

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**HORMÔNIO ALFA ESTIMULANTE DOS MELANÓCITOS
(α -MSH) NÃO MODIFICA AS CONVULSÕES INDUZIDAS
POR PENTILENOTETRAZOL E POR PILOCARPINA EM
CAMUNDONGOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Fernanda Rossatto Temp

Santa Maria - RS, 2013

**HORMÔNIO ALFA ESTIMULANTE DOS MELANÓCITOS (α -
MSH) NÃO MODIFICA AS CONVULSÕES INDUZIDAS POR
PENTILENOTETRAZOL E POR PILOCARPINA EM
CAMUNDONGOS**

Por

Fernanda Rossatto Temp

Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como
requisito parcial para obtenção do grau de

MESTRE EM FARMACOLOGIA

Orientador: Professor Dr. Carlos Fernando de Mello
Co-orientador: Professor Dr. Gustavo Petri Guerra

Santa Maria, RS, Brasil, 2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

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

**HORMÔNIO ALFA ESTIMULANTE DOS MELANÓCITOS (α -MSH)
NÃO MODIFICA AS CONVULSÕES INDUZIDAS POR
PENTILENOTETRAZOL E POR PILOCARPINA EM CAMUNDONGOS**

elaborada por

Fernanda Rossatto Temp

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Farmacologia

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha (USP)

Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira (UFSM)
Santa Maria, 2013

Dedicatória

A minha família e ao meu namorado
Rodrigo. Sem eles eu não teria chegado até
aqui. Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me proporcionar tudo isso.

A meus pais, Ernani e Jane por serem meus guias e inspiradores de minha formação como ser humano e profissional. Devo-lhes tudo o que sou.

Ao meu namorado Rodrigo, pelo seu amor, incentivo, companheirismo, amizade, carinho, apoio e muita paciência.

Aos meus irmãos, Fabiana e Estevan, por sempre estarem por perto e torcerem pelo meu sucesso, transmitindo-me amor e carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos F. Mello, por me acolher em seu laboratório e me ensinar a amar a pesquisa. Pelos seus ensinamentos, conhecimentos, carinho, amizade, orientação e atenção imprescindíveis para a realização deste trabalho. Obrigada por acreditar em mim quando eu queria continuar a pesquisar sobre o α -MSH. Professor, ao senhor, minha eterna admiração e gratidão.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Gustavo Petri Guerra, por sempre me apoiar quando eu chegava com uma nova idéia de experimento. Pelos ensinamentos, amizade, ajuda, atenção e incentivo para realização deste trabalho. Muito obrigada!

À Professora Dra. Teresa Nieves Scimonelli, por proporcionar a interação que resultou no presente trabalho. A senhora é parte principal deste trabalho.

À minha amiga Quéli que o Mestrado me proporcionou e que vou levar para a vida inteira. Obrigada por estar presente nos momentos importantes da minha vida, pela ajuda na realização dos experimentos, pelos momentos de descontração, felicidade, alegria, pelas palavras sinceras. Obrigada!!!

À Aline, amiga de todas as horas. Obrigada pela ajuda nos experimentos, pelo convívio, companheirismo. Obrigada por tudo sempre!!!

À minha querida Profe Ju. Obrigada por sempre estender a mão quando precisei.

Às amadas e queridas ICs Josi, Laura, Amanda e Ana. Obrigada pela ajuda nos experimentos, pela amizade e convívio.

Obrigada a todos os colegas e amigos do LabNeuro por tornarem os meus dias mais feliz e pelo constante aprendizado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, que contribuíram para a minha formação científica.

Aos animais, que foram fundamentais para a realização desta pesquisa.

À Universidade Federal de Santa Maria por proporcionar o conhecimento científico através da sua pós-graduação.

À CAPES pela bolsa de estudo.

A todos que de alguma forma contribuíram e acreditaram em mim. Muito obrigada!

*"A mente que se abre a
uma nova idéia jamais voltará
ao seu tamanho original".
(Albert Einstein)*

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

HORMÔNIO ALFA ESTIMULANTE DOS MELANÓCITOS (α -MSH) NÃO MODIFICA AS CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL E POR PILOCARPINA EM CAMUNDONGOS

AUTORA: Fernanda Rossatto Temp

ORIENTADOR: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Gustavo Petri Guerra

LOCAL E DATA DE DEFESA: Santa Maria, 26 de novembro de 2013.

O hormônio alfa-estimulante dos melanócitos (α -MSH), é um peptídeo derivado da pró-opiomelanocortina (POMC) envolvido em diferentes funções neurológicas que também exercem efeitos antiinflamatórios, incluindo o sistema nervoso central (SNC). Embora inflamação tenha sido relacionada com convulsão e epilepsia, nenhum estudo tem investigado se o α -MSH sistemicamente altera crises. Portanto, no presente estudo verificou-se se α -MSH altera as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) e pilocarpina. Camundongos machos Swiss receberam α -MSH (1.66, 5 ou 15 μ g/3 μ L, intracerebroventricular (i.c.v.) or sistêmico (0.1, 0.3 ou 1 mg/kg, intraperitoneal (i.p.)). Cinco a sessenta minutos após a injeção do peptídeo, os animais receberam PTZ (60 mg/kg, i.p.) ou pilocarpina (370 mg/kg, i.p.). Latência para mioclonia e convulsão tônico-clônica, número de episódios convulsivos duração e gravidade das convulsão, foram avaliadas pela escala de Racine e Meurs. Os níveis de IL-1 β no hipocampo foram medidos através de um ensaio imunoenzimático (ELISA). Nem administração de α -MSH intracerebroventricular (1.66, 5 ou 15 μ g/3 μ L) nem sistêmica (0.1, 0.3 ou 1 mg/kg) alterou as convulsões induzidas por PTZ e pilocarpina. α -MSH, PTZ ou pilocarpina não alteraram os níveis de IL-1 β no hipocampo. Embora a inflamação tem sido implicada em convulsões e epilepsia e α -MSH é um peptídeo antiinflamatório potente, os nossos resultados não suportam um papel para α -MSH no controle das convulsões.

Palavras-chaves: Hormônio alfa-estimulante dos melanócitos, inflamação central, epilepsia.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Graduate Course in Pharmacology
Federal University of Santa Maria, RS, Brazil

ALPHA MELANOCYTE STIMULATING HORMONE (α -MSH) DOES NOT MODIFY PENTYLENETETRAZOL- AND PILOCARPINE-INDUCED SEIZURES IN MICE

AUTHOR: Fernanda Rossatto Temp

ADVISOR: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

CO-ADVISOR: Prof. Dr. Gustavo Petri Guerra

PLACE AND DATE OF THE DEFENSE: Santa Maria, November 26th 2013.

Alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH) is a pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptide involved in different neurological functions that also exerts anti-inflammatory effects, including in the central nervous system (CNS). Although inflammation has been implicated in seizures and epilepsy, no study has systematically investigated whether α -MSH modifies seizures. Therefore, in the current study we determined whether α -MSH alters pentylenetetrazol (PTZ)- and pilocarpine-induced seizures. Adult male Swiss mice were injected with α -MSH (1.66, 5 or 15 μ g/3 μ L, intracerebroventricular (i.c.v.) or systemic (0.1, 0.3 or 1 mg/kg, intraperitoneally (i.p.)). Five to sixty minutes after the injection of the peptide, animals were injected with PTZ (60 mg/kg, i.p.) or pilocarpine (370 mg/kg, i.p.). Latency to myoclonic jerks and tonic-clonic seizures, number of seizure episodes, total time spent seizing and seizure intensity, assessed by the Racine and Meurs scales were recorded. Interleukin 1 beta (IL-1 β) levels in the hippocampus were measured by a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Neither intracerebroventricular (1.66, 5 or 15 μ g/3 μ L, i.c.v.) nor systemic (0.1, 0.3 or 1 mg/kg, i.p.) administration of α -MSH altered PTZ- and pilocarpine-induced seizures. IL-1 β levels in the hippocampi were not altered by α -MSH, PTZ or pilocarpine. Although inflammation has been implicated in seizures and epilepsy and α -MSH is a potent antiinflammatory peptide, our results do not support a role for α -MSH in seizure control.

Keywords: Melanocyte-stimulating-hormone, central inflammation, epilepsy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Introdução

Figura 1: Estrutura primária do hormônio alfa estimulante dos melanócitos (α -MSH).....	18
Figura 2: Processamento da POMC com conseqüente formação das diferentes melanocortinas.....	20
Figura 3: Esquema ilustrativo do processamento da POMC hipotalâmica.....	21
Figura 4: Vias de sinalização das melanocortinas.....	24
Figura 5: Via de sinalização JAK/STAT.....	26
Figura 6: Bloqueio da ativação do fator de transcrição kB (NFkB).....	30
Figura 7: Via anti-inflamatória colinérgica mediada pelo nervo vago.....	31
Figura 8: Metabolismo do ácido araquidônico.....	35
Figura 9: Hipótese da sinalização da inflamação.....	37
Figura 10: Representação esquemática do efeito do AMPc sobre atividade do NF-kB.....	39
Figura 11: Estrutura molecular da pilocarpina.....	41

Resultados

Figura 1: Lack of effect of α -MSH (0.1, 0.3 or 1 mg/kg, i.p., fifteen minutes before PTZ) on PTZ-induced seizures	45
Figura 2: Lack of effect of α -MSH (0.1, 0.3 or 1 mg/kg, i.p., thirty minutes before PTZ) on PTZ-induced seizures	46
Figura 3: Lack of effect of α -MSH (0.1, 0.3 or 1 mg/kg, i.p., sixty minutes before PTZ) on PTZ-induced seizures	47
Figura 4: Lack of effect of α -MSH (1.66 μ g, 5 μ g or 15 μ g/ 3 μ L, i.c.v., fifteen minutes before PTZ) on PTZ-induced seizures	47
Figura 5: Lack of effect of α -MSH (0.1, 0.3 or 1 mg/kg, i.p., thirty minutes before pilocarpine) on pilocarpine-induced seizures	48
Figura 6: Lack of effect of α -MSH (1.66, 5 or 15 μ g/ 3 μ L, i.c.v., thirty minutes before pilocarpine) on pilocarpine-induced seizures	49

Figura 7: Lack of effect of α -MSH (15 μ g/ 3 μ L, i.c.v., five minutes before pilocarpine) on pilocarpine-induced seizures50

Figura 8: Lack of effect of α -MSH (1.66 μ g/ 3 μ L, i.c.v.), PTZ (60 mg/kg, i.p.) or pilocarpine (370 mg/kg, i.p.) on IL-1 β levels in the hippocampus50

Dados adicionais

Figura 1: Effect of phenobarbital (Pheno, 20 mg/kg, p.o.) on pentylenetetrazol-induced seizure in mice53

Figura 2: Effect of phenobarbital (Pheno, 20 mg/kg, p.o.) on pilocarpine-induced seizure in mice54

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MSH - Hormônio alfa-estimulante dos melanócitos
POMC - Pró-opiomelanocortina
MC - Melanocortinas
 G_s - Proteína G estimulatória
SNC - Sistema Nervoso Central
IL-1 β - Interleucina 1 β
IL-6 - Interleucina seis
TNF- α - Fator de necrose tumoral α
i.p. - Intraperitoneal
i.c.v. - Intracerebroventricular
PTZ - pentilenotetrazol
ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico
 β -LPH - β -lipotrofina
 β -END - β -endorfina
PC1 - Pró-hormônio convertase 1
NT - Peptídeo N-terminal
PC2 - Pró-hormônio convertase 2
 γ -LPH - γ -lipotrofina
CLIP - Peptídeo do lobo intermediário semelhante à corticotrofina
CPE - Carboxipeptidase E
PAM - Monooxigenase amidante de α -peptidil
NAT - N-acetiltransferase
PRCP - Prolil carboxipeptidase
NPY - Neuropeptídeo Y
AC - Adenilil ciclase
AMP_c - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
PKA - Proteína quinase A
CREB - Elemento de ligação responsivo ao AMP_c
MAPK - Proteína quinase ativada por mitógenos
I κ B - Inibidor kB
NF κ B - Fator de transcrição nuclear kB
PKC - Proteína quinase C
[Nle⁴, D-Phe⁷] α -MSH - NDP- α -MSH
NOS - Oxido nítrico sintase
COX-2 - Ciclooxigenase 2
IFN- γ - Interferon γ
CRH - Hormônio de liberação de corticotrofina
COX - Ciclooxigenase
LOX - Lipooxigenase
PGE2 - Prostaglandina E2
TNF- α - Fator de necrose tumoral
LTB₄ - Leucotrieno B₄
PAF - Fator de agragação plaquetária
AVE - Acidente vascular encefálico
NMDA - N-metil-D-aspartato

IKK - Enzima I κ B quinase
DAMPs - Padrões moleculares associados ao dano
PAMPs - Padrões moleculares associados à patógenos
HMGB1 - proteína do grupo box-1 de alta mobilidade
LPS - Lipopolissacarídeo
PRRs - Receptores de reconhecimento padrão
TLR - *toll-like* receptor
RAGE - Advanced glycation end products receptors
SE - *status epilepticus*
BHE - Barreira hematoencefálica
GABA_A - Ácido gama-aminobutírico
ELT - Epilepsia do lobo temporal

PPGFARMACOLOGIA/UFSM, RS

TEMP, Fernanda Rossatto

Mestre

2013

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Hormônio alfa estimulante dos melanócitos.....	18
1.1.1 Definição	18
1.1.2 Síntese de α -MSH	19
1.1.3 Degradação do α -MSH no SNC.....	21
1.2 Receptores das melanocortinas	22
1.2.1 Vias de sinalização dos receptores das melanocortinas	24
1.2.2 Receptores das melanocortinas envolvidos na inflamação	26
1.2.3 Mecanismos neuroprotetores e antiinflamatórios do α -MSH	28
1.3 Epilepsia.....	32
1.4 Crises epiléticas e inflamação	33
1.4.1 Inflamação.....	33
1.4.2 Mecanismos inflamatórios na convulsão	36
1.4.3 Canais iônicos ativados por hiperpolarização e controlados por nucleotídeos cíclicos (HCN).....	38
1.5 Modelos experimentais de convulsão	39
1.5.1 Pentilenotetrazol (PTZ)	40
1.5.2 Modelo de crise aguda por pilocarpina	40
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo geral	42
2.2 Objetivos específicos	42
3 RESULTADOS	43
3.1 Artigo Científico	43
3.2 Dados adicionais	53

3.2.1 Materiais e Métodos	53
3.2.2 Resultados	53
4 DISCUSSÃO	55
5 CONCLUSÕES	57
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está organizada em tópicos, a saber: **Introdução**, **Objetivos**, **Artigo**, **Conclusão** e **Referências**. As seções **Materiais e Métodos**, **Resultados**, **Discussão** e **Referências** são apresentadas no próprio manuscrito que está publicado na revista *Life Sciences*, representando os resultados obtidos.

A **Introdução** apresenta o embasamento teórico que permitiu a formulação da proposta do trabalho. Os **Objetivos (geral e específicos)** estão dispostos no corpo do trabalho. E a seção “**Artigo**” contém o manuscrito aceito para publicação, no qual constam os principais resultados obtidos durante o período do Mestrado. Na **Conclusão** há uma abordagem geral da dissertação.

Por fim, as **Referências bibliográficas** referem-se apenas às citações dos itens **Introdução** e **Conclusão** deste trabalho.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hormônio alfa estimulante dos melanócitos

1.1.1 Definição

O α -MSH, também conhecido como α -melanocortina, é um neuropeptídeo de treze aminoácidos (Figura 1), que é produzido a partir do processamento pós-traducional da pró-opiomelanocortina (POMC) (BRZOSKA et al., 2008; BUTLER, 2006; CATANIA et al., 2000; MOUNTJOY et al., 1992). Juntamente com o α -MSH, a POMC origina outras melanocortinas como: β -MSH, γ -MSH e ACTH.

α -MSH

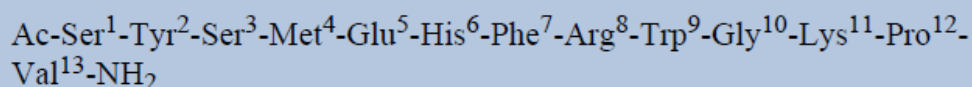


Figura 1: Estrutura primária do hormônio alfa estimulante dos melanócitos (α -MSH) (FUNG; HRUBY, 2005).

A POMC, descoberta em 1977 por Mains e colaboradores e Robert e Herbert, é o peptídeo mais antigo da família dos opióides. O gene que codifica a POMC, detectado no genoma de vertebrados e invertebrados (DOUGLASS; CIVELLI; HERBERT, 1984; SUNDSTROM; DREBORG; LARHAMMAR, 2010), compreende 711 pares de bases contidas em três exons separados por dois íntrons (DROUIN et al., 1985). O produto da tradução do RNA mensageiro resultante após o *splicing* origina esta proteína de 31 kDa (EHRLICH et al., 2010).

A POMC é expressa no SNC e amplamente em tecidos periféricos. No SNC, a POMC é identificada especialmente no núcleo arqueado do hipotálamo e núcleo do trato solitário do tronco cerebral, e na hipófise anterior e intermediária (CATANIA et al., 2004; MAYOROV et al., 2011; WIKBERG et al., 2000). Em tecidos periféricos, sua expressão ocorre em

linfócitos, monócitos, queratinócitos e melanócitos, sendo importante para inflamação (LIPTON; CATANIA, 1997).

A POMC é a precursora de vários peptídeos bioativos, como o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), a β -lipotrofina (β -LPH), a β -endorfina (β -END), e o α -, β - e γ -MSH (DOUGLASS et al., 1984; EIPPER; MAINS, 1982; PRITCHARD; TURNBULL; WHITE, 2002). Os produtos peptídicos gerados a partir do processamento da POMC variam em função do tecido. Por exemplo, o ACTH e a β -LPH são os principais produtos do processamento na hipófise anterior, enquanto o α -MSH e a β -END são mais abundantes na hipófise intermediária (DROUIN et al., 1985). O α -MSH é encontrado em macrófagos, neutrófilos, melanócitos, queratinócitos, células epiteliais, células B, células *natural killer* e subtipos de células T (AURIEMMA et al., 2012; LOSER et al., 2010).

1.1.2 Síntese de α -MSH

O processamento da POMC inicia-se pela pró-hormônio convertase 1 (PC1 também conhecida como PC3), que cliva a POMC para produzir pró-corticotrofina (pró-ACTH) e β -lipotrofina (β -LPH). Após, a PC1 cliva a molécula do pró-ACTH para produzir um peptídeo N-terminal (NT), um *peptídeo de ligação* e o ACTH₁₋₃₉. A pró-hormônio convertase 2 (PC2) cliva a β -LPH, originando os fragmentos de γ -lipotrofina (γ -LPH) e β -endorfina (β -END). A γ -LPH e o peptídeo NT também são clivados pela PC2, gerando respectivamente β -MSH e γ -MSH (Figura 2) (BERTOLINI; TACCHI; VERGONI, 2009; CATANIA et al., 2010; PRITCHARD et al., 2002). O processamento do, ACTH₁₋₃₉ origina os fragmentos peptídicos ACTH₁₋₁₇ e o ACTH₁₈₋₃₉, também chamado peptídeo do lobo intermediário semelhante à corticotrofina (CLIP). Por fim, a clivagem do fragmento ACTH₁₋₁₇ pela carboxipeptidase E (CPE) origina o α -MSH₁₋₁₄. Já se sabe que a POMC, PC1 e PC2, bem como outras proteases, também encontram-se expressas em tecidos extrapituitários, como o sistema imunológico (BLALOCK, 1985).

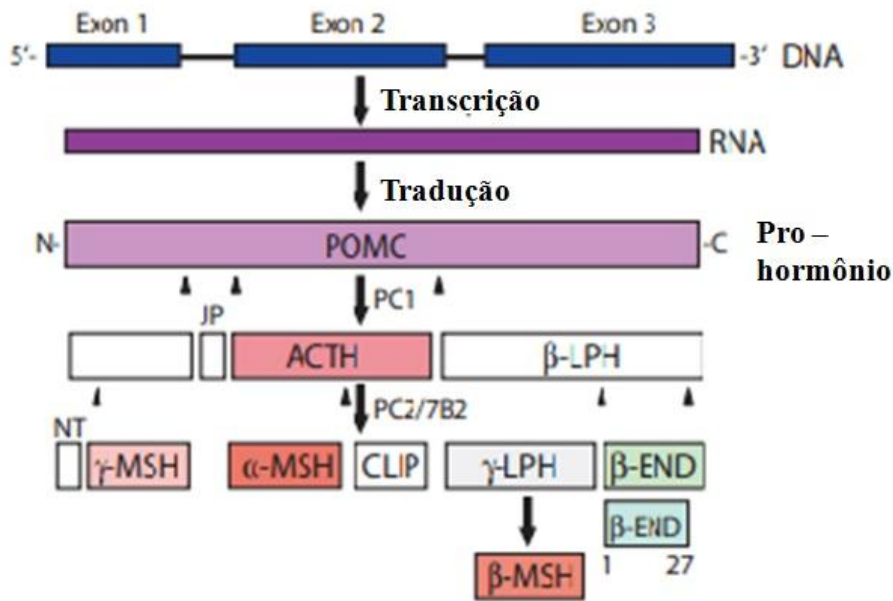


Figura 2: Processamento da POMC com conseqüente formação das diferentes melanocortinas (adaptado de BRZOSKA et al., 2008).

