



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: BIOQUÍMICA
TOXICOLÓGICA**

Neuroinflamação e Via Apoptótica na Epilepsia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aline Kegler

Santa Maria, RS, Brasil

2015

Neuroinflamação e Via Apoptótica

Por

Aline Kegler

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS) como
requisito para obtenção do grau de Mestre em Bioquímica Toxicológica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Michele Rechia Figuera

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

NEUROINFLAMAÇÃO E VIA APOPTÓTICA NA EPILEPSIA

elaborada por
Aline Kegler

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Bioquímica Toxicológica

COMISSÃO EXAMINADORA:

Michele Rechia Fighera, Dra.
(Orientadora)

Marino Muxfeldt Bianchin, Dr. (UFRGS)

Melissa Orlandin Premaor, Dra. (UFSM)

Santa Maria, 09 de fevereiro de 2015.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meu caminho!

À minha Família, amo vocês!

À Dra. Marta Duarte, pela oportunidade de início do Mestrado!

À Professora Dra. Michele Rechia Figuera. Obrigada de coração por ser minha orientadora. Agradeço todo o apoio, dedicação, oportunidades, incentivos. Agradeço por ter acreditado em mim. MUITO OBRIGADA! Prof^a, tu é uma 'baita' orientadora!

Ao Professor Dr. Luiz Fernando Freire Royes, meu co-orientador, obrigada por tudo!

À banca examinadora, Professor Marino Bianchin e Professora Melissa Premaor, pela disponibilidade de avaliação do meu trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A todas as pessoas que colaboraram em alguma técnica, alguma estatística, enfim, 'me deram uma mão'. São muitas as pessoas que, de alguma forma, me ajudaram, e assim contribuíram para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Toxicológica
Universidade Federal de Santa Maria

NEUROINFLAMAÇÃO E VIA APOPTÓTICA NA EPILEPSIA

AUTORA: Aline Kegler
ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Michele Rechia Figuera
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 09 de fevereiro de 2015.

A epilepsia é uma doença neurológica que afeta em torno de 1% da população mundial, tendo consequências no âmbito neurobiológico, neuroquímico, cognitivo e psicológico. Apesar do bom prognóstico, o elevado número de pacientes com epilepsia, que apresentam convulsões refratárias aos medicamentos, reflete a falta de um melhor entendimento dos distúrbios excitotóxicos característicos desta doença. A partir disto, o objetivo deste estudo foi investigar se existe uma associação entre os marcadores apoptóticos e a via inflamatória em indivíduos epiléticos e naqueles sem a doença. Amostras de sangue foram coletadas de pacientes com epilepsia e posteriormente foram analisados os níveis de proteína carbonil, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (INF- γ), acetilcolinesterase (AChE), caspases (CASP8 e CASP3) e picogreen (PG). Os resultados mostraram um aumento em todos os parâmetros bioquímicos analisados no sangue de pacientes com epilepsia quando comparado aos controles. Além disso, foi observada uma correlação positiva entre TNF- α com as caspases (8 e 3). O IFN- γ correlacionou-se apenas com os níveis da caspase 3. A correlação entre os parâmetros analisados com a gravidade das crises epiléticas e o tratamento com fármacos antiepiléticos (FAEs) não foi significativa, indicando que a administração de medicamentos para controle das crises e melhora dos sintomas não influenciou nos resultados obtidos. Dessa forma, os nossos dados sugerem que as crises epiléticas podem induzir a geração de um ciclo vicioso entre neuroinflamação e apoptose celular, induzindo ao estresse oxidativo e resultando no dano ao DNA nos pacientes com epilepsia. Além disso, nós sugerimos que o uso de FAEs que atuem na via do TNF- α ou IFN- γ poderia representar uma terapia complementar no tratamento dos pacientes epiléticos.

Palavras-chave: epilepsia, neuroinflamação, fatores apoptóticos, dano ao DNA, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Post-Graduate Program in Biochemistry
Federal University of Santa Maria, Brazil

NEUROINFLAMMATION AND APOPTOTIC PATHWAY IN EPILEPSY

AUTHOR: Aline Kegler
ADVISER: Michele Rechia Figuera
CO-ADVISER: Luiz Fernando Freire Royes
Defense Place and Date: Santa Maria, February 09, 2015.

Epilepsy is a neurological disease that affects around 1% of world population, with neurobiological, neurochemical, cognitive and psychological consequences. Despite the good prognosis, the high number of epilepsy patients who have refractory seizures to medicine, reflects lack of a better understanding about excitotoxic disorders characteristic of the disease. So, the aim of the study was to investigate if there is an association between apoptotic markers and inflammation pathway in epileptic subjects and those without the disease. Blood samples were collected from subjects with epilepsy and were measured protein carbonyl, tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interferon gamma (IFN- γ), acetylcholinesterase (AChE), caspases (CASP8 and CASP3) and picogreen (PG). The results showed an increase in all analyzed biochemistry parameters from epilepsy subjects when compared to healthy, suggesting that there is a relation between this disease with apoptotic and inflammatory markers. Furthermore, there was a positive correlation between TNF- α with CASP 8 and 3. IFN- γ was just correlated with caspase 3. The correlation between analyzed parameters with seizure severity and antiepileptic drugs (AEDs) treatment was not significant, indicating that medicine administration and symptoms improve did not influence obtained results. So, our results suggest that epileptic seizures can induce the creation of a vicious circle between neuroinflammation and cell death, resulting in DNA damage in epilepsy patients. Furthermore, we suggest that AEDs acting in TNF- α or IFN- γ pathway could represent an adjunctive therapy in epilepsy patients treatment.

Keywords: epilepsy, neuroinflammation, apoptotic factors, DNA damage, oxidative stress.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Epilepsia.....	8
1.2 A inflamação e o Sistema Nervoso.....	9
1.3 O papel da inflamação na epilepsia.....	11
1.4 Citocinas e a regulação da resposta inflamatória.....	12
1.5 Sistema Colinérgico Neuronal.....	15
1.6 Morte celular e Apoptose.....	18
1.7 Espécies Reativas de Oxigênio e Apoptose.....	24
1.8 Objetivos.....	27
1.8.1 Objetivo Geral.....	27
1.8.2 Objetivos Específicos.....	27
2. ARTIGO CIENTÍFICO.....	28
3. DISCUSSÃO.....	51
4. CONCLUSÃO.....	54
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

A epilepsia é um dos mais frequentes transtornos neurológicos graves, atingindo cerca de 50 milhões de pessoas no mundo, 40 milhões delas em países em desenvolvimento (HEANEY et al., 2002). Sua prevalência gira em torno de 5-10/1.000, apresentando-se em geral, com uma distribuição bimodal: picos de incidência no primeiro ano de vida e após os 60 anos de idade (SANDER, 2003).

No Brasil, embora poucos sejam os estudos epidemiológicos, a prevalência está aproximadamente entre 5.1 a 8.2/1.000 (GUERREIRO et al., 1999). Atualmente é considerada um problema de saúde pública, devido às consequências socioeconômicas, orgânicas e psicológicas que acarreta (BRADLEY et al., 2004).

O termo epilepsia abrange diversas síndromes, cuja característica principal é a recorrência, não provocada, de crises epiléticas (COSTA et al., 1998). As manifestações clínicas da epilepsia iniciam abruptamente e são altamente variáveis na forma de apresentação: alteração da consciência, transtornos motores, sensitivos e autonômicos (ELGER e SCHMIDT, 2008), que podem ser resultado dos processos que culminam em hiperexcitabilidade neuronal.

O substrato fisiopatológico comum para todos os tipos de crises epiléticas é o desequilíbrio entre a neurotransmissão excitatória (glutamatérgica) e inibitória (GABAérgica) sobre os circuitos neuronais. Desta forma, uma redução na propagação do impulso GABAérgico e aumento na transmissão glutamatérgica pode causar uma ativação supra-fisiológica dos seus receptores e, conseqüentemente, um desbalanço energético celular, estresse oxidativo e neuroinflamação, culminando na morte neuronal (BENARROCH, 2010). Além disso, mutações nos canais voltagem-dependente de sódio, potássio, cloreto e cálcio podem resultar em despolarização acentuada ou repetitiva, contribuindo para a hiperexcitabilidade neuronal e convulsões (MCCORMICK e CONTRERAS, 2001; ARMIJO et al., 2002; SINGH et al., 2002; MELDRUM e ROGAWSKI, 2007; FATTORE e PERUCCA, 2011; VEZZANI et al., 2011).

Em relação à variabilidade das manifestações clínicas, estas se justificam pelas diferentes regiões envolvidas na hiperexcitabilidade neuronal, e a atual classificação baseia-se em achados clínicos e eletroencefalográficos (MARCHETTI,

2001).

As epilepsias e as crises epilépticas são atualmente classificadas, em relação a sintomatologia, em focais ou generalizadas (BERG et al., 2010). Nas primeiras, o tipo de crise é determinado pelo ponto de origem da descarga neural, a chamada zona de origem ictal, e pelo seu grau de propagação no cérebro. No entanto, nem sempre a zona de origem ictal é a geradora das manifestações clínicas (zona sintomatogênica), nestes casos tratando-se de um “córtex silencioso” (ROSENOW e LUDERS, 2001). A fisiopatologia das crises generalizadas é diversa, caracterizando-se por uma disfunção, geralmente de origem genética, dos circuitos tálamo-corticais (MCCORMICK e CONTRERAS, 2001). Quanto à etiologia, as epilepsias são classificadas atualmente como genéticas, estruturais/metabólicas ou de causa desconhecida (BERG et al., 2010). Estes termos vem substituir os antigos conceitos de crises idiopáticas (sem lesão estrutural cerebral associada), sintomáticas (com lesão estrutural associada) ou criptogênicas, cuja etiologia era presumível, porém não diagnosticada.

O prognóstico geral para o controle das crises é bom: 70% dos pacientes entram em remissão após 5 anos do diagnóstico (COCKERELL et al., 1997). Mesmo assim, há um aumento do risco de mortalidade tanto para a população adulta quanto a pediátrica (RAFNSSON et al., 2001).

1.2 A inflamação e o Sistema Nervoso

O sistema imune constitui-se de células e moléculas responsáveis pelo reconhecimento de organismos invasores estranhos, impedindo sua disseminação (PARHAM, 2001). Neste sentido, evidências experimentais demonstram que o sistema nervoso central (SNC) interfere na resposta imunológica e essa exerce influência sobre este sistema, modulando-se reciprocamente (BUTTS e STERNBERG, 2008). Dentre estas respostas imunológicas, está a inflamação, que pode ser desencadeada por alguma lesão infecciosa, traumática ou tóxica (PERRY et al., 1995) e caracteriza-se pelo recrutamento de células do sistema imune, alterações da permeabilidade vascular, sensibilização de terminações nervosas e produção de moléculas denominadas mediadores inflamatórios (WILLIAMS, 1983).

