

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

Aline Kegler

**POLIMORFISMO Ala16ValMnSOD NA EPILEPSIA:
ENVOLVIMENTO DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS,
OXIDATIVOS E GLICOLIPÍDICOS**

Santa Maria, RS

2019

Aline Kegler

**POLIMORFISMO Ala16ValMnSOD NA EPILEPSIA:
ENVOLVIMENTO DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS,
OXIDATIVOS E GLICOLIPÍDICOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Bioquímica**.

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

Kegler, Aline

POLIMORFISMO Ala16ValMnSOD NA EPILEPSIA: ENVOLVIMENTO
DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS, OXIDATIVOS E GLICOLIPÍDICOS
/ Aline Kegler.- 2019.

72 f.; 30 cm

Orientador: Dra. Michele Rechia Fighera

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica
Toxicológica, RS, 2019

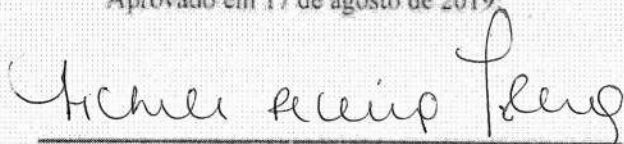
1. Epilepsia 2. Polimorfismo 3. Neuroinflamação 4.
Marcadores apoptóticos 5. Estresse oxidativo I. Rechia
Fighera, Dra. Michele II. Título.

Aline Kegler

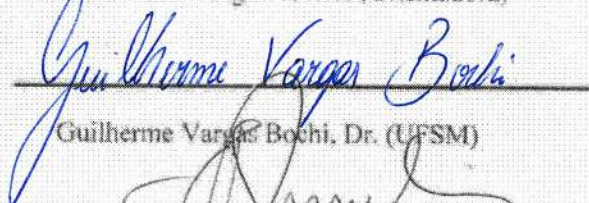
**POLIMORFISMO Ala16ValMnSOD NA EPILEPSIA:
ENVOLVIMENTO DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS,
OXIDATIVOS E GLICOLIPÍDICOS**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do título de **Doutora em Bioquímica**.

Aprovado em 17 de agosto de 2019:



Michele Rechia Figuera, Dra. (Orientadora)




Guilherme Vargas Bochi, Dr. (UFSM)



Marino Muxfeldt Blachin, Dr. (UFRGS) - Parecer



Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)



Rômulo Pilon Barcellos, Dr. (UPF) - Parecer

RESUMO

POLIMORFISMO Ala16ValMnSOD NA EPILEPSIA: ENVOLVIMENTO DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS, OXIDATIVOS E GLICOLIPÍDICOS

AUTORA: Aline Kegler

ORIENTADORA: Prof.^a. Dr.^a Michele Rechia Fighera

A epilepsia é uma doença neurológica que acomete aproximadamente 1% da população mundial. Apesar do bom prognóstico, existem pacientes que apresentam convulsões refratárias aos medicamentos, refletindo a falta de um melhor entendimento dos distúrbios neuroquímicos envolvendo a doença. Os mecanismos de ação associados à epilepsia envolvem fatores inflamatórios, apoptóticos, de dano ao DNA e também fatores genéticos. Além disso, a síndrome metabólica (MetS) é um problema emergente entre pacientes com epilepsia. Estudos demonstram que mutações genéticas, como o polimorfismo do nucleotídeo único da superóxido dismutase manganês (MnSOD Ala16Val SNP) está associado à modulação da via inflamatória, oxidativa e apoptótica, assim como, a distúrbios metabólicos, como obesidade e dislipidemia. Entretanto, pouco se sabe sobre a relação do polimorfismo da MnSOD Ala16Val com a epilepsia, bem como, a influência da mutação genética nos parâmetros inflamatórios, de estresse oxidativo, marcadores apoptóticos e da dislipidemia nessa patologia. Dessa forma, inicialmente foram recrutados pacientes com epilepsia e voluntários saudáveis para análise da associação do polimorfismo da MnSOD Ala16Val e epilepsia. O perfil metabólico, níveis plasmáticos de citocinas inflamatórias, caspases, dano ao DNA e atividade da SOD também foram analisados. Os resultados mostraram uma maior proporção do genótipo VV no grupo epilepsia em comparação ao grupo controle. Além disso, observou-se maiores níveis de TNF- α e Caspase-8, maior atividade da AChE e maior concentração de picogreen em pacientes com epilepsia que apresentam o genótipo VV quando comparados ao genótipo AA e AV do grupo epilepsia e grupo controle. Uma interessante correlação entre os marcadores no grupo epilepsia com genótipo VV, além da correlação com o tipo de crise também foi observada. Uma correlação importante entre marcadores inflamatórios foi observada no grupo epilepsia (genótipo VV). Os resultados sugerem o polimorfismo da MnSOD Ala16Val na contribuição do prognóstico da doença, visto que o polimorfismo genético mostrou influência no aumento dos marcadores inflamatórios, oxidativos, apoptóticos e metabólicos, contribuindo para a manutenção do estado inflamatório na epilepsia.

Palavras-chave: epilepsia, polimorfismo, neuroinflamação, marcadores apoptóticos, estresse oxidativo, fatores metabólicos.

ABSTRACT

Ala16ValMnSOD POLYMORPHISM IN EPILEPSY: INVOLVEMENT OF INFLAMMATORY, OXIDATIVE AND GLICOLIPIDIC BIOMARKERS

AUTHOR: Aline Kegler

ADVISOR: Michele Rechia Fighera

Epilepsy is a neurological disease that affects around 1% of world population, with neurobiological, neurochemical, cognitive and psychological consequences. Despite of the good prognosis, there is a high proportion of epilepsy patients who are refractory to antiepileptic drugs, reflecting the need of a better understanding about neurochemical disorders characteristics involving the disease. Inflammatory, apoptotic, DNA damage, and genetic processes are involved in epilepsy. Furthermore, metabolic syndrome (MetS) is another problem in epilepsy. Some studies demonstrate that genetic mutations, as manganese superoxide single nucleotide polymorphism (MnSOD Ala16Val SNP) is associated to inflammatory, oxidative, and apoptotic pathways, as well as to metabolic disturbances, as obesity and dyslipidemia. However, the relation between MnSOD Ala16Val SNP and epilepsy is not well known, as well as the genetic mutation influence on inflammatory, oxidative stress, apoptotic and dyslipidemia. Epilepsy patients and volunteers were recruited to participate. Metabolic profile, cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, AChE), caspases (1, 8 e 3), DNA damage, and SOD activity were evaluated. The results demonstrated increased proportion of VV genotype in epilepsy group when compared to control group. Increased levels of TNF- α , AChE, Caspase-8 and Picogreen in epilepsy patients with VV genotype compared to AA and AV from epilepsy and control groups. An interesting correlation among biomarkers in epilepsy group with VV genotype and seizure type was already observed. A correlation between TNF- α vs. Caspase-8, and cholesterol vs. Triglycerides was observed in epilepsy group with VV genotype. The results from the study suggest the MnSOD Ala16Val SNP contributing to the disease prognosis, in view that the genetic polymorphism demonstrated influence in the inflammatory, oxidative, apoptotic, and metabolic biomarkers, contributing to the maintenance of inflammation in epilepsy.

Key Words: epilepsy, polymorphism, neuroinflammation, apoptotic markers, oxidative stress, metabolism

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Epilepsia	8
1.2 Epileptogênese	9
1.3 Classificação das crises epiléticas	10
1.4 Classificação das epilepsias	11
1.5 Classificação etiológica	12
1.6 Síndrome epilética	14
1.7 Epidemiologia	14
1.8 Tratamento da epilepsia	14
1.9 Fisiopatologia da epilepsia	16
1.10 Neuroinflamação	17
1.11 Citocinas	18
1.12 Interleucina-1beta	20
1.13 Fator de necrose tumoral alfa	21
1.14 Interleucina-6	23
1.15 Acetilcolinesterase	24
1.16 Apoptose e caspases	26
1.17 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo	28
1.18 Superóxido dismutase	30
1.19 Superóxido dismutase dependente de manganês	31
1.20 Polimorfismo do gene da superóxido dismutase dependente de manganês	32
1.21 Dislipidemia e epilepsia	34
1.22 Impacto econômico da epilepsia e doenças cardiovasculares	35
2. OBJETIVOS	37

2.1 Objetivo geral	37
2.2 Objetivos específicos	37
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS	38
4. DISCUSSÃO	55
5. CONCLUSÃO	60
6. REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

De acordo com a *International League Against Epilepsy* (ILAE) a epilepsia é uma condição neurológica crônica caracterizada pela recorrência de crises epiléticas espontâneas e recorrentes (FISHER et al., 2017).

Crise epilética é definida como a ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas resultantes de atividade neuronal síncrona ou excessiva, geralmente causada por alterações estruturais e/ou bioquímicas, envolvendo predominantemente o córtex cerebral (FISHER et al., 2005). As manifestações clínicas decorrentes das crises epiléticas estão relacionadas às áreas cerebrais afetadas pelas descargas sincrônicas que iniciam de forma súbita, incluindo fenômenos anormais e transitórios. Entre essas manifestações clínicas podemos citar as alterações da consciência, eventos motores, sensitivos/sensoriais, autonômicos ou alterações psíquicas (THURMAN et al., 2011). Além disso, as crises epiléticas podem desencadear consequências neurobiológicas, cognitivas e sociais (FISHER et al., 2014). As crises epiléticas são pleomórficas e frequentemente estereotipadas para um determinado indivíduo, dependendo da zona cortical envolvida em suas crises, seja pelo local da origem, seja pela propagação preferencial das descargas epiléticas. Crises epiléticas são imprevisíveis e transitórias, apresentando início súbito e duração curta, embora, excepcionalmente, possam se prolongar por mais de quatro a cinco minutos (YACUBIAN e KOCHEN, 2014). As crises epiléticas também podem variar quanto à frequência. Podem ocorrer uma média de menos de uma crise ao ano, como podem ocorrer várias crises ao dia.

A ocorrência de uma convulsão não significa que o indivíduo tenha epilepsia, até 10% da população em geral pode apresentar uma convulsão durante a vida (OMS, 2016). Uma crise convulsiva após uma concussão, ou decorrente de uma febre alta, ou pelo uso ou abstinência de drogas, são exemplos de convulsões provocadas, que não levam a um diagnóstico de epilepsia (FISHER et al., 2014). Deste modo, a epilepsia compreende diversas alterações, incluindo mais de 15 tipos diferentes de crises epiléticas e mais de 30 síndromes epiléticas (LÖSCHER et al., 2013; FISHER et al., 2014; WHO, 2016).