A geração do α -MSH a partir do α -MSH₁₋₁₄ é catalisada primeiramente pela CPE, que remove o aminoácido da porção carboxi-terminal. Em seguida a enzima monooxigenase amidante de α -peptidil (PAM) catalisa a formação desacetil- α -MSH₁₋₁₃. Uma N-acetiltransferase (NAT) converte o desacetil- α -MSH₁₋₁₃ para uma forma mais ativa, o acetil- α -MSH₁₋₁₃ (Figura 3) (D'AGOSTINO; DIANO, 2010).

O acetil- α -MSH₁₋₁₃ produzido principalmente em neurônios do núcleo arqueado, é liberado no hipotálamo, tálamo, mesencéfalo, amígdala e tronco cerebral. Nestas estruturas, o acetil- α -MSH₁₋₁₃ liga-se a receptores MCs pós-sinápticos e desencadeia seus efeitos metabólicos (RENQUIST et al., 2011). Além disso, o acetil- α -MSH₁₋₁₃ pode ligar-se a auto-receptores, como os receptores MC-3 presentes na membrana pré-sináptica, diminuindo a liberação de α -MSH pela pré-sinapse (CATANIA, 2008; CHEN et al., 1997; RENQUIST et al., 2011; ROBBINS et al., 1993).

1.1.3 Degradação do α -MSH no SNC

O acetil- α -MSH₁₋₁₃ é clivado por uma prolil carboxipeptidase (PRCP) presente em lisossomos, gerando o acetil- α -MSH₁₋₁₂ (Figura 3), um produto inativo (D'AGOSTINO; DIANO, 2010; DIANO, 2011). A PRCP é uma enzima pertencente à família das carboxipeptidases que contém resíduos de serina, histidina e aspargina no centro ativo, que são essenciais para a sua atividade catalítica. Esta enzima catalisa a inativação do α -MSH pela remoção do resíduo de valina da porção carbóxi-terminal, produzindo o peptídeo inativo α -MSH₁₋₁₂ com doze aminoácidos (D'AGOSTINO; DIANO, 2010).

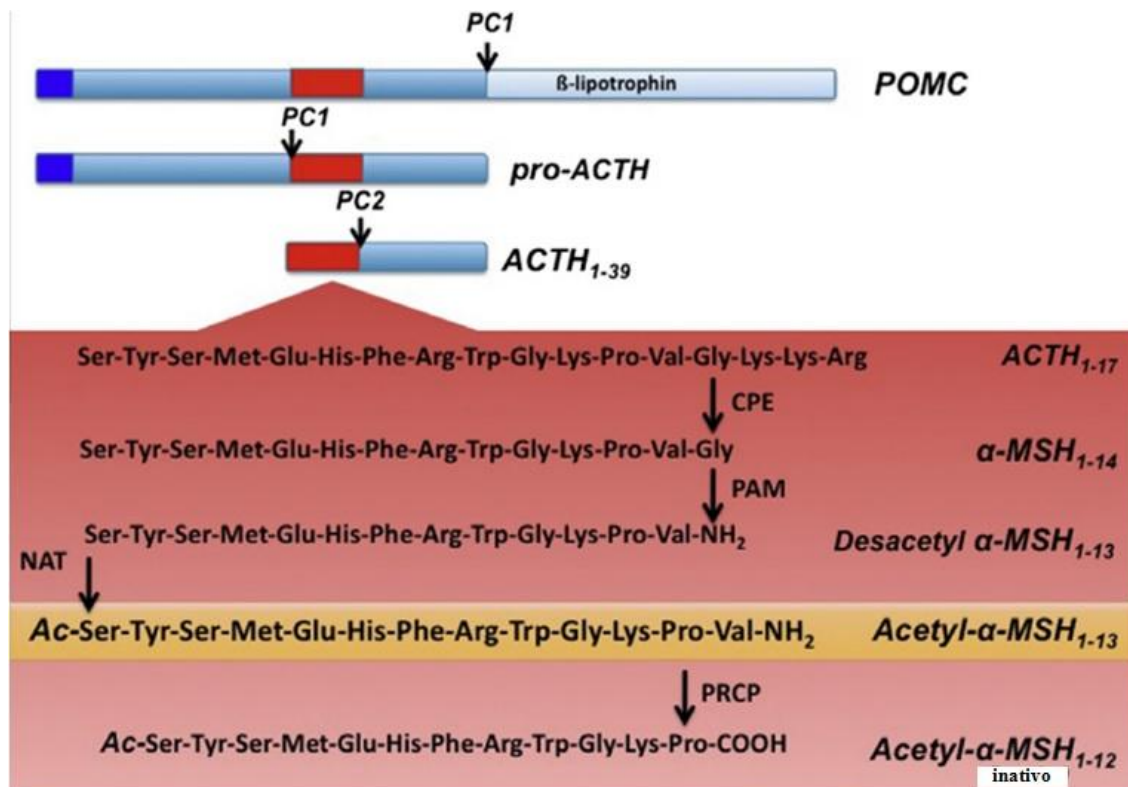


Figura 3: Esquema ilustrativo do processamento da POMC hipotalâmica (adaptado de DIANO, 2011).

1.2 Receptores das melanocortinas

Cinco subtipos de receptores MC: MC-1 a MC-5, clonados há aproximadamente vinte anos atrás (RAMACHANDRAPPA et al., 2013), revelaram possuir diferentes funções, afinidades de ligação, e níveis de expressão em tecidos específicos para os distintos peptídeos derivados da POMC (BRZOSKA et al., 2008; GANTZ; FONG, 2003; MAASER; KANNENGIESSER; SPECHT et al., 2006).

Todas as melanocortinas: α -, β -, γ -MSH e ACTH compartilham uma sequência comum de aminoácidos: histidina-fenilalanina-arginina-triptofano (His-Phe-Arg-Trp), correspondentes aos resíduos 6-9 do ACTH e α -MSH. Esta é a sequência mínima necessária para o reconhecimento pelos receptores das melanocortinas (MC), que se encontram expressos na superfície celular das células, e que medeiam as respostas induzidas por estes peptídeos sinalizadores. O receptor MC-2, uma exceção, necessita, pelo menos, da sequência de aminoácidos 1-17 do ACTH para ser estimulado (CATANIA et al., 2004; GETTING, 2006; HOLDER; HASKELL-LUEVANO, 2004).

O receptor MC-1, o primeiro a ser clonado, desempenha um papel importante na regulação da melanogênese e pigmentação (AURIEMMA et al., 2012; GETTING, 2006; LOSER et al., 2010). O peptídeo α -MSH tem uma alta afinidade de ligação ao receptor MC-1 (α -MSH \geq ACTH > β -MSH >> γ -MSH) (SUZUKI et al., 1996). O receptor MC-1 é expresso principalmente na pele (queratinócitos, melanócitos e fibroblastos), cérebro, glândula adrenal, por células do sistema imunológico (monócitos, neutrófilos, células dendríticas, linfócitos T CD8⁺) células de melanoma, células gliais, células endoteliais e epiteliais secretoras, mastócitos, células trofoblásticas, células do músculo esquelético e células de luteína (BRZOSKA et al., 2008; ELLIOTT et al., 2004; GANTZ; FONG, 2003; LOSER et al., 2010).

O receptor MC-2 é o único receptor que possui seletividade de ligação para o hormônio ACTH₁₋₃₉. A ligação do ACTH₁₋₃₉ ao receptor MC-2 estimula a adenilil ciclase (AC), promovendo à ativação da proteína quinase A (PKA), aumentando a expressão de enzimas esteroidogênicas (CATANIA et al., 2004). O receptor MC-2 é expresso na zona fasciculada e glomerulosa do córtex da adrenal, testículos, adipócitos, queratinócitos, linfócitos e células β -pancreáticas (BRZOSKA et al., 2008; GANTZ; FONG, 2003).

O receptor MC-3 liga preferencialmente γ -MSH (γ -MSH = ACTH \geq α -MSH) (BRZOSKA et al., 2008; CATANIA et al., 2004; GANTZ; FONG, 2003). Foi mostrado que o receptor MC-3 apresenta atividade anti-inflamatória e possui papel importante em funções cardiovasculares e na regulação da homeostase energética (CATANIA et al., 2004; GETTING et al., 2001). O receptor MC-3 é expresso no trato gastrointestinal, placenta, coração, intestino, timo, adipócitos, músculo esquelético, sistema imunológico e em diversas áreas do SNC, como em neurônios que contém neuropeptídeo Y (NPY) no núcleo arqueado, hipotálamo ventromedial, núcleo habenular médio, área tegmentar ventral e núcleos da rafe (BRZOSKA et al., 2008; CATANIA et al., 2004; GANTZ; FONG, 2003; GETTING, 2006; LASAGA et al., 2008; ROSELLI-REHFUSS et al., 1993).

O receptor MC-4 tem a mesma afinidade de ligação pela α -melanocortina e pelo ACTH (α -MSH = ACTH > β -MSH >> γ -MSH), sendo predominantemente expresso no hipotálamo, tálamo, córtex e tronco cerebral. O receptor MC-4 também é expresso na pele, linfócitos, células do músculo esquelético e medula espinhal (GETTING, 2006; WIKBERG et al., 2000). Este subtipo de receptor regula a maioria dos efeitos centrais das melanocortinas, incluindo a neuroproteção e inflamação. Estudos indicam que o receptor MC-4 está envolvido na regulação da homeostase energética, comportamento alimentar (CATANIA et al., 2010; MCDANIEL et al., 2012), bem como função erétil e comportamento sexual (HADLEY, 2005; VAN DER PLOEG et al., 2002).

O último receptor a ser clonado e identificado em humanos e camundongos, o receptor MC-5, possui importante papel na termorregulação e na regulação da secreção de glândulas sebáceas, e é semelhante ao receptor MC-1 e MC-4 em sua capacidade de reconhecer α -MSH e ACTH, mas não γ -MSH (α -MSH \geq ACTH >> γ -MSH) (CATANIA et al., 2004; CHEN et al., 1997). O receptor MC-5 é expresso também no músculo esquelético, pele, cérebro, glândulas exócrinas, fígado, coração, baço, sistema imunológico, pulmão, estômago, útero, tecido adiposo, glândula adrenal, placenta, ovário, medula óssea e glândulas mamárias (CATANIA et al., 2004; CHEN et al., 1997; COLOMBO et al., 2002; GETTING, 2006; VAN DER KRAAN et al., 1998).

Além dos agonistas endógenos listados acima, os receptores MC podem ligar os antagonistas naturais (em realidade, agonistas inversos) proteína Agouti e a proteína relacionada ao Agouti (AgRP) (GANTZ; FONG, 2003; MOUNTJOY et al., 1992).

1.2.1 Vias de sinalização dos receptores das melanocortinas

Os receptores MC (MC-1 a MC-5) pertencem à família da rodopsina (classe A), e são receptores acoplados a proteínas Gs, possuem o domínio amino-terminal voltado para o meio extracelular, e o domínio carbóxi-terminal voltado para o meio intracelular (BRZOSKA et al., 2008; STAROWICZ; PRZEWLOCKA, 2003).

Quando ativados, os receptores MC estimulam a enzima AC, aumentando assim a formação de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc), nucleotídeo sintetizado no interior da célula a partir do ATP. O AMPc pode se ligar aos dois sítios da subunidade regulatória da PKA no citoplasma e liberar a subunidade catalítica, a qual migra para o núcleo, levando à fosforilação da CREB (elemento de ligação responsivo ao AMPc), ao aumento da síntese proteica (CARUSO et al., 2012; ELLIOTT et al., 2004), e a interações com a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), bem como inibição da degradação do inibidor (I κ B alpha) do fator de transcrição nuclear kB (NF-kB). Assim, as MC inibem a translocação do NF-kB para o núcleo, inibindo, conseqüentemente, a transcrição de vários genes inflamatórios (Figura 4).

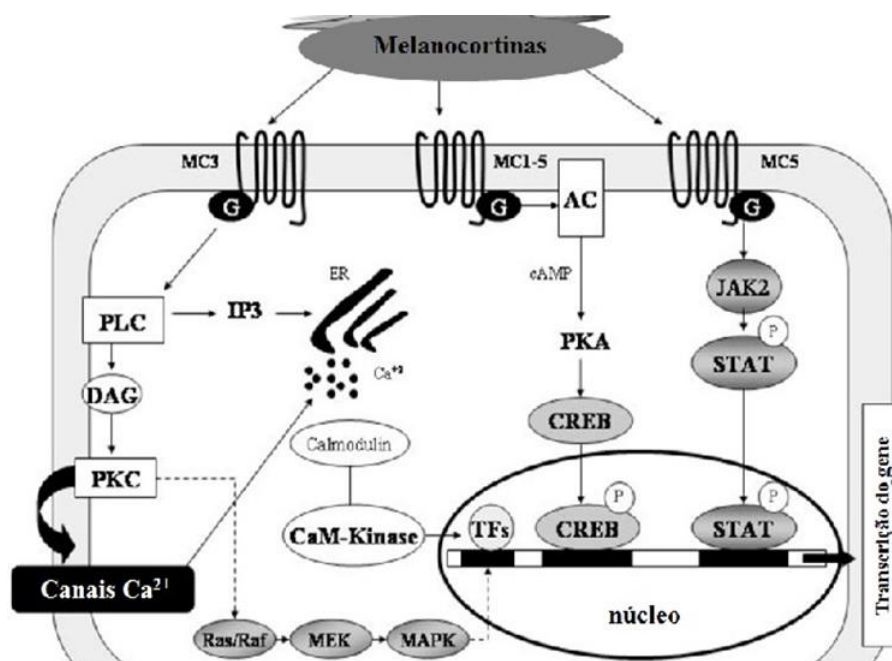


Figura 4: Vias de sinalização das melanocortinas (adaptado de LEONE; NOERA; BERTOLINI, 2013).

Os receptores MC podem ativar diferentes vias de sinalização, dependentes e independentes de AMPc, como: MAPK, proteína quinase C (PKC), aumento de cálcio intracelular seguida da ativação secundária de inositol trifosfato, aumento no influxo de cálcio extracelular e transcrição/tradução da Janus quinase (BUGGY, 1998; EVES; HAYCOCK, 2010; GANTZ; FONG, 2003).

O receptor MC-4 pode acoplar-se às quatro principais classes de proteínas G: G_s , G_q (envolvida na ativação da enzima fosfolipase C), G_i (inibitória) e G_o (regula canais de cálcio) (CHAI et al., 2009; YANG, 2011).

Segundo Buggy (1998), pró-linfócitos B (Ba/F3) expressam somente o receptor MC-5 na membrana. Tem sido observado que α -MSH, ao se ligar ao receptor MC-5 localizado na superfície de linfócitos B, fosforila a quinase citoplasmática JAK2, a qual fosforila as tirosinas presentes no receptor. Essas tirosinas fosforiladas são capazes de recrutar proteínas STATs presentes no citosol (Figura 5). Uma vez fosforiladas, as STATs dimerizam-se e translocam-se para o núcleo, onde ativam a transcrição de genes que modulam a inflamação e apoptose. Além do α -MSH, os seus análogos sintéticos [Nle^4 , $D-Phe^7$] α -MSH (NDP- α -MSH) e ACTH (1-24) aumentam a expressão de marcadores dos fatores de transcrição JAK2 fosforilada, ERK1/2 fosforilada, tirosinas-STAT3 fosforiladas e reduzir os níveis de mediadores pró-inflamatórios, no ventrículo esquerdo, em modelo de ratos com reperfusão/isquemia miocárdica (OTTANI et al., 2013). É interessante que os efeitos do NDP- α -MSH sobre o infarto no ventrículo esquerdo reduz após a inibição da ativação das vias JAK2 e ERK1/2 (OTTANI et al., 2013) evidenciando, assim, uma importante função dessas vias transdutoras de sinal.

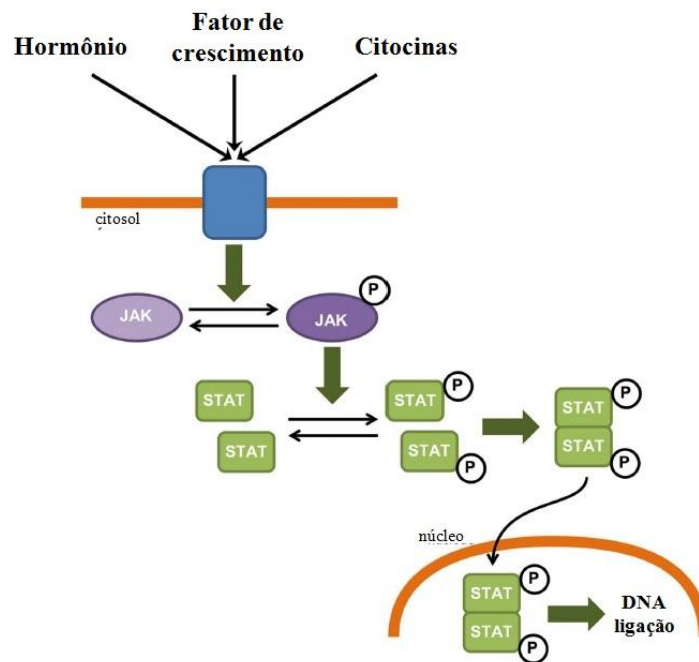


Figura 5: Via de sinalização JAK/STAT (adaptado de NICOLAS et al., 2013).

Também tem sido demonstrado que receptores MC-1, MC-3, MC-4 e MC-5, quando expressos em células HEK293 (células embrionárias de rim humano), e estimuladas com α -MSH ou desacetil- α -MSH, medeiam um aumento do íon cálcio intracelular, além de ativar a enzima adenilil ciclase (MOUNTJOY et al., 2001). Porém a via exata da transdução do sinal do cálcio pela melanocortina e seus receptores ainda não está clara.

1.2.2 Receptores das melanocortinas envolvidos na inflamação

Os receptores MC-1, MC-3 e MC-4 inibem a produção e a liberação de mediadores inflamatórios em diferentes tecidos, resultando em um efeito anti-inflamatório (CATANIA et al., 2004). Evidências sugerem que os receptores MC-1 e MC-3 medeiam o efeito anti-inflamatório do α -MSH na periferia, enquanto que o receptor MC-4, apesar de ser encontrado também em órgãos periféricos, está envolvido nos efeitos anti-inflamatórios centrais do α -

MSH (CARUSO et al., 2004; ICHIYAMA et al., 1999; LAM; GETTING, 2004; MAASER; KANNENGIESSER; SPECHT et al., 2006; MOUNTJOY et al., 2003).

Alguns estudos sugerem que grande parte dos efeitos anti-inflamatórios e imunomodulatórios do α -MSH são mediados pela ativação dos receptores MC-1 (AURIEMMA et al., 2012; LOSER et al., 2010), devido ao fato de que este receptor apresenta maior afinidade pelo α -MSH do que pelos outros peptídeos tipo melanocortina (MOUNTJOY, 1994). A ligação da α -melanocortina ao receptor MC-1 diminui a translocação nuclear do NF- κ B (fator de transcrição nuclear), pelo impedimento da degradação de I κ B, como veremos em detalhe mais adiante (ANDERSEN et al., 2005; GETTING, 2006). A importância do receptor MC-1 na inflamação intestinal tem sido observada, pois camundongos nocaute para o receptor MC-1 apresentam exacerbação da inflamação intestinal induzida por sulfato de dextrano sódico (MAASER; KANNENGIESSER; KUCHARZIK, 2006). No entanto, há evidências contrárias na literatura indicando que, mesmo na ausência do receptor MC-1, o peptídeo α -MSH injetado sistemicamente pode inibir a ativação do NF- κ B em modelo de inflamação cerebral aguda induzida por LPS (lipopolissacarídeo) (ICHIYAMA et al., 1999). Tal achado sugere que os efeitos anti-inflamatórios do α -MSH podem ser mediados por outros subtipos de receptores MC, e que na ausência de um subtipo, os outros receptores MC tornam-se mais importantes para regular a inflamação.