A atividade pró-inflamatória constitui-se de uma série de linhagens celulares atuantes conforme o estímulo ambiental celular onde se encontram. Proteínas solúveis, as citocinas, são as responsáveis pela identificação deste ambiente, assim como as células do sistema fagocitário, principalmente os macrófagos, são as principais efetoras da resposta inflamatória.

O encéfalo é envolto por um grupamento de células endoteliais especializadas capazes de conferir proteção através de uma barreira semipermeável e seletiva, a barreira hematoencefálica (BHE), que juntamente com os locais de drenagem linfática garante uma proteção diferenciada ao SNC. Consequentemente, os mediadores pós-insulto encontrados no cérebro são majoritariamente sintetizados por células do parênquima cerebral, células da BHE e do plexo coróide (VEZZANI e GRANATA, 2005).

O recrutamento leucocitário periférico possui influência sobre a BHE. Quando presente, o estímulo lesivo promove uma instabilidade nesta barreira mediante a ativação de metaloproteinases (enzimas pertencentes à família das proteases) (ZHANG et al., 2010), permitindo o contato das células do sistema imune periférico com o interior do encéfalo. O tecido cerebral lesionado libera mediadores estimulando a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , favorecendo a expressão de moléculas de adesão e integrinas de membrana, promovendo a adesão leucocitária e quimiotaxia da mesma população celular. A partir destas ações, o resultado é o aumento da permeabilidade da BHE, possibilitando a transmigração da circulação periférica para o foco lesivo encontrado no cérebro (VEZZANI et al., 2011).

Ao transpor a BHE, podem ser encontrados três grupos celulares distintos: os neurônios, a macroglia e microglia. A macroglia é representada pelos oligodentrócitos e astrócitos, responsáveis, respectivamente, pelas funções de mielinização axonal e regulação de permeabilidade da BHE (DA COSTA et al., 1998). A microglia é representada pelos macrófagos residentes do SNC. Essas células podem responder a estímulos ambientais e serem ativadas para a realização de suas atividades fagocíticas (DA COSTA et al., 1998; VEZZANI e GRANATA, 2005; CHOI e KOH, 2008; VEZZANI et al., 2011). Dentre os fatores que podem desencadear a neuroinflamação, pode-se citar a presença de agentes infecciosos, traumas, dano cerebral, isquemias ou doenças crônico-degenerativas (VEZZANI et al., 2011). Quando acontece um estímulo lesivo, ocorre a liberação de citocinas IL-

1 β , IL-6 e TNF- α no foco lesivo. Estas são proteínas de importante atividade pró-inflamatória, que quando liberadas ativam as células microgliais e astrócitos através da atuação sobre a expressão e regulação gênica dessas células, aumentando a expressão de receptores para estas citocinas nas demais células do SNC (ROGAWSKI e LOSCHER, 2004; VEZZANI et al., 2011). O objetivo do aumento da expressão destes receptores é propiciar um maior número de células ativas em um curto período, otimizando a percepção do estímulo lesivo.

1.3 O papel da inflamação na epilepsia

Evidências experimentais e clínicas sugerem a relação da inflamação cerebral (neuroinflamação) na epileptogênese e desenvolvimento das crises epiléticas recorrentes (VEZZANI, 2005; VEZZANI et al., 2011). A utilização de quimioconvulsivantes ou estímulos elétricos são capazes de liberar ondas de mediadores inflamatórios, conforme achados em modelo experimental de epilepsia (VEZZANI et al., 2011). A influência da resposta inflamatória na epilepsia foi primeiramente observada em pacientes resistentes ao tratamento com drogas antiepilépticas, visto que estes apresentaram uma importante redução do número de crises após o uso de anti-inflamatórios (RIIKONEN, 2004).

A resposta inflamatória inicialmente produz mediadores capazes de promover a expressão de moléculas de adesão necessárias para migração leucocitária através da BHE. A ligação destes componentes aos receptores dos astrócitos promove sua ativação, eleva a síntese de glutamato e aumenta a excitabilidade neuronal, favorecendo o desenvolvimento das crises. A presença de crises epiléticas induz a produção de mediadores, iniciada pelas células do endotélio cerebral. Dentre estes importantes mediadores pró-inflamatórios, podem ser citadas as citocinas, receptores tipo Toll (TLR) e transdutores de sinal, responsáveis pela ativação do fator de transcrição nuclear Kappa B (NF- κ B) (VEZZANI, 2005).

O NF- κ B é um importante regulador de processos fisiológicos e fisiopatológicos (JANSSENS e TSCHOPP, 2006), como a resposta imune inata e adquirida, participa dos processos de proliferação celular (BONIZZI e KARIN, 2004),

morte celular (SUN e LEY, 2008), neuroproteção e neurodegeneração (O'NEILL e KALTSCHMIDT, 1997; FRIDMACHER et al., 2003).

A inflamação pode também contribuir para o desenvolvimento das crises epiléticas ou no estabelecimento do quadro de crises epiléticas recorrentes. Além disso, a resposta inflamatória é capaz de promover a liberação de prostaglandinas, atuar sobre o centro hipotalâmico (ZETTERSTROM et al., 1998), e desta forma, desenvolver a reação febril, um dos cinco sinais da resposta inflamatória (KUMAR, 2005).

A inflamação, mesmo quando periférica, é capaz de influenciar o desenvolvimento das crises epiléticas. A resposta inflamatória ao lipopolissacarídeo (LPS) de paredes de bactérias gram-negativas promove a ativação de receptores tipo Toll, como TLR4, consequentemente induzindo a produção da proteína HMGB1 (high mobile group box 1). O LPS é um potente ativador de astrócitos e microglia, consequentemente favorecendo o desenvolvimento das crises através do aumento da excitabilidade neural (MAROSO et al., 2010).

1.4 Citocinas e a regulação da resposta inflamatória

Os estímulos capazes de promover atividades celulares especializadas, por exemplo, as sinapses nervosas das células neuronais, estão relacionadas a proteínas solúveis, as citocinas. Estas moléculas são secretadas por células do sistema imune inato e adaptativo e possuem a capacidade de mediar diversas funções celulares distintas (ABBAS et al., 2008). A presença de agentes agressores, patógenos, antígenos, traumas ou crises epiléticas podem desencadear a produção destas proteínas (VEZZANI, 2005).

1.4.1 Fator de Necrose Tumoral alfa

O TNF-alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória produzida inicialmente como uma proteína transmembrana, a pró-TNF, que sofre clivagem liberando a forma solúvel do TNF- α (BRADLEY, 2008). Estímulos inflamatórios ou infecciosos, principalmente por macrófagos e linfócitos, mas também por neutrófilos, fibroblastos,

células do músculo liso (BALAKUMAR e SINGH, 2006), astrócitos e microglia (KRONFOL e REMICK, 2000) são os responsáveis pela sua produção.

Após ser produzido e liberado, o TNF- α irá ligar-se a receptores específicos denominados TNFR1 e TNFR2, estimulando a transcrição e produção da enzima IKK (*IKB kinase*), com conseqüente produção do fator nuclear Kappa B (NF- κ B). Este fator, quando ativado, irá agir no núcleo da célula, induzindo a produção de proteínas envolvidas nas respostas inflamatória e imunológica, responsáveis pelas principais ações biológicas do TNF- α .

O receptor mais abundante é o TNFR1, e a sua ocupação ativa cascatas que podem levar à sobrevivência, proliferação, diferenciação ou apoptose. As ações intracelulares do TNF- α são mediadas principalmente por este receptor, enquanto a função do TNFR2 é principalmente moduladora, potencializando a associação do TNF com TNFR1 (ADERKA, 1996). De fato, o TNF- α pode induzir apoptose quando se liga a TNFR1 nos neurônios e microglia (BRIETZKE e KAPCZINSKI, 2008) e os seus níveis séricos correlacionam-se com a gravidade das infecções (BRADLEY, 2008).

Dentre as ações biológicas do TNF- α estão o estímulo ao recrutamento de neutrófilos e monócitos, realizado através da ativação endotelial e promoção da secreção de quimiocinas produzidas por macrófagos e células endoteliais.

No SNC, o TNF- α é capaz de ativar seus dois tipos de receptores, p55 e p75, possibilitando a modulação da via de sinalização celular (LOETSCHER, STEINMETZ e LESSLAUER, 1991; MUKAI et al., 2009). Os receptores do tipo p55 tem sido implicados na ativação da morte celular programada, enquanto os receptores p75 estão associados com ativação do fator nuclear Kappa B (NF- κ B) (NATOLI et al., 1997; ZHUANG et al., 1999; SHENG et al., 2005).

A presença das crises epilépticas acarreta na elevação de RNAm para esta citocina nas regiões do hipocampo, amígdala e córtex piriforme, pré-frontal e parietal (PLATA-SALAMAN et al., 2000; GODLEVSKY et al., 2002). Assim, o principal efeito fisiológico do TNF- α é a promoção e ativação da resposta imune e inflamatória através do recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção. De acordo com estudos em modelos experimentais, o TNF- α demonstra um efeito dose-dependente. Baixas concentrações desta citocina ($<10^{-9}$ M) são responsáveis por desencadear uma inflamação local e ativação de leucócitos; uma dose mediana é responsável por desenvolver efeitos sistêmicos, como a atuação no eixo

hipotalâmico, enquanto que altas concentrações produzem o choque séptico, contribuindo para a baixa resistência vascular e redução do débito cardíaco (ABBAS et al., 2008).

1.4.2 Interferon-gama

O interferon-gama (INF- γ) é uma citocina inflamatória envolvida nos mecanismos de defesa, estabelecimento de processos inflamatórios e autoimunidade, produção de mediadores derivados de macrófagos, por exemplo, o TNF- α , também atuando na regulação negativa da síntese de mediadores anti-inflamatórios, como a IL-10 (EL-HASHEMITE et al., 2004).

É produzido pela subpopulação de linfócitos T auxiliares CD4+ (Th 2) e linfócitos CD8+. A ação do INF- γ ocorre através da interação desta citocina com as subunidades α e β dos seus receptores de superfície celular, R1 e R2 (DARNELL et al., 1994; DARNELL, 1998). O receptor R1 apresenta um sítio de ligação para o INF- γ , enquanto o receptor R2 sinaliza este sítio de ligação, ativando as vias Janus quinases (JAK1 e JAK2) e ativando os sinais de transcrição (DARNELL et al., 1994).

De acordo com estudos genéticos e imunohistoquímicos, o efeito proliferativo ou citotóxico do IFN- γ é determinado primariamente pela densidade de seus receptores localizados na superfície celular (BERNABEI et al., 2003).

Dentre os papéis do IFN- γ durante a resposta celular, estão inclusos a proliferação celular, apoptose e interação leucócitos-células endoteliais (BOEHM et al., 1997). O IFN- γ sozinho possui a capacidade de induzir a apoptose em algumas células, porém, geralmente, sua função é sensibilizar as células para o receptor de morte, induzindo a apoptose (CHAWLA et al., 2003).