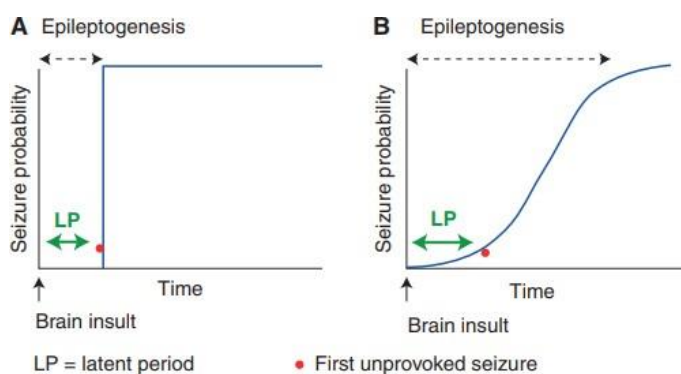
Uma situação convulsiva específica é o chamado *status epilepticus* (SE). Esta condição constitui-se da ocorrência de uma crise convulsiva prolongada (5 minutos ou mais de atividade convulsiva clínica ou eletroencefalográfica), ou da repetida atividade convulsiva sem

recuperação entre as crises (não retornando à linha de base). O SE é considerado uma emergência médica e está associado com uma alta morbidade, mortalidade e risco significativo de déficit cognitivo (BROPHY et al., 2012).

1.2 Epileptogênese

O processo de epileptogênese ocorre quando há um desequilíbrio entre os mecanismos de excitação e inibição sináptica, com consequente produção de um estado de hiperexcitabilidade e hipersincronia (PITKÄNEN et al., 2015). Eventos iniciais tais como predisposição genética, traumas e infecções poderiam levar ao início da epileptogênese, envolvendo alterações estruturais e funcionais, favorecendo a geração de crises espontâneas recorrentes (PITKÄNEN e LUKASIUK, 2011). Esse processo conduz a um desequilíbrio entre a excitação e inibição neuronal, resultando em hiperexcitabilidade de uma população específica de neurônios cerebrais (DeLORENZO et al., 2005). Embora a epileptogênese concentre diferentes características tais como morte neuronal e inflamação, seus mecanismos não estão completamente elucidados (CHANG e LOWESTEIN, 2003).

Figura 1. Epileptogênese. Extraído de Pitkänen et al. (2015).



Definição de epileptogênese:

- (A) Previamente, a epileptogênese era considerada como a representação do período latente, o qual era definido como o tempo entre o insulto e a ocorrência da primeira crise não-provocada.
- (B) Mais recentemente, com base em várias observações experimentais e clínicas, considera-se agora que a epileptogênese se estende além do período latente, que ainda é definido como o tempo da lesão precipitante e a primeira crise clínica. No

entanto, as observações de que crises subconvulsivas podem ter ocorrido antes da primeira convulsão clínica e que, a frequência e a gravidade das crises aumentam progressivamente ao longo do tempo, indicam que a epileptogênese pode continuar indefinidamente.

1.3 Classificação das crises epiléticas

1.3.1 Definição operacional das crises

A *International League Against Epilepsy* (ILAE) publicou um *Official Report* elaborado por Fisher e colaboradores (2014), definindo epilepsia a partir das seguintes condições:

1. Ocorrência de pelo menos duas crises não provocadas (ou reflexas), ou seja, sem uma causa temporária ou reversível, ocorrendo em um período superior a 24 horas;
2. Ocorrência de uma crise não provocada (ou reflexa) associada à probabilidade de pelo menos 60% de ocorrência de futuras crises;
3. Diagnóstico de uma síndrome epilética.

Neste mesmo documento foi definido que a epilepsia pode ser considerada resolvida nos casos em que a doença está relacionada com a idade ou quando o indivíduo está livre de crises por pelo menos 10 anos, desde que durante os últimos cinco anos não tenha utilizado fármacos antiepiléticos. O termo “resolvida” foi considerado o mais adequado para expressar que a pessoa não possui mais crise epiléticas, sem excluir o fato da existência de probabilidade de recorrência das crises (FISHER et al., 2014).

1.3.2 Tipos de crises epiléticas

Primeiramente, a classificação das crises epiléticas baseia-se na descrição clínica e achados eletroencefalográficos. As crises epiléticas são classificadas naquelas de início focal, início generalizado e início desconhecido (FISHER et al., 2017) (Figura 2).

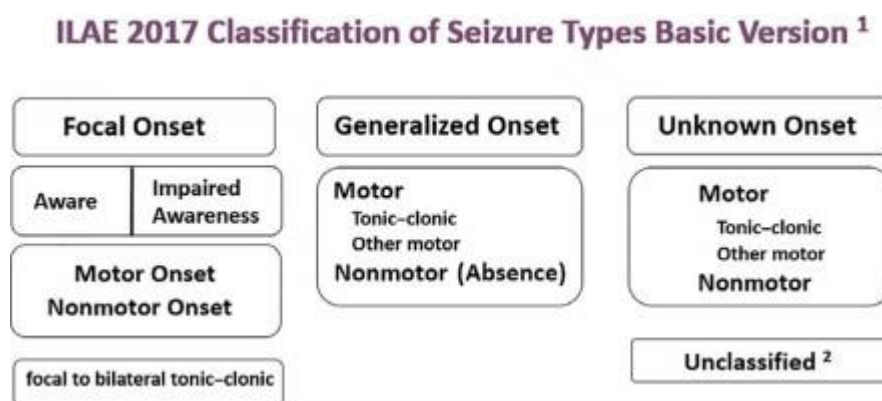
Crises focais

As crises focais são originadas em grupos de neurônios delimitados a um único hemisfério cerebral, podendo atingir tanto uma região discretamente localizada, como uma região mais amplamente distribuída (BERG et al., 2010).

Crises generalizadas

As crises generalizadas têm início em alguma região cerebral, rapidamente envolvendo redes neuronais distribuídas bilateralmente (ambos os hemisférios cerebrais) (BERG et al., 2010).

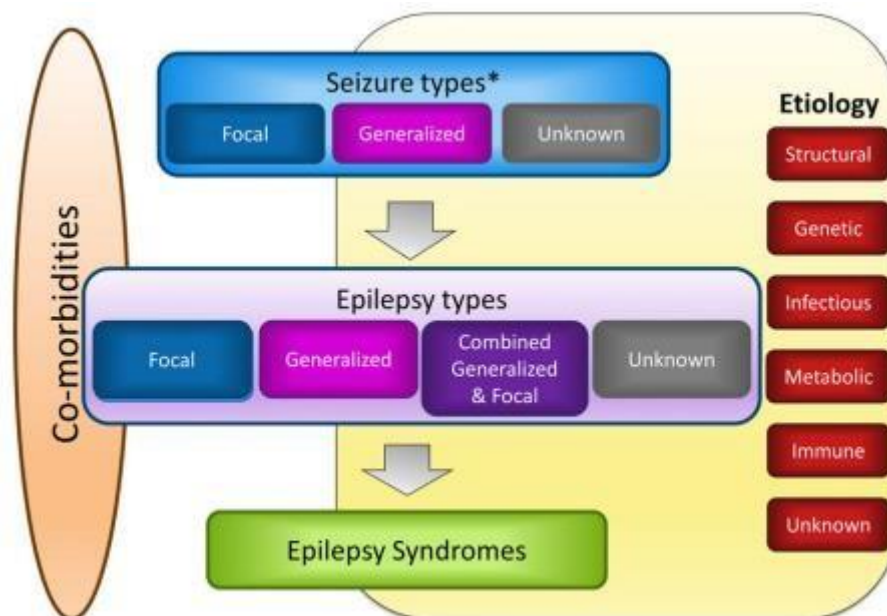
Figura 2. Classificação operacional da ILAE para os tipos de crises epilépticas. Extraído de Fisher et al. (2017).



1.4 Classificação das epilepsias

A nova classificação das epilepsias (Figura 3) é uma classificação de múltiplos níveis, designados para permitir a classificação das epilepsias em ambientes clínicos diferentes. Este reconhece a ampla variação de recursos ao redor do mundo, significando que diferentes níveis de classificação serão possíveis dependendo dos recursos disponibilizados ao clínico no momento do diagnóstico. Quando for possível, um diagnóstico em todos os três níveis deverá ser buscado bem como a etiologia de epilepsia de um indivíduo.

Figura 3. Esquema diagnóstico para a classificação das epilepsias. Os tipos de crises * denotam o início das crises epilépticas. Extraído de Scheffer et al. (2017).



1.5 Classificação Etiológica

Etiologia estrutural

O conceito subjacente a etiologia estrutural é o de que uma anormalidade estrutural acarreta um risco substancialmente aumentado de estar associado com a epilepsia com base em estudos apropriadamente desenhados (BERG et al., 2010). Uma etiologia estrutural se refere a anormalidades visíveis em estudos de neuroimagem estrutural na qual a avaliação eletroclínica em conjunção com os achados de imagem levam à um grau razoável de inferência de que a anormalidade da imagem é, provavelmente, a causa das crises do paciente. A identificação de lesões estruturais sutis requer estudos de RM apropriados utilizando protocolos específicos para epilepsia (GAILLARD et al., 2009).

Etiologia genética

O conceito de epilepsia genética é que ela é o resultado direto de uma mutação genética conhecida ou presumida na qual as crises epilépticas constituem o sintoma central da doença. As epilepsias na quais a etiologia genética tem sido implicada são muito diversas e, na maioria dos casos, os genes responsáveis ainda não são conhecidos.

Etiologia infecciosa

A etiologia mais comum em todo o mundo é a epilepsia que ocorre como resultado de uma infecção (VEZZANI et al., 2016). O conceito de uma etiologia infecciosa é o de que as crises resultam diretamente de uma infecção conhecida na qual as crises epiléticas são os sintomas centrais da afecção. Exemplos comuns em regiões específicas do mundo incluem neurocisticercose, tuberculose, HIV, malária cerebral, toxoplasmose cerebral, e infecções congênitas como pelo Zika vírus e citomegalovírus.

Etiologia metabólica

O conceito de uma epilepsia metabólica é que a epilepsia é o resultado direto de um distúrbio metabólico conhecido ou presumido no qual o sintoma central do distúrbio são as crises epiléticas. Causas metabólicas se referem a distúrbios metabólicos bem delineados com manifestações ou alterações bioquímicas em todo o corpo como a porfiria, a uremia, as aminoacidopatias ou as crises por dependência de piridoxina.

Etiologia imune

O conceito de uma epilepsia imune é que ela resulta diretamente de um distúrbio imune no qual as crises são o sintoma central desta afecção. Uma gama de epilepsias imunes com apresentações características tanto em adultos como em crianças tem sido reconhecida (ARSOV et al., 2012).

Etiologia desconhecida

Nesta categoria não é possível fazer um diagnóstico específico além da semiologia eletroclínica básica tal como na epilepsia do lobo frontal. Existem pacientes com epilepsia para os quais as causas de suas crises ainda não são conhecidas.

1.6 Síndrome epiléptica

Uma síndrome epiléptica se refere a um conjunto de características incluindo tipos de crises, EEG e características de imagem, que tendem a ocorrer juntas. Frequentemente tem características dependentes da idade, tais como idade de início e remissão (quando aplicável), desencadeadores de crises, variação diurna e algumas vezes prognóstico. A síndrome epiléptica também pode ter comorbidades distintas tais como disfunção intelectual e psiquiátrica e características eletroencefalográficas e em estudos de neuroimagem (SCHEFFER et al., 2017).

1.7 Epidemiologia

A epilepsia é uma alteração neurológica prevalente, compreendendo diferentes síndromes e condições, abrangendo 0,6-1,5% da população mundial (BELL et al., 2014). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo são portadoras de epilepsia e cerca de 80% dos indivíduos acometidos encontram-se em países de baixa e média renda (OMS, 2017). No mundo, há cerca de 2,4 milhões de novos pacientes epilépticos a cada ano, dos quais pelo menos 50% começam na infância e adolescência (TUTANC et al., 2015).

