutos, e após esse período, a recomendação é encaminhar o paciente para o atendimento médico (Meldrum & Brierley, 1973; Turski et al., 1983; Glauser, 2007; Albuquerque & Cendes, 2011).

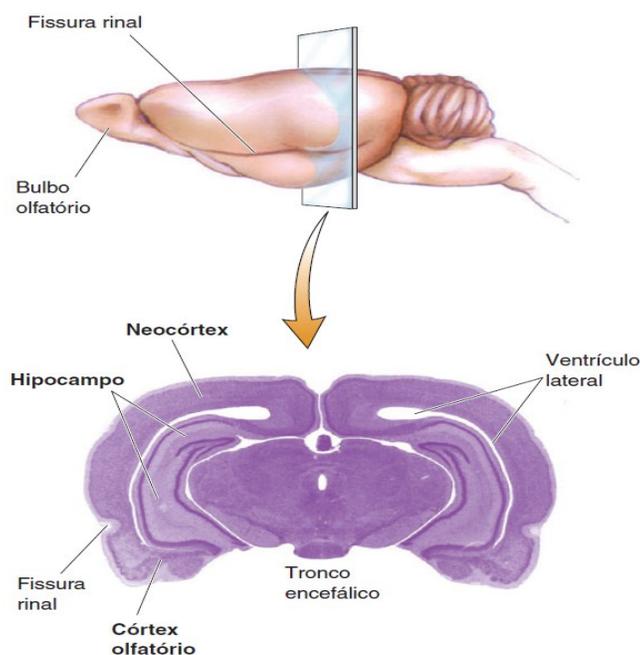
A Epilepsia é a predisposição do paciente de manifestar crises epiléticas recorrentes e espontâneas, então um paciente que apresentou uma única crise epilética ou crise decorrente de um Acidente Vascular Cerebral (AVC), trauma ou infecção não será diagnosticado necessariamente com epilepsia (Fisher et al., 2014). Por sua vez, as Síndromes Epiléticas possuem características típicas que ocorrem juntas, como tipo de crise, resultado do Eletroencefalograma (EEG) e comorbidades, como exemplo das Síndromes de Dravet e Lennox-Gastaut (Scheffer et al., 2017).

A epilepsia é uma das doenças do sistema nervoso mais recorrentes na população mundial, e motiva a comunidade científica em busca de medicamentos para as crises (World Health Organization [WHO], 2015; WHO, 2019). Ao longo do tempo, várias classes de medicamentos antiepiléticos foram sendo desenvolvidos, entretanto cerca de 30% dos pacientes com epilepsia apresentam resistência aos medicamentos disponíveis, caso

conhecido como Epilepsia Refratária (Kwan et al., 2010). Por isso, existe grande interesse em desenvolver novas formas de tratamento para a epilepsia, entre as quais estão: cirurgias; técnicas de neuromodulação, uso de dieta cetogênica, e participação do sistema endocanabinoide (Sander, 1993; Kwan et al., 2010; Perucca & Gilliam, 2012; Yacubian et al., 2014). Uma das epilepsias refratárias mais comuns é a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) (Fernandes, 2013; Nakahara, 2018) considerada focal, por acometer a região específica que lhe nomeia, nesse tipo frequentemente se encontra uma lesão na forma de perda neuronal na região do hipocampo conhecida como Esclerose Hipocampal (EH) (Babb et al., 1984; Blümcke, 2009) outros achados patológicos, também presentes, são neurodegeneração (perda de células nervosas), neurogênese (produção de novos neurônios), assim como, gliose (aumento de células gliais), brotamento axonal e alteração na matriz extracelular (Thom, 2014; Cristina et al., 2020). Por isso, o hipocampo é um dos principais focos epiléticos estudados (Figura 1).

Figura 1

Representação do hipocampo

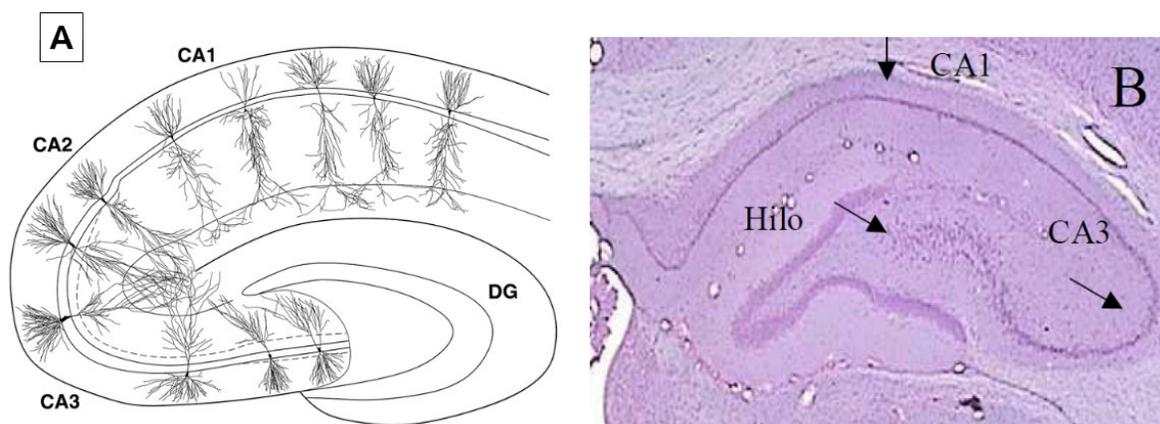


Nota. Corte coronal do encéfalo de rato Fonte: Bear *et al.*(2017).

O hipocampo é uma estrutura localizada no Lobo Temporal compondo o sistema límbico, ele é conhecido por função relacionada com memória e aprendizagem e ter uma constituição anatômica dividida em subcampos nomeados de Ca1, Ca2, Ca3, Ca4 (Giro denteado) e Hilo (Andersen et al., 2007).

Figura 2

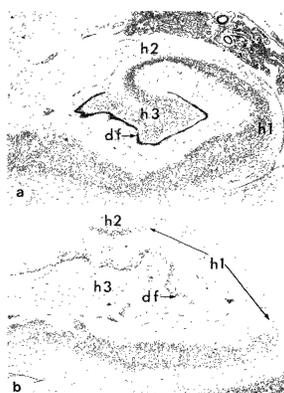
Indicação dos Subcampos do Hipocampo



Nota. A: subcampos Ca1; Ca2; Ca3 e Giro Denteado. Fonte: Ishizuka et al. (1995); Andersen et al. (2007). B: subcampos Ca1; Ca3 e hilo em rato Wistar com epilepsia. Fonte Scorza et al. (2006).

Figura 3

Perda celular nos Subcampos do Hipocampo



Nota. Áreas anteriormente conhecidas como H1 (Sommer), H2 e H3. A figura mostra perda celular principalmente em H1 e H3, porém mais preservada em setor resistente H2. (Falconer, 1974)

Na epilepsia comumente encontra-se perda neuronal nas regiões hipocâmpais Ca1, Ca3, Ca4, com menor dano na região Ca2, mais preservada por processos ainda não bem conhecidos, mas que levou a um maior interesse dos pesquisadores para essas áreas mais lesionadas (Falconer, 1974; Margerison & Corsellis, 1966; Scorza et al., 2006), contudo, observa-se um crescente interesse para a região Ca2, pelos pesquisadores (Whitebirch et. al, 2022; Dudek et al., 2023).