A indução da apoptose através do INF- γ é lenta (24 a 48 h) e a sensibilização mediada por esta citocina requer um pré-tratamento de 1 a 2 dias, sugerindo o envolvimento da indução de genes em ambos casos. De fato, vários genes pró-apoptóticos, incluindo os que codificam caspase 8, TRAIL e FasL, tem sido identificados como alvos de transcrição de IFN- γ (SHUSTOV et al., 1998; XU et al., 1998 ; SEDGER et al., 1999; RUIZ et al., 2000; SHIN et al., 2001; YANG et al., 2003).

1.5 Sistema Colinérgico Neuronal

A descoberta de uma nova via de controle da síntese de citocinas pró-inflamatórias regulada pelo sistema nervoso autônomo é a via colinérgica anti-inflamatória (PAVLOV e TRACEY, 2005; GALLOWITSCH e PAVLOV, 2007).

O sistema colinérgico é responsável pela propagação do impulso nervoso em sinapses neuronais e neuromusculares através da ação do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (KAWASHIMA e FUJII, 2003; TRACEY, 2007).

No neurônio pré-sináptico, a ACh é sintetizada a partir de colina e acetilcoenzima A. Esta reação é sintetizada através da enzima colina acetiltransferase (ChAT-choline acetyltransferase) (SOREQ e SEIDMAN, 2001). O transporte de colina, do meio extracelular para dentro da célula é desempenhado pelo transportador de colina (CHT-high affinity choline transporter) (KAWASHIMA e FUJII, 2003). A ACh sintetizada é armazenada em vesículas sinápticas pelo transportador vesicular de ACh (VACHT vesicular acetylcholine transporter) (PRADO et al., 2002). Quando ocorrer a propagação do impulso nervoso, os potenciais de ação serão responsáveis por liberar a ACh para a fenda sináptica, permitindo a ligação à receptores específicos expressos na membrana plasmática da célula pós-sináptica.

A hidrólise da ACh é executada pela enzima acetilcolinesterase (AChE), que originará colina e acetato, regulando a concentração do transmissor na sinapse, modulando, desta forma, a transmissão do impulso nervoso (SOREQ e SEIDMAN, 2001).

Os receptores de ACh podem ser divididos em dois tipos: nicotínicos e muscarínicos. Os receptores nicotínicos (nAChR) são canais iônicos ativados por ligantes, formando estruturas homo e heteropentaméricas a partir de subunidades α , β , γ , δ e/ou ϵ . Os associados à proteínas do tipo G são denominados receptores muscarínicos (mAChR). Cinco tipos deste receptor são conhecidos: M1 a M5 (SOREQ e SEIDMAN, 2001; PAVLOV e TRACEY, 2005; GWILT et al., 2007).

Os dois tipos de receptores estão distribuídos no sistema nervoso central e periférico, porém, possuem diferentes localizações sinápticas e exibem variadas funções na transmissão colinérgica (PAVLOV e TRACEY, 2006).

A ação anti-inflamatória da acetilcolina (ACh) é desempenhada através da supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias (PRADO et al., 2002). Assim, a acetilcolinesterase (AChE) emerge como uma importante contribuição no controle

das vias das respostas inflamatória e imune, mediada por receptores muscarínicos e nicotínicos.

Estudos demonstram que a ativação dos receptores nicotínicos em macrófagos reduziu significativamente a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e IL-6, enquanto que a produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10, não foi alterada (BOROVIKOVA et al., 2000; WANG et al., 2003). A inibição da atividade da AChE foi capaz de reduzir os níveis de TNF- α e IL-1 β em cultura de linfócitos (NIZRI et al., 2006). Neste sentido, inibidores da AChE reduzem a proliferação de linfócitos e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, atenuando a inflamação através do aumento da concentração de ACh no espaço extracelular (NIZRI et al., 2006).

A via colinérgica anti-inflamatória representa um mecanismo de resposta do SNC à presença de estímulos inflamatórios. Este é mediado pela ação do nervo vago (TRACEY, 2007). O nervo vago é o maior constituinte da divisão parassimpática do sistema nervoso autônomo (GALLOWITSCH e PAVLOV, 2007). Origina-se no tronco cerebral, percorrendo o pescoço, tórax e abdômen dirigindo-se para os órgãos viscerais. Contém fibras que possuem componentes sensoriais (aférentes) e motores (eferentes), responsáveis pelo controle das funções destes órgãos (TRACEY, 2005; TRACEY, 2009). De acordo com evidências experimentais, a ativação do nervo vago eferente diminui os níveis de TNF- α sistêmico e também de outras citocinas pró-inflamatórias, inibindo, desta forma, a resposta inflamatória (PAVLOV e TRACEY, 2006; ROSAS-BALLINA et al., 2008). Estas pesquisas demonstram que para além das funções clássicas de regulação do batimento cardíaco e função gastrointestinal, o nervo vago é também um regulador da resposta inflamatória (PAVLOV e TRACEY, 2006).

A IL-1 β ou o LPS são ativadores das fibras aférentes do nervo vago, as quais servem de sensor para a inflamação (PAVLOV e TRACEY, 2005; GWILT et al., 2007). A transmissão desta informação ao sistema nervoso central estimula o nervo vago eferente a produzir ACh (GWILT et al., 2007). Desta forma, a ACh induz a inibição da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e outras células produtoras de citocinas. Este processo somente é possível através da ativação do receptor nAChR $\alpha 7$, o qual é expresso na membrana plasmática destas células do sistema imune (PARRISH et al., 2008). (Figura 1). Estudos demonstram um importante papel deste receptor para os efeitos anti-inflamatórios do nervo vago.

A estimulação deste nervo torna-se ineficiente na supressão dos níveis de TNF- α em ratos *knockout* para o gene codificante para o receptor, enquanto que, em ratos controle, esta resposta não é observada (PAVLOV e TRACEY, 2006).

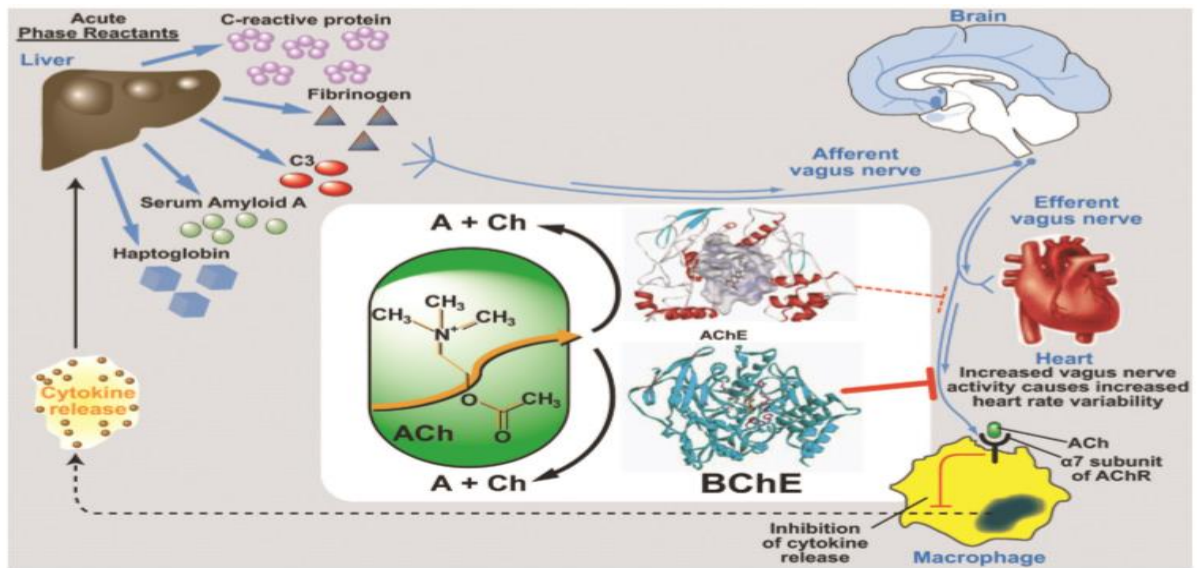


Figura 1- Via colinérgica anti-inflamatória. Após um dano cerebral, o nervo vago aferente irá liberar, através do sistema periférico, a acetilcolina. Este neurotransmissor irá se ligar ao seu receptor específico na superfície de macrófagos, a subunidade $\alpha 7$, conseqüentemente inibindo da liberação de citocinas pró-inflamatórias. Extraído de Ben Assayag et al. (2010).

1.6 Morte celular e Apoptose

Define-se morte celular como um processo que abrange uma sucessão de eventos a partir da ação de agentes lesivos (KUMAR et al., 2008). A classificação pode ser baseada nas diferenças de critérios: características morfológicas (autofagia, necrose e apoptose), aspectos funcionais (fisiológica ou patológica, programada ou acidental), características imunológicas (imunogênica ou não imunogênica), ou aspectos enzimáticos (com ou sem ação de nucleases ou proteases, como caspases, catepsinas e outras) (GRIVICICH, REGNER e ROCHA, 2007; KUMAR et al., 2008; KROEMER et al., 2009).

A célula em apoptose é fragmentada e sofre o processo de endocitose por células vizinhas e especializadas. Porém, antes deste processo, ocorrem algumas alterações morfológicas, dentre elas, o citoplasma torna-se mais denso, a cromatina torna-se condensada e ocorre a formação de corpos apoptóticos (WYLLIE et al., 1981; BOLETI et al., 2008).

A apoptose é uma modalidade de morte celular comum aos estados fisiológicos e patológicos. Em situações fisiológicas a apoptose elimina células que já cumpriram sua função e também contribuem para manutenção do número de células nos tecidos. No entanto, em condições patológicas a apoptose possui a função de eliminar células danificadas geneticamente ou células com lesões irreparáveis (KUMAR et al., 2008).

Estímulos exógenos, agindo em receptores de membranas e/ou endógenos, gerados após diferentes agressões podem desencadear a apoptose. A indução de modificações funcionais e morfológicas características do processo são induzidas por proteases, onde são encontradas as principais representantes, as caspases. Estas enzimas possuem um resíduo de cisteína no sítio ativo e clivam substratos que possuem resíduos de ácido aspártico em sequências específicas (GRIVICICH, REGNER e ROCHA, 2007).

As caspases podem ser divididas em dois grupos funcionais: as que participam diretamente da apoptose (caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9 e 10) e as que estão envolvidas na indução da inflamação (caspases 1, 4, 5, 11, 12 e 14) (CHEN et al., 1998).