No Brasil, os estudos epidemiológicos sobre epilepsia são limitados. Isso pode estar relacionado a dificuldade inerente de classificação das crises epilépticas, bem como ao acesso da maioria da população mais carente ao diagnóstico e tratamento (SANDER, 2003). Apesar disso, estima-se que a prevalência brasileira da doença seja de 1,4% da população em geral (FERREIRA e SILVA, 2009).

1.8 Tratamento da epilepsia

Nos últimos anos houve um considerável desenvolvimento no entendimento da fisiopatologia, características e prognóstico da epilepsia (TRINKA et al., 2016). O tratamento inicial da epilepsia é o medicamentoso (PUTIGNANO et al., 2017) sendo a estratégia mais utilizada para o controle de grande parte dos diferentes tipos de crises epilépticas (PERUCCA e TOMSON, 2011). Os principais mecanismos de ação das drogas antiepilépticas são o bloqueio dos canais de sódio ou cálcio voltagem-dependente e aumento da inibição mediada por GABA (WHITE, 2007).

Estudos indicam que aproximadamente 70% dos pacientes obtêm sucesso no tratamento. No entanto, na faixa de 25-30% dos pacientes são refratários, ou seja, continuam a ter crises apesar do tratamento com medicamentos anticonvulsivantes (ASHRAFI et al., 2017).

Principais anticonvulsivantes e mecanismos de ação. Extraído de Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Epilepsia - Ministério da Saúde (2013).

Principais anticonvulsivantes	Mecanismo de ação
Carbamazepina	bloqueio dos canais de sódio voltagem-dependente
Clobazam	liga-se aos receptores GABA-A
Etossuximida	bloqueio dos canais de cálcio
Fenitoína	bloqueio dos canais de sódio voltagem-dependente
Fenobarbital	prolongamento da abertura dos canais de cloro e receptores GABA-A
Gabapentina	ligação à proteína $\alpha 2$ -gama
Primidona	efeito atribuído à biotransformação hepática de suas moléculas em fenobarbital
Topiramato	bloqueio dos canais de sódio voltagem-dependente, modulação negativa dos canais de cálcio tipo-L, ativação da condutância do potássio, potencialização da ação inibitória GABAérgica
Lamotrigina	inibição dos canais de sódio voltagem-dependentes
Vigabatrina	inibe irreversivelmente a GABA-transaminase (GABA-T)

1.9 Fisiopatologia da epilepsia

A fisiopatologia da epilepsia configura-se como um desequilíbrio entre excitação neuronal (neurotransmissão glutamatérgica) e inibição neuronal (GABA - ácido γ -aminobutírico) (BRIGGS e GALANOPOULOU, 2011).

Porém, além deste modelo de excitação/inibição estar relacionado à epilepsia, já é estabelecido que a ativação de processos inflamatórios (neuroinflamação) e o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio podem contribuir tanto para o desencadeamento das crises epiléticas, como podem ocorrer em consequência das mesmas (SHIN et al., 2011). Do mesmo modo, evidências sugerem que a morte neuronal também pode ser apresentada como causa e/ou consequência das crises epiléticas (MARTINC et al., 2012).

1.9.1. Mecanismo de ação envolvendo a neurotransmissão GABA e glutamato.

Estudos sugerem o envolvimento do sistema glutamatérgico (KHAN et al., 2000) e sistema gabaérgico (GABA) (COSTA-LOTUFO et al., 2002) na manutenção e/ou propagação da epilepsia.

A neurotransmissão sináptica excitatória no SNC é mediada principalmente pelo neurotransmissor glutamato, o qual é armazenado em vesículas sinápticas e liberado por exocitose cálcio-dependente (HERTZ et al., 1999). O glutamato desempenha sua ação através da ativação dos receptores glutamatérgicos, os quais estão localizados nas membranas pré-sinápticas e pós-sinápticas. Os receptores glutamatérgicos podem ser ionotrópicos (ativados por NMDA, AMPA ou cainato) ou metabotrópicos (acoplados à proteína G). Em um processo patológico, como é o estado epilético, ocorre a liberação de glutamato, ativando os receptores de NMDA, levando à necrose neuronal por aumento na concentração de cálcio (MELDRUM e GARTHWAITE, 1990).

O sistema gabaérgico tem como principal neurotransmissor inibitório o GABA. Assim como o glutamato, o GABA é armazenado em vesículas sinápticas e liberado para o meio extracelular de modo cálcio-dependente, onde ativa seus receptores. Os receptores gabaérgicos são divididos em três tipos, conforme as propriedades farmacológicas, bioquímicas e eletrofisiológicas: GABA-A e GABA-C são ionotrópicos; GABA-B metabotrópico (COOPER

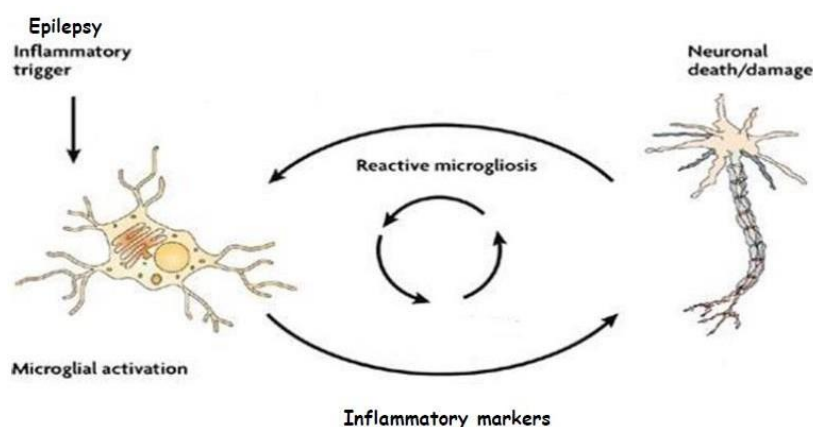
et al., 1991). Os receptores GABA-A possuem sítios de ligação para barbitúricos e benzodiazepínicos, entre outros, atuando desta forma como agonistas na transmissão inibitória, sendo que alguns desses fármacos são utilizados na clínica durante processos convulsivos (COSTA-LOTUFO et al., 2002). Os neurotransmissores glutamato e GABA participam das alterações convulsivas, sugerindo que as alterações na transmissão excitatória e inibitória possam contribuir para a modificação da excitabilidade neuronal (COSTA-LOTUFO et al., 2002).

1.10 Neuroinflamação

A inflamação é um importante processo adaptativo para a manutenção e reparo tecidual. No entanto, a persistência deste processo provoca alterações significativas das funções teciduais, prejudicando a homeostase sistêmica (LUGRIN et al., 2014). O SNC possui um sistema imune composto por células imunocompetentes, como a micróglia e os astrócitos (DONG e BENVENISTE, 2001; LUCAS et al., 2006). A resposta inflamatória no SNC inclui complexas e integradas respostas celulares, tais como a ativação da glia. Esta, quando ativada, libera diferentes mediadores pró-inflamatórios (citocinas, por exemplo), as quais podem contribuir para a disfunção neuronal e progressão de patologias do SNC (KHANSARI et al., 2009).

A neuroinflamação desempenha um papel crítico em diferentes doenças neurológicas e psiquiátricas (JONES e THOMSEN, 2013). Embora a inflamação possa ser um processo de defesa fisiológica, benéfica para a reparação e recuperação do SNC (WEE, 2010) estudos descrevem a associação da neuroinflamação com a epilepsia (VEZZANI, 2005; VEZZANI et al., 2011). A síntese de mediadores inflamatórios é iniciada pelas células do endotélio cerebral, a qual é estimulada na presença de crises epiléticas (RAVIZZA et al., 2010). De acordo, pesquisas experimentais demonstram que a crise *per se* promove aumento da resposta inflamatória (MAROSO et al., 2011) e as crises recorrentes fazem com que se propague uma inflamação crônica, podendo, assim, haver desenvolvimento do quadro de epilepsia (VEZZANI et al., 2011). Além disso, estudos clínicos e experimentais indicam que citocinas e moléculas relacionadas encontram-se em níveis elevados no tecido encefálico após a epileptogênese (WILCOX e VEZZANI, 2014).

Figura 4. Neuroinflamação desencadeada pela epilepsia. Adaptado de Block et al. (2007).



1.11 Citocinas

Citocinas são polipeptídios que compõem uma classe de reguladores inflamatórios das respostas imune inata e adaptativa no corpo humano, incluindo o SNC (BACHSTETTER e VAN ELDIK, 2010). Como são moléculas sinalizadoras, as citocinas podem induzir as vias de sinalização intracelular através da estimulação de receptores próprios (PANDEY e AGRAWAL, 2006) exercendo distintas respostas biológicas (DARDIOTIS et al., 2012).

As citocinas são expressas sob condições normais, em baixas quantidades no SNC, estando envolvidas em processos fisiológicos como aprendizado e memória (SCHNEIDER et al., 1998; JANKOWSKY e PATTERSON, 1999). No entanto, sob condições patológicas, como traumas ou crises epiléticas, há a liberação de maiores níveis de citocinas inflamatórias (VEZZANI e GRANATA, 2005), ocorrendo a persistência do processo inflamatório, induzindo a uma alteração significativa das funções dos tecidos, conseqüentemente alterando a homeostase sistêmica (LUGRIN et al., 2014).

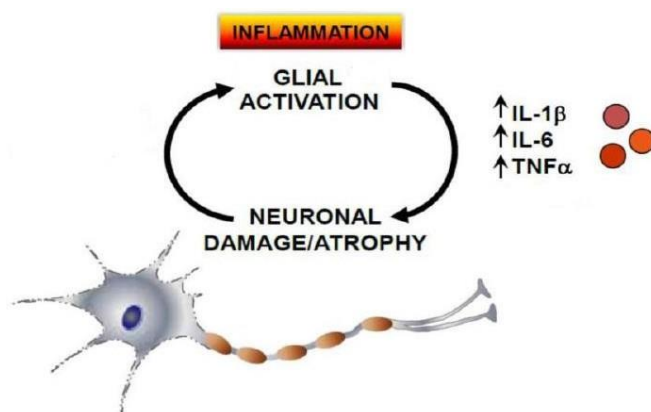
Com relação às estruturas do cérebro, o hipocampo é a região que apresenta a maior densidade de receptores para citocinas, tornando-se particularmente vulnerável ao processo inflamatório (WILSON et al., 2002; MATTSON e MAGNUS, 2006). Na epilepsia, o excesso de produção e liberação de citocinas, ou sua presença prolongada no tecido relaciona-se com a disfunção sináptica, excitotoxicidade e morte neuronal por apoptose (ALLAN e ROTHWELL, 2001; ALLAN et al., 2005; BACHSTETTER et al., 2011). Além disso, experimentalmente, as

citocinas pró-inflamatórias mostraram contribuir para a diminuição do limiar de convulsão, facilitando a ocorrência de crises convulsivas (WILCOX e VEZZANI, 2014).

A ativação de citocinas inflamatórias após crises epiléticas foi primeiramente reportada por um estudo de Minami et al. 1990, o qual cita que após crises epiléticas prolongadas através da injeção de pentilenotetrazol em ratos, causou um *up-regulation* da IL-1 β , considerada uma citocina pró-inflamatória “chave”. Além disso, um estudo envolvendo o uso de ácido cáinico em modelo de *status epilepticus* em ratos demonstrou que além da IL-1 β , as citocinas IL-6 e TNF- α encontravam-se também *up-regulated* no SNC (MINAMI et al., 1991).