Modelos experimentais com animais são usados para reproduzir total ou parcialmente características clínicas que podem ser comparadas com aquelas vistas nos seres humanos ou outras espécies. Os modelos animais de epilepsia podem ser do tipo agudo e do tipo crônico o qual necessita de maior cuidado, trabalho e custo econômico. Esses modelos reproduzem crises epiléticas recorrentes ao longo do tempo, a fim de observar aspectos fisiopatológicos semelhantes aos de pacientes com epilepsia. (Garcia et al., 2009). Os modelos de epilepsia podem ser classificados segundo o tipo de crise que eles provocam: modelos de crises focais, modelos de crises generalizadas e modelos de *Status epilepticus* (SE). Os modelos de crises focais pelo uso de substâncias convulsivas ou estimulação elétrica promovem uma agressão inicial, para provocar uma lesão com potencial de gerar crises, que podem ser usados em modelos de crises agudas, após essa fase ocorre um período de latência, ausência de crises e com alterações estruturais e funcionais do tecido nervoso até a fase crônica, na qual um estado de hiperexcitabilidade proporciona crises epiléticas recorrentes e espontâneas. (Garcia et al., 2009)

Os modelos de crises generalizadas utilizam animais geneticamente modificados, ou espécies que tenham uma predisposição para apresentar crises epiléticas, entre os tipos de crises generalizadas pode-se elencar: crises de ausências, crises reflexas e crises tônico-clônica generalizada. Os modelos de *Status epilepticus*, principalmente pela administração sistêmica de ácido caínico (KA) ou pilocarpina (PILO), tentam explicar mecanismos fisiopatológicos relacionados ao *Status epilepticus*, os déficits neurológicos relacionados e

auxiliar na busca de tratamentos eficazes. Os modelos de SE permitem observar tanto as mudanças anatômicas na fase tardia, como mudanças que ocorrem na fase inicial durante a epileptogênese.(Garcia et al., 2009).

Um modelo animal ideal apresentaria tanto características clínicas das doenças, como as suas causas, entretanto este modelo ainda não foi encontrado. Os modelos são selecionados pelo seu desenho e objetivos da pesquisa (Garcia et al., 2009). O modelo de epilepsia por Pilocarpina é estudado desde 1983 e usado para promover alterações comportamentais semelhantes a da epilepsia. Turski e colaboradores já sabiam da importância funcional da acetilcolina e seus análogos, além dos inibidores da acetilcolinesterase (enzima que catalisa a acetilcolina) como desencadeadores de epileptogênese no sistema nervoso, por isso investigaram se a Pilocarpina (PILO), um agonista colinérgico, já usado como colírio para glaucoma, seria capaz de desencadear crises. Um estado epiléptico agudo, com crise tônico-clônica generalizada como evento inicial, foi observado possível de ser aplicado em um modelo animal de epilepsia. (Turski *et al.*, 1983; Turski *et al.*, 1984)

Turski *et al.* (1983) demonstraram que o modelo de pilocarpina era um bom modelo de Epilepsia do Lobo Temporal (frequente nos casos de epilepsia refratária), e que provocava achados eletroencefalográficos e neuropatológicos semelhantes às lesões cerebrais de pacientes com epilepsia, além de descreverem a evolução comportamental das crises a partir de uma escala já conhecida elaborada por Racine em 1972 e usada em muitos modelos de epilepsia atualmente. Nessa escala os animais são observados ao longo das crises e são identificadas 5 fases progressivas. A Tabela 1 apresenta o comportamento na escala de Racine (Racine,1972).

Tabela 1*Comportamento na Escala de Racine*

Fase	Apresenta
1	Movimentos bucais e faciais
2	Aceno de cabeça
3	Clônus do membro anterior
4	Elevação
5	Elevação e queda

Devido à pouca informação da época sobre registro elétrico em ratos, Racine examinou a correlação entre atividade epileptiforme de pós-descargas (**After discharges** - ADs) e crises motoras nos animais. Considerando que a estimulação elétrica diminuiria o limiar para a ocorrência de pós-descargas, grupos de animais foram implantados com eletrodos para estimular eletricamente a amígdala e o hipocampo. No primeiro grupo, uma corrente sublimiar foi testada na amígdala e no hipocampo, no segundo grupo outra corrente de baixa intensidade foi testada na amígdala e no hipocampo e no terceiro grupo uma corrente de alta intensidade foi aplicada apenas na amígdala. Os animais foram observados com a escala de 5 pontos. Racine observou que as pós-descargas eram cruciais para o desenvolvimento de convulsões motoras, porém uma vez que o limiar era atingido não havia muita diferença entre uma baixa ou alta intensidade para o desenvolvimento das crises. (Racine, 1972).

Pesquisas com modelo de Pilocarpina para o estudar o envolvimento do hipocampo na epilepsia ainda são feitos em tempo mais recente. Em 2022 Buckmaster e colaboradores utilizando modelo de pilocarpina propuseram que a região ventral do hipocampo é uma zona primária para a ocorrência de crises epiléticas e ao inativar a região ventral os animais apresentaram menos crises que ao inativar região dorsal hipocampal, e não viram diferença na

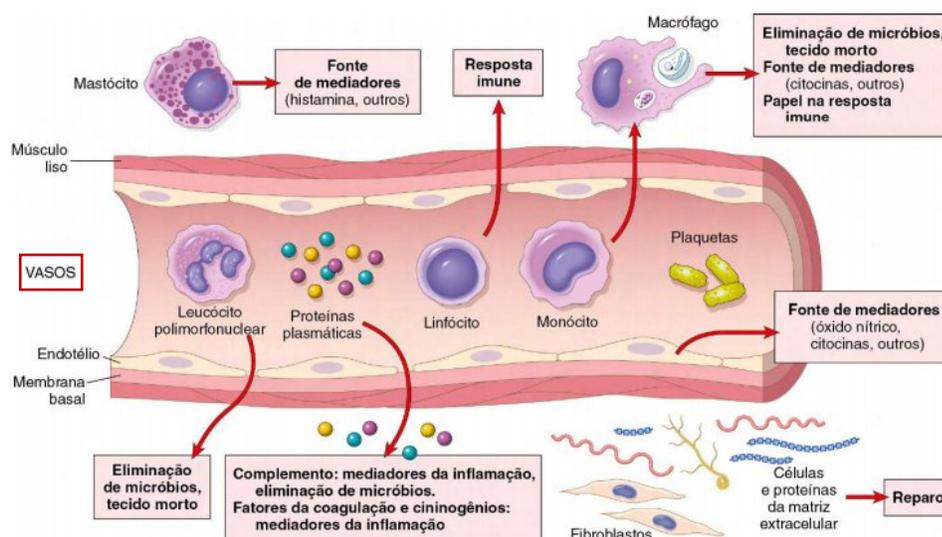
inativação da amígdala. Em outro estudo, com modelo de pilocarpina, Mátyás observou que todos os animais com crises epiléticas apresentaram esclerose hipocampal, além disso, os animais com crise tiveram piora na memória e aprendizagem e aumento da ativação microglial. E em 2023, Grote com sua equipe de pesquisa identificaram que muitos pacientes cuja crises persistiam mesmo após a cirurgia de remoção do hipocampo que atuaria como foco epilético não apresentavam esclerose hipocampal, mas apenas gliose reconhecendo este quadro como uma nova síndrome que não se beneficiariam somente com a cirurgia, mas necessita de novas estratégias de tratamento (Buckmaster *et al.*, 2022; Mátyás *et al.*, 2022; Grote *et al.*, 2023).

A pesquisa neurobiológica é desenvolvida por várias técnicas laboratoriais entre elas a imunohistoquímica, técnica que tem a função de permitir a visualização de estruturas teciduais e celulares, quando é aplicada para células isoladas ou agrupadas sem matriz extracelular chama-se imunocitoquímica, com algumas similaridades procedimentares, mas diferente da imunohistoquímica na forma de obtenção do material e esta ser aplicada a um tecido com suas diferentes estruturas. A base da imunohistoquímica é constituída por um marcador acoplado a um anticorpo que se associa a um antígeno no tecido, por causa da marcação visível do marcador consegue-se visualizar as estruturas a serem analisadas (Ferro, 2014). Essa técnica é comumente utilizada para estudos neuropatológicos incluindo para epilepsia.

Além de observar a perda neuronal no tecido nervoso a imunohistoquímica, também pode auxiliar no estudo do processo inflamatório. A inflamação ocorre em tecidos vascularizados, como uma resposta imunológica contra o causador de uma lesão inicial e tentativa de restaurar o estado normal do local lesionado (Kumar *et al.*, 2018; De Paulo *et al.*, 2010). O processo inflamatório é composto por três elementos: aumento do fluxo sanguíneo, pela dilatação dos vasos; aumento da permeabilidade vascular que favorece a saída de células e outras substâncias até o local da lesão; e acúmulo de células e mediadores inflamatórios na região lesionada, para combater o agente agressor (físico, químico ou biológico) (Kumar *et al.*, 2018; Armaganijan *et al.*, 2006; Camargo *et al.*, 2004).

Figura 4

Componentes das respostas inflamatórias



Nota. Fonte: Kumar *et al.*, 2013. Destaque em vermelho para o vaso sanguíneo, do qual os componentes do processo inflamatório chegam a vários tecidos.