As caspases envolvidas na apoptose são divididas de acordo com a estrutura e função de seus pró-domínios. As caspases ativadoras ou iniciadoras (caspases 8, 9 e 10) possuem um pró-domínio funcional grande e ativo. É onde ocorre a associação com proteínas adaptadoras como Apaf-1 (fator 1 de ativação de proteases de apoptose) e FADD (domínio de morte associado a Fas). As caspases efetadoras ou executoras possuem pró-domínios pequenos ou inexistentes, sendo estes responsáveis pela clivagem de substratos (GRIVICICH, REGNER e ROCHA, 2007; KUMAR et al., 2008)

As caspases ativadoras irão ativar as caspases executoras, amplificando os sinais de morte, ativando mais caspases ativadoras e/ou irão interagir com outras moléculas, principalmente proteínas reguladoras e estruturais, clivando-as e favorecendo a morte celular. São inativadas proteínas do citoesqueleto, proteínas reparadoras de DNA, proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 e ativadores transcricionais como NF- κ B (KUMAR et al., 2008).

As caspases podem ser ativadas através de duas principais vias: via extrínseca ou via de morte mediada por receptor e via intrínseca ou mitocondrial (Figura 2).

A via extrínseca da apoptose é iniciada quando os ligantes de morte extracelulares interagem com seus respectivos receptores presentes na superfície da membrana plasmática. Os grupos de receptores pertencem à família do fator de necrose tumoral (TNF), enquanto que entre os ligantes de morte encontram-se o TNF- α e FasL. Quando o ligante Fas-L interage com o receptor Fas na superfície celular, há a formação de trímeros que irão se ligar, no citoplasma da célula, à uma proteína adaptadora denominada FADD. Forma-se assim, um complexo molecular que se liga à pró-caspase 8, com consequente formação de um complexo denominado DISC. Neste complexo irá ocorrer a ativação da pró-caspase 8, com consequente ativação da caspase 3 efetora, culminando na morte celular (BOATRIGT e SALVESEN, 2003).

Alguns estudos observaram a presença de processos degenerativos e morte neuronal após crises epilépticas em diferentes modelos experimentais e após *status epilepticus* (SE) em humanos (HONCHAR, OLNEY e SHERMAN, 1983; TURSKI et al., 1983; LIU et al., 1994; FUJIKAWA, 1996; PEREDERY et al., 2000; MEN et al., 2000).

De fato, Henshall e colaboradores mostraram um aumento da expressão da caspase 3 no neocórtex de pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT), sugerindo o envolvimento da via apoptótica nesta doença (HENSHALL et al., 2000).

A via intrínseca está envolvida com a mitocôndria. A mitocôndria tem um papel essencial na ativação da via apoptótica e morte celular (SCHINZEL et al., 2005), sendo uma fonte de proteínas pró e anti-apoptótica, assim como de citocromo *c*. Nesta via, o citocromo *c* liberado da mitocôndria para o citosol liga-se ao fator 1 de ativação de proteases (Apaf-1), formando um complexo denominado apoptossomo, e ativando a caspase 9. Assim, é iniciada a cascata da caspase citocromo *c* dependente. A caspase 9 ativa a caspase 3, causando ativação em cascata das outras caspases (CHEN et al., 1998). Em ambas as vias, a ativação da caspase 3 é o ponto crucial e irreversível do fenômeno de morte celular. Neste estágio não há mecanismos que possam reverter a apoptose (HENGARTNER, 2000).

Neste contexto, alguns estudos mostraram um aumento na liberação do citocromo *c*, Apaf-1 e ativação das caspases 9 e 3, com subsequente fragmentação do DNA no hipocampo de ratos após SE, sugerindo a ativação da via intrínseca (TURSKI et al., 1983; LEITE, BORTOLOTTO e CAVALHEIRO, 1990). Entretanto, HENSHALL (2007) observou a ativação das vias extrínseca e intrínseca da apoptose após crises epiléticas no cérebro de ratos.

Os canais de ânions voltagem-dependente (VDAC) são canais que controlam a permeabilidade da membrana externa da mitocôndria. Encontram-se superpostos aos canais ANT (Adenine Nucleotide Transferase) que estão situados na membrana interna, formando assim, os poros de permeabilidade transicional. Devido à permeabilidade controlada, apenas moléculas pequenas, de até 5 KD conseguem passar por estes canais. Moléculas maiores, dentre elas os fatores apoptogênicos (ex: citocromo *c*) ficam isoladas no espaço intermembranas. Estes fatores, na presença de sinais apoptóticos são liberados no citoplasma, podendo assim, ativar as caspases (ANAZETTI e MELO, 2007; GRIVICICH, REGNER e ROCHA, 2007; KUMAR et al., 2008). As proteínas da família Bcl (B Cell Lymphoma) exercem o importante papel na transdução do sinal apoptótico por regular a permeabilidade da membrana mitocondrial ao citocromo *c*. Podem ser divididas em dois grupos: pró-apoptóticas como Bax e Bak e antiapoptóticas como Bcl-2 e Bcl-xl (SUGAWARA et al., 2004).

As proteínas da família Bcl possuem domínios homólogos do tipo BH (Baculovir Homologue). As proteínas Bcl-2 e Bcl-xl possuem quatro dos domínios BH (BclBH4), sendo consideradas estabilizadoras de membranas. Já as proteínas Bax e Bak compartilham três domínios BH (BclBH3) enquanto, as Bid, Bad, Bod, Bim e Puma compartilham um único domínio (BclBH1), sendo consideradas assim, desestabilizadoras da membrana, aumentando a permeabilidade e induzindo a liberação de moléculas pró-apoptóticas (GRIVICICH, REGNER e ROCHA, 2007).

Existem dois mecanismos para explicar a maneira como Bax e Bak provocam a liberação dos fatores apoptogênicos: o primeiro é a permeabilização seletiva da membrana externa mitocondrial. Esta acontece quando Bax e Bak oligomerizam-se, ocorrendo a formação de canais específicos para a passagem do citocromo *c* para o citoplasma. A regulação de canais já existentes é o segundo mecanismo proposto.

Os poros de permeabilidade transicional permitem a difusão não seletiva de moléculas pequenas através da membrana mitocondrial interna, e também são responsáveis por assegurar a manutenção do gradiente eletroquímico definido como $\Delta\Psi_m$ (delta-fi mitocondrial – potencial de membrana interna mitocondrial). Quando ocorre a abertura destes poros, a membrana mitocondrial externa é danificada, liberando, inespecificamente, os fatores apoptogênicos. Porém, a inserção de Bax na membrana mitocondrial causa a saída do citocromo *c* e a dissipação do $\Delta\Psi_m$, levando à perda das funções mitocondriais (GRIVICICH, REGNER e ROCHA, 2007).

Alguns estudos indicam que o SE convulsivo em humanos pode resultar em dano neuronal por ativação de mecanismos moleculares envolvendo a rota apoptótica (DEGIORGIO et al., 1999; LANSBERG et al., 1999; MEN et al., 2000). De fato, alguns estudos mostram que tanto o aumento da expressão e translocação da proteína pró-apoptótica Bax, como a ativação da caspase 3, um mediador chave na morte celular por apoptose foram observados após SE induzido por cainato (HENSHALL, CHEN e SIMON, 2000).

O ativador de caspase derivado da mitocôndria (SMAC) é outro exemplo de molécula também liberada por estímulos apoptóticos. Esta molécula é capaz de impedir a ação das IAPs (família de proteínas inibidoras da apoptose) que atuam através dos mecanismos de prevenção à ativação de pró-caspases e inibindo a atividade das que se encontram ativadas (SUGAWARA et al., 2004).

A caspase 3, além de promover a ativação da cascata de caspases, cliva o inibidor de endonuclease ICAD, promovendo a liberação da DNase ativada por caspase (CAD), ou inativa a enzima reparadora de DNA (PARP). Desta forma, a caspase 3 acarreta a quebra do DNA, conseqüentemente, impedindo a sobrevivência celular (SUGAWARA et al., 2004).

O fator indutor de apoptose (AIF), além de ativar diretamente a caspase 9, é ativador de endonucleases (enzimas que possuem a capacidade de clivar o DNA) possivelmente através da ativação das caspases 3 e 7. Quando liberados no citoplasma, o AIF e as endonucleases podem migrar diretamente para o núcleo, induzindo a fragmentação do DNA com subseqüente fragmentação da cromatina, tornando-se importante no processo de apoptose por via independente das caspases (GRIVICICH, REGNER e ROCHA, 2007).

Desta forma, as análises quantitativas da caspase 8 (iniciadora) e caspase 3 (executora) (HENSHALL et al., 2000), podem ser importantes indicativos de morte celular programada na epilepsia.

O tecido celular sofre mudanças em razão de determinados processos fisiológicos e patológicos, e estas mudanças são, geralmente, estimadas através da mensuração do conteúdo de DNA (HUNZIKER, 1992). A quantificação dos ácidos nucléicos é um passo crucial em muitas aplicações diagnósticas e biológicas. Diversos ensaios estão disponíveis para quantificação do DNA solúvel, porém poucos são específicos e sensíveis para DNA dupla fita como o picogreen (PG) (VITZTHUM et al., 1999). Este método de quantificação apenas emite fluorescência quando se liga com o DNA dupla fita, diferenciando-se da maioria de outros ensaios onde a afinidade pelo DNA e RNA diminuem suas especificidades (HÁ et al., 2011).

Embora sejam induzidas de maneiras independentes, as vias intrínseca e extrínseca da apoptose podem estar correlacionadas. A atuação dos ligantes FAS e TNF- α aos seus respectivos receptores de morte ativam a pró-caspase 8, a qual cliva a proteína Bid, provocando sua translocação para a mitocôndria, resultando na saída do citocromo c. Dessa forma, o sinal de morte amplifica-se e o processo iniciado extrinsecamente é difundido, envolvendo a atuação dos mecanismos mitocondriais (KUMAR et al., 2008).