A relação entre crises epiléticas e citocinas em humanos foi primeiramente reportada por Peltola et al. (1998) em um estudo que demonstra um aumento nos níveis de IL-6 no líquido cérebro espinhal e plasma de pacientes, 24 horas após crises epiléticas. Neste sentido, estudos sugerem as citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 dentre as principais citocinas pró-inflamatórias envolvidas na geração e propagação das crises epiléticas (DE SIMONI et al., 2000; ANDRZEJCZAK, 2011).

Figura 5. Envolvimento de citocinas no processo inflamatório. Adaptado de Jurgens e Johnson (2012).



1.12 Interleucina-1beta (IL-1 β)

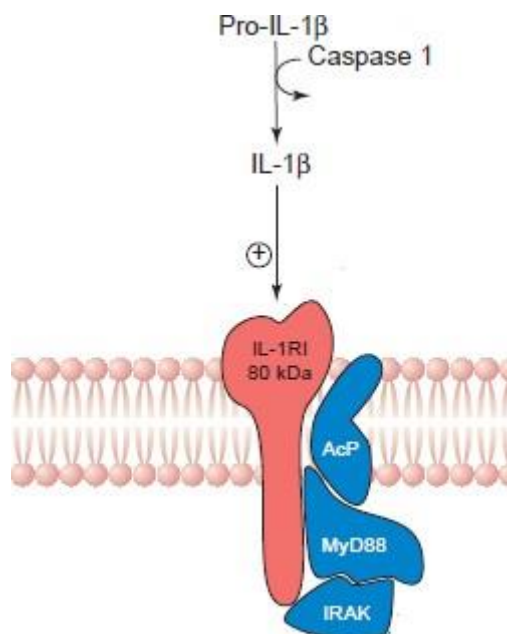
A IL-1 β é um dos membros de uma grande família gênica denominada Interleucina 1 (IL-1) e todos os membros desta família IL-1 estão presentes no cérebro (DINARELLO et al., 1998). É produzida principalmente por monócitos, macrófagos e células dendríticas (ABBAS et al., 2008), sendo que a IL-1 β é o tipo mais estudado na neuroinflamação e epilepsia (LI et al., 2011). É sintetizada como um precursor inativo de 31 kDa (pró-IL-1 β) (BOUTIN et al., 2003). Posteriormente, para se tornar a forma ativa de 17kDa, a proteína precursora (pró-IL-1 β) sofre uma clivagem enzimática pela caspase-1, também conhecida como IL-1 β *converting enzyme* (ICE).

A função biológica da IL-1 β é mediada através da sua ligação ao receptor tipo I de interleucina-1 (IL-1RI) (BLACK et al., 1988). Após a ligação da interleucina com seu receptor específico, desencadeia-se uma cascata de fosforilações, levando à formação do complexo de cinases e proteínas adaptadoras que realizam a ativação do fator de transcrição nuclear Kappa B (NF- κ B) (BALOSSO et al., 2008), transcrição de genes relacionados à IL-6 e TNF- α (ABBAS et al., 2008; BALOSSO et al., 2008). A IL-1 β é considerada um mediador central, não apenas por sua habilidade de *upregulate* outras citocinas inflamatórias, tais como IL-6 e TNF- α , mas também por ser a primeira citocina a ser liberada sob condições patológicas (BOUTIN et al., 2003).

Uma forte ativação do complexo IL-1 β /IL-1RI em células gliais e neuronais foi observada em análise de amostras cerebrais de pacientes com epilepsia do lobo temporal com esclerose hipocampal (RAVIZZA e VEZZANI, 2006). Além disso, com relação aos efeitos da IL-1 β na transmissão sináptica, houve um aumento da excitabilidade neuronal e um decréscimo no limiar das crises epiléticas no hipocampo e também em regiões susceptíveis às crises (VEZZANI et al., 1999). Desta maneira, a IL-1 β é classificada como uma molécula pró-convulsiva, sendo que inibidores desta via podem vir a tornarem-se anticonvulsivantes de grande valor terapêutico (VEZZANI et al., 2011).

Figura 6. Ação da IL-1 β . Adaptado de Rothwell e Luheshi (2000).

AcP: *accessory protein*; MyD88: *Myeloid differentiation protein*; IRAK: *interleukin-1 receptor associated kinase*;



1.13 Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina pró-inflamatória inicialmente sintetizada como um precursor de proteína transmembrana (tmTNF), posteriormente clivada na forma solúvel madura (sTNF) através da metaloprotease TNF- α *converting enzyme* (TACE) (KÄRKKÄINEN et al., 2000) liberando a forma solúvel do TNF- α (BRADLEY, 2008). Estímulos inflamatórios, principalmente por macrófagos, são os principais responsáveis pela produção desta citocina (TANSEY e SZYMKOWSKI, 2009).

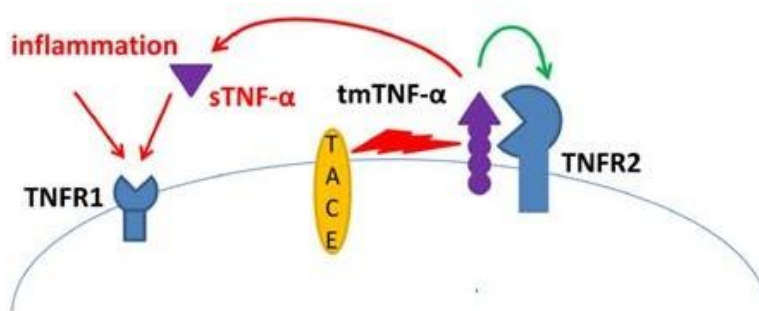
Os efeitos biológicos do TNF- α são mediados através da interação com receptores transmembrana específicos, denominados receptor de TNF tipo I (TNFR1 ou p55) e tipo II (TNFR2 ou p75) (CABAL-HIERRO e LAZO, 2012). Enquanto o TNFR1 é expresso majoritariamente em diferentes tipos celulares do SNC, o TNFR2 é principalmente expresso nas células da micróglia (BASTIEN e LACROIX, 2014). O TNFR1 é responsável por diferentes ações do TNF- α , incluindo a produção de citocinas, ativação do fator de transcrição nuclear Kappa B (NF- κ B) e apoptose. Em neurônios e micróglia, o TNF- α é capaz de induzir a apoptose quando ligado ao receptor TNFR1 (BRIETZKE e KAPCZINSKI, 2008). Já o TNFR2 não possui o domínio de morte celular, sinalizando reações anti-apoptóticas, levando a

produção de fatores neurotróficos, neuroprotetores e anticonvulsivantes (VEZZANI e GRANATA, 2005).

Além de estimular a produção de diferentes mediadores inflamatórios, o TNF- α pode também formar espécies reativas de oxigênio (CHU, 2013). Estudos demonstram que, assim como a IL-1 β , o TNF- α possui propriedades neuromoduladoras, sendo, desta forma, capaz de aumentar a excitabilidade neuronal através de diferentes efeitos na neurotransmissão mediada por TNFR1. Além disso, de acordo com Plata-Salamán (2000) e Godlevsky et al. (2002) a presença das crises epiléticas pode acarretar na elevação de RNA mensageiro (RNAm) para esta citocina em diferentes regiões cerebrais: hipocampo, amígdala e córtex piriforme, pré-frontal e parietal.

As consequências da ação do TNF- α nas crises epiléticas e processos inflamatórios através da neurodegeneração/neuroproteção parece depender de seus níveis no cérebro, e também de qual tipo de receptor está predominantemente ativado (DARDIOTIS et al., 2012). Porém, enquanto o TNFR1 é descrito como um fator pró-ictogênico, o TNFR2 desempenha um papel anti-ictogênico (BALOSSO et al., 2013).

Figura 7. Síntese do TNF- α (tmTNF), o qual será clivado em *mature soluble form* (sTNF) através da TNF- α converting enzyme (TACE) liberando a forma solúvel do TNF- α , o qual irá se ligar ao receptor TNFR1, com conseqüente instalação do processo inflamatório. Adaptado de Green et al. (2016).

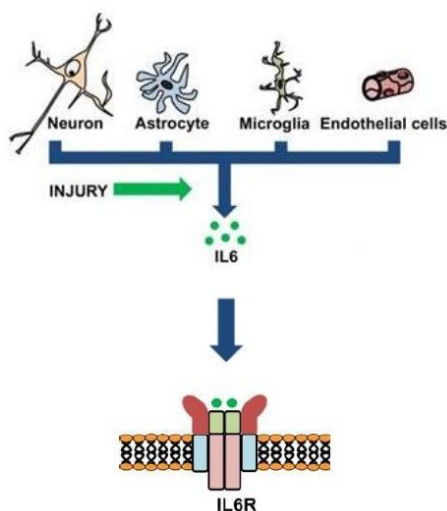


1.14 Interleucina-6 (IL-6)

A interleucina-6 (IL-6) é descrita como uma proteína-chave no SNC, devido a evidências não somente na neuroinflamação, mas em diversas outras patologias do sistema nervoso (SPOOREN et al., 2011). Possui um importante papel regulatório sobre as imunidades inata e adaptativa, sendo sintetizada principalmente através de células dendríticas, astrócitos, células microgлияis, células endoteliais, entre outros (NAVA-CASTRO et al., 2018).

A função biológica da IL-6 ocorre através da ligação a seu receptor IL-6R. Porém, é necessário um recrutamento adicional de outros receptores de proteínas para induzir as vias de sinalização (ERTA et al., 2012). Da mesma forma que IL-1 β e TNF- α , a IL-6 é rapidamente produzida pelas células gliais durante a crise epiléptica (VEZZANI et al., 2008). Além disso, a presença destas crises induz a um rápido aumento de RNAm de IL-6 em diferentes regiões do hipocampo, conseqüentemente aumentando também a produção de RNAm para o receptor de IL-6 (IL-6R) na região hipocampal. Em modelos experimentais utilizando-se o ácido caínico e indução por estímulos elétricos, observou-se uma elevação na expressão da citocina IL-6 e seu receptor (IL-6R) em células gliais (VEZZANI et al., 2002; KALUEFF et al., 2004). Esta observação experimental demonstra que a IL-6 é capaz de contribuir para o início das crises epilépticas, bem como é estabelecido o efeito neurotóxico e pró-convulsivante desta citocina (CAMPBELL et al., 1993; SAMLAND et al., 2003; KALUEFF et al., 2004; JONAKAIT, 2007).

Figura 8. Produção da IL-6 através de diferentes células cerebrais. Adaptado de Erta et al. (2012).



1.15 Acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor encontrado no sistema nervoso central e sistema nervoso periférico, sintetizada pela enzima colina acetiltransferase (ChAT) a partir de acetil coenzima A e colina (TUCEK, 1988). Após sua síntese, a acetilcolina é armazenada em vesículas sinápticas, a qual através do impulso nervoso será liberada para a fenda sináptica, permitindo sua ligação a receptores específicos. Os receptores de acetilcolina podem ser divididos em dois tipos: receptores nicotínicos (nAChR) - canais iônicos ativados por ligantes e receptores muscarínicos (mAChR) - associados a proteínas do tipo G (GWILT et al., 2007).