São sinais comuns na inflamação: vermelhidão (rubor), aumento da temperatura (calor), edema (tumor, “inchaço”), dor e a perda de função da região, quando mais grave (Davies & Hagen, 1997; Santos Júnior, 2003).

As citocinas são polipeptídeos produzidos por diferentes células que agem como mediadores inflamatórios na resposta imune inata ou específica; os mediadores inflamatórios são substâncias que iniciam ou regulam a inflamação, como exemplo, a família da interleucina 1, da qual a interleucina - 1 beta (IL- 1 β) é uma das principais (Kumar *et al.*, 2018). A IL- 1beta é uma proteína produzida por várias células, como leucócitos, células endoteliais, epiteliais e no sistema nervoso, por micróglias e astrócitos; funcionalmente envolvida na resposta da imunidade inata e mais recentemente foi atribuído a ela um valor de mediador neurofisiológico, para além do inflamatório, e essencial para a homeostasia dos sistemas orgânicos (Giulian *et al.*, 1986; Davies *et al.*, 1999; Lima, 2023). Já o receptor ao qual a IL1- beta se liga, o receptor

de IL-1 tipo I (IL-1R1), estaria presente em células endoteliais, ependimárias, células do plexo coroide, neurônios do giro denteado, e também expresso em nível menor por astrócitos, mas não por micróglia (Liu *et al.*, 2019).

Tabela 2

Papel atribuído a interleucina - 1 beta

Interleucina - 1 beta	
Inflamatório	Neurofisiológico
Expressão de citocinas e quimiocinas inflamatórias	Sobrevivência neuronal
Infiltração de leucócitos	Crescimento de neuritos
Fagocitose	Poda sináptica
Atividade Bactericida	Transmissão sináptica
Atividade do sistema complemento	Neuroplasticidade
Ativação da imunidade adaptativa	Funções neuroendócrinas
	Antineurogênico

Nota. Lima, 2023

Tradicionalmente um aumento da expressão de IL - 1 beta e da ativação microglial são característicos de processo inflamatório no sistema nervoso (Giulian *et al.*, 1986; Dinarello, 1997; Davies *et al.*, 1999) e a resposta inflamatória pode agravar doenças agudas e crônicas nesse sistema (Liu *et al.*, 2007; Mendiola & Cardona *et al.*, 2018). As células gliais em torno dos neurônios também desencadeiam respostas imunes, além de fornecerem suporte, barreira protetora e nutrição para os neurônios (Ransohoff & Perry, 2009; Buffo *et al.*, 2010)

A micróglia é uma linhagem macrofágica no sistema nervoso central, ela se apresenta em estado de repouso, quando não há indícios patológicos e executa varreduras no tecido, como “vigilantes” (Nimmerjahn *et al.*, 2005). Ela também apresenta-se em estado ativo, quando ocorre alteração morfológica na célula microglial, expressão de receptores na superfície celular (Kreutzberg 1999) e liberação de citocinas e quimiocinas, como a IL- 1 beta (Giulian *et al.*, 1986). Doenças neurodegenerativas, traumas, tumores, acidentes vasculares, substâncias excitotóxicas, a exemplo do glutamato, ATP, ADP podem induzir alterações na micróglia (Kreutzberg 1999).

Então, a resposta inflamatória é claramente uma forma de defesa contra a causa inicial de agressão, mas esta resposta quando exagerada pode aumentar o dano no tecido inclusive na epilepsia (De Paulo, 2010). Devido à alta prevalência na sociedade, pela necessidade de novos tratamentos e pelas consequências nas vidas dos pacientes e familiares, assim como, os danos nos subcampos hipocampais, faz-se necessário estudar crises epiléticas, com modelos animais de epilepsia.

Objetivos

Objetivo Geral:

Identificar e quantificar a tendência de perda neuronal e processo inflamatório nas áreas hipocampais Ca1/Ca2 em direção Ca3, em modelo animal agudo de epilepsia induzida por pilocarpina.

Objetivos específicos:

- Selecionar para contagem de células os animais que apresentarem crises a partir da fase 3 da escala de Racine;
- Quantificar a marcação Anti-NeuN e Anti-IL-1b entre hipocampos de ratos adultos que sofreram e não sofreram *Status Epilepticus*;
- Quantificar a marcação Anti-NeuN e Anti-IL-1b em hipocampos de ratos adultos que sofreram *Status Epilepticus*, com tempos de sobrevivência de 1 e 7 dias;

Métodos

Deu-se seguimento ao trabalho do nosso grupo de pesquisa (Da Silva, 2023), no qual foram induzidas crises epiléticas nos animais através do modelo de pilocarpina. Em seguida, os animais foram observados quanto a intensidade e frequência das crises a partir da Escala

de 5 pontos de Racine. Terminada a observação cada animal foi levado para perfusão (de acordo com o grupo), a fim de fixar os tecidos para estudo neuropatológico, e feita a análise dos tecidos montados nas lâminas. Os procedimentos foram realizados no Laboratório de Neurobiologia localizado no Instituto de Ciências Biológicas da UFPA e na Seção de Patologia Clínica e Experimental do Instituto Evandro Chagas.

Animais

Rattus norvegicus (raça Wistar) de 250-300g foram mantidos em gaiolas em temperatura ambiente de 25°C, com disponibilidade de água e comida e respeitando o ciclo claro-escuro de 12h. Os experimentos ocorreram entre 8h30 e 16h. Trinta ratos foram manuseados para a pesquisa e somente aqueles sobreviventes ao tempo determinado foram empregados para a análise, um total de 11 animais divididos em 3 grupos: grupo controle (n=5), administrada apenas solução salina sem ser induzido à crises epiléticas, com tempo de sobrevivência de 7 dias; grupo 1 dia (n=3), animais com sobrevivência até 1 dia após a indução das crises; grupo 7 dias (n=3), animais com sobrevivência até 7 dias após a indução das crises. Todos os esforços foram aplicados para evitar o estresse excessivos dos animais durante os procedimentos. O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da UFPA (CEUA/UFPA) - CEUA Nº 3347221217. Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas sugeridas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Procedimentos de Indução das crises por modelo de pilocarpina de *Status Epilepticus* (SE).

Os animais foram transferidos para gaiolas individuais 30 min antes de cada procedimento para habituação, após esse período foi administrado 1 mg/kg s.c (via subcutânea) de Metil-escopolamina 30 min antes da pilocarpina para atenuar os efeitos colinérgicos periféricos da pilocarpina. Passados os minutos os animais receberam 325 mg/kg

i.p (via intraperitoneal) de pilocarpina diluída em 10 mL de solução salina. E os estágios das crises foram avaliados de acordo com a Escala de Racine por 1h, após essa hora cada grupo recebeu o tratamento de 10mg/kg de Diazepam para interrupção das crises. Baseado em (Turski *et al.*, 1983; Turski *et al.*, 1984; Racine,1972).

As crises motoras foram avaliadas segundo Escala de 5 pontos: 1) Movimentos bucais e faciais; 2) Balançar a cabeça; 3) Clônus do membro anterior; 4) Elevação 5) Elevação e queda. Compuseram os grupos os animais que alcançarem entre 3 e 5 da escala (Racine,1972).

Perfusão e craniotomia

Cada animal de acordo com o grupo foi levado para perfusão, craniotomia, criopreservação e secção tecidual dos encéfalos.

Os animais foram anestesiados com 10 mg/kg i.p de xilazina e 80 mg/kg i.p de cetamina e os reflexos dos animais testados, após a ausência de respostas é feita a perfusão.

Na perfusão é feito um corte na região ventral do animal para expor a caixa torácica e ter acesso ao coração. O coração (no ventrículo esquerdo) é conectado a um sistema hídrico para a passagem de solução salina 0,9% com heparina (1mL/L) a fim de lavar o sangue dos órgãos do animal, além disso, para que a solução circule e não acumule líquido com risco de romper os tecidos é feito um pequeno corte no átrio direito do coração. Após a salina, é passado pelo coração solução de paraformaldeído de 4% para fixar os tecidos do animal durante 3h.