Vários estudos têm mostrado que o receptor MC-3 desempenha um importante papel nos efeitos anti-inflamatórios do α -MSH (GETTING, 2002; GETTING et al., 2001; GETTING et al., 2003). Giuliani e colaboradores (2006) apontam que o agonista do receptor MC-3, γ 2-MSH, não possui efeito protetor na isquemia global transitória em gerbilos, apenas o peptídeo análogo da melanocortina NDP- α -MSH, o qual ativa principalmente subtipos de receptores da melanocortina expressos no SNC (receptor MC-3 e MC-4). Além disso, o bloqueio farmacológico do receptor MC-4 previne os efeitos neuroprotetores do NDP- α -MSH. Estes dados sugerem que o efeito neuroprotetor do NDP- α -MSH é mediado por receptor MC-4.

Há evidências de que tanto o α -MSH como o γ -MSH, por meio dos receptores MC-3 e MC-4 presentes no SNC, inibem a ativação do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal induzida pela IL-1 β . Além disso, o pré-tratamento com antagonistas dos receptores MC-3/MC-4 atenua significativamente estes efeitos do α -MSH e do γ -MSH (CRAGNOLINI et al., 2004). Outro estudo mostrou que a ligação do α -MSH ao receptor MC-4 diminui a expressão da enzima

óxido nítrico sintase (NOS), atenuando a expressão de ciclooxigenase 2 (COX-2) e a liberação de prostaglandina E₂ (PGE₂) em cultura de astrócitos estimulados com LPS/interferon gama (IFN- γ) (CARUSO et al., 2007).

1.2.3 Mecanismos neuroprotetores e antiinflamatórios do α -MSH

O α -MSH apresenta ação neuroprotetora em muitos modelos de dano neuronal, vascular, inflamatório e traumático, considerado um peptídeo neuroimunomodulatório endógeno que inibe a inflamação por agir diretamente sobre as células periféricas do hospedeiro, células inflamatórias gliais, por modular a liberação de substâncias inflamatórias e pela sua ação nos receptores cerebrais que ativam a via anti-inflamatória neural (CATANIA, 2008; LIPTON; CATANIA, 1997; LIPTON et al., 1991).

A inflamação sistêmica libera citocinas pró-inflamatórias, que agem centralmente resultando na liberação do hormônio de liberação da corticotrofina (CRH), presente na hipófise anterior. O CRH regula atividade do gene da POMC, o que resulta no aumento da produção e secreção de peptídeos derivados da POMC, como: MSH, ACTH e β -endorfina (FUKATA; IMURA; NAKAO, 1994; PECORI GIRALDI; CAVAGNINI, 1998; SLOMINSKI et al., 2000). O peptídeo α -MSH liberado na circulação sistêmica, ativa os receptores MC presente nos tecidos e atua como anti-inflamatório (CARUSO et al., 2004; GIULIANI et al., 2006; ICHIYAMA et al., 1999).

A ligação do α -MSH aos receptores MC diminui a expressão de citocinas pró-inflamatórias, embora também contribua para o aumento da produção da citocina anti-inflamatória IL-10, a qual reduz a produção de outras citocinas com atividade pró-inflamatória em macrófagos (BHARDWAJ et al., 1996; REDONDO et al., 1998). A fim de ratificar se a inflamação das vias aéreas é mediada pela produção de IL-10, camundongos nocauteados para o gene de IL-10 receberam tratamento com α -MSH e não apresentaram efeito na produção de anticorpos contra alérgenos (RAAP et al., 2003). Contudo, o α -MSH inibiu a inflamação aguda tanto na presença quanto na ausência da IL-10, sugerindo que a IL-10 não seja um mediador essencial para os efeitos anti-inflamatórios do α -MSH (LIPTON et al., 1999).

A inflamação constitui uma resposta tecidual contra lesões que da origem a mediadores inflamatórios, basicamente, por meio de duas vias: via das ciclooxygenases (COX), que produz prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos; e via das lipooxygenases (LOX) que produz leucotrienos e lipoxinas (CAPRA et al., 2013). Alguns estudos têm avaliado a influência do α -MSH na via da COX. Cragnolini e colaboradores (2006) mostraram que o tratamento com α -MSH (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) in vivo inibe o efeito da IL-1 β sobre a liberação de prostaglandina E₂ (PGE₂). Por outro lado, a administração de α -MSH, ou de seu análogo NDP- α -MSH, não alteram o aumento dos níveis plasmáticos de PGE₂ induzido pela IL-1 β (DAYNES et al., 1987). Hiltz e colaboradores (1992), investigaram se o α -MSH poderia inibir a resposta inflamatória induzida pela injeção de IL-1 β , IL-6, TNF- α , leucotrieno B₄ (LTB₄), fator de agregação plaquetária (PAF) ou IL-8. O α -MSH inibiu a inflamação induzida por IL-1 β , IL-6 ou TNF- α . Contudo, mesmo em altas doses, o tratamento com α -MSH não foi capaz de atenuar o edema induzido por LTB₄, PAF e IL-8. Assim, até o momento não existe qualquer prova de que o peptídeo α -MSH possa influenciar na cascata do ácido araquidônico.

Um estudo realizado por Clark e colaboradores (1985) mostra que o α -MSH (200-600 ng, i.c.v.) 30 minutos após injeção de araquidonato (25 μg , i.c.v.) ou PGE₂ (2 μg , i.c.v.) não é capaz de atenuar a resposta febril em coelhos. O mesmo efeito é observado por Davidson e colaboradores (1992) os quais não observaram efeito antipirético do α -MSH na hipertermia induzida pela PGE₂. Assim, esses estudos constituem claras evidências de que o α -MSH não influencia na cascata do ácido araquidônico, a qual apresenta uma estreita relação com o desenvolvimento de convulsões.

A injeção de um análogo do glutamato, ácido caínico (10 mg/kg, i.p.), em ratos machos Sprague-Dawley, ocasiona uma sequência de eventos comportamentais e eletrofisiológicos, bem como neurodegeneração no encéfalo (FORSLIN ARONSSON et al., 2007). Entretanto, a administração de α -MSH (0,5 mg/Kg; i.p.) nos intervalos de tempo de 20 minutos, 24 e 48 horas após a injeção do ácido caínico, resulta em neuroproteção da camada de células piramidais CA1 do hipocampo (FORSLIN ARONSSON et al., 2007). Além disso, a administração de α -MSH (i.p.) após um insulto isquêmico reduz a morte de células neuronais na camada de células piramidais (CA1) do hipocampo em mais de 30% quando comparado aos animais *sham* (animais que não sofrem insulto isquêmico), e fornece

aproximadamente 75% de neuroproteção comparado com animais isquêmicos que receberam salina (ARONSSON et al., 2006).

Também tem sido descrito que a estimulação da PKA induzida por α -MSH em culturas de células T helper 1 (THP1) tratadas com acetato miristato de forbol (PMA) causa inibição da ativação da quinase p38 e subsequente ativação do NF-kB, bloqueando assim a produção de TNF- α induzida por LPS (Figura 6) (YOON et al., 2003).

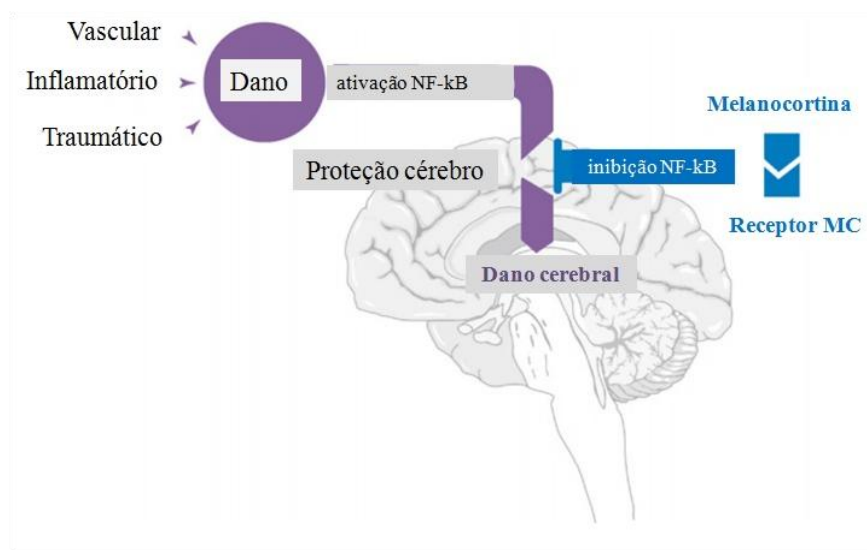


Figura 6: Bloqueio da ativação do fator de transcrição nuclear kB (NF-kB) (adaptado de CATANIA, 2008).

Apesar das evidências de que a via do NF-kB está envolvida nos efeitos anti-inflamatórios do α -MSH, se sabe que o α -MSH pode reduzir os níveis de citocinas sem afetar a expressão desses receptores, provavelmente por ativar CREB, fator de transcrição presente em vários tipos de neurônios no SNC e não envolver a via NF-kB (CARUSO et al., 2010).

Tem sido sugerido que a ativação da via anti-inflamatória colinérgica mediada pelo nervo vago também está envolvida nos efeitos anti-inflamatórios do α -MSH. Bitto e colaboradores (2011) observaram que o análogo da melanocortina NDP- α -MSH reverte o acidente vascular encefálico (AVE) hemorrágico em camundongos pela ativação dessa via, que envolve a estimulação do receptor MC-4 presente no núcleo motor dorsal do vago. Estes receptores provocam a ativação das fibras nervosas vagais que, rapidamente, conduzem à liberação de acetilcolina (Figura 7). A acetilcolina liberada ativa receptores colinérgicos

nicotínicos que contêm a subunidade alfa-7 em macrófagos e outras células do sistema imunológico, inibindo a síntese e liberação de citocinas inflamatórias (BITTO et al., 2011; GIULIANI et al., 2010; GUARINI et al., 2004). Assim, o efeito benéfico das melanocortinas em modelos de AVE sugere que as melanocortinas e os receptores MC-4 podem ser alvos promissores para o tratamento desta condição patológica.

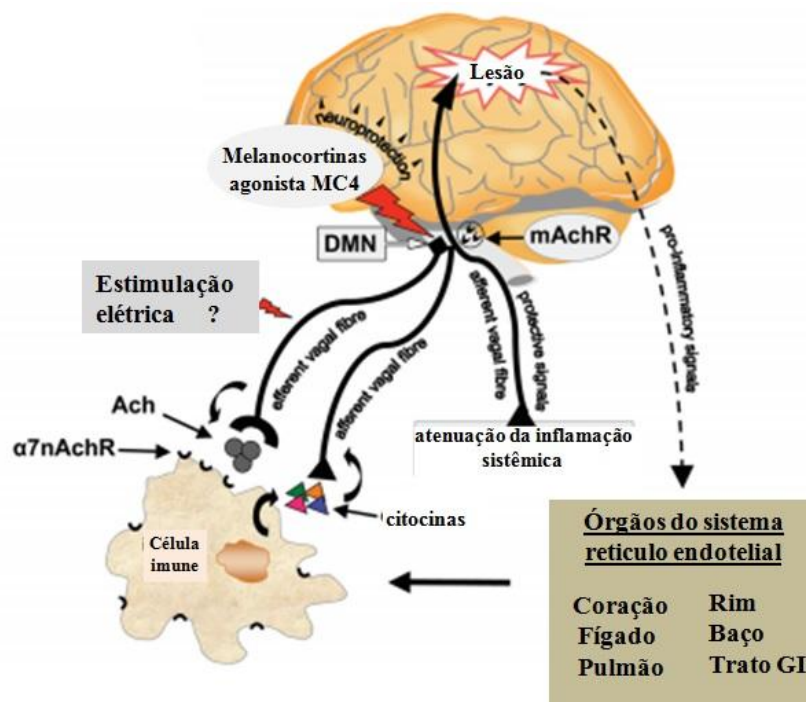


Figura 7: Via antiinflamatória colinérgica mediada pelo nervo vago (adaptado de GIULIANI et al., 2010).

1.2.4 α -MSH como opção terapêutica

Na clínica médica não existem estudos sobre o efeito terapêutico do α -MSH sobre crises epiléticas. Contudo, há alguns estudos que investigaram o efeito de fragmentos do α -MSH sobre as crises epiléticas de crianças. Neste sentido, o peptídeo ORG-2766, fragmento 4-9 da sequência do ACTH e do desacetil- α -MSH, não atenuou a frequência de convulsões em quatro crianças que apresentavam convulsão intratável (PENNELLA; BACHMAN; SANDMAN, 1982). Além disso, o tratamento com o fragmento ACTH 4-10, o qual

corresponde ao fragmento desacetil- α -MSH 4-10, não diminui a frequência das convulsões ou o padrão de eletroencefalograma (EEG) de crianças epiléticas (WILLIG; LAGENSTEIN, 1980).

O α -MSH tem sido proposto como um possível tratamento para um grande número de doenças da clínica médica, uma vez que possui atividades biológicas que incluem: a redução do comportamento alimentar e da inflamação, indução da pigmentação da pele, ação antipirética, efeitos regenerativos no cérebro, efeito facilitador do aprendizado e da memória, efeito sobre funções cardiovasculares, sexual e dor neuropática (BECKWITH et al., 1977; CATANIA et al., 2004; NI et al., 2006; VRINTEN et al., 2001).

O α -MSH e os outros peptídeos derivados da POMC são biologicamente instáveis, sendo facilmente hidrolisados por proteases (HRUBY et al., 2011). Embora ativo, o α -MSH apresenta uma meia-vida curta, de aproximadamente 20 a 25 minutos, em humanos (ASHTON et al., 1977; REDDING et al., 1978) e de 90 minutos em coelhos (RUDMAN et al., 1983).

1.3 Epilepsia

A etimologia do vocábulo *epilepsia* tem origem dos povos antigos que acreditavam que os epiléticos eram possuídos por maus espíritos e demônios. Aproximadamente, entre 400 a.C. (antes de Cristo) e 200 d.C. (depois de Cristo), Hipócrates, acompanhado por Arateus, Celsus e Plínio, focaram seus estudos na identificação da epilepsia como uma disfunção do cérebro. Portanto, a partir dessa época a definição da condição epilética passou a ser de natureza clínica (ENGEL; PEDLEY, 2008; SHORVON, 2007; VANEY, 1989).

Epilepsia é uma disfunção cerebral caracterizada por uma predisposição persistente de gerar crises epiléticas, que apresenta como conseqüências alterações neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais. Para que a disfunção seja caracterizada como epilepsia é necessária a ocorrência de pelo menos uma crise epilética. Define-se como crise epilética a ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas gerados por uma atividade neuronal sincrônica e excessiva (FISHER et al., 2005). Considerada uma disfunção neurológica crônica, a epilepsia afeta aproximadamente 50 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que desses, 80%

encontram-se nos países em desenvolvimento, principalmente devido a infecções parasitárias (neurocisticercose), infecção intracraniana ocasionada por vírus ou bactérias, tocotraumatismo, traumatismo crânio encefálico, agentes tóxicos e fatores hereditários (SENANAYAKE; ROMAN, 1993; CREMER et al., 2009; PITKÄNEN; SCHWARTZKROIN; MOSHÉ, 2006; OMS, 2012).

As causas da epilepsia são diversas, e abrangem desde defeitos no desenvolvimento do cérebro, decorrentes de displasias ou neurônios corticais ectópicos, até mutações genéticas, como defeitos nos canais iônicos ou distúrbios metabólicos. Entretanto, a maioria das causas ainda é desconhecida (CREMER et al., 2009; VEZZANI et al., 2011). Sendo assim, tanto uma diminuição na atividade dos neurônios inibitórios quanto um aumento na atividade dos neurônios excitatórios são os prováveis mecanismos responsáveis pelo início da crise convulsiva. Porém, estes estados de excitabilidade aumentada, condições importantes tanto para a geração de uma crise convulsiva quanto para a epileptogênese, podem ter outros fatores desencadeantes, como processo inflamatório no SNC, com liberação de citocinas e quimiocinas (KLEEN; HOLMES, 2008). Estudos recentes extrapolam esses conceitos clássicos e mostram que tanto crises agudas como a epileptogênese podem iniciar com um processo inflamatório (FABENE; BRAMANTI; CONSTANTIN, 2010; KLEEN; HOLMES, 2008; VEZZANI et al., 2011).

1.4 Crises epiléticas e inflamação

1.4.1 Inflamação

A inflamação é uma resposta fisiopatológica a uma agressão, infecção ou estresse biológico, normalmente desencadeado por patógenos invasores ou por dano celular, provocado mesmo em condições estéreis (WALKER; SILLS, 2012). A inflamação consiste na liberação de moléculas inflamatórias (citocinas e quimiocinas), geradas, inicialmente, pela ativação de macrófagos, mastócitos, células NK (natural Killer) que fazem parte da imunidade inata (VEZZANI et al., 2011).

A inflamação é uma reação complexa em tecidos que consiste principalmente nas respostas dos vasos sanguíneos e leucócitos. As principais defesas do organismo contra invasores estranhos são as proteínas plasmáticas e os leucócitos circulantes, assim como os fagócitos teciduais, que são derivados de células circulantes. A presença de proteínas e leucócitos no sangue dá a eles a habilidade de alcançarem qualquer local onde eles possam ser necessários. Devido aos invasores como micro-organismos e células necróticas estarem presentes nos tecidos, fora da circulação, isto resulta no fato de que as células circulantes e as proteínas têm de ser rapidamente recrutadas para estes locais extravasculares. A resposta inflamatória coordena as reações dos vasos, leucócitos e proteínas plasmáticas (KUMAR et al., 2010).

As reações vasculares e celulares da inflamação são disparadas por fatores solúveis que são produzidos por várias células ou derivadas de proteínas do plasma e são ativadas em resposta ao estímulo inflamatório. Micro-organismo, células necróticas podem desencadear a produção de mediadores inflamatórios e então provocar a inflamação (KUMAR et al., 2010). Vários mediadores participam da resposta inflamatória, incluindo: quimiocinas, citocinas (IL-1, IL-6, TNF- α), peptídeo como a bradicinina, tromboxanos, prostaglandinas, prostaciclina, leucotrienos, entre outras (MANTOVANI et al., 2011; SERHAN et al., 2007; VEZZANI; FRIEDMAN; DINGLELINE, 2013). Tais mediadores iniciam e amplificam a resposta inflamatória e determinam sua gravidade e manifestações clínicas e patológicas (KUMAR et al., 2010).

A via dos eicosanóides tem sido implicada na gênese e/ou propagação de crises epiléticas. A produção de eicosanóides se inicia a partir da liberação dos fosfolipídios de membrana pela ação da enzima fosfolipase A₂, que pode ser ativada por estímulos mecânicos, físicos e/ou produzidos por diversos mediadores (AKIBA; SATO, 2004). Assim, o ácido araquidônico (ácido graxo presente de forma esterificada nas membranas celulares) é liberado, servindo de substrato para a produção de mediadores inflamatórios por meio de duas vias: 1) Via da ciclooxigenase (COX), que produz prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos e 2) Via da lipooxigenase (LOX), a qual produz leucotrienos e lipoxina (Figura 8) (CAPRA et al., 2013).

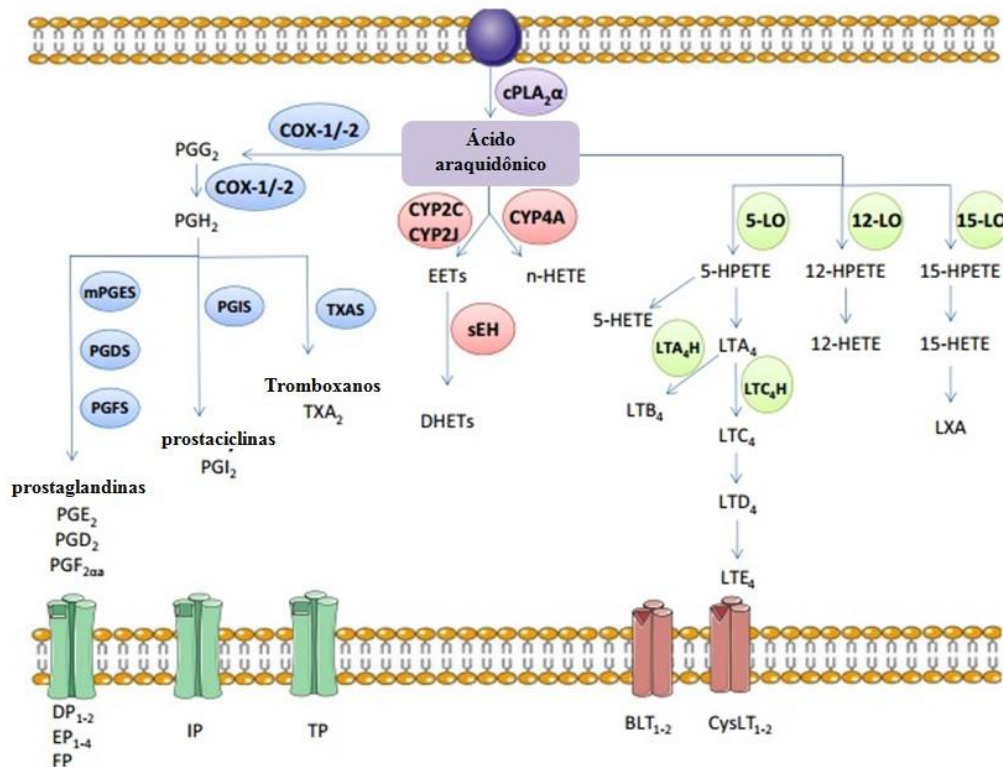


Figura 8: Metabolismo do ácido araquidônico (adaptado de MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2013).