A via colinérgica anti-inflamatória é um mecanismo fisiológico de resposta responsável por modular ações inflamatórias através do nervo vago (BERNIK et al., 2002). A ativação do nervo vago eferente diminui os níveis de TNF- α e outras citocinas, consequentemente inibindo a resposta inflamatória (ROSAS-BALLINA et al., 2008).

A IL-1 β é um ativador das fibras aferentes do nervo vago, atuando como um sensor para a inflamação. Neste sentido, a transmissão desta informação ao SNC estimula o nervo vago eferente a produzir acetilcolina (GWILT et al., 2007). Assim, a acetilcolina induz a inibição da síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, visto que este processo somente será possível através da ativação do receptor nicotínico $\alpha 7$ da acetilcolina (nAChR $\alpha 7$), o qual é expresso na membrana plasmática das células do sistema imune (PARRISH et al., 2008).

A enzima acetilcolinesterase (AChE) é a responsável pela hidrólise da acetilcolina, originando colina e acetato, modulando assim a transmissão do impulso nervoso (SOREQ e SEIDMAN, 2001). A ação anti-inflamatória da acetilcolina é desempenhada através da supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias (PRADO et al., 2002). Estudos descrevem que a ativação dos receptores nicotínicos em macrófagos foi capaz de reduzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 β e IL-6 (WANG et al., 2003). Nizri et al. (2006) em seu estudo descreve que a inibição da atividade da AChE foi capaz de reduzir os níveis de TNF- α e IL-1 β em cultura de linfócitos. Neste sentido, inibidores da AChE reduzem a proliferação de linfócitos e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, atenuando a inflamação através do aumento da concentração de acetilcolina no espaço extracelular (NIZRI et al., 2006).

Figura 9. Sinapse colinérgica. Extraído de Henretig et al. (2019).
 ACh: *acetylcholine*; AChE: *acetylcholinesterase*.

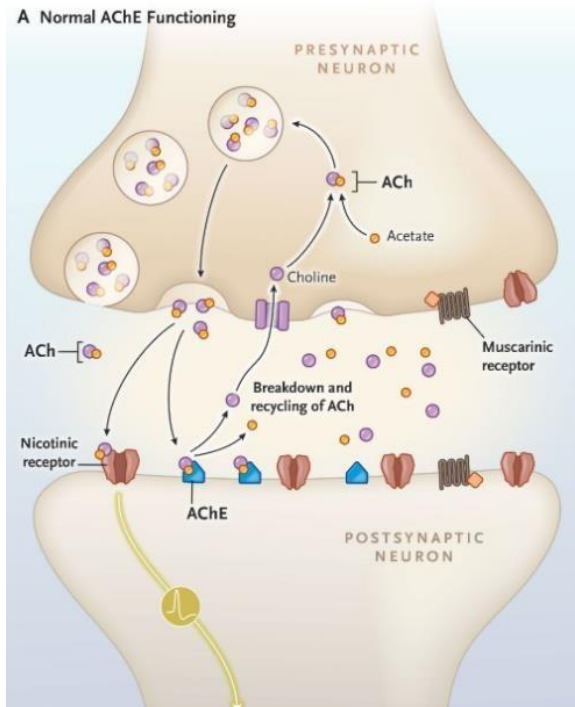
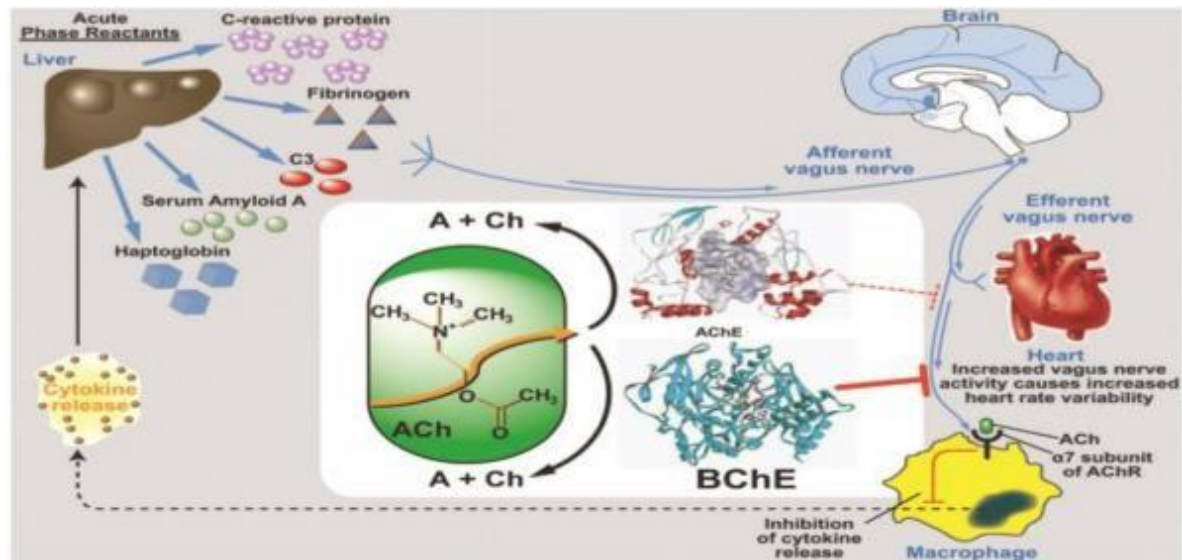


Figura 10. Via colinérgica anti-inflamatória. Extraído de Ben Assayag et al. (2010).



1.16 Apoptose e Caspases

Apoptose é um mecanismo ativo de regulação genética, a qual ocorre através de sinalizações intracelulares (WILLINGHAM, 1999). É considerado um importante processo para a homeostase tecidual e controle da inflamação (SAVILL et al., 2002). A regulação e execução da apoptose é atribuída principalmente a duas grandes famílias: BCL-2 (B cell CLL/Lymphoma 2) e caspases (SPANOS et al., 2002).

As caspases (*cystein-dependent aspartate-specific protease*) são enzimas presentes entre as membranas mitocondriais e na matriz extracelular, na forma de precursores inativos (zimogênios). As caspases são executoras da morte por apoptose e compreendem duas classes diferentes: iniciadoras (caspases -1, 2, -8, -9 e -10) e efetoras (caspases-3, -6 e -7) que clivam substratos específicos e são responsáveis pelas características típicas deste tipo de morte (KIECHLE e ZHANG, 2002; RIEDL e SHI, 2004). Existem duas principais vias que levam à apoptose, ambas as quais culminam em direção comum para a morte celular programada: vias extrínseca e intrínseca.

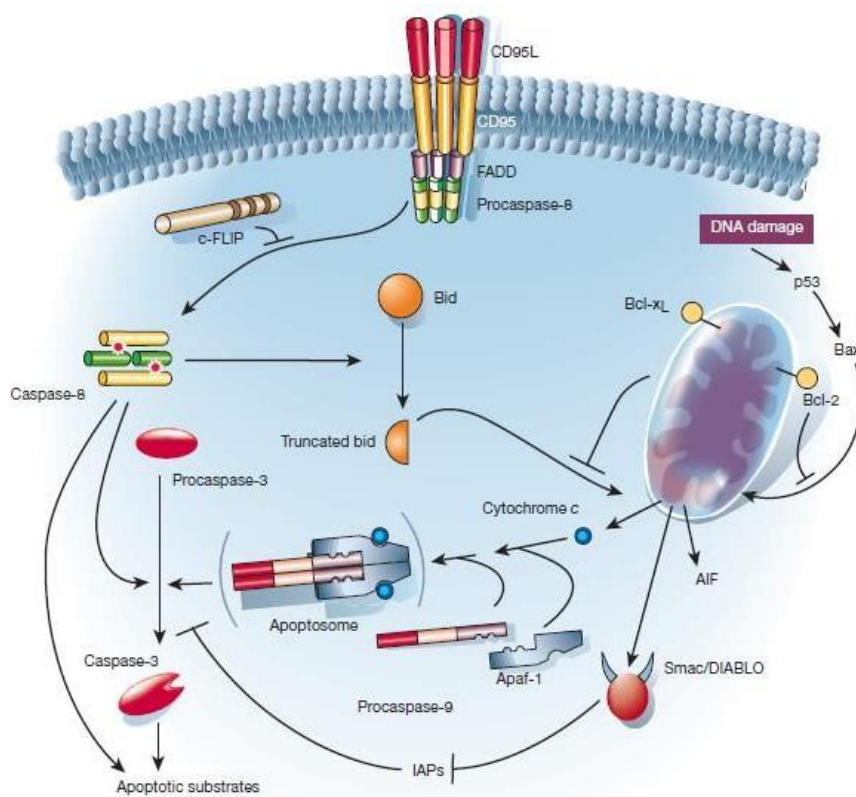
Via extrínseca (via de receptor de morte): é desencadeada por um dos membros da superfamília de receptores de necrose tumoral (rTNF). Estes receptores, quando estimulados, associam-se, através de proteínas adaptadoras como a *Fas-associated death domain* (FADD) ativando a pró-caspase 8 (HENGARTNER, 2000). Seguidamente, a caspase-8 ativa caspase-3, sendo que esta caspase efetora cliva a PARP - *poly (ADP-ribose) polymerase* e ativa *caspase-activated DNase* (CAD) culminando em dano ao DNA e morte celular (HOTCHKISS et al., 2009).

Via intrínseca (mitocondrial): é desencadeada em consequência de diferentes sinais de estresse intracelular, tais como danos no DNA, vírus entre outros mecanismos (HENGARTNER, 2000). Nesta via, quando os sinais de morte atingem a mitocôndria, alterações no potencial de membrana mitocondrial interna ($\Delta\Psi_m$) começam a ocorrer, gerando uma transição da permeabilidade mitocondrial (TPM), fatores estes que irão ocasionar um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), e conseqüentemente, a liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma (GRIVICICH et al., 2007). Com estas alterações, ocorre a facilitação na translocação de proteínas mitocondriais, bloqueio na síntese de ATP, além de contribuir para a ativação das caspases -9 e -3, e também facilitar a liberação do citocromo *c*. O citocromo *c* liberado da mitocôndria para o citosol associa-se com o fator 1 de ativação de proteases (APAF-1). Essa associação irá recrutar a caspase iniciadora 9, formando o complexo denominado apoptossomo. Esta é a iniciadora da cascata da caspase citocromo *c* dependente, que ativa, portanto, a caspase 3 (LI et al., 1997). O fator de indução da apoptose (AIF) e as

proteínas SMAC/Diablo também são fatores mitocondriais que podem levar a ativação da apoptose (SCHULTZ et al., 2000). Em ambas as vias (extrínseca e intrínseca), a ativação da caspase 3 é o ponto crucial e irreversível do fenômeno de morte celular. Neste estágio não há mecanismos que possam reverter a apoptose (HENGARTNER, 2000).

Figura 11. Vias extrínseca e intrínseca de apoptose. Extraído de Hengartner (2000).