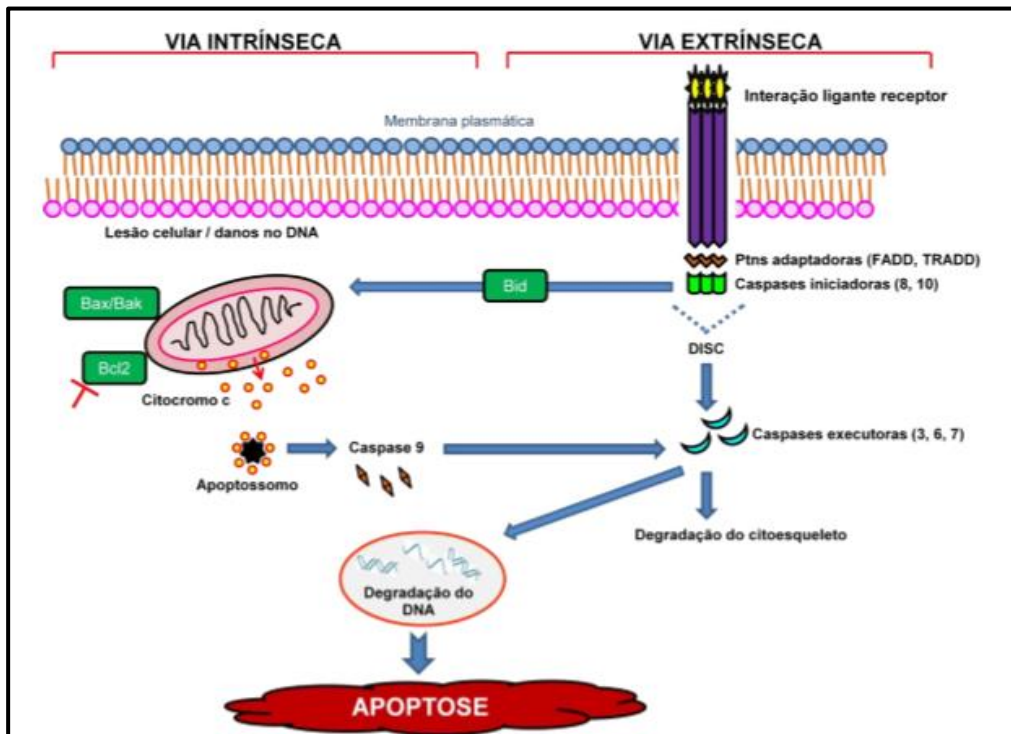


Figura 2- Vias de ativação da apoptose. A via extrínseca é ativada através da interação ligante receptor na superfície da membrana plasmática, formação de proteínas adaptadoras que irão ativar a pró-caspase 8, que por consequência ativa a caspase 3. A via intrínseca da apoptose é ativada através da mitocôndria, onde proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak se oligomerizam, com consequente liberação do citocromo c para o citosol da célula, ativando a caspase 9 que irá ativar a caspase 3. Ambas culminam com a ativação da cascata das caspases e com a degradação de substratos celulares específicos que levam às alterações características deste processo de morte celular. Extraído de Andrade et al. (2011).

1.7 Espécies Reativas de Oxigênio e Apoptose

As lesões ocasionadas pelos radicais livres e/ou espécies reativas de oxigênio (EROs) também podem induzir a morte celular por apoptose (Figura 3).

Os radicais livres são moléculas altamente instáveis e reativas, que contêm um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. Como a maioria dos radicais livres são derivados do metabolismo do oxigênio, usa-se o termo “Espécies Reativas de Oxigênio” para denominá-los (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Essas EROs são formadas durante o metabolismo normal, por processos enzimáticos e não enzimáticos, e, quando há um aumento na sua produção, causam danos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos celulares (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 1989).

As enzimas e as proteínas podem ser atacadas pelos EROs gerados nos diversos processos metabólicos. As EROs podem atacar os resíduos de aminoácidos (especialmente prolina, arginina, lisina e treonina) para produzir grupos carbonila (DEAN et al., 1997; MAISONNEUVE et al., 2009), os quais podem ser quantificados por espectrofotometria (LEVINE et al., 1990). O principal indicador e marcador de oxidação protéica é a determinação do conteúdo de proteína carbonilada (BEAL, 2002; MAISONNEUVE et al., 2009).

As alterações provocadas pelas EROs modificam a atividade biológica das macromoléculas, especialmente das enzimas, podendo alterar a sua atividade catalítica, devido à desorganização estrutural. As células que apresentarem as membranas danificadas ficam sujeitas a citólise, apoptose e prejuízo no transporte ativo de substâncias (PILKA et al., 2009).

A proteína carbonilada pode ser gerada também através da clivagem oxidativa das proteínas por um sistema de α -amidação ou por oxidação das cadeias laterais de glutamato. Também, os grupos carbonilados podem ser introduzidos nas proteínas por uma reação secundária das cadeias laterais nucleofílicas de cisteína (Cis), histidina (His) e lisina (Lis) com aldeídos produzidos durante a peroxidação lipídica (como o malondialdeído, entre outros). Além disso, derivados carbonilados reativos (cetoaminas, cetoaldeídos) gerados como uma consequência da reação de açúcares redutores, ou seus produtos de oxidação com resíduos de Lis das proteínas (reações de glicação ou glicooxidação) com a eventual formação de produtos finais de glicação-lipoxidação avançados, podem levar a formação de

grupos carbonilados (DALLE-DONNE et al., 2003; STADTMAN, 2004; PILKA et al., 2009). O mecanismo da carbonilação ainda não está totalmente esclarecido, entretanto os mais aceitos são um aumento no número de espécies oxidantes; um decréscimo nos *scavengers* dessas espécies (GALVANI et al., 2008); um aumento na susceptibilidade dessas proteínas a oxidação e um decréscimo na remoção das espécies oxidadas (DAVIES, 2000).

A modificação oxidativa das proteínas por EROs implica na progressão de várias patologias humanas como as doenças cardíacas (CORREA et al., 2008), neoplasias (BATTISTI et al., 2008) e epilepsia (FREITAS, 2009).

Após episódios convulsivos, o dano tecidual é capaz de gerar espécies reativas (ER), podendo ocasionar a morte neuronal (LIANG, HO e PATEL, 2000); ERAKOVIC et al., 2001; KANEKO et al., 2002) e com o fato de o cérebro possuir uma alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados, essas ER são capazes de afetar a expressão de proteínas funcionais de membrana e receptores (MAES et al., 1999; LIANG, HO e PATEL, 2000). Além disso, sob estímulos apoptóticos, o ligante TNF- α é capaz de elevar a concentração intracelular de EROs (GRIVICICH, REGNER e ROCHA, 2007; KUMAR et al., 2008) contribuindo para a ativação da cascata apoptótica.

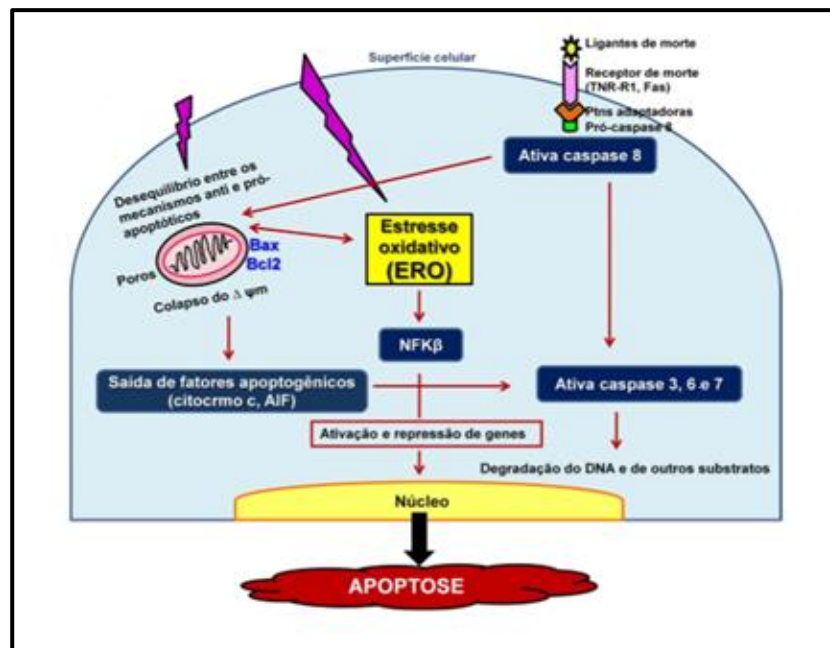


Figura 3- Indução da apoptose pelo aumento da geração de ERO intracelular. Quando ERO aumentam no interior da célula ocorre o estresse oxidativo, alterações nas membranas mitocondriais, dissipação do potencial de membrana mitocondrial, liberação dos fatores apoptogênicos para o citoplasma, culminando com a ativação da cascata das caspases e apoptose. Adaptado de Andrade et al. (2011).

Sabendo-se que, as caspases 8 e 3 são marcadores apoptóticos envolvidos no dano ao DNA e podem ser ativadas através da ligação do TNF-α a seus receptores e pelo INFγ, assim como a proteína carbonil é uma medida inespecífica de dano oxidativo, torna-se importante a medida destes parâmetros para a compreensão das vias apoptóticas na epilepsia. Dessa forma, a investigação desta cascata pode auxiliar na melhor compreensão da patologia e, portanto, fornecer conhecimento para o desenvolvimento de novas medidas terapêuticas mais eficazes e seguras para os pacientes epiléticos.

1.8 Objetivos

1.8.1 Objetivo Geral

Investigar se existe uma associação entre a via inflamatória e apoptótica, bem como, um envolvimento do dano oxidativo nas amostras sanguíneas de pacientes com epilepsia tratados no setor de Neurologia do Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), comparando com indivíduos saudáveis.

1.8.2 Objetivos Específicos

Determinar os níveis séricos do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interferon gama (INF- γ) e acetilcolinesterase (AChE) nos pacientes epiléticos, comparando com os indivíduos saudáveis;

Determinar a ativação das caspases 8 e 3 no soro dos pacientes epiléticos, comparando com os indivíduos saudáveis;

Investigar os possíveis danos ao DNA através do teste picogreen em amostra plasmática dos pacientes epiléticos, comparando com os indivíduos saudáveis;

Avaliar as concentrações plasmáticas de proteína carbonilada nos pacientes epiléticos, comparando com os indivíduos saudáveis;

Avaliar uma possível associação entre a média do número de crises com os parâmetros bioquímicos analisados no estudo;

Avaliar uma possível associação entre os fármacos utilizados pelos pacientes epiléticos com os parâmetros bioquímicos analisados no estudo;

Analisar a correlação entre os marcadores inflamatórios AChE, TNF- α e INF- γ com os marcadores de morte celular, caspase 8 e caspase 3 em pacientes epiléticos.

3 DISCUSSÃO

O papel da inflamação e do dano oxidativo cerebral está relacionado a diversas doenças neurológicas, e particularmente, ao mecanismo fisiopatológico da epilepsia (GRIFFIN, 2006; VEZZANI et al., 2011; MAO et al., 2013). Além disso, autores descrevem que as crises epiléticas podem conduzir à morte neuronal (BENZON et al., 2002; CRESPEL et al., 2002), porém, o mecanismo exato da morte celular a partir das crises epiléticas não está bem esclarecido.

Os resultados deste estudo mostraram que pacientes com epilepsia apresentaram elevados níveis de proteína carbonilada, marcadores inflamatórios (AChE, TNF- α e IFN- γ), assim como, um aumento nos níveis de caspases (8 e 3) e dano ao DNA nas amostras sanguíneas de pacientes com epilepsia. Interessantemente, nós encontramos uma correlação significativa entre os marcadores inflamatórios e apoptóticos nos pacientes com epilepsia, mas não com IFN- γ e CASP 8. Os dados também mostraram uma ausência de correlação com os níveis de marcadores de estresse oxidativo, inflamatórios e apoptóticos com a gravidade das crises epiléticas e com o uso dos fármacos antiepiléticos (FAEs), sugerindo que a intensidade das crises ou o uso de medicamentos não influenciam nos níveis dos marcadores analisados. Desta forma, nossos resultados mostram, pela primeira vez, evidências clínicas de um círculo vicioso entre inflamação e a via apoptótica, conduzindo ao dano do DNA nos pacientes epiléticos.