A inflamação também pode ter origem auto-imune e resultar em uma lesão tecidual no qual os títulos de auto-anticorpos ou de linfócitos T auto-reativos estão aumentados. As auto-inflamações constituem um amplo espectro de doenças auto-imunes, tendo em uma das extremidades a resposta direcionada contra um único órgão ou tecido, resultando em doença órgão-específico e, na outra extremidade, as reações auto-imunes contra antígenos disseminados, causando uma doença generalizada sistêmica (KUMAR et al., 2010). Neste sentido, crises associadas a doenças auto-imunes, como por exemplo pacientes com lupus eritematoso sistêmico e encefalopatia de Hashimoto (BIEN; SCHEFFER, 2011), também têm sido descritas, constituindo evidência adicional do envolvimento do sistema imune no desenvolvimento de crises, além dos já conhecidos aumentos de citocinas IL-6, IL-1beta e TNF-alfa induzidos pela administração de agentes pró-inflamatórios.

1.4.2 Mecanismos inflamatórios na convulsão

A inflamação pode facilitar e/ou exacerbar as convulsões, embora o mecanismo exato pelo qual isso acontece ainda não está totalmente esclarecido. Uma das hipóteses propostas, é que a inflamação desencadeie respostas imunológicas através do reconhecimento de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) e padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), como por exemplo, a HMGB1 (proteínas do grupo box-1 de alta mobilidade) e LPS (CREMER et al., 2009; DEDEURWAERDERE et al., 2012; MAROSO et al., 2010; MATSUO et al., 2006; RODGERS et al., 2009).

Estudos têm demonstrado que o LPS pode facilitar convulsões induzidas por pilocarpina, por ligar-se a receptores de reconhecimento padrão (PRRs), como os receptores *toll-like* (TLR-4) e receptores de produtos finais de glicação avançada (*advanced glycation end products receptors* - RAGE). Esse efeito facilitatório das convulsões é revertido por ifenprodil, o qual exerce sua ação por bloqueio dos receptores NMDA, sugerindo, assim, o envolvimento desses receptores nas convulsões induzidas por LPS (Figura 9) (MAROSO et al., 2010; MATSUO et al., 2006; RODGERS et al., 2009).

Essa associação entre DAMPs ou PAMPs e PRRs, desencadeia um aumento na produção de citocinas e ativação de receptores, como por exemplo, o receptor para IL-1 (IL-1Ra), cujo antagonismo diminui as convulsões induzidas por LPS. Também tem sido demonstrado que a superexpressão de TNF- α e IL-6 no cérebro de camundongos estão associadas à presença de convulsões espontâneas esporádicas (AKASSOGLU et al., 1997; CAMPBELL et al., 1993). Além disso, camundongos transgênicos que superexpressam IL-6 em astrócitos apresentam maior suscetibilidade ao desenvolvimento das convulsões induzidas por agonistas glutamatérgicos (SAMLAND et al., 2003) e convulsões espontâneas (AKASSOGLU et al., 1997; CAMPBELL et al., 1993). Já se sabe também, que a atividade convulsiva provocada por bicuculina está relacionada com a superexpressão da IL-1 β (LIBRIZZI et al., 2012). E que injeção intrahipocampal de ácido caínico induz aumento na imunoreatividade da IL-1 β em astrócitos (BALOSSO et al., 2008).

Oliveira e colaboradores (2008), mostraram que PGE₂ possui um papel importante em convulsões. A administração de anticorpos monoclonais anti-PGE₂ atenua as convulsões induzidas por PTZ. Além disso, a injeção i.c.v. de PGE₂ facilita o aparecimento das

convulsões induzidas por este agente convulsivante, bem como por ácido metilmalônico (SALVADORI et al., 2012), e diminui a atividade da enzima $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ no hipocampo de ratos (OLIVEIRA et al., 2009).

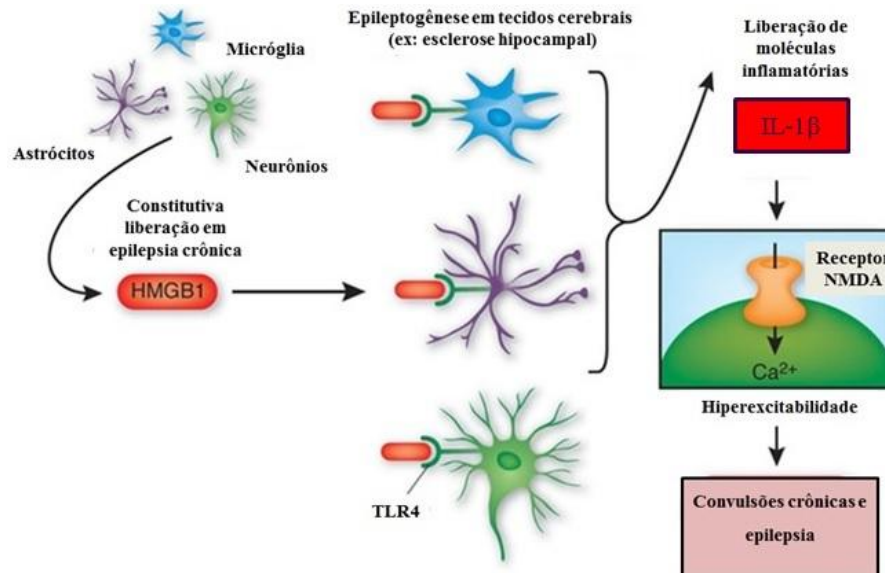


Figura 9: Hipótese da sinalização da inflamação (Adaptado de KLEEN; HOLMES, 2010).

Nos últimos anos muitas evidências têm sustentado a hipótese de que a presença de processos inflamatórios no cérebro pode constituir um mecanismo comum e fundamental na fisiopatologia das convulsões e da epilepsia (DEDEURWAERDERE et al., 2012; VEZZANI et al., 2011). Apesar da grande variedade de medicamentos antiepiléticos disponíveis comercialmente, cerca de um terço dos pacientes com epilepsia não responde à terapia farmacológica (PERUCCA; FRENCH; BIALER, 2007). Isso tem despertado o interesse em pesquisas com foco nas estratégias anti-inflamatórias com atividade anticonvulsivante (DEDEURWAERDERE et al., 2012; RAVIZZA; BALOSSO; VEZZANI, 2011).

1.4.3 Canais iônicos ativados por hiperpolarização e controlados por nucleotídeos cíclicos (HCN)

Os canais iônicos ativados por hiperpolarização e controlados por nucleotídeos cíclicos (HCN) têm a função de controlar a excitabilidade neuronal, potenciais sinápticos de integração dendrítica, transmissão sináptica, e atividade oscilatória rítmica em neurônios individuais e redes neuronais. A corrente associada à abertura desses canais, designada I_h , está presente em células excitáveis, incluindo neurônios, células marca-passo cardíaco, e fotorreceptores. Dentre as características da I_h estão a ativação por hiperpolarização da membrana, permeabilidade a Na^+ e K^+ , ativação destes canais por ligação direta de nucleotídeos cíclicos (HOFMANN; BIEL; KAUPP, 2005; BIEL et al., 2009). Evidências experimentais indicam que esses canais são altamente expressos no SNC e contribuem para mecanismos de epilepsia e dor (BENARROCH, 2013; MARCELIN et al., 2009). De fato, tem sido relatado tanto aumento como redução na expressão dos canais HCN em diferentes modelos animais de epilepsia do lobo temporal, assim como na epilepsia em humanos (OLIVEIRA et al., 2011) o que é compatível com a condutância destes canais tanto ao potássio como ao sódio. Além disso, em tipos específicos de neurônios, a expressão de canais HCN2 têm importante função na modulação da geração de potenciais de ação, em resposta a mediadores inflamatórios, como a PGE_2 , a qual aumenta a produção de AMPc (EMERY; YOUNG; MCNAUGHTON, 2012). Portanto, em neurônios o aumento do AMPc está associado a abertura dos canais HCN e a despolarização (BENARROCH, 2013).

O α -MSH se liga em receptores MC acoplados a uma proteína G_s , ativando a adenil ciclase, e aumentando a produção de AMPc em células gliais (GANTZ; FONG, 2003; BRZOSKA et al., 2010). O aumento de AMPc induzido por α -MSH parece reduzir a atividade do NF- κ B por três mecanismos distintos: 1) indução da transcrição do I κ B por mecanismos dependentes de CREB; 2) bloqueio da atividade da enzima I κ B quinase (IKK β) prevenindo a fosforilação do I κ B e a sua degradação; 3) por aumentar os níveis intracelulares de I κ B, por interferir na ubiquitinação e/ou subsequente degradação pelo proteossoma (GERLO et al., 2011).

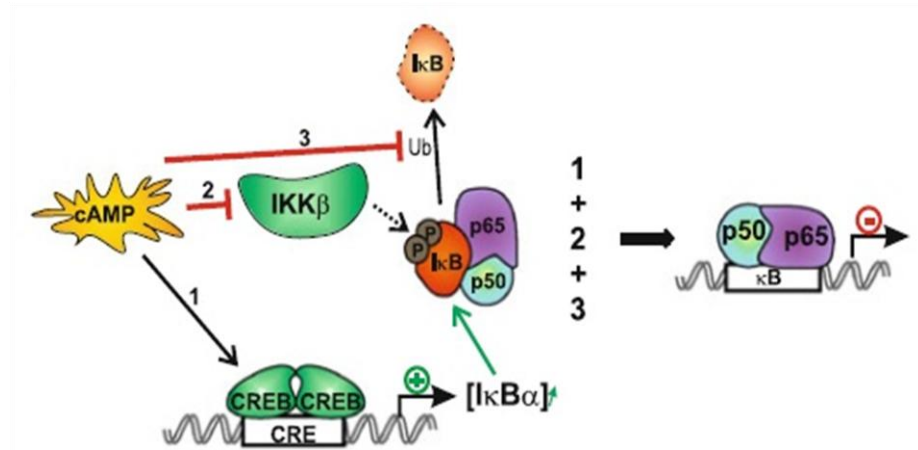


Figura 10: Representação esquemática do efeito do AMPc sobre atividade do NF-κB (Adaptado de GERLO et al., 2011).

1.5 Modelos experimentais de convulsão

Modelos animais são bastante utilizados para estudos da fisiopatologia do processo convulsivo, pois reproduzem alterações comportamentais, eletroencefalográficas e neuroquímicas que são semelhantes à epilepsia em humanos (BEN-ARI; TREMBLAY; OTTERSEN, 1980). Uma variedade de modelos animais tem sido desenvolvida. Entre eles, destacam-se modelos genéticos (que desenvolvem crises espontâneas ou por estímulo sensorial), modelos elétricos (como o abrasamento e eletrochoque) e modelos farmacológicos, como os que usam ácido caínico, pilocarpina, penicilina, 4-aminopiridina, toxina colérica, bicuculina, picrotoxina, PTZ (BIDMON et al., 2008). Em nosso estudo optamos pelo PTZ e pilocarpina, dois modelos farmacológicos agudos de crise, sendo analisada a latência para o primeiro episódio mioclônico e para a crise generalizada tônico-clônica. As crises induzidas por PTZ são associadas a um grau variável de ruptura da barreira hematoencefálica (LORENZO et al., 1975), podendo ser inibidas por agentes anti-inflamatórios (OLIVEIRA et al., 2008), enquanto, o *status epilepticus* (SE) induzido pela pilocarpina depende diretamente do aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE) (MARCHI et al., 2009).

1.5.1 Pentilenotetrazol (PTZ)

O PTZ é um estimulante do SNC, e tem sido utilizado como um agente indutor de crises, sendo utilizado tanto em modelos experimentais de epilepsia agudos quanto crônicos (LOSCHER, 2009). O PTZ é um antagonista do receptor GABA_A (ácido gama-aminobutírico), um receptor acoplado a um canal permeável a cloreto, cuja ativação provoca hiperpolarização localizada na membrana neuronal, o que torna o neurônio refratário a estímulos despolarizantes (CREMER et al., 2009).

O PTZ tem sido utilizado experimentalmente tanto em pesquisas com foco na fisiopatologia das crises convulsivas, quanto na identificação de fármacos que possam inibir e/ou diminuir a suscetibilidade para crises. Algumas das principais vantagens do modelo do PTZ são o curto período de latência para crise generalizada tônico-clônica, a mínima degeneração neuronal e alto valor preditivo de eficácia clínica das drogas anticonvulsivantes identificadas por este modelo (ENGEL; PEDLEY, 2008; CREMER et al., 2009).

As doses de PTZ administradas nos modelos animais de convulsões variam entre os autores. Comumente estão entre 30 a 110 mg/kg. Quando o objetivo é induzir uma única crise convulsiva, a dose é aplicada uma só vez, enquanto que, para a indução de convulsões repetidas como no modelo do *abrasamento químico*, são administradas doses repetidas, em concentrações subconvulsivantes, em diferentes intervalos de tempo como de 24 em 24 ou de 48 em 48 horas. O tratamento varia de 2 a 8 semanas (ENGEL; PEDLEY, 2008; CREMER et al., 2009).

1.5.2 Modelo de crise aguda por pilocarpina

A pilocarpina é um alcalóide extraído das folhas da *Pilocarpus jaborandi* e *Pilocarpus microphyllus* (Figura 10), plantas encontradas nas florestas da América do Sul. O modelo da pilocarpina, descrito pela primeira vez por Turski e colaboradores (1983), é considerado um dos três modelos químicos mais utilizados no estudo da epilepsia. A pilocarpina ativa receptores colinérgicos muscarínicos do subtipo M1 (BYMASTER et al., 2003; HAMILTON et al., 1997), localizado na camada do córtex entorrinal. A ativação desse subtipo de receptor

muscarínico amplia o influxo de cálcio, causando uma despolarização da membrana e repetidos disparos dos neurônios, acompanhado de atividade pós-sináptica (KLINK; ALONSO, 1997).

As crises induzidas por pilocarpina iniciam-se no hipocampo e se propagam para a amígdala e neocórtex (TURSKI et al., 1983). As crises manifestam-se por movimentos orofaciais, salivação, piscar de olhos, movimentos de vibrissas, bocejos seguidos por movimentos clônicos da cabeça e crise motora límbica (CAVALHEIRO et al., 1991). Na primeira fase denominada de fase aguda, os animais apresentam hiperatividade, tremores e clonias de patas nos primeiros 5 minutos (HIRSCH; BARAM; SNEAD, 1992). Este comportamento é seguido pelo aumento na atividade motora culminando em SE em torno de 30 a 40 minutos após a administração.

Estudos têm revelado que a pilocarpina induz elevação dos níveis de glutamato no hipocampo, levando ao aparecimento de convulsões. Devido à atividade neuronal intensa provocada pela estimulação de receptores M1, sugere-se que as convulsões são mantidas pela ativação de receptores NMDA promovendo ações excitotóxicas no hipocampo e estruturas adjacentes (NAGAO; ALONSO; AVOLI, 1996; SMOLDERS et al., 1997). É importante enfatizar que o SE induzido pela pilocarpina é altamente dependente da ruptura da BHE (MARCHI et al., 2007), assim como da inflamação sistêmica e central (MARCHI et al., 2009). Portanto, esse modelo é provavelmente mais sensível a ação de drogas com perfil anti-inflamatório, como o proposto para o α -MSH.

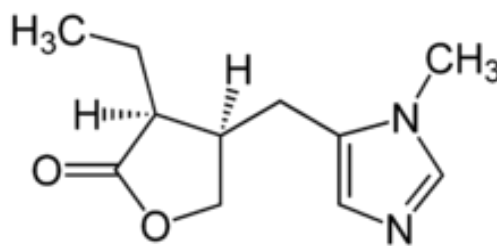


Figura 11: Estrutura molecular da pilocarpina.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do α -MSH sobre as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) e pilocarpina em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

1. Investigar o efeito da administração intraperitoneal ou intracerebroventricular de α -MSH sobre a latência para primeira mioclonia; latência para a convulsão generalizada (tônico-clônica); número de convulsão, duração e gravidade das convulsão induzidas por PTZ em camundongos;
2. Investigar o efeito da administração intraperitoneal ou intracerebroventricular de α -MSH sobre a latência para a convulsão generalizada (tônico-clônica); número de convulsão, duração e gravidade das convulsão induzidas por pilocarpina em camundongos;

3 RESULTADOS

3.1 Artigo Científico



Alpha melanocyte stimulating hormone (α -MSH) does not modify pentylenetetrazol- and pilocarpine-induced seizures

Fernanda Rossatto Temp^a, Aline Carré Santos^a, Joseane Righes Marafiga^b, Ana Cláudia Jesse^b, Quéli Fernandes Lenz^a, Sara Marquesan Oliveira^b, Gustavo Petri Guerra^c, Teresa Nieves Scimonelli^d, Carlos Fernando Mello^{a,*}

^a Graduate Program in Pharmacology, Center of Health Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^b Department of Physiology and Pharmacology, Center of Health Sciences, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^c Department of Food Technology, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Medianeira, Medianeira, PR 85884-000, Brazil

^d IFEC CONICET, Department of Pharmacology, School of Chemistry, National University of Córdoba, Córdoba, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 May 2013

Accepted 4 September 2013

Keywords:

Melanocyte-stimulating-hormone
Central inflammation
Epilepsy

ABSTRACT

Aims: Alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH) is a pro-opiomelanocortin (POMC)-derived peptide involved in different neurological functions that also exerts anti-inflammatory effects, including in the central nervous system (CNS). Although inflammation has been implicated in seizures and epilepsy, no study has systematically investigated whether α -MSH modifies seizures. Therefore, in the current study we determined whether α -MSH alters pentylenetetrazol (PTZ)- and pilocarpine-induced seizures.

Main methods: Adult male Swiss mice were injected with α -MSH (1.66, 5 or 15 μ g/3 μ l, intracerebroventricular (i.c.v.)) or systemic (0.1, 0.3 or 1 mg/kg, intraperitoneally (i.p.)). Five to sixty minutes after the injection of the peptide, animals were injected with PTZ (60 mg/kg, i.p.) or pilocarpine (370 mg/kg, i.p.). Latency to myoclonic jerks and tonic-clonic seizures, number of seizure episodes, total time spent seizing and seizure intensity, assessed by the Racine and Meurs scales were recorded. Interleukin 1 beta (IL-1 β) levels in the hippocampus were measured by a commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Key findings: Neither intracerebroventricular (1.66, 5 or 15 μ g/3 μ l, i.c.v.) nor systemic (0.1, 0.3 or 1 mg/kg, i.p.) administration of α -MSH altered PTZ- and pilocarpine-induced seizures. IL-1 β levels in the hippocampi were not altered by α -MSH, PTZ or pilocarpine.

Significance: Although inflammation has been implicated in seizures and epilepsy and α -MSH is a potent anti-inflammatory peptide, our results do not support a role for α -MSH in seizure control.

© 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Neurotrauma, stroke, infection, and febrile seizures are all associated with acute seizures and increased risk of developing epilepsy (Dedeurwaerdere et al., 2012). Several lines of evidence support a relationship between inflammation and epilepsy (Cremer et al., 2009; Dedeurwaerdere et al., 2012; Perucca et al., 2007; Vezzani et al., 2011a). Inflammation is triggered by molecular patterns associated to pathogens (PAMPs) or molecular patterns associated to damage (DAMPs) (Maroso et al., 2010). These molecules activate the host defense system and also increase neural tissue excitability (Matsuo et al., 2006; Rodgers et al., 2009). PAMPs and DAMPs bind to toll-like receptors (TLR) and advanced glycation end product receptors (RAGE), which are expressed mainly on the cell surface of astrocytes and microglial cells in the central nervous system

(Medzhitov, 2007). TLR have also been reported in neurons (Zhou et al., 2009), particularly in dysplastic neurons from epileptic patients (Zurolo et al., 2011). Interestingly, the epicortical application of lipopolysaccharide (LPS) produces spontaneous epileptiform discharges (Rodgers et al., 2009) and high-mobility group box-1 (HMGB1), a non-histone nuclear protein, facilitates kainate- and bicuculine-induced seizures (Maroso et al., 2010). Moreover, it is fairly known that activation of TLR increases microglial tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin 6 (IL-6), macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) and interleukin 1 beta (IL-1 β) expression (Allan et al., 2005; Dunne and O'Neill, 2003; Farooqui et al., 2007; Li et al., 2011). In this context, several studies have described that these pro-inflammatory cytokines increase seizure susceptibility (Galic et al., 2012; Li et al., 2011; Vezzani et al., 2012).