A via extrínseca é ativada por moléculas, tais como CD95L que se ligam aos seus receptores de morte na superfície celular e, por meio de moléculas adaptadoras FADD, irá recrutar moléculas pró-caspase 8, resultando na sua ativação. A via intrínseca é ativada por sinais intracelulares que convergem na mitocôndria e por meio de membros da família Bcl-2, modifica a permeabilidade da membrana mitocondrial, fazendo com que essa organela libere moléculas, tais como citocromo *c* e Smac/DIABLO. Na figura, o citocromo *c* irá se associar à proteína adaptadora Apaf-1 e ativar moléculas pró-caspase 9. As duas vias de ativação irão culminar em uma rota comum de execução de apoptose, por meio da ativação de pró-caspase 3, finalmente ativando a caspase 3.



1.17 Espécies Reativas de Oxigênio e Estresse Oxidativo

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas quimicamente reativas que contêm elétrons desemparelhados (HOVATTA et al., 2010). A produção destas espécies ocorre normalmente durante as funções celulares, por exemplo, durante o consumo de oxigênio, necessário para o processo de obtenção de energia (COBB e COLE, 2015).

As EROs são produzidas principalmente pelas mitocôndrias, pelo sistema de citocromo P450, e também pela ativação de processos inflamatórios (CÁRDENAS-RODRÍGUEZ et al., 2013). Embora as espécies reativas sejam formadas normalmente durante o metabolismo para cumprir algumas ações fisiológicas, estas são extremamente reativas e instáveis, e seu efeito celular depende dos níveis de produção. Desta forma, considerando uma produção excessiva, podem ocorrer alterações celulares morfológicas e funcionais, inclusive o desbalanceamento da homeostase do cálcio intracelular (TURRENS, 2003). Existem três tipos principais de EROs: radical ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-) (APRIOKU, 2013).

O tecido nervoso possui uma intensa atividade metabólica e uma grande quantidade de lipídios e metais oxidáveis, porém uma concentração limitada de enzimas antioxidantes. Desta maneira, devido às suas características fisiológicas, este tecido torna-se mais susceptível ao dano por estresse oxidativo (COBB e COLE, 2015).

O estresse oxidativo está envolvido na epilepsia, a qual é capaz de alterar a função celular e a síntese de compostos relacionados à morte celular por convulsão (MEHVARI et al., 2016). Neste sentido, o aumento da geração de radicais livres pode resultar em disfunção mitocondrial no hipocampo, precedendo morte de células neuronais e causando subsequente epileptogênese (MÉNDEZ-ARMENTA et al., 2014). Além disso, a produção exacerbada de EROs ocasionam a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes por um mecanismo ainda não bem definido (BRANCO et al., 2013).

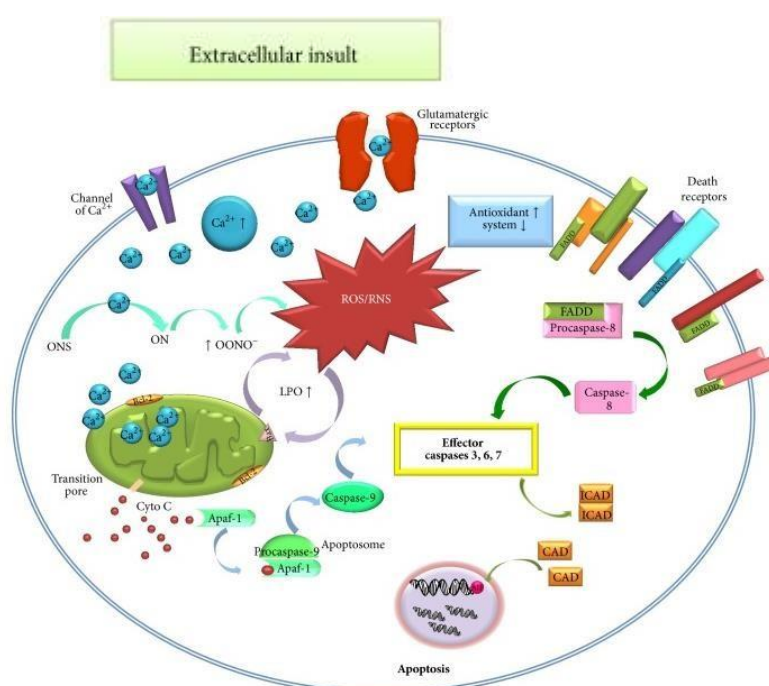
A alteração dos gradientes iônicos (Na^+ , K^+ e Ca^{2+}) pode resultar em uma hiperativação dos receptores glutamatérgicos, promovendo um aumento do influxo de Ca^{2+} na célula. A disfunção mitocondrial também pode estar envolvida no aumento do conteúdo de Ca^{2+} intracelular, estando, desta forma, relacionada com as crises epilépticas (SHIN et al., 2011). Pode-se também relacionar o aumento de Ca^{2+} com a alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial levando a liberação do citocromo *c* da mitocôndria para o citoplasma, ativando a via das caspases. Neste sentido, ocorrendo a ativação da DNase ativada por caspase (CAD),

promove-se a fragmentação do ácido desoxirribonucléico (DNA) e morte celular (MÉNDEZ-ARMENTA et al., 2014).

Em um modelo de convulsão induzido por pilocarpina, sugere-se que o dano neuronal ocorrido seja resultado da produção exacerbada de EROs, decorrentes da disfunção mitocondrial. Sugere-se esta ligação da disfunção mitocondrial e epilepsia pois alguns pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT) apresentaram deficiência mitocondrial no foco das convulsões (KUNZ et al., 2000). Nesse sentido, o aumento da produção de radicais livres tem sido implicado ao processo de epileptogênese (MARTINC et al., 2014). Além disso, estudos em modelos experimentais e em humanos também sugerem a participação do estresse oxidativo na refratariedade ao tratamento farmacológico da epilepsia (CÁRDENAZ-RODRÍGUEZ et al., 2013).

Figura 12. Modelo proposto da relação entre a apoptose e morte celular em modelos de epilepsia. Extraído de Méndez-Armenta et al. (2014).

AIF: *apoptosis-inducing factor*; Apaf 1: *apoptosis protease activating factor-1*; Bcl-2: *antiapoptotic protein*; Bax: *proapoptotic proteins*; CAD: *caspase activated DNase*; ICAD: *inhibitor of caspase activated DNase*; NOS: *nitric oxide synthase*; ON: *oxide nitric*; OONO^- : *peroxide nitrite*; LPO *lipid peroxidation*; ROS : *reactive oxygen species*; RNS: *reactive nitrogen species*; Ca^{2+} : *calcium*; FADD: *Fas-associated protein with death domain*; Cyto c: *cytochrome c*.



1.18 Superóxido dismutase (SOD)

A enzima superóxido dismutase (SOD) constitui-se de uma família de metaloproteínas responsáveis pela reação de catálise do radical ânion superóxido (O_2^-) resultando na formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (NORDBERG e ANÉR, 2001).

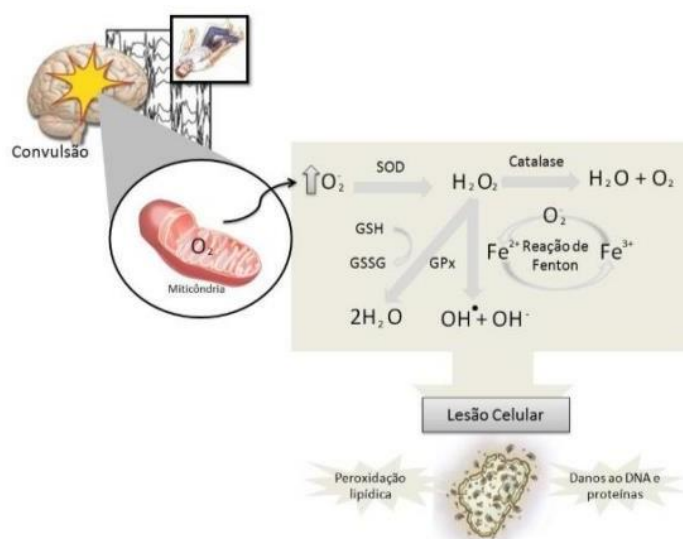
Três isoformas da SOD são conhecidas, dependendo do íon em seu sítio ativo (ZELKO et al., 2002).

- SOD1: CuZn-SOD - superóxido dismutase dependente de cobre e zinco, citosólica;
- SOD2: MnSOD - superóxido dismutase dependente de manganês, mitocondrial;
- SOD3: CuZn-SOD - superóxido dismutase dependente de cobre e zinco, extracelular.

O estresse oxidativo, que se caracteriza por um aumento desproporcional na produção de espécies reativas de oxigênio frente às defesas antioxidantes, pode mediar a destruição de organelas e membrana plasmática, contribuindo, também, para a disfunção na barreira hematoencefálica e edema tecidual (TUTTOLOMONDO et al., 2009; CECHETTI et al., 2012).

Estudos mostram que o estresse oxidativo tem um papel importante na patogênese da epilepsia devido à grande suscetibilidade do sistema nervoso às lesões causadas pelas EROs (MENON et al., 2012). O cérebro é alvo de EROs por muitas razões, incluindo a alta concentração de lipídios peroxidáveis, baixos níveis de antioxidantes protetores, alto consumo de oxigênio e altos níveis de ferro, que podem agir como agentes pró-oxidantes sob condições patológicas (SAEED et al., 2007). No cérebro, a expressão da superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD), uma enzima antioxidante importante na detoxificação de EROs, apresenta consequências cruciais em doenças neurodegenerativas (KIM et al., 2002). Neste sentido, recentemente tem-se sugerido que métodos que aumentem a expressão/atividade da MnSOD podem se conferir em estratégias válidas no tratamento de doenças ligadas ao aumento na produção de EROs pelas mitocôndrias, incluindo inúmeras condições neurológicas (HOLLEY et al., 2011), como a epilepsia.

Figura 13. Potencialização da formação de espécies reativas decorrentes da convulsão e dos danos causado pelo estresse oxidativo. Extraído de Coelho (2014).



1.19 Superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD)

A enzima MnSOD (SOD2) é codificada por um gene nuclear, sendo posteriormente transportada para o interior da mitocôndria. A forma ativa desta enzima é encontrada na matriz mitocondrial, onde exerce sua atividade antioxidante (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; MITRUNEN e HIRVONEN, 2003).

Estudos demonstram que a expressão da MnSOD é vital para a sobrevivência. De acordo com Lebovitz et al. (1996) estudos experimentais em ratos *knockout* demonstraram letalidade após o nascimento, além de alterações tais como neurodegeneração (LI et al., 1995). A sequência sinal de MnSOD é essencial para as etapas de processamento e transporte correto da enzima para a mitocôndria, porém a presença de polimorfismos nesta região é capaz de afetar a distribuição da enzima MnSOD (SUTTON et al., 2003).