Embora o papel do sistema colinérgico na epilepsia permaneça desconhecido, alterações na atividade da enzima AChE sugerem que este sistema possa contribuir para a regulação das respostas imune na epilepsia. A função principal da AChE é a hidrólise da Ach (KAWASHIMA e FUJII, 2000), conhecida por possuir propriedades anti-inflamatórias e de supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias (BOROVIKOVA et al., 2000; KAWASHIMA e FUJII, 2003).

De acordo com Nizri et al. (2006), inibidores da AChE reduzem a secreção de citocinas pró-inflamatórias, entre elas, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , consequentemente atenuando a inflamação através do aumento de ACh nos espaços extracelulares. Os dados deste estudo mostraram um aumento na atividade da enzima AChE em amostra sanguínea dos pacientes com epilepsia, sugerindo que este aumento na atividade enzimática pode levar a um decréscimo dos níveis de ACh, contribuindo

para o estado inflamatório. Além disso, hipóteses sugerem que a enzima AChE possa antagonizar a sinalização colinérgica vagal a nível de macrófagos (BOROVIKOVA et al., 2000; KAWASHIMA e FUJII, 2003), ativando o sistema inflamatório e eventos apoptóticos.

Nesse contexto, estudos mostram que TNF- α e INF- γ produzem um efeito excitatório na geração e propagação da atividade epiléptica (LUO et al., 2010; VEZZANI et al., 2011). O TNF- α é capaz de aumentar a excitabilidade neuronal através da ativação de seus receptores (MCCOY e TANSEY, 2008), induzindo diretamente a excitotoxicidade através da ativação dos receptores NMDA (ZOU e CREWS, 2005). Após a ligação do TNF- α , seus receptores podem ser internalizados, levando a ativação de caspases executoras através da via extrínseca da apoptose (MICHEAU e TSCHOPP, 2003; SKELDON et al., 2014). Da mesma forma, o INF- γ pode induzir a apoptose através da ativação da caspase 8 (YANG et al., 2003; SIEGMUND et al., 2005).

A caspase 8 combinada a sua capacidade de induzir a apoptose pela via extrínseca, também pode induzir a ativação da via apoptótica intrínseca através da clivagem da Bcl-2, iniciando os eventos apoptóticos mitocondriais. Estes eventos induzem um aumento da produção de espécies reativas e liberação de fatores apoptogênicos mitocondriais (como o citocromo c) ao citosol, conduzindo a uma ativação da caspase 3 e dano celular (BUDIARDJO et al., 1999). De acordo, nossos dados mostram um aumento do TNF- α e INF- γ , assim como a ativação das caspases (8 e 3) e dano ao DNA no sangue dos pacientes com epilepsia.

Interessantemente, nós observamos uma correlação significativa entre os marcadores inflamatórios e apoptóticos nas amostras sanguíneas de pacientes com epilepsia. Estes resultados mostram a existência de uma forte associação entre inflamação e apoptose, propondo a existência de um ciclo vicioso entre esses eventos e que esses marcadores possam sinalizar a presença da doença, mesmo não tendo relação com a intensidade das crises epiléticas. De fato, não foi observado uma correlação entre os níveis de proteína carbonil, marcadores inflamatórios (TNF- α e INF- γ) e apoptóticos (Caspases 8 e 3) com a gravidade ou tempo de duração das crises ou o uso de fármacos antiepiléticos. De fato, Luo et al. (2010) não encontraram diferença nos níveis de INF- γ entre os grupos de animais que desenvolveram completamente as crises epiléticas após o estímulo elétrico com aqueles que apresentaram crises parcialmente, indicando que as mudanças

nos níveis do IFN- γ não estavam associadas a gravidade da epilepsia. Da mesma forma, Mao et al. (2013) mostraram um aumento nos níveis de interleucina 17A nos pacientes epiléticos comparando com controles saudáveis, sem nenhuma correlação com a duração ou tipo de crise ou com o uso de FAEs. Outros autores também mostraram que não houve diferença estatística entre os níveis dos marcadores oxidativos e inflamatórios quando comparados aos pacientes epiléticos tratados e não tratados (PEKER et al., 2009; MAO et al., 2013), sugerindo que o uso de FAEs não interferem na medida destes marcadores.

Dessa forma, nossos dados e aqueles mencionados anteriormente sugerem que o aumento dos níveis de TNF- α e IFN- γ podem ser o resultado das crises epiléticas e não a causa direta das convulsões. De acordo, estudos mostram que o IFN- γ e TNF- α produzem um efeito excitatório na geração e propagação das crises epiléticas, assim como, eles podem ter um papel fundamental nas síndromes epiléticas (LUO et al., 2010; VEZZANI et al., 2011).

Finalmente, nossos dados sugerem que as crises epiléticas desregulam o potencial intrínseco celular, induzindo ao aumento de sinais pró-inflamatórios. Esta cascata de eventos pode ativar as caspases tanto pela via apoptótica extrínseca quanto intrínseca e resultar no dano ao DNA, criando um ciclo vicioso entre neuroinflamação e apoptose celular. Portanto, é plausível propor que os níveis aumentados de TNF- α , IFN- γ e AChE resultam na ativação da via apoptótica e aumento na produção de espécies reativas, conseqüentemente, causando dano ao DNA nos pacientes com epilepsia (Figura 3). Além disso, nós sugerimos que os eventos detectados neste estudo podem contribuir, parcialmente, com a patofisiologia da epilepsia, e que o uso de fármacos que possam agir na via do TNFR ou na ação do IFN- γ poderia representar uma terapia complementar no tratamento dos pacientes epiléticos.

4 CONCLUSÃO

EPILEPSIA

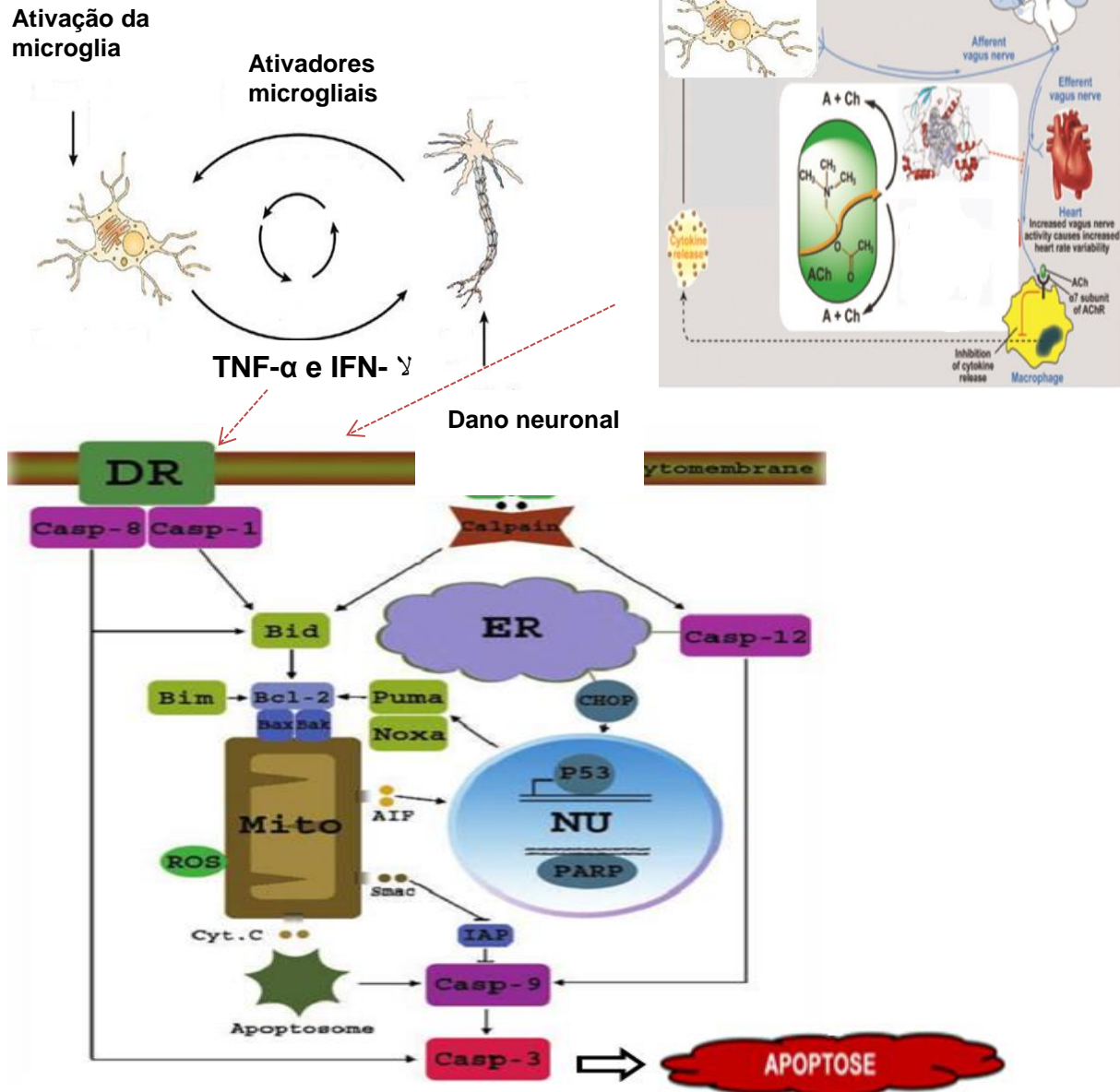


Figura 4- Esquema da via apoptótica na epilepsia. As crises epilépticas induzem a ativação microglial, conseqüentemente liberando fatores inflamatórios (TNF- α e IFN- γ), causando o dano neuronal. A injúria neuronal libera fatores neurotóxicos (ativadores microgliais) que reativam a microglia, gerando um ciclo vicioso. Após a ligação do TNF- α ao seu receptor de morte (DR), ocorre a ativação de caspases executoras, como a CASP 8, através da via extrínseca da apoptose. Da mesma forma, o IFN- γ induz a apoptose através da ativação da CASP 8. A caspase 8 também pode induzir a ativação da via apoptótica intrínseca através da clivagem da Bcl-2, contribuindo para a oligomerização de Bax e Bak e iniciando os eventos apoptóticos mitocondriais. Estes eventos induzem um aumento da produção de

espécies reativas e liberação de fatores apoptogênicos mitocondriais (como o citocromo c) ao citosol, conduzindo a uma ativação da caspase 3 e dano ao DNA. Adaptado de Block et al. (2007) e Ben Assayag et al. (2010).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K. et al. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ADERKA, D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 7, n. 3, p.231-240, 1996.