O procedimento de craniotomia consiste na decapitação do animal e retirada do encéfalo armazenado em tampão fosfato 0,1 M. O encéfalo é criopreservado com solução de sacarose em tampão fosfato 0,1M, após a crioproteção, os tecidos são imersos no meio de inclusão Tissue-TeK OCT 4583 (SAKURA), congelados e cortados coronalmente em criostato Leica CM3050 a 30 μ m. As secções são acondicionados em solução anti-congelante na geladeira.

Imunohistoquímica

Após a fixação e extração do encéfalo foi utilizado o material armazenado seccionado, para técnica de imunohistoquímica.

Primeiro as secções encefálicas foram lavadas com água destilada (5 minutos) + PBS (Solução Tampão Fosfato). Logo em seguida, foi feita a recuperação antigênica por alta temperatura, para reverter possíveis alterações no tecido provenientes da fixação, com solução de ácido cítrico em banho Maria a 90° C por 20 minutos, e então, foi feita uma segunda lavagem com água destilada + PBS por 5 minutos.

Em seguida, foi realizada a permeabilização do material com solução de Saponina durante 10 minutos. E então outras duas lavagens de PBS, por 5 minutos cada.

Foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas com BSA (Bovine Serum Albumin) 10% por 30 minutos.

E finalmente a incubação com os respectivos anticorpos primário (aqueles que se ligam ao antígeno de interesse) por toda a noite (overnight). A Tabela 2 contém os anticorpos primários utilizados.

No dia seguinte foram feitas duas lavagens para remoção do excesso de anticorpo primário, em PBS por 5 minutos cada. A Tabela 2 contém os anticorpos primários utilizados.

Tabela 3*Anticorpos Primários Utilizados*

<i>Anticorpo Primário</i>	<i>Diluição</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Função</i>
Anticorpo monoclonal anti- NeuN de camundongo	1:50	LSBio (LS-C312122)	Marcar Neurônios maduros
Anticorpo policlonal anti-IL- 1 β feito em coelho	1:100	Abcam (ab9722)	Marcar a expressão da citocina pró-inflamatória IL- 1 β

Em seguida, foi aplicado a técnica Labelled Streptavidin Biotin (LSAB): primeiro as amostras, já expostas ao anticorpo primário na etapa anterior, foram incubadas em um ligante biotinilado contendo IgG anti-camundongo e anti-coelho (fabricante Dako REF K0675) por 30 minutos a 37° C, como anticorpo secundário.

Mais duas lavagens em PBS, por 5 minutos cada, e uma incubação em Streptavidina conjugada a enzima Horseradish Peroxidase (HRP), por 30 minutos a 37°C (fabricante Dako REF K0675), para marcação que foi revelado com DAB (Diaminobenzidine), cromógeno incolor que ao ser oxidado pela HRP adquire cor castanha.

Então, após a incubação com a Streptavidina conjugada a HRP foram feitas duas lavagens com PBS por 5 minutos cada, e feita a revelação com a solução de DAB, na qual o tempo de revelação varia entre 30 segundos e 2 minutos e a reação foi interrompida com a lavagem das amostras em PBS.

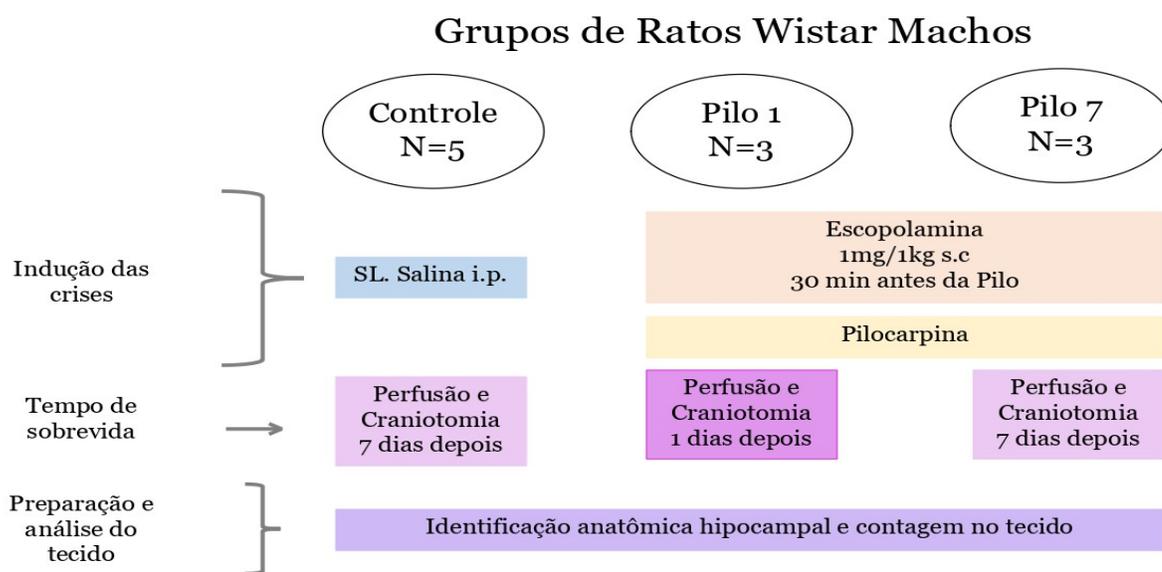
As secções marcadas foram montadas em lâminas, para isso elas passaram pelos processos de desidratação e diafanização, com uma bateria de: álcool 70%, 80%, 90%, 100%, 100%, xilol 1 e xilol 2 (2 minutos em cada solução).

Para finalmente realizar a montagem com Permount (Fisher Scientific) e lamínulas para proteção tecidual.

Todas as etapas seguiram o protocolo padrão do laboratório de Imunohistoquímica, da Seção de Patologia Clínica e Experimental (SAPEX), do Instituto Evandro Chagas (IEC).

Figura 5

Representação das etapas da Metodologia



Nota. (Pilo= Pilocarpina).

Análise quantitativa

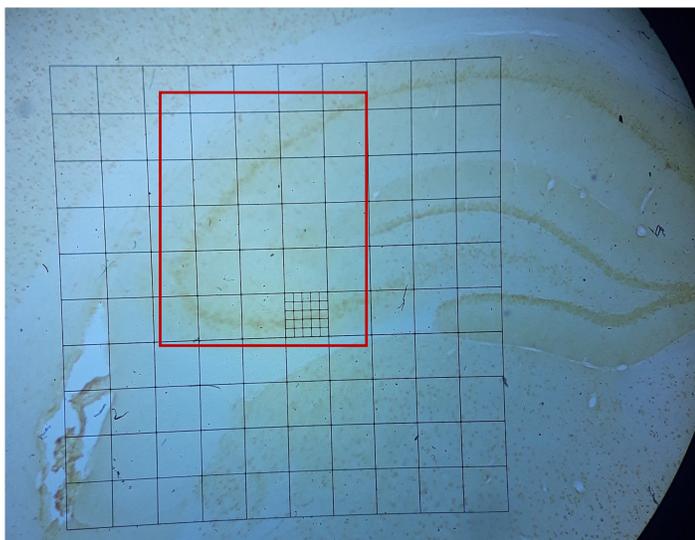
Após a identificação de cada área hipocampal de interesse foi feita a análise. As análises foram realizadas em um microscópio óptico binocular (Motic, modelo BA310E) acoplado a um sistema de captura de imagem do próprio modelo (Moticam 5+5.0 MP/ USB 3.0) no software Motic Imagem Plus 3.0

Foram contados em cada hipocampo da secção encefálica: 8 campos adjacentes na região de transição de Ca1/Ca2 em direção Ca3, para ser feita a contagem manual das células marcadas pelo processo de imunohistoquímica, a partir de um retículo de contagem quadrado (10x10, de área 254 μ m x 254 μ m) sobre a imagem visualizada na objetiva de 40x do

microscópio. Ao todo foram contados 528 campos para a marcação NeuN e 513 campos para a marcação IL-1b.

Figura 6

Representação do retículo de contagem



Nota. As células foram contadas dentro de 8 campos adjacentes na região hipocampal indicada pelo retângulo vermelho na figura.