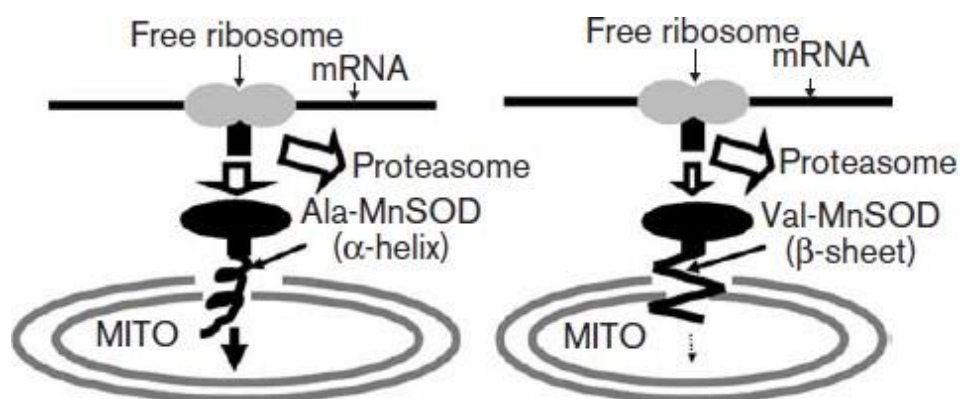
Devido ao fato de a enzima MnSOD ser uma das principais na linha de defesa antioxidante, convertendo EROs em metabólitos menos tóxicos (KALYANARAMAN, 2013), torna-se importante o estudo dos polimorfismos deste gene, pois este polimorfismo pode contribuir para uma menor eficiência da enzima codificada. Neste sentido uma especial atenção tem sido direcionada para o polimorfismo da MnSOD, principalmente pelo metabolismo mitocondrial, relacionado à regulação da apoptose celular (NOMURA et al., 1999).

1.20 Polimorfismo do gene da superóxido dismutase dependente de manganês (Ala16Val MnSOD)

A enzima SOD 2 é produzida a partir de um gene nuclear localizado no cromossomo 6, sub-região q25.3 (CHURCH et al., 1992). Inicialmente é produzido um mRNA que irá migrar para o citoplasma, com o objetivo de síntese da proteína SOD2 – a qual ainda não é funcional. A proteína SOD2 possui uma sequência polipeptídica – *mitochondrial target sequence* (MTS) a qual a direciona para o interior da mitocôndria, onde será ativada, passando então a apresentar atividade (ZELKO et al., 2002).

Existe um polimorfismo de um único nucleotídeo, do inglês *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), o qual possui como nome oficial SOD2, do inglês *superoxide dismutase 2 mitochondrial*. A substituição de alanina (Ala) por valina (Val) no 16º aminoácido (Ala16Val) da sequência-sinal da MnSOD sugere uma mudança na estrutura da proteína (SHIMODA-MATSUBAYASHI et al., 1996). O polimorfismo Ala16Val MnSOD possui os dois alelos A e V, resultando em três possíveis genótipos: AA, VV e AV (ZELKO et al., 2002). A variante A-MnSOD apresenta uma estrutura α -hélice, facilitando sua entrada para o interior da mitocôndria. No entanto, a variante V-MnSOD apresenta uma estrutura β -lâmina, acarretando em menor atividade da enzima MnSOD, visto que essa variante está parcialmente detida no poro da membrana interna mitocondrial, dificultando sua entrada (SUTTON et al., 2005).

Figura 14. Representação esquemática da importação da MnSOD, sugerindo os diferentes efeitos do polimorfismo Ala16Val MnSOD. Extraído de Sutton et al. (2005).

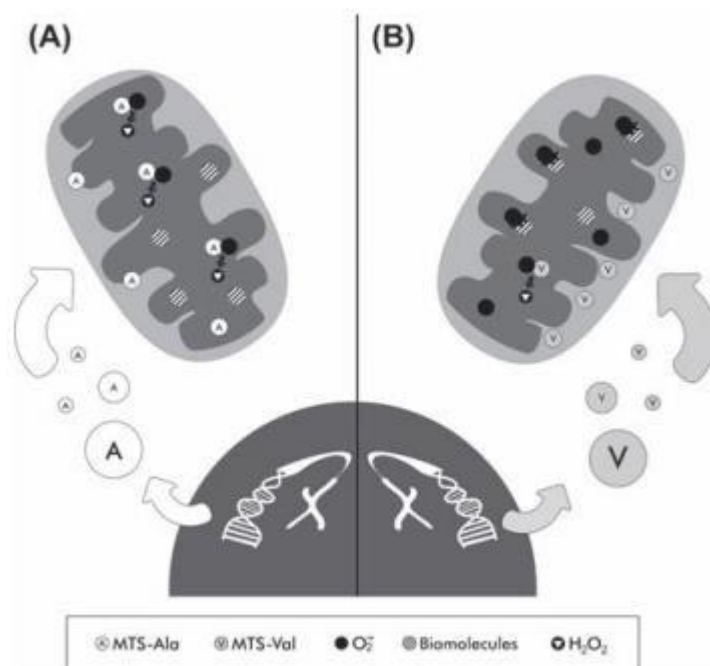


Neste sentido, os portadores do alelo V (genótipo VV) apresentam uma menor eficiência de transporte desta enzima, bem como a atividade enzimática da SOD2 no interior da mitocôndria (SUTTON et al., 2003). De acordo, um estudo realizado por Sutton et al. (2005), sugeriu que o precursor AlaSOD2 gera de 30-40% mais MnSOD eficiente quando comparado ao precursor ValSOD2. Esta diferença na eficiência enzimática relacionada ao genótipo da enzima pode resultar acarretar em disfunções e maiores riscos de doenças associadas ao estresse oxidativo (BRESCIANI et al., 2013).

Estudos sugerem o envolvimento do polimorfismo Ala16ValMnSOD com diferentes patologias estresse-oxidativo dependentes. Em alguns casos, o risco da doença associa-se ao alelo A ou genótipo AA, como nos casos de câncer de próstata (MAO et al., 2010) e câncer de mama (COX et al., 2006). Com relação ao alelo V ou genótipo VV, existem estudos relacionando com complicações do diabetes (JONES et al., 2010) e hipercolesterolemia (DUARTE et al., 2010).

Figura 15. Eficiência do transporte da MnSOD na mitocôndria de acordo com o genótipo Ala16Val MnSOD. Extraído de Bresciani et al. (2013).

MTS: *mitochondrial target sequence*



1.21 Dislipidemia e epilepsia

Estudos sugerem que pacientes em tratamento com determinadas drogas antiepilépticas podem desenvolver um risco maior de desenvolver dislipidemia (MANTEL-TEEUWISSE et al., 2001). Neste sentido, em pacientes com epilepsia, o risco de morte por doença cardiovascular é de 1,5 à 2,5 vezes maior quando comparado à população em geral (BRODIE et al., 2013). Entre as diferentes causas de morte, estudos demonstram altas incidências de doenças cardiovasculares e cerebrovasculares em pacientes com epilepsia quando comparados com a população em geral, podendo ser uma das causas do aumento da mortalidade neste grupo (OLESEN et al., 2011). Porém, a razão exata para o aumento do risco de doenças vasculares é desconhecida. No entanto, o estilo de vida e o uso de drogas antiepilépticas podem ser fatores desencadeantes (CHUANG et al., 2012).

As dislipidemias são classificadas de acordo com os dados laboratoriais (níveis séricos de colesterol e triglicérides) e conforme a etiologia. Na classificação laboratorial, pode-se classificar a dislipidemia como: a) hipercolesterolemia isolada, ou seja, o CT acima de 240 mg/dL e/ou do colesterol LDL para níveis maiores que 160 mg/dL; b) hipertrigliceridemia isolada – aumento dos níveis de TG acima de 200 mg/dL; hiperlipidemia mista – aumento dos níveis de CT associado ao aumento dos níveis de TG, a diminuição isolada do colesterol HDL abaixo de 40 mg/dL, ou, por fim, a associação destes fatores. A classificação etiológica subdivide-se em dislipidemias primárias, com origem genética e dislipidemias secundárias, as quais podem ser causadas por outras doenças ou utilização de medicamentos (XAVIER et al., 2013).

A aterosclerose é uma doença inflamatória crônica que afeta os vasos sanguíneos, abrangendo artérias de grande e médio calibre. A placa aterosclerótica é caracterizada pela presença de dislipidemia, inflamação e disfunção do complexo antioxidante, fatores estes que contribuem para o estresse oxidativo e alteração na homeostase circulatória (SCHERER e PSALTIS, 2016).

Os níveis elevados de colesterol e triglicérides, podem estar relacionados com a disfunção endotelial, aumentando a permeabilidade da camada íntima a lipoproteínas plasmáticas, contribuindo para a retenção destas no espaço subendotelial. Esta retenção induz a oxidação das partículas de LDL, formando o LDL oxidado (LDLox), o qual é considerado nocivo ao endotélio, colaborando para a produção de espécies reativas (SKILTON et al., 2007).

As espécies reativas de nitrogênio e oxigênio são produzidas pelos macrófagos, células endoteliais ou células musculares lisas, os quais são responsáveis pela oxidação do colesterol

LDL, formando o LDL_{ox} (ALBERTINI et al., 2002; GAUTIER et al., 2009). O LDL_{ox} provoca a expressão de moléculas de adesão leucocitária na superfície endotelial, e estas são responsáveis pela atração de monócitos e linfócitos para a parede arterial (LEVITAN et al., 2009). Os monócitos migram para o espaço subendotelial onde se diferenciam em macrófagos, que por sua vez captam o LDL_{ox} através de receptores específicos, ativando os linfócitos T e promovendo a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Essas citocinas causam uma maior ativação de macrófagos, ativação vascular e inflamação, estimulam a proliferação das células musculares lisas e a síntese de colágeno, as quais se agregam as células espumosas, completando a formação da placa aterosclerótica (CHAKARIDA et al., 2009; BERG et al., 2009; EMMANUEL et al., 2009).

Os linfócitos ativados passam a secretar Interleucina 1 (IL-1) a qual ativará os linfócitos T (CD4), os quais passam a secretar as citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α , IL-2 e IFN- γ , responsáveis por causarem maior ativação de macrófagos, ativação vascular e inflamação (CHARAKIDA et al., 2009). Adicionalmente, também ocorre produção de proteínas de fase aguda como proteína C reativa, α 1-glicoproteína ácida e fibrinogênio (HANSSON, 2005).

Nesse sentido, achados clínicos e experimentais inferem que os processos neuroinflamatórios, como a dislipidemia (SERRANO-CASTRO et al., 2017; LI et al., 2019) podem ter uma relação com a epilepsia (VEZZANI e GRANATA, 2005; VEZZANI et al., 2013). Acredita-se que o aumento de mediadores pró-inflamatórios esteja envolvido no comprometimento da função da barreira hematoencefálica, na neurodegeneração e na hiperexcitabilidade neuronal desenvolvida após um insulto inicial (VEZZANI e GRANATA, 2005; VEZZANI et al., 2013).

1.22 Impacto econômico da epilepsia e doenças cardiovasculares

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, os custos com as doenças cardiovasculares no Brasil em 2012 foram de 1078 dólares *per capita* (WHO, 2015). Somando-se aos custos diretos com o tratamento da epilepsia, os gastos com o tratamento das morbidades associadas deveriam ser acrescentados. As doenças cardiovasculares estão inseridas nestas morbidades (WHO, 1999).

Neste sentido, a avaliação de parâmetros lipídicos considerados fatores de risco clássicos para doença cardiovascular podem contribuir com a avaliação clínica e redução de possíveis efeitos adversos no seguimento de pacientes.