Alpha-melanocyte stimulating hormone (α -MSH) is a thirteen amino acid neuropeptide derived from the post-translational processing of pro-opiomelanocortin (POMC) (Brzoska et al., 2008; Butler, 2006; Catania et al., 2000) that binds to Gs protein-coupled melanocortin receptors (MC-Rs) (Gantz and Fong, 2003; Mountjoy

* Corresponding author. Tel.: +55 55 3220 9378; fax: +55 55 3220 8241.
E-mail address: cf.mello@smail.ufsm.br (C.F. Mello).

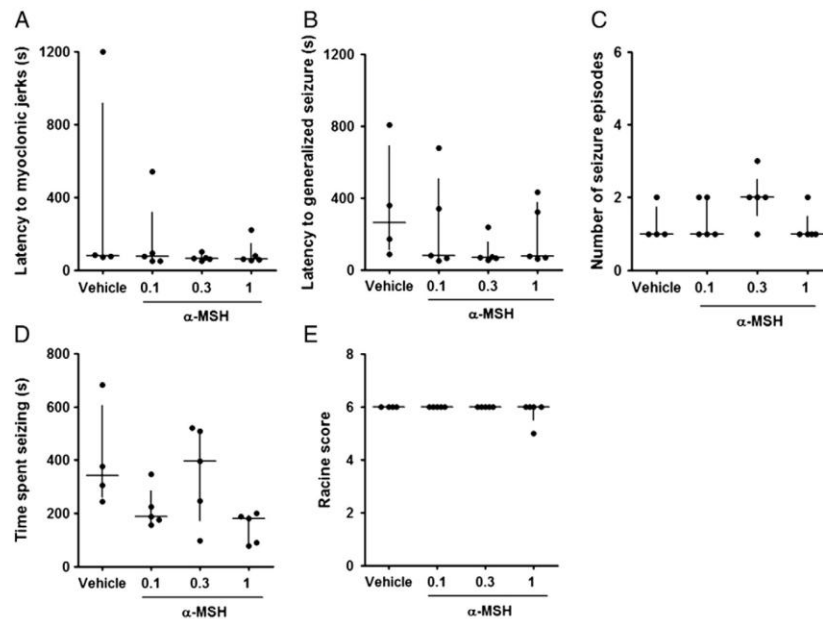


Fig. 1. Lack of effect of α -MSH (0.1, 0.3 or 1 mg/kg, i.p., 15 min before PTZ) on PTZ-induced seizures. Latency to myoclonic jerks (A); latency to generalized tonic-clonic seizures (B); number of seizure episodes (C); total time spent seizing (D) and Racine scale (E). Data are presented as median and interquartile range for n = 4–5 in each group.

et al., 1992). Three out five of MC-R subtypes described (MC1-R, MC3-R and MC4-R) have anti-inflammatory role (Caruso et al., 2004; Catania et al., 2004; Ichijama et al., 1999; Maaser et al., 2006; Mountjoy et al., 2003). α -MSH binding to these MC-Rs downregulates various pro-inflammatory cytokines and increases the expression of the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Bhardwaj et al., 1996; Redondo et al., 1998). α -MSH downregulates pro-inflammatory cytokines by inhibiting I κ B degradation. As a result, nuclear factor κ B (NF κ B) is maintained complexed with I κ B in the cytoplasm, and does not trigger the transcription of target genes that encode pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α (Brzoska et al., 2008; Catania, 2008; Catania et al., 2010; Hiscott et al., 1993; Muceniec and Dambrova, 2010).

A number of studies have suggested a role for inflammatory mediators in pentylenetetrazol (PTZ)- and pilocarpine-induced seizures (Funck et al., 2011; Maroso et al., 2010; Oliveira et al., 2008; Rambo et al., 2009; Vezzani et al., 2010, 2011a, 2011b), and that α -MSH triggers anti-inflammatory mechanisms in the central nervous system (CNS). However, no study has determined whether α -MSH modify PTZ- and pilocarpine-induced seizures. Therefore, in the current study we investigated whether α -MSH decreases the seizures elicited by these chemoconvulsants.

Material and methods

Animals

Adult male Swiss mice (28 ± 3 g; n = 184), housed ten to a cage, and maintained under controlled light and environment (12-h light/

dark cycle, 24 ± 1 °C, 55% relative humidity) with free access to food (Guabi, Santa Maria, Brazil) and water, were used. All animals were obtained from the Animal House of the Federal University of Santa Maria.

Behavioral tests were conducted during the light phase of the cycle (from 9:00 a.m. to 5:00 p.m.). All experiments reported in this study were conducted in accordance with the policies of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 80-23), revised in 1996, and with the Institutional and National regulations for animal research. All efforts were made to reduce the number of animals used to a minimum, as well as to minimize their suffering (Committee on Care and Use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Santa Maria authorization number: 008/2013).

Reagents

PTZ, pilocarpine and methylscopolamine bromide were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). α -MSH was purchased from Bachem (CA, USA). Drugs were dissolved in sterile 0.9% NaCl or sterile phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4. The murine IL-1 β kit was purchased from PreproTech (São Paulo, Brazil).

Surgical procedures

All animals were anesthetized with ketamine (100 mg/kg, intraperitoneally (i.p.)) and xylazine (10 mg/kg, i.p.), placed in a rodent stereotaxic apparatus, and were implanted with one 27-gauge guide cannula placed 1 mm above the right lateral ventricle, at the following coordinates

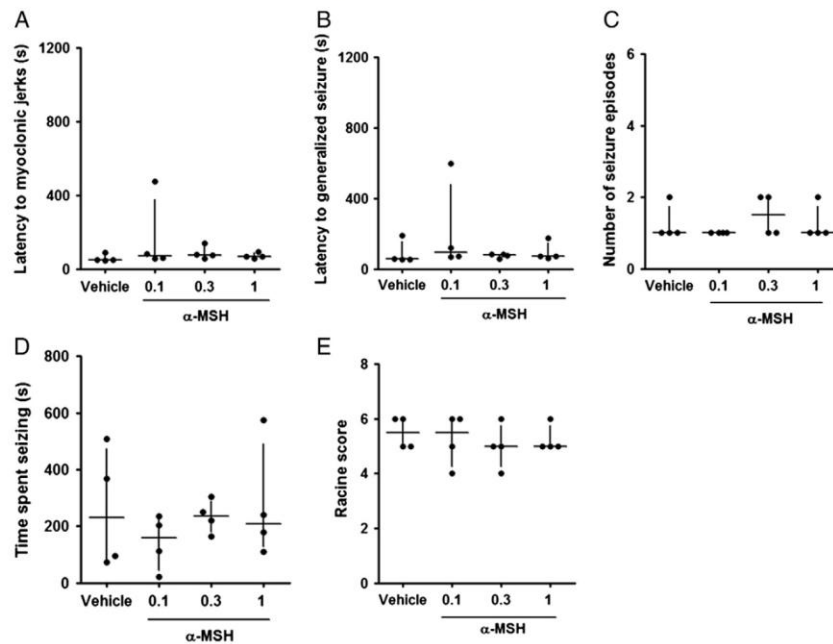


Fig. 2. Lack of effect of α -MSH (0.1, 0.3 or 1 mg/kg, i.p., 30 min before PTZ) on PTZ-induced seizures. Latency to myoclonic jerks (A); latency to generalized tonic-clonic seizures (B); number of seizure episodes (C); total time spent seizing (D) and Racine scale (E). Data are presented as median and interquartile range for n = 4 in each group.

relative to bregma: AP 0 mm, ML 0.9 mm, V 1.6 mm from the dura (Paxinos and Franklin, 2008). Chloramphenicol (200 mg/kg, i.p.) (Oliveira et al., 2008) was administered immediately before the surgical procedure to prevent infection.

Injection procedures

The effect of α -MSH on PTZ- or pilocarpine-induced seizures was investigated by injecting the animals with α -MSH (0.1, 0.3 or 1 mg/kg, i.p., in those experiments in which the effect of the systemic administration of α -MSH was investigated or 1.66, 5 or 15 μ g/3 μ L, intracerebroventricular (i.c.v.), in those experiments in which the effect of the central administration of α -MSH was investigated) or respective vehicle (sterile 0.9% NaCl, 10 mL/kg, i.p. or PBS, i.c.v.). All intracerebroventricular injections were performed by using a Hamilton syringe and a 30-gauge needle fitted into the guide cannula. The tip of the infusion needle protruded 1.0 mm beyond that of the guide cannula into the right lateral ventricle. The needles were left in place for additional 60 s to minimize backflow.

Experiment 1: effect of systemic α -MSH on PTZ-induced seizures

The effect of systemic α -MSH on PTZ-induced seizures was investigated by administering α -MSH at the doses 0.1, 0.3 or 1 mg/kg (i.p.), or sterile 0.9% NaCl (10 mL/kg, i.p.), 15, 30 or 60 min before the injection of PTZ (60 mg/kg, i.p.) (Funck et al., 2011). The animals were evaluated for the appearance of behavioral seizures, as described below. α -MSH doses and injection intervals were chosen based on a previous study (Ichiyama et al., 1999), which has shown an anti-inflammatory action of systemic α -MSH in the CNS.

Experiment 2: effect of i.c.v. α -MSH on PTZ-induced seizures

Since the systemic administration of α -MSH did not alter PTZ-induced seizures, we hypothesized that this effect could be due to its low blood brain barrier permeability (Wilson, 1988). Therefore, the effect of i.c.v.-administered α -MSH on PTZ-induced seizures was investigated. α -MSH (1.66, 5 or 15 μ g/3 μ L) or vehicle (3 μ L of PBS, pH 7.4) were injected 15 min before PTZ (60 mg/kg, i.p.). Immediately after PTZ injection, the animals were evaluated for the appearance of behavioral seizures, as described below. Initial α -MSH doses and injection intervals were chosen based on a previous study (Izumi et al., 1973).

Experiment 3: effect of systemic α -MSH on pilocarpine-induced seizures

Considering that α -MSH did not alter PTZ-induced seizures, and that anticonvulsant activity depends on the chemical agent used to induce seizures (Oliveira et al., 2008), we tested whether α -MSH altered pilocarpine-induced seizures. Animals were injected with methylscopolamine bromide (1 mg/kg, i.p.) (Muller et al., 2009) to attenuate the peripheral cholinergic effects of pilocarpine. Fifteen minutes after the injection of methylscopolamine, animals were injected with saline or α -MSH (0.1, 0.3 or 1 mg/kg, i.p.). Pilocarpine (370 mg/kg, i.p.) (Costa et al., 2012) was administered 30 min thereafter.

Experiment 4: effect of i.c.v. α -MSH on pilocarpine-induced seizures

Since the systemic administration of α -MSH did not alter pilocarpine-induced seizures, we decided to test whether α -MSH, administered by the i.c.v. route, prevented seizures. Animals were injected with methylscopolamine bromide (1 mg/kg, i.p.) to prevent the peripheral cholinergic effects of pilocarpine. Fifteen minutes after the injection of methylscopolamine, animals were injected with α -MSH

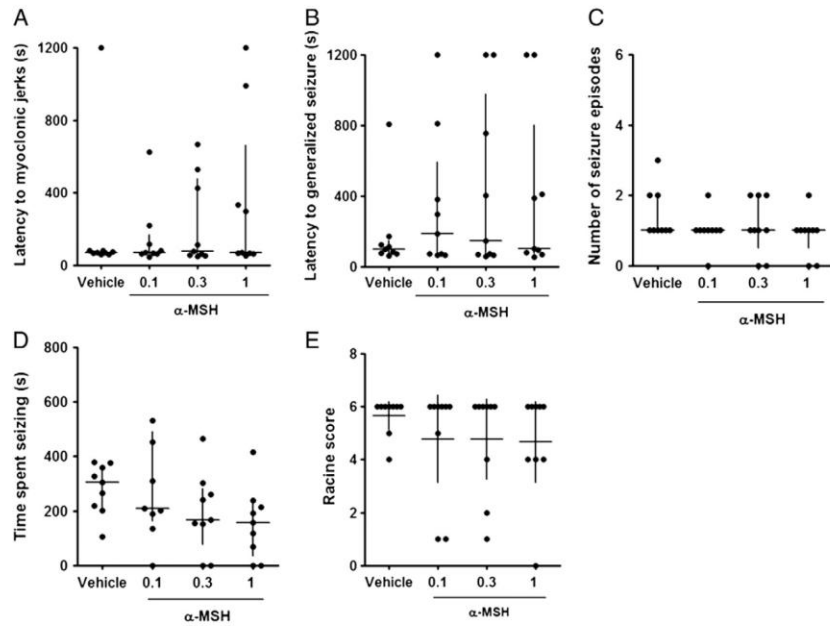


Fig. 3. Lack of effect of α -MSH (0.1, 0.3 or 1 mg/kg, i.p., 60 min before PTZ) on PTZ-induced seizures. Latency to myoclonic jerks (A); latency to generalized tonic-clonic seizures (B); number of seizure episodes (C); total time spent seizing (D) and Racine scale (E). Data are presented as median and interquartile range for $n = 9$ in each group.

(1.66, 5 or 15 μ g/3 μ L) or vehicle (3 μ L of PBS, pH 7.4). Pilocarpine (370 mg/kg, i.p.) was administered 30 min thereafter.

α -MSH (15 μ g/3 μ L) or vehicle (3 μ L of PBS, pH 7.4). Pilocarpine (370 mg/kg, i.p.) was administered 5 min thereafter.

Experiment 5: effect of early i.c.v. α -MSH on pilocarpine-induced seizures
 Considering that the half-life of α -MSH is relatively short (Ahmed et al., 2013), we decided to decrease the time between the administration of the peptide and pilocarpine, in order to guarantee that α -MSH would be present in the brain when pilocarpine was injected. Animals were injected with methylscopolamine bromide (1 mg/kg, i.p.) to prevent the peripheral cholinergic effects of pilocarpine. Twenty minutes after the injection of methylscopolamine, animals were injected with

Experiment 6: effect of early i.c.v. α -MSH and of PTZ and pilocarpine on IL-1 β levels in the hippocampus

The effect of α -MSH, PTZ- or pilocarpine on IL-1 β levels was investigated by injecting the animals with α -MSH (1.66 μ g/3 μ L, i.c.v.) or respective vehicle (sterile 0.9% NaCl, 10 mL/kg, i.p. or PBS, i.c.v.). α -MSH or vehicle (3 μ L of PBS, pH 7.4) were injected 15 min before PTZ (60 mg/kg, i.p.). Those animals subjected to pilocarpine-induced seizures were first injected with methylscopolamine bromide (1 mg/

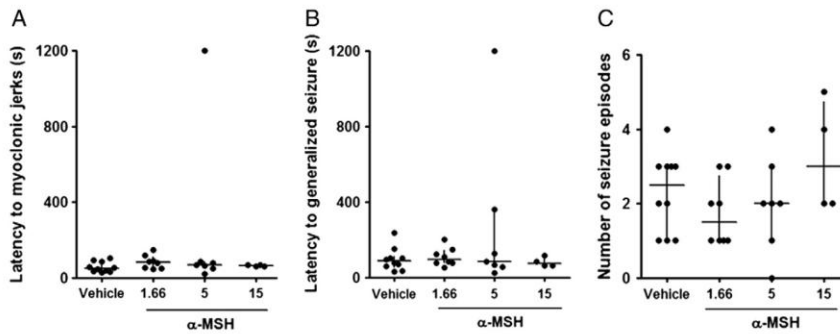


Fig. 4. Lack of effect of α -MSH (1.66 μ g, 5 μ g or 15 μ g/3 μ L, i.c.v., 15 min before PTZ) on PTZ-induced seizures. Latency to myoclonic jerks (A); latency to generalized tonic-clonic seizure (B); and number of seizure episodes (C). Data are presented as median and interquartile range for $n = 4$ –10 in each group.

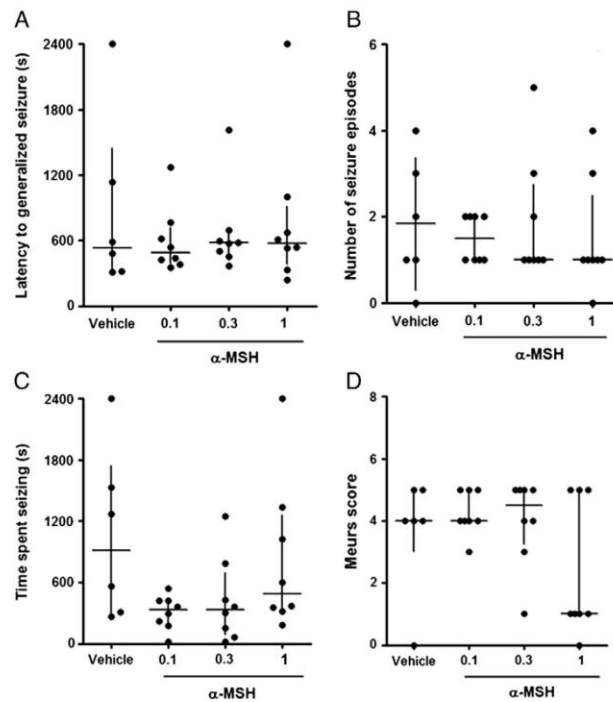


Fig. 5. Lack of effect of α -MSH (0.1, 0.3 or 1 mg/kg, i.p., 30 min before pilocarpine) on pilocarpine-induced seizures. Latency to generalized tonic-clonic seizure (A); and number of seizure episodes (B); and total time spent seizing (C) and Meurs scale (D). Data are presented as median and interquartile range for $n = 6$ –8 in each group.

kg, i.p.) to prevent the peripheral cholinergic effects of pilocarpine and, 15 min thereafter, they were injected with α -MSH (1.66 μ g/3 μ L) or vehicle (3 μ L of PBS, pH 7.4). Pilocarpine (370 mg/kg, i.p.) was administered 30 min after α -MSH. PTZ-injected animals were killed by decapitation 20 min after PTZ injection, and the hippocampi were dissected and homogenized in appropriated buffer (PBS containing 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and bovine serum albumin (BSA) 0.5%, pH 7.4). Samples were centrifuged at 25,000 g for 10 min and the supernatant was used to measure IL-1 β levels, which were corrected for total protein content. Protein content was measured by the bicinchoninic acid (BCA) method (Pierce, Rockford, IL).

Seizure evaluation

After the injection of PTZ or pilocarpine, the animals were videomonitoring for 20 or 40 min, respectively, for the appearance of seizures and the following parameters were recorded: latency to myoclonic jerks (only for PTZ-injected animals), latency to generalized tonic-clonic seizures, number of seizure episodes and total time spent seizing, according to Ferraro et al. (1999). The severity of PTZ-induced seizures was scored by the modified Racine scale (Luttjohann et al., 2009), as follows: (1), sudden behavioral arrest and/or motionless staring; (2), facial jerking with muzzle or muzzle and eye; (3), neck jerks; (4), clonic seizure in a sitting position; (5), convulsion including clonic and/or tonic-clonic seizure while lying on the belly and/or pure tonic seizure; and (6), convulsion including clonic and/or tonic-clonic seizure while lying on the side and/or wild

jumping. The severity of pilocarpine-induced seizures was evaluated by the Meurs scale (Meurs et al., 2008), as follows: (0) normal, non-epileptic activity; (1) mouth and facial movements, hyperactivity, grooming, sniffing, scratching, wet dog shakes; (2) head nodding, staring, tremor; (3) forelimb clonus, forelimb extension; (4) rearing, salivating, tonic-clonic activity; and (5) falling, status epilepticus. Mice were sacrificed 20 or 40 min after PTZ or pilocarpine injection, respectively.

Statistical analysis

Latency to myoclonic jerks and to generalized tonic-clonic seizures, number and total time spent seizing were analyzed by Kruskal–Wallis test followed by nonparametric Dunn's multiple comparison test because these variables did not meet ANOVA assumptions (normal distribution and homoscedasticity). These data are presented as median and interquartile range. IL1 β levels were analyzed by a factorial 2 (saline or α -MSH) \times 3 (saline, PTZ or pilocarpine) ANOVA, and are presented as mean and S.E.M. A probability of $p < 0.05$ was considered significant.