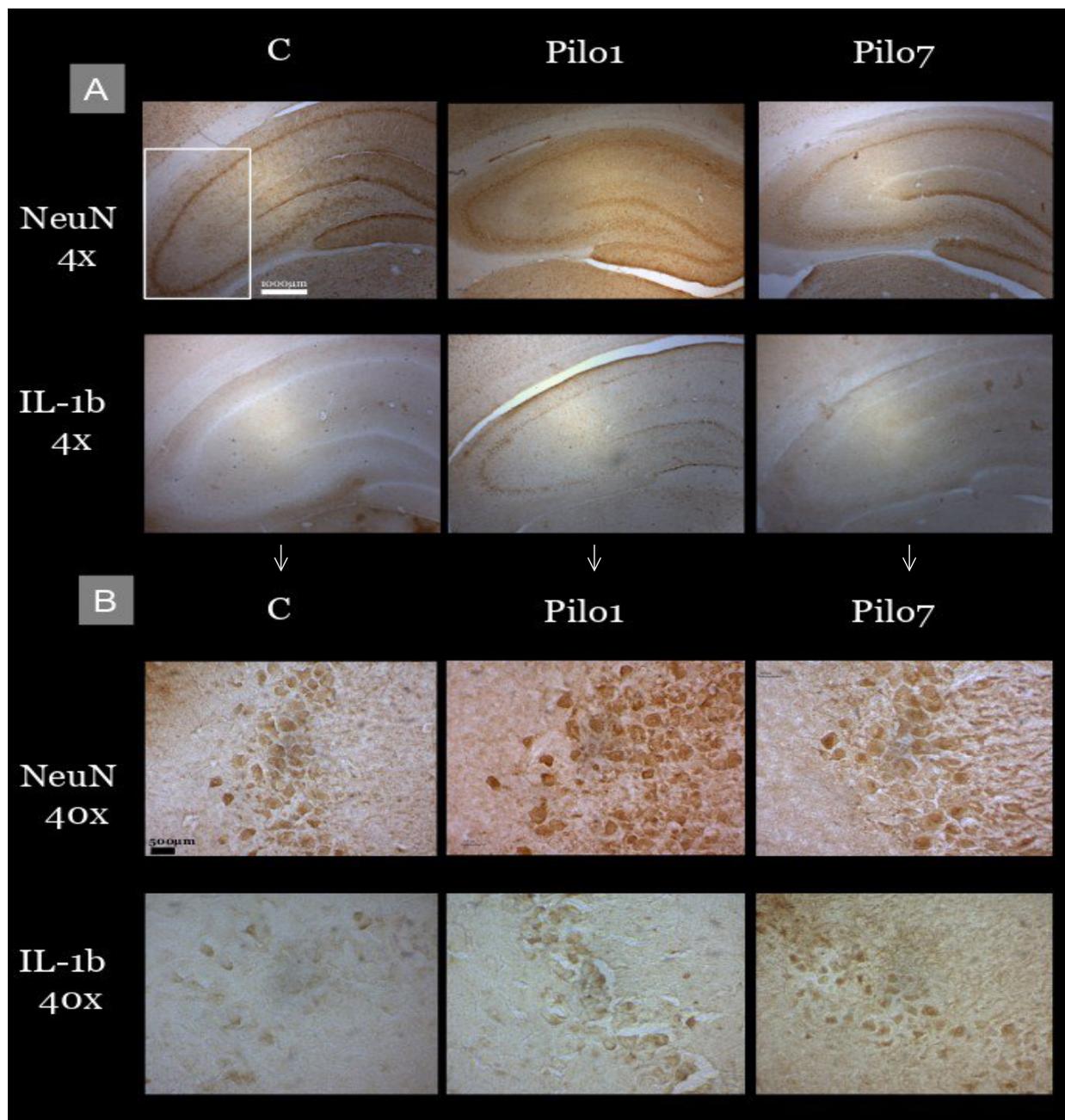
Análise estatística

Foi realizado um somatório da quantidade de células contadas em cada campo, para cada indivíduo, e foi realizada uma análise de comparação entre os grupos com grau de significância $\alpha = 0,05$ utilizando o teste estatístico Kruskal-Wallis, com o auxílio do programa IBM® SPSS® Statistics.

Resultados

Figura 7

Fotomicrografias do Hipocampo



Nota. O retângulo branco na imagem representa a região hipocampal, na qual foi realizada a contagem nos grupos controle (C), pilocarpina 1 dia (Pilo 1) e pilocarpina 7 dias (Pilo 7), da marcação neuronal (NeuN) e expressão de citocinas (IL-1b). Indicação da escala em 1000µm (linha horizontal branca), em aumento de 4x em **A** e escala de 500µm (linha horizontal preta), em aumento de 40x em **B**.

As crises epilépticas foram induzidas nos animais e a frequência e intensidade das crises observadas de acordo com a escala de Racine, 11 animais sobreviveram ao tempo estabelecido, com os quais quantificou-se a marcação Anti-NeuN e Anti-IL-1b nos tecidos hipocampais dos animais de acordo com os grupo controle, pilocarpina 1 dia e pilocarpina 7 dias.

A morfologia do hipocampo e a coloração das células marcadas com o anticorpo Anti-NeuN foi observada presente nos três grupos (figura 7), já a marcação Anti-IL-1b foi mais fraca nos grupos controle, sem crises, e também no grupo pilocarpina 7 dias, e com maior intensidade no grupo pilocarpina 1 dia.

Tabela 4

Quantidade de células marcadas por indivíduo/rato.

Grupo	Rato	NeuN	IL-1b
Controle	1	2299	485
Controle	2	2593	285
Controle	3	2462	86
Controle	4	1480	478
Controle	5	1811	867
Pilo 1 dia	1	2631	212
Pilo 1 dia	2	2680	1735
Pilo 1 dia	3	2033	1038
Pilo 7 dias	1	2622	731
Pilo 7 dias	2	1443	250
Pilo 7 dias	3	1981	86

Nota. Quantificação de neurônios e expressão de interleucinas -1b. Pilo = pilocarpina.

Tabela 5

Quantidade de células marcadas por grupo.

Marcação	Grupo controle	Grupo pilocarpina 1 dia	Grupo pilocarpina 7 dias	Total
NeuN	10645	7344	6046	24.035
IL-1b	2201	2985	1067	6.253

Nota. Quantificação de neurônios e expressão de interleucinas - 1b. Pilo= pilocarpina.

Tabela 6

Estatística Descritiva NeuN

Descritivos NeuN	Grupo controle	Grupo pilocarpina 1 dia	Grupo pilocarpina 7 dias
Média	2129,00	2448,00	2015,33
Mediana	2299,00	2631,00	1981,00
Desvio Padrão	468,351	360,235	590,249
Variância	219352,500	129769,000	348394,333
Percentil (25)	1811,0000	2332,0000	1712,0000
Percentil (75)	2462,0000	2655,5000	2301,5000

Nota. Percentil de Turkey's Hinger..