ANAZETTI, M. C.; MELO, P. S. Morte celular por apoptose: Uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**, v.1, n.1, p.37-58, 2007.

ANDRADE, W. **Banco de dados do programa SIE, módulo biblioteca, aplicáveis às Ciências Farmacêuticas**. 2011. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011.

ARMIJO, J. A. et al. Advances in the physiopathology of epileptogenesis: molecular aspects. **Rev Neurol**, v. 34, n. 5, p. 409-429, 2002.

BALAKUMAR, P.; SINGH, M. Anti-tumour necrosis factor-alpha therapy in heart failure: future directions. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 99, n. 6, p. 391-397, 2006.

BATTISTI, V. et al. Measurement of oxidative stress and antioxidant status in acute lymphoblastic leukemia patients. **Clin Biochem**, v. 41, n. 7-8, p. 511-518, 2008.

BEAL, M. F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. **Free Radic Biol Med**, v. 32, n. 9, p. 797-803, 2002.

BENARROCH, E. E. Glutamate transporters: diversity, function, and involvement in neurologic disease. **Neurology**, v. 74, n. 3, p. 259-264, 2010.

BEN ASSAYAG, E. et al. Serum Cholinesterase Activities Distinguish between Stroke Patients and Controls and Predict 12-Month Mortality. **Mol Med**, v. 16, p. 278-286, 2010.

BENGZON, J. et al. Neuronal apoptosis after brief and prolonged seizures. **Prog Brain Res**, v. 135, p. 111-119, 2002.

BERG, A. T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676-685, 2010.

BERNABEI, P. et al. IGF-1 down-regulates IFN-gamma R2 chain surface expression and desensitizes IFN-gamma/STAT-1 signaling in human T lymphocytes. **Blood**, v. 102, n. 8, p. 2933-2939, 2003.

BOATRIGT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15, n. 6, p. 725-731, 2003.

BOEHM, U. et al. Cellular responses to interferon-gamma. **Annu Rev Immunol**, v. 15, p. 749-795, 1997.

BOLETI, A. P. et al. Pouterin, a novel potential cytotoxic lectin-like protein with apoptosis-inducing activity in tumorigenic mammalian cells. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1321-1330, 2008.

BONIZZI, G.; KARIN, M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. **Trends Immunol**, v. 25, n. 6, p. 280-288, 2004.

BOROVIKOVA, L. V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 458-462, 2000.

BRADLEY et al. Neurology in Clinical Practice. **Ed Elsevier**, Fifth edition, 2004.

BRADLEY, J. R. TNF-mediated inflammatory disease. **J Pathol**, v. 214, n. 2, p. 149-160, 2008.

BRIETZKE, E.; KAPCZINSKI, F. TNF-alpha as a molecular target in bipolar disorder. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1355-1361, 2008.

BUDIARDJO, I. et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 15, p. 269-290, 1999.

BUTTS, C. L.; STERNBERG, E. M. Neuroendocrine factors alter host defense by modulating immune function. **Cell Immunol**, v. 252, n. 1-2, p. 7-15, 2008.

CHAWLA-SARKAR, M. et al. Apoptosis and interferons: role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. **Apoptosis**, v. 8, n. 3, p. 237-249, 2003.

CHEN, J. et al. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. **J Neurosci**, v. 18, n. 13, p. 4914-4928, 1998.

CHOI, J.; KOH, S. Role of brain inflammation in epileptogenesis. **Yonsei Med J**, v. 49, n. 1, p. 1-18, 2008.

COCKERELL, O. C. et al. Prognosis of epilepsy: a review and further analysis of the first nine years of the British National General Practice Study of Epilepsy, a prospective population-based study. **Epilepsia**, v. 38, n. 1, p. 31-46, 1997.

CORREA, M.C. et al. Oxidative stress and erythrocyte acetylcholinesterase (AChE) in hypertensive and ischemic patients of both acute and chronic stages. **Biomed Pharmacother**, v. 62, p. 317-324, 2008.

COSTA J.C. et al. Fundamentos Neurobiológicos da Epilepsias: Aspectos Clínicos e Cirúrgicos. **Ed Lemos**, First edition, 1998.

CREPEL, A. et al. Inflammatory reactions in human medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Brain Res**, v. 952, n. 2, p. 159-169, 2002.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clin Chim Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 23-38, 2003.

DA COSTA, J.C. et al. **Fundamentos neurobiológicos das epilepsias** - aspectos clínicos e cirúrgicos. Volume 1. 1998. São Paulo: Lemos Editorial, 2010.

DARNELL, J. E., JR. Studies of IFN-induced transcriptional activation uncover the Jak-Stat pathway. **J Interferon Cytokine Res**, v. 18, n. 8, p. 549-554, 1998.

DARNELL, J. E., JR.; KERR, I. M.; STARK, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. **Science**, v. 264, n. 5164, p. 1415-1421, 1994.

DAVIES, K.J.A. An overview of oxidative stress. **IUBMB Life**, v. 50, p. 241-244, 2000.

DEAN, R. T. et al. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochem J**, v. 324 (Pt 1), p. 1-18, 1997.

DEGIORGIO, C. M. et al. Serum neuron-specific enolase in the major subtypes of status epilepticus. **Neurology**, v. 52, n. 4, p. 746-749, 1999.

FREITAS, R. M. Investigation of oxidative stress involvement in hippocampus in epilepsy model induced by pilocarpine. **Neurosci Lett**, v. 462, n. 3, p. 225-229, 2009.

EL-HASHEMITE, N. et al. Perturbed IFN-gamma-Jak-signal transducers and activators of transcription signaling in tuberous sclerosis mouse models: synergistic effects of rapamycin-IFN-gamma treatment. **Cancer Res**, v. 64, n. 10, p. 3436-3443, 2004.

ELGER, C. E.; SCHMIDT, D. Modern management of epilepsy: a practical approach. **Epilepsy Behav**, v. 12, n. 4, p. 501-539, 2008.

ERAKOVIC, V. et al. Altered activities of rat brain metabolic enzymes caused by pentylenetetrazol kindling and pentylenetetrazol--induced seizures. **Epilepsy Res**, v. 43, n. 2, p. 165-173, 2001.

FATTORE, C.; PERUCCA, E. Novel medications for epilepsy. **Drugs**, v. 71, n. 16, p. 2151-2178, 2011.

FERREIRA, A. L. A., MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v. 43, n.1, p. 61-68, 1997.

FREITAS, R. M. Investigation of oxidative stress involvement in hippocampus in epilepsy model induced by pilocarpine. **Neurosci Lett**, v. 462, n. 3, p. 225-229, 2009.

FRIDMACHER, V. et al. Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection. **J Neurosci**, v. 23, n. 28, p. 9403-9408, 2003.

FUJIKAWA, D. G. The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. **Brain Res**, v. 725, n. 1, p. 11-22, 1996.

GALLOWITSCH-PUERTA, M.; PAVLOV, V. A. Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Life Sci**, v. 80, n. 24-25, p. 2325-2329, 2007.

GALVANI, S. et al. Carbonyl scavenger and antiatherogenic effects of hydrazine derivatives. **Free Radic Biol Med**, v. 45, n. 10, p. 1457-1467, 2008.

GODLEVSKY, L. S. et al. TNF-alpha in cerebral cortex and cerebellum is affected by amygdalar kindling but not by stimulation of cerebellum. **Pol J Pharmacol**, v. 54, n. 6, p. 655-660, 2002.

GRIFFIN, W. S. Inflammation and neurodegenerative diseases. **Am J Clin Nutr**, v. 83, n. 2, p. 470S-474S, 2006.

GRIVICICH, I., REGNER, A., ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p.335-343, 2007.

GUERREIRO, C. et al. Clinical patterns of patients with temporal lobe epilepsy and pure amygdalar atrophy. **Epilepsia**, v. 40, n. 4, p. 453-461, Apr 1999.

GWILT, C. R.; DONNELLY, L. E.; ROGERS, D. F. The non-neuronal cholinergic system in the airways: an unappreciated regulatory role in pulmonary inflammation? **Pharmacol Ther**, v. 115, n. 2, p. 208-222, 2007.

HÁ, T. T. N., HUUY, N. T., MURAO, L. A., LAN, N. T. P., THUY, T. T., et al. Elevated Levels of Cell-Free Circulating DNA in Patients with Acute Dengue Virus. **Infection**. *PloS One*, 2011.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. Free Radicals in Biology and Medicine. **Clarendon Press**, Oxford, 1989.

HEANEY, D. C. et al. Socioeconomic variation in incidence of epilepsy: prospective community based study in south east England. **BMJ**, v. 325, n. 7371, p. 1013-1016, 2002.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HENSHALL, D. C.; CHEN, J.; SIMON, R. P. Involvement of caspase-3-like protease in the mechanism of cell death following focally evoked limbic seizures. **J Neurochem**, v. 74, n. 3, p. 1215-1223, 2000.

HENSHALL, D. C. et al. Alterations in bcl-2 and caspase gene family protein expression in human temporal lobe epilepsy. **Neurology**, v. 55, n. 2, p. 250-257, 2000.

HONCHAR, M. P.; OLNEY, J. W.; SHERMAN, W. R. Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. **Science**, v. 220, n. 4594, p. 323-325, 1983.

HUNZIKER, E.B. **Articular cartilage structure in humans and experimental animals**. In: KUETTNER K.E., et al. *Articular Cartilage and Osteoarthritis*. New York: Raven Press:183–99, 1992.

JANSSENS, S.; TSCHOPP, J. Signals from within: the DNA-damage-induced NF-kappaB response. **Cell Death Differ**, v. 13, n. 5, p. 773-784, 2006.

KANEKO, K. et al. Consequences of nitric oxide generation in epileptic-seizure rodent models as studied by in vivo EPR. **Magn Reson Med**, v. 48, n. 6, p. 1051-1056, 2002.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. Extraneuronal cholinergic system in lymphocytes. **Pharmacol Ther**, v. 86, n. 1, p. 29-48, 2000.

KAWASHIMA, K.; FUJII, T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. **Life Sci**, v. 74, n. 6, p. 675-696, 2003.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 1, p. 3-11, 2009.

KRONFOL, Z.; REMICK, D. G. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. **Am J Psychiatry**, v. 157, n. 5, p. 683-694, 2000.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran. Patologia – Bases patológicas das doenças**. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 49 – 79, 2005.

KUMAR, V. et al. **Lesão celular, morte celular e adaptações**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

LANSBERG, M. G. et al. MRI abnormalities associated with partial status epilepticus. **Neurology**, v. 52, n. 5, p. 1021-1027, 1999.

LEITE, J. P.; BORTOLOTTI, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 14, n. 4, p. 511-517, Winter 1990.