Results

Experiment 1

Figs. 1, 2 and 3 show that α -MSH (0.1, 0.3 or 1 mg/kg, i.p.) injected 15, 30 or 60 min before PTZ, respectively, did not alter the latency to PTZ-induced myoclonic jerks (A), tonic-clonic seizures (B), number of seizure episodes (C), total time spent seizing (D) and Racine scale (E).

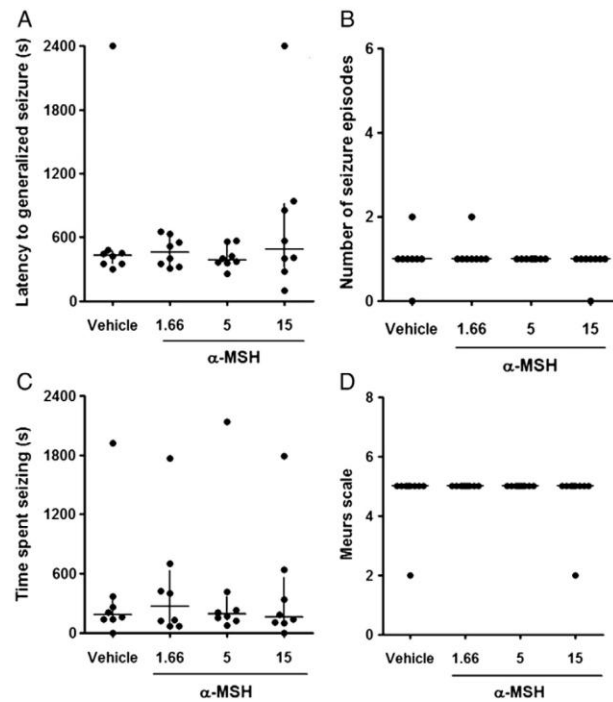


Fig. 6. Lack of effect of α -MSH (1.66, 5 or 15 $\mu\text{g}/3 \mu\text{L}$, i.c.v., 30 min before pilocarpine) on pilocarpine-induced seizures. Latency to generalized tonic-clonic seizure (A); number of seizure episodes (B); total time spent seizing (C) and Meurs scale (D). Data are presented as median and interquartile range for $n = 8$ in each group.

α -MSH also did not alter seizure severity, as assessed by the modified Racine score.

Experiment 2

Fig. 4 shows that α -MSH (1.66, 5 or 15 $\mu\text{g}/3 \mu\text{L}$, i.c.v.), injected 15 min before PTZ, did not alter the latency to PTZ-induced myoclonic jerks (A), tonic-clonic seizures (B), number of seizure episodes (C), total time spent seizing (D) and seizure severity, as assessed by the modified Racine scale (E).

Experiment 3

Fig. 5 shows that α -MSH (0.1, 0.3 or 1 mg/kg, i.p.), injected 30 min before pilocarpine, did not alter the latency to pilocarpine-induced tonic-clonic seizures (A), number of seizure episodes (B), total time spent seizing (C) and Meurs scale (D). α -MSH also did not alter seizure severity, as assessed by the modified Meurs score.

Experiment 4

Fig. 6 shows that α -MSH (1.66, 5 or 15 $\mu\text{g}/3 \mu\text{L}$, i.c.v.), injected 30 min before pilocarpine (370 mg/kg, i.p.), did not alter the latency to pilocarpine-induced tonic-clonic seizures (A), the number of seizure episodes (B), total time spent seizing (C) and Meurs score (D).

Experiment 5

Fig. 7 shows that α -MSH (15 $\mu\text{g}/3 \mu\text{L}$, i.c.v.), injected 5 min before pilocarpine (370 mg/kg, i.p.), did not alter the latency to pilocarpine-induced tonic-clonic seizures (A), the number of seizure episodes (B), total time spent seizing (C) and Meurs score (D).

Experiment 6

Fig. 8 shows that IL-1 β levels in the hippocampi were not altered by α -MSH (1.66 $\mu\text{g}/3 \mu\text{L}$, i.c.v.), PTZ (60 mg/kg, i.p.) or pilocarpine (370 mg/kg, i.p.). Notwithstanding, a naïve group (control data, not included in the factorial ANOVA) presented hippocampal IL-1 β levels approximately 45% lower than injected animals, indicating that the surgical procedure and cannula implantation, per se, increased the hippocampal IL-1 β content. Whole data analysis (including the naïve group) by a single factor analysis revealed a significant effect $F(6,22) = 3.71$; $p = 0.011$. Accordingly, post hoc analysis (Student–Newman–Keuls multiple comparisons test) revealed that the mean of the naïve group differed from all other groups.

Discussion

The current study showed that neither systemic nor intracerebroventricular administration of α -MSH attenuated seizures, regardless of α -MSH dose, time between peptide and convulsant injection, or convulsant agent used.

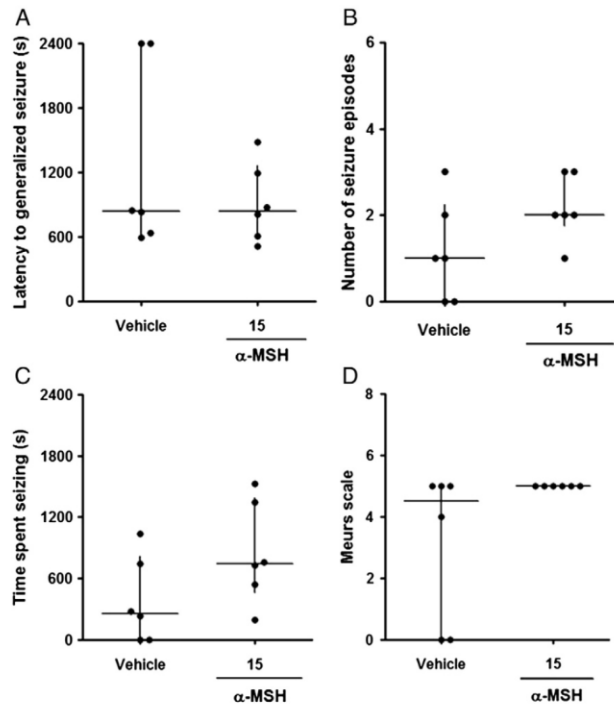


Fig. 7. Lack of effect of α -MSH (15 μ g/3 μ L, i.c.v., 5 min before pilocarpine) on pilocarpine-induced seizures. Latency to generalized tonic-clonic seizure (A); number of seizure episodes (B); total time spent seizing (C) and Meurs scale (D). Data are presented as median and interquartile range for $n = 6$ in each group.

Only a few studies have investigated the effect of α -MSH or its fragments on seizures. The i.c.v. administration of the peptide ORG-2766, a 4–9 fragment of adrenocorticotropic hormone (ACTH) and desacetyl α -MSH sequences, decreases seizures in electrically kindled mice (Goldman and Berman, 1984). Notwithstanding, ORG-2766 does not displace labeled α -MSH in cell preparations, even at concentrations within the millimolar range (Schioth et al., 1995), suggesting that it does not interact with α -MSH binding sites. Therefore, it seems unlikely that α -MSH receptors are involved in the anticonvulsant effect of ORG-2766 in mice, as initially thought. Moreover, ORG-2766 did not significantly alter seizure frequency of four children with intractable seizures (Pentella et al., 1982). Willig and Lagenstein (1980) studied the effect of the 4–10 ACTH fragment (which corresponds to the desacetyl 4–10 α -MSH fragment) on seizure frequency of seven epileptic children and, similar to Pentella et al. (1982), did not find any improvement in seizure frequency or in the EEG pattern of the studied patients. On the other hand, Croiset and De Wied (1992), have found that whereas ACTH(1–39), ACTH(1–24), ACTH(1–18), ACTH(1–16) and ACTH(18–39) were not active, subcutaneous pretreatment with smaller ACTH-like fragments, such as ACTH(4–9), ACTH(4–10), ACTH(4–10)(7D-Phe), ACTH(7–16), and ORG-2766, reduced the severity of pilocarpine (2.4 mg/2 μ L, i.c.v.)-induced seizures. The authors have argued that anti-epileptic activity appeared to reside in the sequence 1–16 and, more specifically, in the sequences 4–7 and 7–16, of the ACTH molecule.

Plotnikoff and Kastin (1976), have suggested that α -MSH (0.01–1 mg/kg, i.p.) by itself decreases the percentage of mice that present

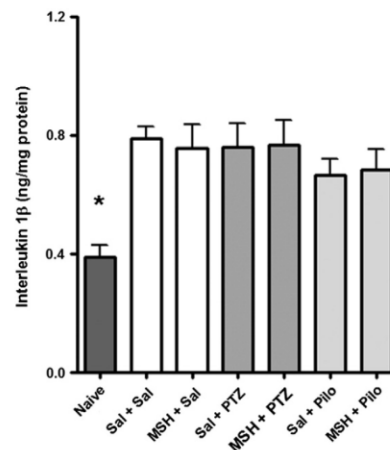


Fig. 8. Lack of effect of α -MSH (1.66 μ g/3 μ L, i.c.v.), PTZ (60 mg/kg, i.p.) or pilocarpine (370 mg/kg, i.p.) on IL-1 β levels in the hippocampus. All groups differ from naive (SNK test) for a $p < 0.05$.

audiogenic-evoked seizures. Notwithstanding, the differences between groups reported in that study were not statistically significant. On the other hand, Izumi et al. (1973) have shown that α -MSH (10 μ g, i.c.v.) decreases the latency to ouabain-elicited seizures in rats, suggesting that this peptide may facilitate seizures. However, the large injected volume (50 μ l) into the left lateral ventricle may have added a confounding factor (increased cranial pressure and expanded extracellular volume, for instance), and contributed for the observed effects (Routtenberg, 1972).

Our first set of experiments demonstrated that systemically-administered α -MSH does not alter PTZ-induced seizures. Regarding this point, it is worth mentioning that, until the present moment, neither active nor facilitated transport has been reported for any α -MSH fragment or analog in the blood-brain barrier (BBB). Current evidence suggests that diffusion of the peptide across the BBB is poor in mice, similar to other water-soluble macromolecules, such as inulin (Wilson, 1988). Notwithstanding, systemic α -MSH suppresses fever induced LPS (25 μ g/kg, i.p.) via central melanocortin receptors regardless of suppression of corticosterone and IL-6 release (Huang et al., 1998), suggesting that despite its low BBB permeability, low systemic doses of α -MSH alter central functions.

The limited penetration of the peptide into the CNS (Rapoport et al., 1980; Wilson, 1988) in mice motivated the experiment that investigated whether i.c.v. injected α -MSH decreased PTZ-induced seizures. However, α -MSH (1.66, 5 or 15 μ g/3 μ l, i.c.v.), did not prevent or attenuate PTZ-induced seizures measured as latency to myoclonic jerks and tonic-clonic seizures, and number of seizure episodes (Fig. 4A–C).

Although PTZ-induced seizures have been associated with variable degree of BBB disruption (Lorenzo et al., 1975), and inhibited by selected anti-inflammatory agents (Oliveira et al., 2008), pilocarpine-induced status epilepticus have been reported to highly depend on increased BBB permeability (Marchi et al., 2007) and on early peripheral (Marchi et al., 2009) and central inflammation (Fabene et al., 2010). Therefore, considering that an anti-inflammatory role for α -MSH has been demonstrated in both periphery (Hiltz and Lipton, 1989) and central nervous system (Lasaga et al., 2008; Muceniece and Dambrova, 2010), we hypothesized that α -MSH would probably be more effective in an experimental model of status epilepticus that depends on peripheral and central inflammation, the pilocarpine model. However, the systemic administration of α -MSH, at doses recognized to decrease peripheral and central inflammatory markers (Ichiyama et al., 1999; Rajora et al., 1997), did not attenuate pilocarpine-induced seizures, further suggesting a lack of anticonvulsant effect of α -MSH. In this respect, it is interesting that a single large dose of systemic α -MSH inhibits fever, but not other aspects of the LPS-induced acute phase response (Martin and Lipton, 1990). Therefore, based on these findings, one might also propose that the inhibitory effect of α -MSH on the inflammatory response may not quantitative or qualitatively comprehend those involved in the development of pilocarpine-induced seizures. Regarding this point it is particularly interesting that operated mice presented high levels of IL-1 β compared with the naïve group, regardless of the pharmacological treatment (Fig. 8). Therefore, it is possible that α -MSH is not able to modify an already established inflammatory response, though α -MSH (i.c.v.) has been reported to decrease IL1 β -induced activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis (Cragolini et al., 2004).

All mice injected i.c.v. with 1.66, 5 or 15 μ g of α -MSH exhibited unusual behaviors, such as hindlimb and forelimb stretchings and yawning (supplementary content), whereas those mice injected with α -MSH by the i.p. route did not. Such a behavioral repertoire has been previously shown in animals subjected to intracerebral injection of α -MSH, but not after intravenous injections of the peptide (Bertolini et al., 1988; Ferrari et al., 1963). The observation that the i.c.v. injection of the peptide induces a known typical behavioral repertoire indicates that animals received biologically active doses of the peptide, and rule out the possibility that insufficient amounts of α -MSH or other factor

other than the lack of anticonvulsant action of the neuropeptide underlie the currently reported lack of effect of α -MSH. At last, it is worth mentioning that control unpublished results show that both PTZ- and pilocarpine-induced seizures are attenuated by phenobarbital (20 mg/kg, per oral route (p.o.)), confirming the vast literature showing that PTZ- and pilocarpine-induced seizures are sensitive to known anticonvulsants, and the suitability of these animal models for investigating drugs with anticonvulsant activity (Moshé et al., 2006). Notwithstanding, we do not rule out an anticonvulsant effect of α -MSH in other models.

In summary, our data support that either systemic or intracerebroventricularly-administered α -MSH does not alter PTZ- or pilocarpine induced seizures.

Conclusion

The current results do not imply a protective role for α -MSH against PTZ- and pilocarpine-induced seizures.

Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Dr. Juliano Ferreira for kindly donating the IL-1 β kit and the financial support from CAP/Fapes (029/10), CAPES/PRODOC, CNPq, PIBIC/CNPq and DOCHF/Fapergs and PROBIC/Fapergs. FRT, QFL and ACS are recipients of CAPES fellowships. CFM is the recipient of a productivity fellowship of CNPq (304029/2010-6).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2013.09.006>.

References

- Ahmed TJ, Montero-Melendez T, Perretti M, Pitzalis C. Curbing inflammation through endogenous pathways: focus on melanocortin peptides. *Int J Inflamm* 2013;2013: 985815.
- Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol* 2005;5:629–40.
- Bertolini A, Poggioli R, Vergoni AV. Cross-species comparison of the ACTH-induced behavioral syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 1988;525:114–29.
- Bhardwaj RS, Schwarz A, Becher E, Mahnke K, Aragane Y, Schwarz T, et al. Pro-opiomelanocortin-derived peptides induce IL-10 production in human monocytes. *J Immunol* 1996;156:2517–21.
- Brzoska T, Luger TA, Maaser C, Böhm M. Alpha-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, anti-inflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. *Endocr Rev* 2008;29:581–602.
- Butler AA. The melanocortin system and energy balance. *Peptides* 2006;27:281–90.
- Caruso C, Mohn C, Karara AL, Rettori V, Watanabe H, Schiöth HB, et al. Alpha-melanocyte-stimulating hormone through melanocortin-4 receptor inhibits nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression in the hypothalamus of male rats. *Neuroendocrinology* 2004;79:278–86.
- Catania A. Neuroprotective actions of melanocortins: a therapeutic opportunity. *Trends Neurosci* 2008;31:353–60.
- Catania A, Cutuli M, Garofalo L, Carlin A, Airaghi L, Barcellini W, et al. The neuropeptide α -MSH in host defense. *Ann N Y Acad Sci* 2000;917:227–31.
- Catania A, Gatti S, Colombo G, Lipton JM. Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol Rev* 2004;56:1–29.
- Catania A, Lonati C, Sordi A, Carlin A, Leonardi P, Gatti S. The melanocortin system in control of inflammation. *Scientific World Journal* 2010;10:1840–53.
- Costa JP, Ferreira PB, De Sousa DP, Jordan J, Freitas RM. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. *Neurosci Lett* 2012;523:115–8.
- Cragolini AB, Perello M, Schiöth HB, Scimonelli TN. Alpha-MSH and gamma-MSH inhibit IL-1 β induced activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis through central melanocortin receptors. *Regul Pept* 2004;122:185–90.
- Cremer CM, Palomero-Gallagher N, Bidmon HJ, Schleicher A, Speckmann EJ, Zilles K. Pentylentetrazole-induced seizures affect binding site densities for GABA, glutamate and adenosine receptors in the rat brain. *Neuroscience* 2009;163:490–9.