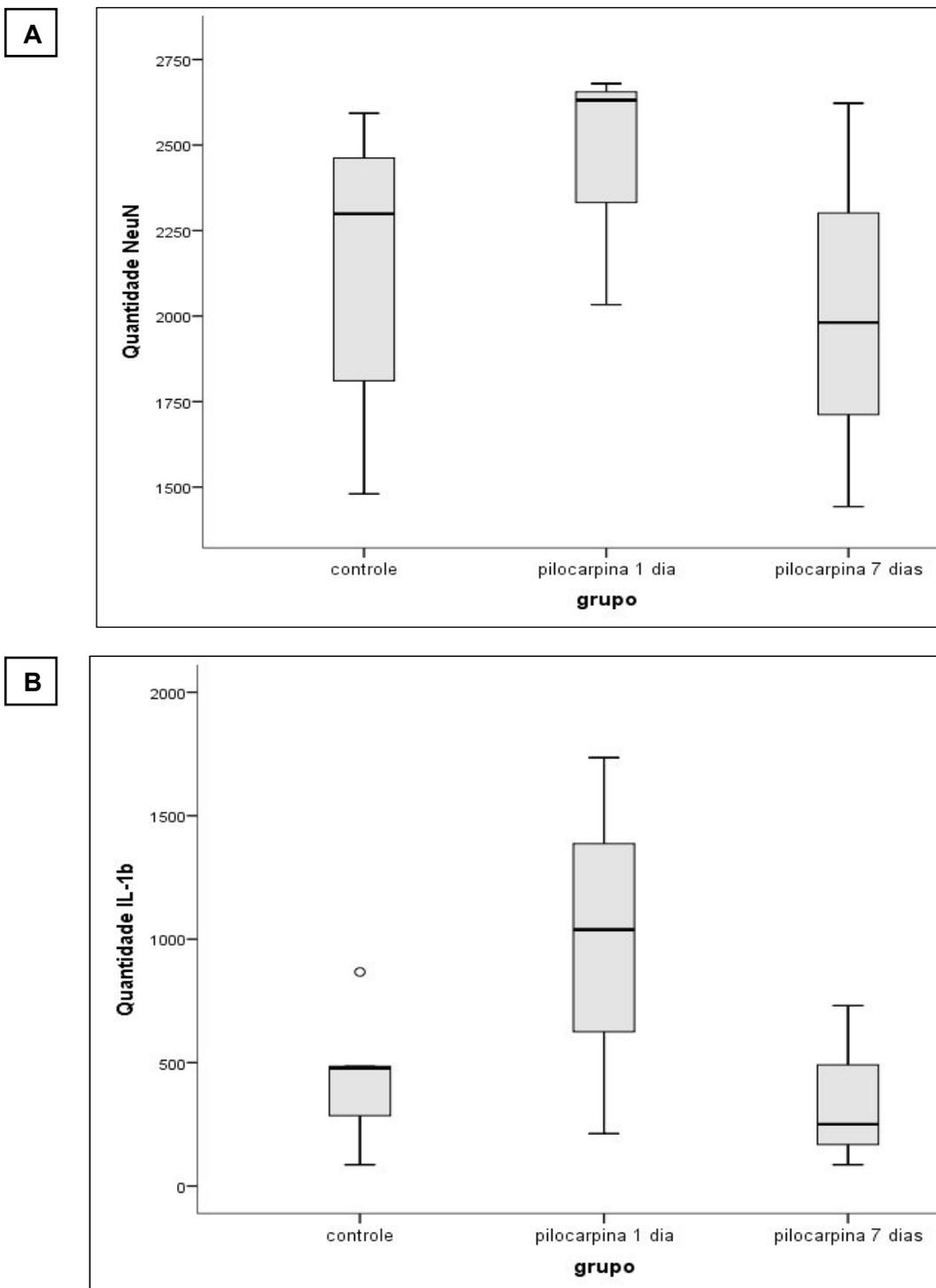
Tabela 7

Estatística Descritiva IL-1b

Descritivos IL-1b	Grupo controle	Grupo pilocarpina 1 dia	Grupo pilocarpina 7 dias
Média	440,20	995,00	355,67
Mediana	478,00	1038,00	250,00
Desvio Padrão	289,456	762,410	335,232
Variância	83784,700	581269,000	112380,333
Percentil (25)	285,0000	625,0000	168,0000
Percentil (75)	485,0000	1386,5000	490,5000

Nota. Percentil de Turkey's Hinger.

Tomando como referência os valores das medianas encontradas, o grupo pilocarpina 1 dia apresentou maior valor do que o grupo controle e grupo pilocarpina 7 dias, nessa ordem, tanto para a marcação NeuN como para a expressão de IL-1b (ver tabelas 6 e 7). Apesar disso, não se observou diferença estatística significativa entre os grupos controle e pilocarpina 1 dia e 7 dias para NeuN (figura 8A), nem para os grupos controle, pilocarpina 1 dia e 7 dias para IL-1b (figura 8B) ao realizarmos o teste não paramétrico Kruskal-Wallis.

Figura 8*Quantificação de neurônios e expressão de interleucinas-1b*

Nota. A: Representação da quantificação neuronal com a marcação do anticorpo anti-NeuN. *B:* Representação da quantificação das citocinas expressas com a marcação do anticorpo anti-IL-1b.

Marcação NeuN em **A**: Grupo controle (mediana = 2299;); Grupo pilocarpina 1 dia (mediana = 2631); Grupo pilocarpina 7 dias (mediana = 1981); Kruskal-Wallis sig =0,257. Marcação IL-1b em **B**: Grupo controle (mediana = 478;); Grupo pilocarpina 1 dia (mediana = 1038); Grupo pilocarpina 7 dias (mediana = 250); Kruskal-Wallis sig =0,416.

Discussão

Atualmente é bem estabelecida a importância das estruturas límbicas, como o hipocampo, para a ocorrência de crises epiléticas em pacientes com Epilepsia do Lobo Temporal Mesial (ELTM), nesses pacientes frequentemente se encontra uma lesão no hipocampo, a Esclerose Hipocampal, por esse motivo um dos tratamentos mais indicados para lidar com a refratariedade dessa epilepsia é a remoção cirúrgica do hipocampo que atua como foco epilético no indivíduo (Boling, 2018).

Nossos dados no levam a pensar sobre a ação inflamatória neuronal em resposta à agressão inicial das crises, e como está de acordo com trabalhos clássicos de pilocarpina (Turski *et al.*, 1984; Curia *et al.*, 2008), em que a perda neuronal é mais evidente em período maior de observação dos animais, modelos crônicos de epilepsia, diferente desta proposta que analisou um modelo agudo de *Status epilepticus*, para observar possíveis alterações iniciais no tecido nervoso.

Buscamos observar o efeito inicial de crises epiléticas ao delimitar uma área de transição Ca1/Ca2 em direção Ca3 para a contagem, a partir de comparações com a literatura, uma vez que a região Ca2 é de difícil identificação sem técnicas de marcação mais específicas como as imunofluorescências associadas a marcações enzimáticas, a exemplo PCP4 (Dudek *et al.*, 2022), o que nos interessa investigar futuramente, entretanto imunofluorescências tem sua visibilidade comprometida com o passar do tempo o que dificulta a contagem.

Além disso, a área Ca2 hipocampal é tradicionalmente vista como mais preservada da degeneração neuronal, do que suas vizinhas Ca1 e Ca3 (Falconer, 1974; Whitebirch *et al.*, 2022), principalmente em seres humanos e modelos animais observados por um tempo maior.

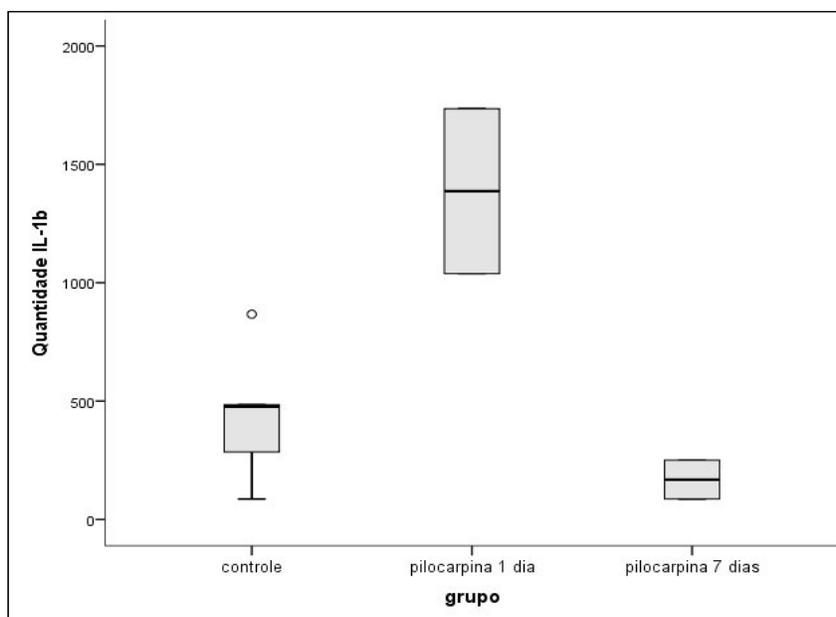
Tudo isso nos indica sobre a importância de se prevenir e administrar o tratamento mais adequado para as crises de forma precoce, já que a recorrência das crises é um fator relevante na degeneração neuronal.

Ao considerar os papéis inflamatórios e mais recentemente o neurofisiológico da interleucina - 1 beta, é compreensível a sua presença no grupo controle e nos grupos induzidos a terem crises epiléticas.