LEVINE, R. L. et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LIANG, L. P.; HO, Y. S.; PATEL, M. Mitochondrial superoxide production in kainate-induced hippocampal damage. **Neuroscience**, v. 101, n. 3, p. 563-570, 2000.

LIU, Z. et al. Quantitative evaluation of neuronal loss in the dorsal hippocampus in rats with long-term pilocarpine seizures. **Epilepsy Res**, v. 17, n. 3, p. 237-247, 1994.

LOETSCHER, H.; STEINMETZ, M.; LESSLAUER, W. Tumor necrosis factor: receptors and inhibitors. **Cancer Cells**, v. 3, n. 6, p. 221-226, 1991.

LUO X. et al. Effect of intravenous immunoglobulin treatment on brain interferon-gamma and interleukin-6 levels in a rat kindling model. **Epilepsy Res** p. 162-167, 2010.

MAES, M. et al. Lowered omega3 polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids and cholesteryl esters of depressed patients. **Psychiatry Res**, v. 85, n. 3, p. 275-291, 1999.

MAISONNEUVE E. et al. Ruler governing selective protein carbonylation. **PLoS One**, v.4, p. 7269, 2009.

MAO, L. Y. et al. Interictal interleukin-17A levels are elevated and correlate with seizure severity of epilepsy patients. **Epilepsia**, v. 54, n. 9, p. e142-145, 2013.

MARCHETTI, R. L. Terapêutica nos transtornos mentais associados à epilepsia. **Condutas em psiquiatria**, p. 349-384, 2001.

MAROSO, M. et al. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures. **Nat Med**, v. 16, n. 4, p. 413-419, 2010.

MCCORMICK, D. A.; CONTRERAS, D. On the cellular and network bases of epileptic seizures. **Annu Rev Physiol**, v. 63, p. 815-846, 2001.

MCCOY, M. K.; TANSEY, M. G. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. **J Neuroinflammation**, v. 5, p. 45, 2008.

MELDRUM, B. S.; ROGAWSKI, M. A. Molecular targets for antiepileptic drug development. **Neurotherapeutics**, v. 4, n. 1, p. 18-61, 2007.

MEN, S. et al. Selective neuronal necrosis associated with status epilepticus: MR findings. **AJNR Am J Neuroradiol**, v. 21, n. 10, p. 1837-1840, 2000.

MICHEAU, O.; TSCHOPP, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. **Cell**, v. 114, n. 2, p. 181-190, 2003.

MUKAI, Y. et al. Structure-function relationship of tumor necrosis factor (TNF) and its receptor interaction based on 3D structural analysis of a fully active TNFR1-selective TNF mutant. **J Mol Biol**, v. 385, n. 4, p. 1221-1229, 2009.

NATOLI, G. et al. Tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 signaling downstream of TNF receptor-associated factor 2. Nuclear factor kappaB (NFkappaB)-inducing kinase requirement for activation of activating protein 1 and NFkappaB but not of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase. **J Biol Chem**, v. 272, n. 42, p. 26079-26082, 1997.

NIZRI, E. et al. Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: A new role for acetylcholinesterase inhibitors. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 5, p. 540-547, 2006.

O'NEILL, L. A.; KALTSCHMIDT, C. NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. **Trends Neurosci**, v. 20, n. 6, p. 252-258, 1997.

PARHAM P. **Elementos do Sistema Imune e seu Papel**. In: PARHAM P. Ed. O Sistema Imune, Artmed Editora, Porto Alegre, 2001.

PARRISH, W. R. et al. Modulation of TNF release by choline requires alpha7 subunit nicotinic acetylcholine receptor-mediated signaling. **Mol Med**, v. 14, n. 9-10, p. 567-574, 2008.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain Behav Immun**, v. 19, n. 6, p. 493-499, 2005.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. Controlling inflammation: the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Biochem Soc Trans**, v. 34, n. Pt 6, p. 1037-1040, 2006.

PEKER, E. et al. Nitric oxide, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme levels in epileptic children using valproic acid. **Brain Res**, v. 1297, p. 194-197, 2009.

PEREDERY, O. et al. Temporal changes in neuronal dropout following inductions of lithium/pilocarpine seizures in the rat. **Brain Res**, v. 881, n. 1, p. 9-17, 2000.

PERRY, V. H. et al. Inflammation in the nervous system. **Curr Opin Neurobiol**, v. 5, n. 5, p. 636-641, 1995.

PILKA, E. S. et al. Structural basis for substrate specificity in human monomeric carbonyl reductases. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7113, 2009.

PLATA-SALAMAN, C. R. et al. Kindling modulates the IL-1beta system, TNF-alpha, TGF-beta1, and neuropeptide mRNAs in specific brain regions. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 75, n. 2, p. 248-258, 2000.

PRADO, M. A. et al. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochem Int**, v. 41, n. 5, p. 291-299, 2002.

RAFNSSON, V. et al. Cause-specific mortality in adults with unprovoked seizures. A population-based incidence cohort study. **Neuroepidemiology**, v. 20, n. 4, p. 232-236, 2001.

RIIKONEN, R. Infantile spasms: therapy and outcome. **J Child Neurol**, v. 19, n. 6, p. 401-404, 2004.

ROGAWSKI, M. A.; LOSCHER, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 7, p. 553-564, 2004.

ROSAS-BALLINA, M. et al. Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 31, p. 11008-11013, 2008.

ROSENOW, F.; LUDERS, H. Presurgical evaluation of epilepsy. **Brain**, v. 124, n. Pt 9, p. 1683-1700, 2001.

RUIZ-RUIZ, C.; MUNOZ-PINEDO, C.; LOPEZ-RIVAS, A. Interferon-gamma treatment elevates caspase-8 expression and sensitizes human breast tumor cells to a death receptor-induced mitochondria-operated apoptotic program. **Cancer Res**, v. 60, n. 20, p. 5673-5680, 2000.

SANDER, J. W. The epidemiology of epilepsy revisited. **Curr Opin Neurol**, v. 16, n. 2, p. 165-170, 2003.

SCHINZEL, A. C. et al. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 34, p. 12005-12010, 2005.

SEDDER, L. M. et al. IFN-gamma mediates a novel antiviral activity through dynamic modulation of TRAIL and TRAIL receptor expression. **J Immunol**, v. 163, n. 2, p. 920-926, 1999.

SHENG, W. S. et al. TNF-alpha-induced chemokine production and apoptosis in human neural precursor cells. **J Leukoc Biol**, v. 78, n. 6, p. 1233-1241, 2005.

SHIN, E. C. et al. IFN-gamma induces cell death in human hepatoma cells through a TRAIL/death receptor-mediated apoptotic pathway. **Int J Cancer**, v. 93, n. 2, p. 262-268, 2001.

SHUSTOV, A. et al. Differential expression of Fas and Fas ligand in acute and chronic graft-versus-host disease: up-regulation of Fas and Fas ligand requires CD8+ T cell activation and IFN-gamma production. **J Immunol**, v. 161, n. 6, p. 2848-2855, 1998.

SIEGMUND, D. et al. Death receptor-induced signaling pathways are differentially regulated by gamma interferon upstream of caspase 8 processing. **Mol Cell Biol**, v. 25, n. 15, p. 6363-6379, 2005.

SINGH, R. et al. Chromosomal abnormalities and epilepsy: a review for clinicians and gene hunters. **Epilepsia**, v. 43, n. 2, p. 127-140, 2002.

SKELDON, A. M.; FARAJ, M.; SALEH, M. Caspases and inflammasomes in metabolic inflammation. **Immunol Cell Biol**, v. 92, n. 4, p. 304-313, 2014.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase--new roles for an old actor. **Nat Rev Neurosci**, v. 2, n. 4, p. 294-302, 2001.

STADTMAN, E. R. Role of oxidant species in aging. **Curr Med Chem**, v. 11, n. 9, p. 1105-1112, 2004.

SUGAWARA, T. et al. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. **NeuroRx**, v. 1, n. 1, p. 17-25, 2004.

SUN, S. C.; LEY, S. C. New insights into NF-kappaB regulation and function. **Trends Immunol**, v. 29, n. 10, p. 469-478, 2008.

TRACEY, K. J. Fat meets the cholinergic antiinflammatory pathway. **J Exp Med**, v. 202, n. 8, p. 1017-1021, 2005.

TRACEY, K. J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. **J Clin Invest**, v. 117, n. 2, p. 289-296, 2007.

TRACEY, K. J. Reflex control of immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 6, p. 418-428, 2009.

TURSKI, W. A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav Brain Res**, v. 9, n. 3, p. 315-335, 1983.

VEZZANI, A. Inflammation and epilepsy. **Epilepsy Curr**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2005.

VEZZANI, A. et al. Therapeutic potential of new antiinflammatory drugs. **Epilepsia**, v. 52 Suppl 8, p. 67-69, 2011.

VEZZANI, A. et al. The role of inflammation in epilepsy. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 1, p. 31-40, 2011.

VEZZANI, A.; GRANATA, T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. **Epilepsia**, v. 46, n. 11, p. 1724-1743, 2005.

VITZTHUM F. et al. **A quantitative fluorescence-based microplate assay for the determination of double-stranded DNA using SYBR Green I and a standard ultraviolet transilluminator gel imaging system.** *Anal Biochem*; 276,59 – 64, 1999.

WANG, H. et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 384-388, 2003.

WILLIAMS, T. J. Interactions between prostaglandins, leukotrienes and other mediators of inflammation. **Br Med Bull**, v. 39, n. 3, p. 239-242, 1983.

WYLLIE, A. H.; BEATTIE, G. J.; HARGREAVES, A. D. Chromatin changes in apoptosis. **Histochem J**, v. 13, n. 4, p. 681-692, 1981.

XU, X. et al. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. **Cancer Res**, v. 58, n. 13, p. 2832-2837, 1998.

YANG, X. et al. Induction of caspase 8 by interferon gamma renders some neuroblastoma (NB) cells sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) but reveals that a lack of membrane TR1/TR2 also contributes to TRAIL resistance in NB. **Cancer Res**, v. 63, n. 5, p. 1122-1129, 2003.

ZETTERSTROM, M. et al. Delineation of the proinflammatory cytokine cascade in fever induction. **Ann N Y Acad Sci**, v. 856, p. 48-52, 1998.

ZHANG, H. et al. Matrix metalloproteinases and neurotrauma: evolving roles in injury and reparative processes. **Neuroscientist**, v. 16, n. 2, p. 156-170, 2010.

ZHUANG, L. et al. TNF receptor p55 plays a pivotal role in murine keratinocyte apoptosis induced by ultraviolet B irradiation. **J Immunol**, v. 162, n. 3, p. 1440-1447, 1999.

ZOU, J. Y.; CREWS, F. T. TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition. **Brain Res**, v. 1034, n. 1-2, p. 11-24, 2005.

WANG, H. et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 384-388, 2003.