- Croiset G, De Wied D. ACTH: a structure–activity study on pilocarpine-induced epilepsy. *Eur J Pharmacol* 1992;229:211–6.
- Dedeurwaerdere S, Friedman A, Fabene PF, Mazarati A, Murashima YL, Vezzani A, et al. Finding a better drug for epilepsy: antiinflammatory targets. *Epilepsia* 2012;53:1113–8.
- Dunne A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci STKE* 2003;2003:re3.
- Fabene PF, Bramanti P, Constantin G. The emerging role for chemokines in epilepsy. *J Neuroimmunol* 2010;224:22–7.
- Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J Neurochem* 2007;101:577–99.
- Ferrari W, Gessa GL, Vargiu L. Behavioral effects induced by intracranially injected ACTH and MSH. *Ann N Y Acad Sci* 1963;104:330–45.
- Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, St Jean P, Schork NJ, Mulholland N, et al. Mapping loci for pentylenetetrazol-induced seizure susceptibility in mice. *J Neurosci* 1999;19:6733–9.
- Funck VR, de Oliveira CV, Pereira LM, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, et al. Differential effects of atorvastatin treatment and withdrawal on pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsia* 2011;52:2094–104.
- Galic MA, Razi K, Pittman QJ. Cytokines and brain excitability. *Front Neuroendocrinol* 2012;33:116–25.
- Gantz I, Fong TM. The melanocortin system. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003;284:E468–74.
- Goldman H, Berman RF. Reduction of amygdaloid kindled seizures by an analog of ACTH/MSH. *Peptides* 1984;5:1061–5.
- Hiltz ME, Lipton JM. Antiinflammatory activity of a COOH-terminal fragment of the neuropeptide alpha-MSH. *FASEB J* 1989;3:2282–4.
- Hiscott J, Marois J, Garoufalos J, D'Addario M, Roulston A, Kwan I, et al. Characterization of a functional NF-kappa B site in the human interleukin 1 beta promoter: evidence for a positive autoregulatory loop. *Mol Cell Biol* 1993;13:6231–40.
- Huang QH, Hruby VJ, Tatro JB. Systemic alpha-MSH suppresses LPS fever via central melanocortin receptors independently of its suppression of corticosterone and IL-6 release. *Am J Physiol* 1998;275:R524–30.
- Ichiyama T, Campbell IL, Furukawa S, Catania A, Lipton JM. Autocrine alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits NF-kappaB activation in human glioma. *J Neurosci Res* 1999;58:684–9.
- Izumi K, Donaldson J, Minnich J, Barbeau A. Ouabain-induced seizures in rats: modification by melatonin and melanocyte-stimulating hormone. *Can J Physiol Pharmacol* 1973;51:572–8.
- Lasaga M, Debeljuk L, Durand D, Scimonelli TN, Caruso C. Role of alpha-melanocyte stimulating hormone and melanocortin 4 receptor in brain inflammation. *Peptides* 2008;29:1825–35.
- Li G, Bauer S, Nowak M, Norwood B, Tackenberg B, Rosenow F, et al. Cytokines and epilepsy. *Seizure* 2011;20:249–56.
- Lorenzo AV, Hedley-Whyte ET, Eisenberg HM, Hsu DW. Increased penetration of horseradish peroxidase across the blood–brain barrier induced by Metrazol seizures. *Brain Res* 1975;88:136–40.
- Luttjohann A, Fabene PF, van Luijckelaar G. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol Behav* 2009;98:579–86.
- Maaser C, Kannengiesser K, Specht C, Luger A, Brzoska T, Luger TA, et al. Crucial role of the melanocortin receptor MC1R in experimental colitis. *Gut* 2006;55:1415–22.
- Marchi N, Oby E, Batra A, Uva L, De Curtis M, Hernandez N, et al. In vivo and in vitro effects of pilocarpine: relevance to ictogenesis. *Epilepsia* 2007;48:1934–46.
- Marchi N, Fan Q, Ghosh C, Fazio V, Bertolini F, Betto G, et al. Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus. *Neurobiol Dis* 2009;33:171–81.
- Maroso M, Balosso S, Ravizza T, Liu J, Aronica E, Iyer AM, 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* 2010;16:413–9.
- Martin LW, Lipton JM. Acute phase response to endotoxin: rise in plasma alpha-MSH and effects of alpha-MSH injection. *Am J Physiol* 1990;259:R768–72.
- Matsuo M, Sasaki K, Ichimaru T, Nakazato S, Hamasaki Y. Increased IL-1beta production from dsRNA-stimulated leukocytes in febrile seizures. *Pediatr Neurol* 2006;35:102–6.
- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007;449:819–26.
- Meurs A, Clinkers R, Ebinger G, Michotte Y, Smolders I. Seizure activity and changes in hippocampal extracellular glutamate, GABA, dopamine and serotonin. *Epilepsy Res* 2008;78:50–9.
- Moshé SL, Pitkänen A, Schwartzkroin PA. Models of seizure and epilepsy. 1st ed. Elsevier Academic Press; 2006.
- Mountjoy KG, Robbins LS, Mortrud MT, Cone RD. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. *Science* 1992;257:1248–51.
- Mountjoy KG, Jenny Wu CS, Dumont LM, Wild JM. Melanocortin-4 receptor messenger ribonucleic acid expression in rat cardiorespiratory, musculoskeletal, and integumentary systems. *Endocrinology* 2003;144:5488–96.
- Muceniece R, Dambrova M. Melanocortins in brain inflammation: the role of melanocortin receptor subtypes. *Adv Exp Med Biol* 2010;681:61–70.
- Muller CJ, Bankstahl M, Groticke I, Loscher W. Pilocarpine vs. lithium-pilocarpine for induction of status epilepticus in mice: development of spontaneous seizures, behavioral alterations and neuronal damage. *Eur J Pharmacol* 2009;619:15–24.
- Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, et al. Modulation of pentylenetetrazol-induced seizures by prostaglandin E2 receptors. *Neuroscience* 2008;152:1110–8.
- Paxinos G, Franklin KBJ. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 3rd ed. London: Elsevier; 2008.
- Penttilä K, Bachman DS, Sandman CA. Trial of an ACTH4–9 analog (ORG 2766) in children with intractable seizures. *Neuropediatrics* 1982;13:59–62.
- Perucca E, French J, Bialer M. Development of new antiepileptic drugs: challenges, incentives, and recent advances. *Lancet Neurol* 2007;6:793–804.
- Plotnikoff NP, Kastin AJ. Neuropharmacological tests with alpha-melanocyte stimulating hormone. *Life Sci* 1976;18:1217–22.
- Rajora N, Boccoli G, Burns D, Sharma S, Catania AP, Lipton JM. Alpha-MSH modulates local and circulating tumor necrosis factor-alpha in experimental brain inflammation. *J Neurosci* 1997;17:2181–6.
- Rambo LM, Ribeiro LR, Oliveira MS, Furian AF, Lima FD, Souza MA, et al. Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylenetetrazol-induced seizures. *Neurochem Int* 2009;55:333–40.
- Rapoport SI, Klee WA, Pettigrew KD, Ohno K. Entry of opioid peptides into the central nervous system. *Science* 1980;207:84–6.
- Redondo P, García-Foncillas J, Okroujnov I, Bandres E. Alpha-MSH regulates interleukin-10 expression by human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1998;290:425–8.
- Rodgers KM, Hutchinson MR, Northcutt A, Maier SF, Watkins LR, Barth DS. The cortical innate immune response increases local neuronal excitability leading to seizures. *Brain* 2009;132:2478–86.
- Routtenberg A. Intracranial chemical injection and behavior: a critical review. *Behav Biol* 1972;7:601–41.
- Schioth HB, Muceniece R, Wikberg JE, Chhajlani V. Characterisation of melanocortin receptor subtypes by radioligand binding analysis. *Eur J Pharmacol* 1995;288:311–7.
- Vezzani A, Balosso S, Maroso M, Zardoni D, Nof F, Ravizza T. ICE/caspase 1 inhibitors and IL-1beta receptor antagonists as potential therapeutics in epilepsy. *Curr Opin Investig Drugs* 2010;11:43–50.
- Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol* 2011a;7:31–40.
- Vezzani A, Maroso M, Balosso S, Sanchez MA, Bartfai T. IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures. *Brain Behav Immun* 2011b;25:1281–9.
- Vezzani A, Balosso S, Ravizza T. Inflammation and epilepsy. *Handb Clin Neurol* 2012;107:163–75.
- Willig RP, Lagenstein I. Therapeutic trial with a fragment of ACTH (ACTH 4–10) in early childhood epilepsy (author's transl). *Monatsschr Kinderheilkd* 1980;128:100–3.
- Wilson JF. Low permeability of the blood–brain barrier to nanomolar concentrations of immunoreactive alpha-melanotropin. *Psychopharmacology (Berl)* 1988;96:262–6.
- Zhou L, Wang X, Wang YJ, Zhou Y, Hu S, Ye L, et al. Activation of toll-like receptor-3 induces interferon-lambda expression in human neuronal cells. *Neuroscience* 2009;159:629–37.
- Zurolo E, Iyer A, Maroso M, Carbonell C, Anik JJ, Ravizza T, et al. Activation of Toll-like receptor, RAGE and HMGB1 signalling in malformations of cortical development. *Brain* 2011;134:1015–32.

3.2 Dados adicionais

3.2.1 Materiais e Métodos

Camundongos machos adultos Swiss (28 ± 3 g), acondicionados dez por caixa, mantidos em ambiente sob luz controlada (12-h ciclo claro/escuro, 24 ± 1 °C, 55% umidade relativa) e livre acesso a água e comida (Guabi, Santa Maria, Brasil). Todos os animais foram provenientes do biotério da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

3.2.2 Resultados

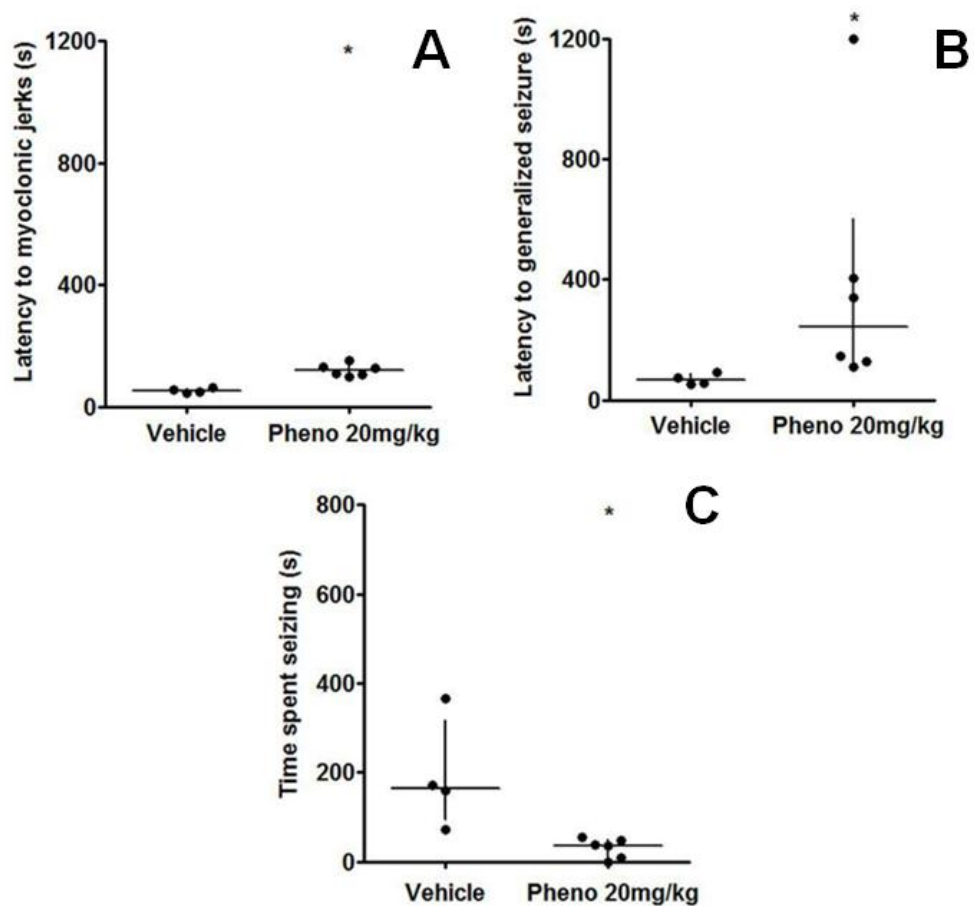


Figure 1: The effect of phenobarbital (Pheno, 20 mg/kg, p.o.) on pentylenetetrazol-induced seizure in mice. Pheno (20 mg/kg, p.o.) was administered 30 minutes prior to PTZ injection (60 mg/kg, i.p.). (A) Latency to myoclonic jerks; (B) latency to generalized tonic-clonic seizures and (C) total time spent seizing (C). Data were

analyzed by non parametric Mann Whitney test, and the results are presented as median and interquartile range for n=4-6 in each group.

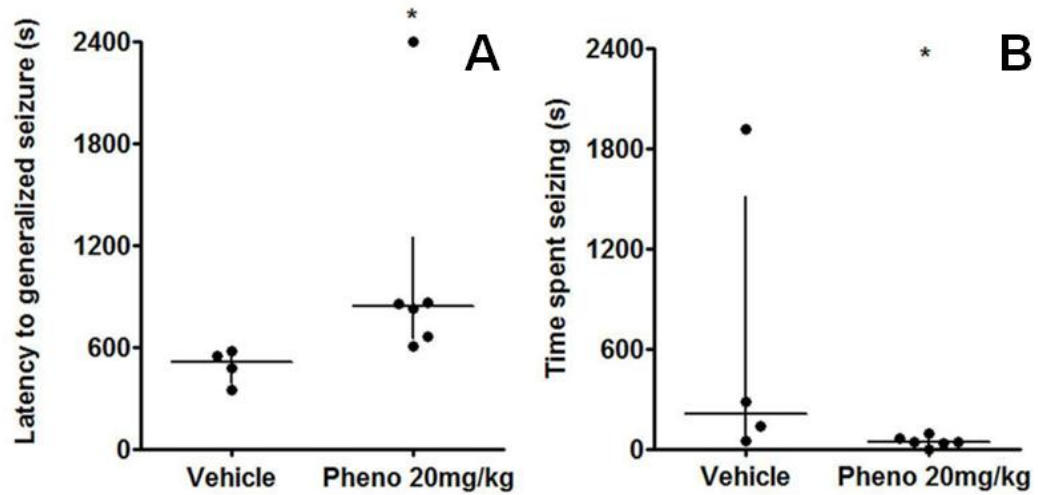


Figure 2: The effect of phenobarbital (Pheno, 20 mg/kg, p.o.) on pilocarpine-induced seizure in mice. Pheno (20 mg/kg, p.o.) was administered thirty minutes prior to the injection of pilocarpine (370 mg/kg, i.p.). (A) Latency to generalized tonic-clonic seizures and (B) total time spent seizing. Data were analyzed by non parametric Mann Whitney test, and the results are presented as median and interquartile range for n=4-6 in each group.

4 DISCUSSÃO

O α -MSH parece apresentar efeito satisfatório no controle da inflamação tanto no sistema nervoso central quanto periférico. Atualmente, uma das estratégias terapêuticas alternativas propostas para o tratamento da epilepsia tem sido a utilização de fármacos anti-inflamatórios, devido ao número crescente de evidências clínicas e experimentais que demonstram uma estreita relação entre a presença de inflamação central e periférica e o desenvolvimento da epilepsia (CREMER et al., 2009; DEDEURWAERDERE et al., 2012; FABENE et al., 2010; PERUCCA et al., 2007; VEZZANI et al., 2011; VEZZANI; FRIEDMAN, 2011). Em virtude disso, a hipótese do presente trabalho foi que o tratamento com α -MSH pode atenuar e/ou inibir os episódios convulsivos induzidos por PTZ e por pilocarpina. Nesse estudo, foi demonstrado que α -MSH não modifica as convulsões induzidas por esses agentes convulsivantes. Os dados obtidos nesta pesquisa apresentam abordagem metodológica cuidadosa, com curva de dose-efeito para cada via testada (i.c.v. ou sistêmico). Assim, os resultados negativos não podem ser atribuídos ao uso de doses ineficazes ou a uma possível incapacidade do α -MSH de atravessar a BHE (que é superada pela injeção i.c.v.). Também foram testados diferentes tempos entre a administração de α -MSH e dos agentes convulsivantes, uma vez que a ausência de efeito do α -MSH poderia ser devido à sua degradação durante este período. Também foi mostrado que animais injetados com α -MSH apresentam uma síndrome caracterizada por bocejos e contorções abdominais, indicando a presença do α -MSH em concentrações biologicamente ativas, no encéfalo, em todos os experimentos realizados pela via i.c.v.

Também foram realizados experimentos para verificar o efeito de uma droga anticonvulsivante clássica, o fenobarbital, nos mesmos modelos experimentais, com os mesmos protocolos, a fim de demonstrar a eficácia dos modelos utilizados para identificar drogas com comprovada atividade anticonvulsivante. A análise dos resultados mostrou que o fenobarbital aumenta a latência para mioclonia, e para as crises generalizadas tônico-clônicas, bem como diminui a duração das crises, como bem estabelecido na literatura (TURSKI et al., 1987; MANDHANE et al., 2007).

Além disso, foi avaliado o efeito do α -MSH sobre o conteúdo hipocampal de IL-1 β . A partir da análise dos dados obtidos observou-se que α -MSH não altera os níveis dessa citocina

no hipocampo sugerindo, assim, que nos modelos testados de indução de crises o α -MSH não é capaz de modificar a resposta inflamatória.

Por fim, e de se ressaltar que a ausência do efeito anticonvulsivante desse peptídeo nos modelos experimentais do PTZ e pilocarpina não exclui a possibilidade de que tal efeito possa ser vislumbrado em outros modelos de indução de crises. Dessa forma, nossos resultados são contundentes no sentido que, pelo menos nos modelos aqui avaliados, o α -MSH claramente não apresenta atividade anticonvulsivante.

5 CONCLUSÕES

1. A administração intraperitoneal ou intracerebroventricular de α -MSH não alterou a latência para primeira mioclonia; latência para a crise generalizada (tônico-clônica); número de crises, duração ou gravidade das crises induzidas por PTZ em camundongos;

2. A administração intraperitoneal ou intracerebroventricular de α -MSH não alterou a latência para a crise generalizada (tônico-clônica); número de crises, duração ou gravidade das crises induzidas por pilocarpina em camundongos;

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASSOGLU, K. et al. Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. **J Immunol**, v. 158, n. 1, p. 438-445, 1997.

AKIBA, S.; SATO, T. Cellular function of calcium-independent phospholipase A2. **Biol Pharm Bull**, v. 27, n. 8, p. 1174-1178, 2004.

ANDERSEN, G. N. et al. Quantitative measurement of the levels of melanocortin receptor subtype 1, 2, 3 and 5 and pro-opio-melanocortin peptide gene expression in subsets of human peripheral blood leucocytes. **Scand J Immunol**, v. 61, n. 3, p. 279-284, 2005.

ARONSSON, A. F. et al. alpha-melanocyte-stimulating hormone is neuroprotective in rat global cerebral ischemia. **Neuropeptides**, v. 40, n. 1, p. 65-75, 2006.

ASHTON, H. et al. Psychopharmacological and endocrinological effects of melanocyte stimulating hormones in normal man. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 55, n. 2, p. 165-172, 1977.

AURIEMMA, M. et al. alpha-MSH-stimulated tolerogenic dendritic cells induce functional regulatory T cells and ameliorate ongoing skin inflammation. **J Invest Dermatol**, v. 132, n. 7, p. 1814-1824, 2012.

BALOSSO, S. et al. A novel non-transcriptional pathway mediates the proconvulsive effects of interleukin-1beta. **Brain**, v. 131, n. Pt 12, p. 3256-3265, 2008.

BECKWITH, B. E. et al. Influence of neonatal injections of alpha-MSH on learning, memory and attention in rats. **Physiol Behav**, v. 18, n. 1, p. 63-71, 1977.

BEN-ARI, Y. et al. Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. **Neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 515-528, 1980.

BENARROCH, E. E. HCN channels: function and clinical implications. **Neurology**, v. 80, n. 3, p. 304-310, 2013.

- BERTOLINI, A. et al. Brain effects of melanocortins. **Pharmacol Res**, v. 59, n. 1, p. 13-47, 2009.
- BHARDWAJ, R. S. et al. Pro-opiomelanocortin-derived peptides induce IL-10 production in human monocytes. **J Immunol**, v. 156, n. 7, p. 2517-2521, 1996.
- BIDMON, H. J. et al. Glutamine synthetase becomes nitrated and its activity is reduced during repetitive seizure activity in the pentylenetetrazole model of epilepsy. **Epilepsia**, v. 49, n. 10, p. 1733-1748, 2008.
- BIEL, M. et al. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. **Physiol Rev**, v. 89, n. 3, p. 847-885, 2009.
- BIEN, C. G.; SCHEFFER, I. E. Autoantibodies and epilepsy. **Epilepsia**, v. 52 Suppl 3, p. 18-22, 2011.
- BITTO, A. et al. Melanocortins protect against multiple organ dysfunction syndrome in mice. **Br J Pharmacol**, v. 162, n. 4, p. 917-928, 2011.
- BLALOCK, J. E. Proopiomelanocortin-derived peptides in the immune system. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 22, n. 6, p. 823-827, 1985.
- BRZOSKA, T. et al. Alpha-melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, antiinflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. **Endocr Rev**, v. 29, n. 5, p. 581-602, 2008.
- BUGGY, J. J. Binding of alpha-melanocyte-stimulating hormone to its G-protein-coupled receptor on B-lymphocytes activates the Jak/STAT pathway. **Biochem J**, v. 331 (Pt 1), p. 211-216, 1998.
- BUTLER, A. A. The melanocortin system and energy balance. **Peptides**, v. 27, n. 2, p. 281-290, 2006.

BYMASTER, F. P. et al. Role of specific muscarinic receptor subtypes in cholinergic parasympathomimetic responses, in vivo phosphoinositide hydrolysis, and pilocarpine-induced seizure activity. **Eur J Neurosci**, v. 17, n. 7, p. 1403-1410, 2003.

CAMPBELL, I. L. et al. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 21, p. 10061-10065, 1993.

CAPRA, V. et al. Eicosanoids and their drugs in cardiovascular diseases: focus on atherosclerosis and stroke. **Med Res Rev**, v. 33, n. 2, p. 364-438, 2013.

CARUSO, C. et al. Melanocortin 4 receptor activation induces brain-derived neurotrophic factor expression in rat astrocytes through cyclic AMP-protein kinase A pathway. **Mol Cell Endocrinol**, v. 348, n. 1, p. 47-54, 2012.

CARUSO, C. et al. Activation of melanocortin 4 receptors reduces the inflammatory response and prevents apoptosis induced by lipopolysaccharide and interferon-gamma in astrocytes. **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 4918-4926, 2007.

CARUSO, C. et al. Alpha-melanocyte-stimulating hormone through melanocortin-4 receptor inhibits nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression in the hypothalamus of male rats. **Neuroendocrinology**, v. 79, n. 5, p. 278-286, 2004.

CARUSO, C. et al. alpha-melanocyte-stimulating hormone modulates lipopolysaccharide plus interferon-gamma-induced tumor necrosis factor-alpha expression but not tumor necrosis factor-alpha receptor expression in cultured hypothalamic neurons. **J Neuroimmunol**, v. 227, n. 1-2, p. 52-59, 2010.

CATANIA, A. Neuroprotective actions of melanocortins: a therapeutic opportunity. **Trends Neurosci**, v. 31, n. 7, p. 353-360, 2008.

CATANIA, A. et al. Alpha-melanocyte-stimulating hormone in normal human physiology and disease states. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11, n. 8, p. 304-308, 2000.

CATANIA, A. et al. Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. **Pharmacol Rev**, v. 56, n. 1, p. 1-29, 2004.

CATANIA, A. et al. The melanocortin system in control of inflammation. **ScientificWorldJournal**, v. 10, p. 1840-1853, 2010.

CAVALHEIRO, E. A. et al. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**, v. 32, n. 6, p. 778-782, 1991.

CHAI, B. et al. Melanocortin-4 receptor activation inhibits c-Jun N-terminal kinase activity and promotes insulin signaling. **Peptides**, v. 30, n. 6, p. 1098-1104, 2009.

CHEN, W. et al. Exocrine gland dysfunction in MC5-R-deficient mice: evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. **Cell**, v. 91, n. 6, p. 789-798, 1997.