Não identificamos perda neuronal, nem diferença significativa no processo inflamatório na análise quantitativa realizada. Embora, diferença significativa entre os grupos controle, pilocarpina 1 dia e 7 dias para IL-1b (figura 8B) não tenha sido observada, chamou atenção o fato do grupo pilocarpina 1 dia expressar mais células marcadas pelo anticorpo Anti-IL-1b, do que o grupo controle e grupo pilocarpina 7 dias (tabela 7 e figura 8B), por isso, retiramos dados discrepantes do grupo pilocarpina 1 dia e 7 dias apenas para verificar a quantificação entre os grupos (figura 9).

Figura 9

Expressão de interleucinas-1b



Nota. Representação da quantificação das citocinas expressas com a marcação do anticorpo anti-IL-1b.

Na figura 9, o grupo pilocarpina 1 dia não se sobrepõe aos demais, como na figura 8B. Embora não apresentado diferença significativa, o padrão de células marcadas em que houve um aumento no grupo pilocarpina 1 dia e redução no grupo pilocarpina 7 dias permaneceu, apesar da retirada dos dados discrepantes, porém devido ao número de animais sobreviventes não podemos abrir mão dos dados. Contudo, esse padrão foi previsto em trabalho qualitativo anterior do nosso grupo de pesquisa (Da Silva, 2023), o que pode ser indicativo de uma tendência de variação a ser confirmada, quando mais animais forem colocados na amostra. A letalidade do modelo de pilocarpina, também observada em outros trabalhos (Whitebirch *et al.*, 2023), reduziu a quantidade de indivíduos em cada grupo o que pode ter implicado nos resultados estatísticos.

Pensando nessa redução do grupo 7 dias é possível que um dano no encéfalo não afete todas as estruturas simultaneamente (Bragin *et al.*, 2009). Em 2022 e 2023 Alexander Whitebirch e colaboradores resgataram os trabalhos de Williamson e Spencer (1994) e Wittner *et al.* (2009) sobre o envolvimento de Ca²⁺ na geração e propagação das crises para outras áreas, por isso Whitebirch *et al.* (2022), também com o modelo de pilocarpina, fizeram o registro eletrofisiológico de fatias hipocâmpais e silenciamento de células da área Ca²⁺, onde encontraram que a região Ca²⁺ apresentou maior excitabilidade e redução da inibição, o que é coerente com o desbalanço excitatório das crises epiléticas, também observaram aumento da propagação excitatória no principal alvo de Ca²⁺, a área Ca¹⁺, a qual é uma das mais afetadas com a perda neuronal, além disso os animais silenciados em Ca²⁺ apresentaram menos crises, com isso eles propõem o envolvimento de Ca²⁺ na geração e propagação das crises, e nos faz pensar que o processo inflamatório migre para outras regiões hipocâmpais em seguida, assim como, sugerem Ca²⁺ para um possível alvo terapêutico contra as crises epiléticas (Whitebirch *et al.*, 2022, 2023).

Considerações finais

O modelo de pilocarpina foi eficaz para a indução do *Status epilepticus* nos animais, a investigação feita neste trabalho propõe que pesquisas futuras sejam realizadas sobre a ação das citocinas no cérebro em crise, com um número maior de animais em cada grupo, ou a escolha (ou adaptação) de um modelo que vise menor letalidade dos animais, em que a dose de pilocarpina precisa ser eficaz para gerar crises epiléticas, acometer o tecido nervoso especificamente na região estuda sem danificar sobremaneira outras estruturas e ainda possibilitar a sobrevivência dos animais para estudos prolongados. Esta pesquisa é um passo que deve ser continuada na busca de compreender a inflamação no processo de epileptogênese, ou seja, como se dá o processo inflamatório inicial no cérebro que desenvolve crise epilética, em especial o papel da interleucina - 1 beta no sistema nervoso, e origem da Esclerose hipocampal, por fim reafirmar a importância da prevenção e do tratamento precoce das crises.

Referências

- Andersen, P. (Ed.). (2007). *The hippocampus book*. Oxford university press.
- Albuquerque, M. D., & Cendes, F. (2011). Estado de mal epiléptico em adultos: revisão e proposta de protocolo. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, 17(4), 164-175. <https://doi.org/10.1590/S1676-26492011000400009>
- 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>
- Bear, M. F., Connors, B. W., & Paradiso, M. A. (2017). *Neurociências: desvendando o sistema nervoso*. Artmed editora.
- Blume, W. T., Lüders, H. O., Mizrahi, E., Tassinari, C., van Emde Boas, W., & Engel, Jr (2001). Glossary of descriptive terminology for ictal semiology: report of the ILAE task force on classification and terminology. *Epilepsia*, 42(9), 1212–1218. <https://doi.org/10.1046/j.1528-1157.2001.22001.x>
- 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>
- Boling W. W. (2018). Surgical Considerations of Intractable Mesial Temporal Lobe Epilepsy. *Brain sciences*, 8(2), 35. <https://doi.org/10.3390/brainsci8020035>
- Bragin, D. E., Sanderson, J. L., Peterson, S., Connor, J. A., & Müller, W. S. (2009). Development of epileptiform excitability in the deep entorhinal cortex after status epilepticus. *The European journal of neuroscience*, 30(4), 611–624. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06863.x>
- Buckmaster, P. S., Reyes, B., Kahn, T., & Wyeth, M. (2022). Ventral Hippocampal Formation Is the Primary Epileptogenic Zone in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy. *The Journal*

- of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience, 42(39), 7482–7495.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0429-22.2022>
- Buffo, A., Rolando, C., & Ceruti, S. (2010). Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochemical pharmacology*, 79(2), 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.09.014>
- Camargos, F. C., Lima, L. C. D., Mendes, E. N., & Bahia, M. (2004). Leucocitúria.
- Cristina, E., Toscano, D. B., Leandro, É., Vieira, M., Carolina, A., Carvalho, D., 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>
- Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R. S., & Avoli, M. (2008). The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of neuroscience methods*, 172(2), 143–157.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2008.04.019>
- Da Silva, B. M. (2023). Análise da expressão de citocinas e neurônios maduros em ratos que sofreram status epilepticus induzido por pilocarpina [Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Pará].
- Davies, M. G., & Hagen, P. O. (1997). Systemic inflammatory response syndrome. *The British journal of surgery*, 84(7), 920–935. <https://doi.org/10.1002/bjs.1800840707>
- Davies, C. A., Loddick, S. A., Toulmond, S., Stroemer, R. P., Hunt, J., & Rothwell, N. J. (1999). The progression and topographic distribution of interleukin-1beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 19(1), 87–98. <https://doi.org/10.1097/00004647-199901000-00010>

- DE PAULO, L. F., ANTUNES, A., CAETAN, M. D., SCHULTZ, T. N., CAMACHO, D. P., & CONSOLARO, R. B. (2010). INFLAMAÇÃO: HISTÓRIA, TIPOS E CAUSAS. *Uningá Review*, 1(1). Retrieved from <https://revista.uninga.br/uningareviews/article/view/465>
- Dinarelli C. A. (1997). Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*, 112(6 Suppl), 321S–329S. https://doi.org/10.1378/chest.112.6_supplement.321s
- Dudek, S. M., Phoenix, A. N., Scappini, E., Shepeleva, D. V., Herbeck, Y. E., Trut, L. N., Farris, S., & Kukekova, A. V. (2023). Defining hippocampal area CA2 in the fox (*Vulpes vulpes*) brain. *Hippocampus*, 33(6), 700–711. <https://doi.org/10.1002/hipo.23546>
- Engel J., Jr (1995). Concepts of epilepsy. *Epilepsia*, 36 Suppl 1, S23–S29. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1995.tb01648.x>
- Falconer, M. (1974). Mesial temporal (Ammon's horn) sclerosis as a common cause of epilepsy: etiology, treatment, and prevention. *The Lancet*, 304(7883), 767-770.
- Fernandes, M. J. da S. (2013). Epilepsia do lobo temporal: mecanismos perspectivas. *Estudos Avançados*, 27(77), 85–98. <https://doi.org/10.1590/S0103-40142013000100007>
- Ferro, A. B. (2014). Imunohistoquímica. <http://hdl.handle.net/10400.21/4569>
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel, J., Jr, 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., French, J. A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F. E., Lagae, L., Moshé, S. L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I. E., & Zuberi, S. M. (2017a). Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy:

- Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*, 58(4), 522–530. <https://doi.org/10.1111/epi.13670>
- 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. (2017b). Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. *Epilepsia*, 58(4), 531–542. <https://doi.org/10.1111/epi.13671>
- Garcia Garcia, M. E., Garcia Morales, I., & Matías Guiu, J. (2010). Modelos experimentales en epilepsia [Experimental models in epilepsy]. *Neurologia (Barcelona, Spain)*, 25(3), 181–188.
- Gentile, A., Freseigna, D., Musella, A., Sepman, H., Bullitta, S., De Vito, F., Fantozzi, R., Usiello, A., Maccarrone, M., Mercuri, N. B., Lutz, B., Mandolesi, G., & Centonze, D. (2016). Interaction between interleukin-1 β and type-1 cannabinoid receptor is involved in anxiety-like behavior in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroinflammation*, 13(1), 231. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0682-8>
- Giulian, D., Baker, T. J., Shih, L. C., & Lachman, L. B. (1986). Interleukin 1 of the central nervous system is produced by ameboid microglia. *The Journal of experimental medicine*, 164(2), 594–604. <https://doi.org/10.1084/jem.164.2.594>
- Glauser T. A. (2007). Designing practical evidence-based treatment plans for children with prolonged seizures and status epilepticus. *Journal of child neurology*, 22(5 Suppl), 38S–46S. <https://doi.org/10.1177/0883073807303068>
- Gomes-Leal, W., Corkill, D. J., Freire, M. A., Picanço-Diniz, C. W., & Perry, V. H. (2004). Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. *Experimental neurology*, 190(2), 456–467. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2004.06.028>

- 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 pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. *Brain : a journal of neurology*, 146(2), 549–560. <https://doi.org/10.1093/brain/awac293>
- Kreutzberg G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in neurosciences*, 19(8), 312–318. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(96\)10049-7](https://doi.org/10.1016/0166-2236(96)10049-7)
- Kumar, V., Abbas A. K., & Aster J. C. (2013). *Robbins patologia básica*. Elsevier Brasil.
- Kwan, P., Arzimanoglou, A., Berg, A. T., Brodie, M. J., Allen Hauser, W., Mathern, G., Moshé, S. L., Perucca, E., Wiebe, S., & French, J. (2010). Definition of drug resistant epilepsy: consensus proposal by the ad hoc Task Force of the ILAE Commission on Therapeutic Strategies. *Epilepsia*, 51(6), 1069–1077. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02397.x>
- Lima T. S. (2023). Beyond an inflammatory mediator: Interleukin-1 in neurophysiology. *Experimental physiology*, 108(7), 917–924. <https://doi.org/10.1113/EP090780>
- Liu, X., Nemeth, D. P., McKim, D. B., Zhu, L., DiSabato, D. J., Berdysz, O., Gorantla, G., Oliver, B., Witcher, K. G., Wang, Y., Negray, C. E., Vegesna, R. S., Sheridan, J. F., Godbout, J. P., Robson, M. J., Blakely, R. D., Popovich, P. G., Bilbo, S. D., & Quan, N. (2019). Cell-Type-Specific Interleukin 1 Receptor 1 Signaling in the Brain Regulates Distinct Neuroimmune Activities. *Immunity*, 50(2), 317–333.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.012>
- Lu, K. T., Wu, C. Y., Yen, H. H., Peng, J. H., Wang, C. L., & Yang, Y. L. (2007). Bumetanide administration attenuated traumatic brain injury through IL-1 overexpression. *Neurological research*, 29(4), 404–409. <https://doi.org/10.1179/016164107X204738>
- Margerison, J. H., & Corsellis, J. A. N. (1966). Epilepsy and the temporal lobes. *Brain*, 89(3), 499–530.

- Mátyás, A., Borbély, E., & Mihály, A. (2022). Hippocampal Sclerosis in Pilocarpine Epilepsy: Survival of Peptide-Containing Neurons and Learning and Memory Disturbances in the Adult NMRI Strain Mouse. *International journal of molecular sciences*, 23(1), 204. <https://doi.org/10.3390/ijms23010204>
- Meldrum, B. S., & Brierley, J. B. (1973). Prolonged epileptic seizures in primates. Ischemic cell change and its relation to ictal physiological events. *Archives of neurology*, 28(1), 10–17. <https://doi.org/10.1001/archneur.1973.00490190028002>
- Mendiola, A. S., & Cardona, A. E. (2018). The IL-1 β phenomena in neuroinflammatory diseases. *Journal of neural transmission* (Vienna, Austria : 1996), 125(5), 781–795. <https://doi.org/10.1007/s00702-017-1732-9>
- Nakahara, S., Adachi, M., Ito, H., Matsumoto, M., Tajinda, K., & van Erp, T. (2018). Hippocampal Pathophysiology: Commonality Shared by Temporal Lobe Epilepsy and Psychiatric Disorders. *Neuroscience journal*. 4852359. <https://doi:10.1155/2018/4852359>
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* (New York, N.Y.), 308(5726), 1314–1318. <https://doi.org/10.1126/science.1110647>
- Noe, F. M., Polascheck, N., Frigerio, F., Bankstahl, M., Ravizza, T., Marchini, S., Beltrame, L., Banderó, C. R., Löscher, W., & Vezzani, A. (2013). Pharmacological blockade of IL-1 β /IL-1 receptor type 1 axis during epileptogenesis provides neuroprotection in two rat models of temporal lobe epilepsy. *Neurobiology of disease*, 59, 183–193. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.07.015>
- Perucca, P., & Gilliam, F. G. (2012). Adverse effects of antiepileptic drugs. *The Lancet. Neurology*, 11(9), 792–802. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70153-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70153-9)
- 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)

- Ransohoff, R. M., & Perry, V. H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual review of immunology*, 27, 119–145.
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132528>
- Sander J. W. (1993). Some aspects of prognosis in the epilepsies: a review. *Epilepsia*, 34(6), 1007–1016. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1993.tb02126.x>
- Santos Júnior, J. C. M. D. (2003). Rubor, calor, tumor e dor e o paciente grave. *Rev. bras. coloproctol*, 206-210.
- 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>
- Scorza, F. A., Arida, R. M., Albuquerque, M. D., & Cavalheiro, E. A. (2006). Epilepsias e hipertensão arterial sistêmica. *Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology*, 12, 219-224.
<https://doi.org/10.1590/S1676-26492006000700006>
- 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>
- 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)
- Turski, W. A., Cavalheiro, E. A., Bortolotto, Z. A., Mello, L. M., Schwarz, M., & Turski, L. (1984). Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and

- morphological analysis. *Brain research*, 321(2), 237–253. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(84\)90177-x](https://doi.org/10.1016/0006-8993(84)90177-x)
- Whitebirch, A. C., LaFrancois, J. J., Jain, S., Leary, P., Santoro, B., Siegelbaum, S. A., & Scharfman, H. E. (2022). Enhanced excitability of the hippocampal CA2 region and its contribution to seizure activity in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Neuron*, 110(19), 3121–3138.e8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.07.020>
- Whitebirch, A. C., Santoro, B., Barnett, A., Lisgaras, C. P., Scharfman, H. E., & Siegelbaum, S. A. (2023). Reduced Cholecystokinin-Expressing Interneuron Input Contributes to Disinhibition of the Hippocampal CA2 Region in a Mouse Model of Temporal Lobe Epilepsy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 43(41), 6930–6949. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2091-22.2023>
- Williamson, A., & Spencer, D. D. (1994). Electrophysiological characterization of CA2 pyramidal cells from epileptic humans. *Hippocampus*, 4(2), 226-237.
- Wittner, L., Huberfeld, G., Clemenceau, S., Erőss, L., Dezamis, E., Entz, L., ... & Miles, R. (2009). The epileptic human hippocampal cornu ammonis 2 region generates spontaneous interictal-like activity in vitro. *Brain*, 132(11), 3032-3046.
- World Health Organization. (2015). WHO Information Kit on Epilepsy: what you can do (No. WHO/MSD/MER/15.7). World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/who-information-kit-on-epilepsy>
- World Health Organization. (2019). Epilepsy: a public health imperative. <https://www.who.int/publications/i/item/epilepsy-a-public-health-imperative>
- Yacubian, E. M. T. (2004). Tratamento medicamentoso das epilepsias. In *Tratamento medicamentoso das epilepsias* (pp. 1-295). https://www.ilae.org/files/dmfile/Tratamento_Medicamentoso_das_Epilepsias1.pdf