CLARK, W. G. et al. Analysis of the antipyretic action of alpha-melanocyte-stimulating hormone in rabbits. **J Physiol**, v. 359, p. 459-465, 1985.

COLOMBO, G. et al. Anti-inflammatory effects of alpha-melanocyte-stimulating hormone in celiac intestinal mucosa. **Neuroimmunomodulation**, v. 10, n. 4, p. 208-216, 2002.

CRAGNOLINI, A. B. et al. Alpha-MSH and gamma-MSH modulate early release of hypothalamic PGE2 and NO induced by IL-1beta differently. **Neurosci Lett**, v. 409, n. 3, p. 168-172, 2006.

CRAGNOLINI, A. B. et al. alpha-MSH and gamma-MSH inhibit IL-1beta induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis through central melanocortin receptors. **Regul Pept**, v. 122, n. 3, p. 185-190, 2004.

CREMER, C. M. et al. Pentylentetrazole-induced seizures affect binding site densities for GABA, glutamate and adenosine receptors in the rat brain. **Neuroscience**, v. 163, n. 1, p. 490-499, 2009.

D'AGOSTINO, G.; DIANO, S. Alpha-melanocyte stimulating hormone: production and degradation. **J Mol Med (Berl)**, v. 88, n. 12, p. 1195-1201, 2010.

DAVIDSON, J. et al. Alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses fever and increases in plasma levels of prostaglandin E2 in the rabbit. **J Physiol**, v. 451, p. 491-502, 1992.

DAYNES, R. A. et al. Alpha-melanocyte-stimulating hormone exhibits target cell selectivity in its capacity to affect interleukin 1-inducible responses in vivo and in vitro. **J Immunol**, v. 139, n. 1, p. 103-109, 1987.

DEDEURWAERDERE, S. et al. Finding a better drug for epilepsy: antiinflammatory targets. **Epilepsia**, v. 53, n. 7, p. 1113-1118, 2012.

DIANO, S. New aspects of melanocortin signaling: a role for PRCP in alpha-MSH degradation. **Front Neuroendocrinol**, v. 32, n. 1, p. 70-83, 2011.

DOUGLASS, J. et al. Polyprotein gene expression: generation of diversity of neuroendocrine peptides. **Annu Rev Biochem**, v. 53, p. 665-715, 1984.

DROUIN, J. et al. Structure of the rat pro-opiomelanocortin (POMC) gene. **FEBS Lett**, v. 193, n. 1, p. 54-58, 1985.

EHRlich, S. et al. Promoter specific DNA methylation and gene expression of POMC in acutely underweight and recovered patients with anorexia nervosa. **J Psychiatr Res**, v. 44, n. 13, p. 827-833, 2010.

EIPPER, B. A.; MAINS, R. E. Phosphorylation of pro-adrenocorticotropin/endorphin-derived peptides. **J Biol Chem**, v. 257, n. 9, p. 4907-4915, 1982.

ELLIOTT, R. J. et al. alpha-Melanocyte-stimulating hormone, MSH 11-13 KPV and adrenocorticotropin hormone signalling in human keratinocyte cells. **J Invest Dermatol**, v. 122, n. 4, p. 1010-1019, 2004.

EMERY, E. C. et al. HCN2 ion channels: an emerging role as the pacemakers of pain. **Trends Pharmacol Sci**, v. 33, n. 8, p. 456-463, 2012.

ENGEL, J.; PEDLEY, T. A. **Epilepsy: A Comprehensive Textbook**. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

EVES, P. C.; HAYCOCK, J. W. Melanocortin signalling mechanisms. **Adv Exp Med Biol**, v. 681, p. 19-28, 2010.

FABENE, P. F. et al. The emerging role for chemokines in epilepsy. **J Neuroimmunol**, v. 224, n. 1-2, p. 22-27, 2010.

FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470-472, 2005.

FORSLIN ARONSSON, A. et al. Alpha-MSH rescues neurons from excitotoxic cell death. **J Mol Neurosci**, v. 33, n. 3, p. 239-251, 2007.

FUKATA, J. et al. Cytokines as mediators in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical function. **J Endocrinol Invest**, v. 17, n. 2, p. 141-155, 1994.

FUNG, S.; HRUBY, V. J. Design of cyclic and other templates for potent and selective peptide alpha-MSH analogues. **Curr Opin Chem Biol**, v. 9, n. 4, p. 352-358, 2005.

GANTZ, I.; FONG, T. M. The melanocortin system. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 284, n. 3, p. E468-474, 2003.

GERLO, S. et al. Cyclic AMP: a selective modulator of NF-kappaB action. **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 23, p. 3823-3841, 2011.

GETTING, S. J. Melanocortin peptides and their receptors: new targets for anti-inflammatory therapy. **Trends Pharmacol Sci**, v. 23, n. 10, p. 447-449, 2002.

GETTING, S. J. Targeting melanocortin receptors as potential novel therapeutics. **Pharmacol Ther**, v. 111, n. 1, p. 1-15, 2006.

GETTING, S. J. et al. Natural and synthetic agonists of the melanocortin receptor type 3 possess anti-inflammatory properties. **J Leukoc Biol**, v. 69, n. 1, p. 98-104, 2001.

GETTING, S. J. et al. Redundancy of a functional melanocortin 1 receptor in the anti-inflammatory actions of melanocortin peptides: studies in the recessive yellow (e/e) mouse suggest an important role for melanocortin 3 receptor. **J Immunol**, v. 170, n. 6, p. 3323-3330, 2003.

- GIULIANI, D. et al. Both early and delayed treatment with melanocortin 4 receptor-stimulating melanocortins produces neuroprotection in cerebral ischemia. **Endocrinology**, v. 147, n. 3, p. 1126-1135, 2006.
- GIULIANI, D. et al. Melanocortins and the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Adv Exp Med Biol**, v. 681, p. 71-87, 2010.
- GUARINI, S. et al. Adrenocorticotropin reverses hemorrhagic shock in anesthetized rats through the rapid activation of a vagal anti-inflammatory pathway. **Cardiovasc Res**, v. 63, n. 2, p. 357-365, 2004.
- HADLEY, M. E. Discovery that a melanocortin regulates sexual functions in male and female humans. **Peptides**, v. 26, n. 10, p. 1687-1689, 2005.
- HAMILTON, S. E. et al. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 24, p. 13311-13316, 1997.
- HILTZ, M. E. et al. Alpha-MSH peptides inhibit acute inflammation induced in mice by rIL-1 beta, rIL-6, rTNF-alpha and endogenous pyrogen but not that caused by LTB4, PAF and rIL-8. **Cytokine**, v. 4, n. 4, p. 320-328, 1992.
- HIRSCH, E. et al. Ontogenic study of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. **Brain Res**, v. 583, n. 1-2, p. 120-126, 1992.
- HOFMANN, F. et al. International Union of Pharmacology. LI. Nomenclature and structure-function relationships of cyclic nucleotide-regulated channels. **Pharmacol Rev**, v. 57, n. 4, p. 455-462, 2005.
- HOLDER, J. R.; HASKELL-LUEVANO, C. Melanocortin ligands: 30 years of structure-activity relationship (SAR) studies. **Med Res Rev**, v. 24, n. 3, p. 325-356, 2004.
- HRUBY, V. J. et al. Design of novel melanocortin receptor ligands: multiple receptors, complex pharmacology, the challenge. **Eur J Pharmacol**, v. 660, n. 1, p. 88-93, 2011.
- ICHIYAMA, T. et al. Autocrine alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits NF-kappaB activation in human glioma. **J Neurosci Res**, v. 58, n. 5, p. 684-689, 1999.

KLEEN, J. K.; HOLMES, G. L. Brain inflammation initiates seizures. **Nat Med**, v. 14, n. 12, p. 1309-1310, 2008.

KLINK, R.; ALONSO, A. Ionic mechanisms of muscarinic depolarization in entorhinal cortex layer II neurons. **J Neurophysiol**, v. 77, n. 4, p. 1829-1843, 1997.

KUMAR, V. et al. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

LAM, C. W.; GETTING, S. J. Melanocortin receptor type 3 as a potential target for anti-inflammatory therapy. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 3, n. 3, p. 311-315, 2004.

LASAGA, M. et al. Role of alpha-melanocyte stimulating hormone and melanocortin 4 receptor in brain inflammation. **Peptides**, v. 29, n. 10, p. 1825-1835, 2008.

LEONE, S. et al. Melanocortins as innovative drugs for ischemic diseases and neurodegenerative disorders: established data and perspectives. **Curr Med Chem**, v. 20, n. 6, p. 735-750, 2013.

LIBRIZZI, L. et al. Seizure-induced brain-borne inflammation sustains seizure recurrence and blood-brain barrier damage. **Ann Neurol**, v. 72, n. 1, p. 82-90, 2012.

LIPTON, J. M.; CATANIA, A. Anti-inflammatory actions of the neuroimmunomodulator alpha-MSH. **Immunol Today**, v. 18, n. 3, p. 140-145, 1997.

LIPTON, J. M. et al. Central administration of the peptide alpha-MSH inhibits inflammation in the skin. **Peptides**, v. 12, n. 4, p. 795-798, 1991.

LIPTON, J. M. et al. Mechanisms of antiinflammatory action of alpha-MSH peptides. In vivo and in vitro evidence. **Ann N Y Acad Sci**, v. 885, p. 173-182, 1999.

LORENZO, A. V. et al. Increased penetration of horseradish peroxidase across the blood-brain barrier induced by Metrazol seizures. **Brain Res**, v. 88, n. 1, p. 136-140, 1975.

LOSCHER, W. Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans. **Eur J Pharmacol**, v. 610, n. 1-3, p. 1-11, 2009.

LOSER, K. et al. The neuropeptide alpha-melanocyte-stimulating hormone is critically involved in the development of cytotoxic CD8⁺ T cells in mice and humans. **PLoS One**, v. 5, n. 2, p. e8958, 2010.

MAASER, C. et al. Role of the melanocortin system in inflammation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1072, p. 123-134, 2006.

MAASER, C. et al. Crucial role of the melanocortin receptor MC1R in experimental colitis. **Gut**, v. 55, n. 10, p. 1415-1422, 2006.

MAINS, R. E. et al. Common precursor to corticotropins and endorphins. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 7, p. 3014-3018, 1977.

MANDHANE, S. N. et al. Timed pentylenetetrazol infusion test: a comparative analysis with s.c.PTZ and MES models of anticonvulsant screening in mice. **Seizure**, v. 16, n. 7, p. 636-644, 2007.

MANNA, S. K.; AGGARWAL, B. B. Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits the nuclear transcription factor NF-kappa B activation induced by various inflammatory agents. **J Immunol**, v. 161, n. 6, p. 2873-2880, 1998.

MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 519-531, 2011.

MARCELIN, B. et al. h channel-dependent deficit of theta oscillation resonance and phase shift in temporal lobe epilepsy. **Neurobiol Dis**, v. 33, n. 3, p. 436-447, 2009.

MARCHI, N. et al. Antagonism of peripheral inflammation reduces the severity of status epilepticus. **Neurobiol Dis**, v. 33, n. 2, p. 171-181, 2009.

MARCHI, N. et al. In vivo and in vitro effects of pilocarpine: relevance to ictogenesis. **Epilepsia**, v. 48, n. 10, p. 1934-1946, 2007.

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.

MATSUO, M. et al. Increased IL-1beta production from dsRNA-stimulated leukocytes in febrile seizures. **Pediatr Neurol**, v. 35, n. 2, p. 102-106, 2006.

MAYOROV, A. V. et al. Cyclic lactam hybrid alpha-MSH/Agouti-related protein (AGRP) analogues with nanomolar range binding affinities at the human melanocortin receptors. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 21, n. 10, p. 3099-3102, 2011.

MCDANIEL, F. K. et al. Constitutive cholesterol-dependent endocytosis of melanocortin-4 receptor (MC4R) is essential to maintain receptor responsiveness to alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSH). **J Biol Chem**, v. 287, n. 26, p. 21873-21890, 2012.

MEIRER, K. et al. Inhibitors of the Arachidonic Acid Cascade: Interfering with Multiple Pathways. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 2013.

MOUNTJOY, K. G. The human melanocyte stimulating hormone receptor has evolved to become "super-sensitive" to melanocortin peptides. **Mol Cell Endocrinol**, v. 102, n. 1-2, p. R7-11, 1994.

MOUNTJOY, K. G. et al. Melanocortin-4 receptor messenger ribonucleic acid expression in rat cardiorespiratory, musculoskeletal, and integumentary systems. **Endocrinology**, v. 144, n. 12, p. 5488-5496, 2003.

MOUNTJOY, K. G. et al. Melanocortin receptor-mediated mobilization of intracellular free calcium in HEK293 cells. **Physiol Genomics**, v. 5, n. 1, p. 11-19, 2001.

MOUNTJOY, K. G. et al. The cloning of a family of genes that encode the melanocortin receptors. **Science**, v. 257, n. 5074, p. 1248-1251, 1992.

NAGAO, T. et al. Epileptiform activity induced by pilocarpine in the rat hippocampal-entorhinal slice preparation. **Neuroscience**, v. 72, n. 2, p. 399-408, 1996.

NI, X. P. et al. Central receptors mediating the cardiovascular actions of melanocyte stimulating hormones. **J Hypertens**, v. 24, n. 11, p. 2239-2246, 2006.

NICOLAS, C. S. et al. The role of JAK-STAT signaling within the CNS. **JAKSTAT**, v. 2, n. 1, p. e22925, 2013.

OLIVEIRA, M. S. et al. Modulation of pentylentetrazol-induced seizures by prostaglandin E2 receptors. **Neuroscience**, v. 152, n. 4, p. 1110-1118, 2008.

OLIVEIRA, M. S. et al. Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. **J Neurochem**, v. 109, n. 2, p. 416-426, 2009.

OLIVEIRA, M. S. et al. Epileptiform activity in the limbic system. **Front Biosci (Schol Ed)**, v. 3, p. 565-593, 2011.

OMS, O. M. D. S. Epilepsy: Fact sheet number 999. 2012. Disponível em: <
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html> >. Acesso em: 19/01/2013.

OTTANI, A. et al. Modulation of the JAK/ERK/STAT signaling in melanocortin-induced inhibition of local and systemic responses to myocardial ischemia/reperfusion. **Pharmacol Res**, v. 72, p. 1-8, 2013.

PECORI GIRALDI, F.; CAVAGNINI, F. Corticotropin-releasing hormone is produced by rat corticotropes and modulates ACTH secretion in a paracrine/autocrine fashion. **J Clin Invest**, v. 101, n. 11, p. 2478-2484, 1998.

PENTECCA, K. et al. Trial of an ACTH4-9 Analogue (ORG 2766) in children with intractable seizures. **Neuropediatrics**, v. 13, n. 2, p. 59-62, 1982.

PERUCCA, E. et al. Development of new antiepileptic drugs: challenges, incentives, and recent advances. **Lancet Neurol**, v. 6, n. 9, p. 793-804, 2007.

PITKÄNEN, A. et al. **Models of Seizure and Epilepsy**. USA: Elsevier, 2006.

PRITCHARD, L. E. et al. Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. **J Endocrinol**, v. 172, n. 3, p. 411-421, 2002.

RAAP, U. et al. Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits allergic airway inflammation. **J Immunol**, v. 171, n. 1, p. 353-359, 2003.

RAMACHANDRAPPA, S. et al. The melanocortin receptors and their accessory proteins. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 4, p. 9, 2013.

RAVIZZA, T. et al. Inflammation and prevention of epileptogenesis. **Neurosci Lett**, v. 497, n. 3, p. 223-230, 2011.

REDDING, T. W. et al. Disappearance and excretion of labeled alpha-MSH in man. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 9, n. 2, p. 207-212, 1978.

REDONDO, P. et al. Alpha-MSH regulates interleukin-10 expression by human keratinocytes. **Arch Dermatol Res**, v. 290, n. 8, p. 425-428, 1998.

RENQUIST, B. J. et al. Physiological roles of the melanocortin MC(3) receptor. **Eur J Pharmacol**, v. 660, n. 1, p. 13-20, 2011.

ROBBINS, L. S. et al. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. **Cell**, v. 72, n. 6, p. 827-834, 1993.

ROBERTS, J. L.; HERBERT, E. Characterization of a common precursor to corticotropin and beta-lipotropin: identification of beta-lipotropin peptides and their arrangement relative to corticotropin in the precursor synthesized in a cell-free system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5300-5304, 1977.

RODGERS, K. M. et al. The cortical innate immune response increases local neuronal excitability leading to seizures. **Brain**, v. 132, n. Pt 9, p. 2478-2486, 2009.

ROSELLI-REHFUSS, L. et al. Identification of a receptor for gamma melanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 19, p. 8856-8860, 1993.

RUDMAN, D. et al. Three types of alpha-melanocyte-stimulating hormone: bioactivities and half-lives. **Am J Physiol**, v. 245, n. 1, p. E47-54, 1983.

SALVADORI, M. G. et al. Prostaglandin E(2) potentiates methylmalonate-induced seizures. **Epilepsia**, v. 53, n. 1, p. 189-198, 2012.

SAMLAND, H. et al. Profound increase in sensitivity to glutamatergic- but not cholinergic agonist-induced seizures in transgenic mice with astrocyte production of IL-6. **J Neurosci Res**, v. 73, n. 2, p. 176-187, 2003.

SENANAYAKE, N.; ROMAN, G. C. Epidemiology of epilepsy in developing countries. **Bull World Health Organ**, v. 71, n. 2, p. 247-258, 1993.

SERHAN, C. N. et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **FASEB J**, v. 21, n. 2, p. 325-332, 2007.

SHORVON, S. The treatment of chronic epilepsy: a review of recent studies of clinical efficacy and side effects. **Curr Opin Neurol**, v. 20, n. 2, p. 159-163, 2007.

SLOMINSKI, A. et al. Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress. **Physiol Rev**, v. 80, n. 3, p. 979-1020, 2000.

SMOLDERS, I. et al. NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. **Br J Pharmacol**, v. 121, n. 6, p. 1171-1179, 1997.

STAROWICZ, K.; PRZEWLOCKA, B. The role of melanocortins and their receptors in inflammatory processes, nerve regeneration and nociception. **Life Sci**, v. 73, n. 7, p. 823-847, 2003.

SUNDSTROM, G. et al. Concomitant duplications of opioid peptide and receptor genes before the origin of jawed vertebrates. **PLoS One**, v. 5, n. 5, p. e10512, 2010.

SUZUKI, I. et al. Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis. **Endocrinology**, v. 137, n. 5, p. 1627-1633, 1996.

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.

TURSKI, W. A. et al. Only certain antiepileptic drugs prevent seizures induced by pilocarpine. **Brain Res**, v. 434, n. 3, p. 281-305, 1987.

VAN DER KRAAN, M. et al. Expression of melanocortin-5 receptor in secretory epithelia supports a functional role in exocrine and endocrine glands. **Endocrinology**, v. 139, n. 5, p. 2348-2355, 1998.

VAN DER PLOEG, L. H. et al. A role for the melanocortin 4 receptor in sexual function. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 17, p. 11381-11386, 2002.

VANEY, C. [The mind and epilepsy: opinions and viewpoints over the course of time]. **Schweiz Rundsch Med Prax**, v. 78, n. 29-30, p. 816-824, 1989.

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

VEZZANI, A.; FRIEDMAN, A. Brain inflammation as a biomarker in epilepsy. **Biomark Med**, v. 5, n. 5, p. 607-614, 2011.

VEZZANI, A. et al. The role of inflammation in epileptogenesis. **Neuropharmacology**, v. 69, p. 16-24, 2013.

VRINTEN, D. H. et al. Neuropathic pain: a possible role for the melanocortin system? **Eur J Pharmacol**, v. 429, n. 1-3, p. 61-69, 2001.

WALKER, L.; SILLS, G. J. Inflammation and epilepsy: the foundations for a new therapeutic approach in epilepsy? **Epilepsy Curr**, v. 12, n. 1, p. 8-12, 2012.

WIKBERG, J. E. et al. New aspects on the melanocortins and their receptors. **Pharmacol Res**, v. 42, n. 5, p. 393-420, 2000.

WILLIG, R. P.; LAGENSTEIN, I. [Therapeutic trial with a fragment of ACTH (ACTH 4-10) in early childhood epilepsy (author's transl)]. **Monatsschr Kinderheilkd**, v. 128, n. 2, p. 100-103, 1980.

YANG, Y. Structure, function and regulation of the melanocortin receptors. **Eur J Pharmacol**, v. 660, n. 1, p. 125-130, 2011.

YOON, S. W. et al. alpha-Melanocyte-stimulating hormone inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production in leukocytes by modulating protein kinase A, p38 kinase, and nuclear factor kappa B signaling pathways. **J Biol Chem**, v. 278, n. 35, p. 32914-32920, 2003.