Embora evidências crescentes sugerem que variações genéticas ou polimorfismos na MnSOD (JONES et al., 2010; CHEN et al., 2012; BRESCIANI et al., 2013), podem afetar significativamente as respostas individuais em várias patologias, até o momento, nenhum estudo sobre esse polimorfismo foi realizado na epilepsia. Devido às evidências que envolvem o polimorfismo MnSOD em diferentes tipos de doenças, seria de grande importância investigar se o polimorfismo Ala16ValMnSOD está relacionado à epilepsia e se as alterações bioquímicas estão associadas a modificações no metabolismo oxidativo, inflamatório e glicolípídico.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliação de parâmetros inflamatórios, apoptóticos, estresse oxidativo, do metabolismo glicolípídico e dano ao DNA e a relação destes com polimorfismo da Ala16ValMnSOD em pacientes com epilepsia.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a influência/relação do polimorfismo genético Ala16ValMnSOD em amostras sanguíneas dos grupos controle e epilepsia sobre os seguintes parâmetros:
 - estresse oxidativo: proteína carbonilada, superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD);
 - dano ao DNA: teste do picogreen e teste cometa;
 - inflamatórios: acetilcolinesterase (AChE), interleucina 1beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α);
 - apoptóticos: caspases -1, -3 e -8;
 - metabolismo: glicemia, colesterol total, triglicerídeos, HDL e LDL;
- Analisar a relação do polimorfismo genético Ala16ValMnSOD em amostras sanguíneas do grupo epilepsia sobre os parâmetros acima citados e correlacionar com os diferentes tipos de crises epilépticas (parciais ou generalizadas);
- Analisar a relação do polimorfismo genético Ala16ValMnSOD em amostras sanguíneas do grupo epilepsia sobre os parâmetros acima citados e correlacionar com o tempo de duração das crises epilépticas;



Research paper

Involvement of MnSOD Ala16Val polymorphism in epilepsy: A relationship with seizure type, inflammation, and metabolic syndrome



Aline Kegler^{a,b}, Alexandra Seide Cardoso^a, Ana Leticia Fornari Caprara^a, Eduardo Tanuri Pascotini^{a,d}, Josi Arend^d, Patricia Gabbi^d, Marta M.M.F. Duarte^d, Ivana B.M. da Cruz^d, Ana Flavia Furian^d, Mauro Schneider Oliveira^d, Luiz Fernando Freire Royes^{b,c,d}, Michele Rechia Fighera^{a,b,c,d,*}

^a Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Neuropsiquiatria, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

^b Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

^c Centro de Educação Física e Desportos, Laboratório de Bioquímica do Exercício (BIOEX), Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

^d Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Apoptosis
Cholesterol
DNA damage
Epilepsy, inflammation, MnSOD Ala16Val polymorphism

ABSTRACT

The MnSOD Ala16Val single nucleotide polymorphism (SNP) has shown to be associated to inflammatory pathways and many metabolic disorders, such as obesity and dyslipidemia. Metabolic syndrome (MetS) is an emergent problem among patients with epilepsy. However, little is known about interaction between MnSOD Ala16Val SNP and metabolic comorbidities in epilepsy. Thus, we investigated the relationship between MnSOD Ala16Val SNP with epilepsy and its influence on MetS, inflammation, apoptosis and DNA damage parameters. Ninety subjects were evaluated (47 epilepsy patients and 43 healthy controls) by questionnaires and laboratorial exams. Levels of inflammatory, apoptotic and DNA damage markers, as well as MnSOD polymorphism were assessed. An increased proportion of VV genotype in epilepsy group when compared to control group was observed. Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Acetylcholinesterase, caspase-8, and Picogreen levels were increased in VV epilepsy group. An important correlation between TNF- α vs caspase-8, and Cholesterol vs. Triglycerides was observed in the epilepsy group with VV genotype. Our findings suggest that the MnSOD Ala16Val SNP might have an important role in epilepsy, mainly in patients with generalized seizures and particularly with VV genotype. The metabolic parameters also presented significant results in epilepsy group with VV genotype, which applying attention in view of further consequences and disorders that could be developed.

1. Introduction

Epilepsy is a chronic neurological disorder characterized by recurrent seizures and affects approximately 50 million people in the world. Studies with animal models and epilepsy patients have shown that the pathogenesis of epilepsy may be associated with glial cell dysfunction (Wetherington et al., 2008), brain vasculature (Friedman et al., 2009), and leucocyte migration (Greenwood et al., 2002). Glial cell mechanisms that promote epileptogenesis include neuronal excitability and inflammatory processes. Studies and experimental models have shown that seizure activity per se can induce brain inflammation and recurrent seizures perpetuate chronic inflammation (Vezzani et al.,

2011). Moreover, evidence suggests that antioxidant enzymes are key regulators of inflammation. Manganese superoxide dismutase (MnSOD or SOD2) is a vital enzyme for mitochondrial survival and related to both anti-inflammatory and antioxidant modulation. It is the first in a chain of enzymes that mediate reactive oxygen species (ROS) generated by the partial reduction of O₂ (Li and Zhou, 2011). A single gene encodes MnSOD, which is located in chromosome 6q25. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been described with Ala16Val (rs4880) and are one of the most studied polymorphisms in the SOD2 gene. In this SNP, alanine (Ala) changes to valine (Val) at the 16th amino acid (Ala16Val) of the signal sequence. This SNP has been shown to cause conformational changes in the target sequence of MnSOD, which

Abbreviations: AChE, Acetylcholinesterase; AA, Alanine/Alanine; AV, Alanine/Valine; CHO, Cholesterol; MnSOD, Manganese Superoxide Dismutase; TNF- α , Tumor Necrosis Factor- α ; TRI, Triglycerides; VV, Valine/Valine

* Corresponding author at: Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Neuropsiquiatria, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil.

E-mail address: mrfighera@yahoo.com.br (M.R. Fighera).

<https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.06.014>

Received 16 October 2018; Received in revised form 15 April 2019; Accepted 10 June 2019

Available online 15 June 2019

0378-1119/ © 2019 Published by Elsevier B.V.

reduces MnSOD effectiveness, mainly in Val allele carriers (Sutton et al., 2005).

In epilepsy, there is a complex cascade of molecular and cellular mechanisms involved in cell death, excitotoxicity, oxidative stress, and inflammation (Aronica and Crino, 2011; Puttachary et al., 2015; Wang and Qin, 2010).

In fact, microglia cells can be rapidly activated in seizures (Yang et al., 2010). This activation may lead to inflammatory cytokine production, including TNF- α (Vezzani and Granata, 2005). TNF- α is an immunomodulatory molecule known to be implicated in many neurological diseases (Lucas et al., 2006), such as epilepsy (Vezzani and Granata, 2005). Immune responses within the CNS and systemic inflammatory events play important roles in the onset and progression of seizures, providing new immune-based approaches as future treatment strategies in epilepsy (Guo and Janigro, 2013). In fact, the elevation of soluble TNF (solTNF) may be a hallmark of acute and chronic neuroinflammation as well as a number of neurodegenerative conditions (McCoy and Tansey, 2008). Some studies also have reported a link between inflammatory pathways and cholinergic signaling, suggesting that cholinesterase activity reflects the intensity of neuroinflammatory responses in neurological diseases (Kalb et al., 2013).

Another point of particular interest is the intermediary role of signal transduction of TNF- α after ligation to its receptor. With the increasing understanding of intracellular death circuitry initiated by TNF- α , the exact role of inflammatory signaling pathways is now believed to be far more complicated than originally thought. Some important findings have highlighted the critical role of inflammation, notably in TNF- α -mediated activation of cell death pathways (Gozzelino et al., 2008). Increased TNF- α levels may exacerbate ligation to TNF- α receptors, leading to executioner caspase activation, i.e.: Caspase-8 (Micheau and Tschoop, 2003), which is an apical caspase activated by seizures (Meller et al., 2006). In fact, seizures may induce the activation of biochemical pathways associated with apoptosis, leading to neural (Meller et al., 2006) and DNA damage (Budihardjo et al., 1999). However, the role of inflammatory and apoptotic pathways in epilepsy is not well established.

Increasing evidence suggests that genetic variations or polymorphisms may significantly affect individual responses to adverse effects. To date, studies have demonstrated the role of Ala16Val MnSOD SNP in many diseases (Bresciani et al., 2013; Chen et al., 2012; Jones et al., 2010), although no study on polymorphism has been performed in epilepsy. Because of the evidence implicating MnSOD polymorphism in different kinds of diseases, the present study aimed to investigate whether Ala16ValMnSOD polymorphism is related to epilepsy and if biochemistry alterations are associated with TNF- α , Caspase-8, and DNA damage.

2. Methods

2.1. Study population

We performed a case-control study with a total of ninety participants: 43 healthy age- and gender-matched participants (control group) and 47 epilepsy patients (epilepsy group) from Neurologic Clinic from the Hospital of Federal University of Santa Maria (HUSM-Brazil). All patients and controls were evaluated using a questionnaire to determine clinical history. No etiology was found after detailed history, physical, laboratory, and imaging studies. Major exclusion criteria were a history of autoimmune, liver, kidney and inflammatory diseases, allergic response, immune deficiency disorder, diabetes, psychiatric illness, malignancy, severe cognitive impairment, or a systemic or central nervous system (CNS) infection 2 weeks before sample collection. Epilepsy was diagnosed by two experienced neurologists according to the 2010 International League Against Epilepsy (ILAE) Classification (Berg et al., 2010). All patients were evaluated for seizure frequency using seizure diaries (Cramer and French, 2001). Afterwards, the

epilepsy patients and healthy subjects received a protocol number. Blood samples were identified with the protocol number of each individual. The study protocol was approved by the local institutional review boards at the authors' affiliated institutions. Informed consent was obtained from all the subjects or their legal guardians. The work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki).

2.2. Epilepsy group

The seizure type from epilepsy group (n = 47) was confirmed through interviews with patients and their relatives as well as EEG analysis and tomography or magnetic resonance imaging. Data on seizure frequency and status of seizure control with medication were also obtained. Forty-five patients were in remission except for two patients who were diagnosed with refractory epilepsy. All epilepsy patients had normal neurological examinations except for one who presented tetra paresis secondary to spinal cord lesion. Forty-six patients had normal 1.5 T MRI imaging; one patient had right and left hippocampal sclerosis.

2.3. Control group

For comparison, 43 healthy subjects were recruited, respecting the mean age and sex from epileptic group.

2.4. Laboratory analyses

Samples were collected at least 7 days from the last seizure. In this study, our patients were seizure-free at least 7 days from the last seizure (Mao et al., 2013). After 12 h of overnight fasting, blood samples were collected by venipuncture using purple, green, and red top Vacutainer® (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), heparin or no anticoagulants, respectively. The specimens were routinely centrifuged within 1 h of collection for 15 min at 2500g. Aliquots of the serum samples and supernatant were saved and stored at -80 °C for subsequent laboratory analysis according to specific methods.

2.5. TNF- α determination

The levels of TNF- α (eBIOSCIENCE, San Diego, USA) were measured in serum by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) as instructed by the manufacturers.

2.6. AChE determination

The AChE enzyme concentration was measured in serum by standard enzymatic methods using Ortho-Clinical Diagnostics® reagentes in automated analyzer (Vitros 950® dry chemistry system; Johnson & Johnson, Rochester, NY).

2.7. Caspase-8 determination

Caspase-8 activity was determined in serum by Assay Kits, Fluorimetric (BioVision, Mountain View, CA).

2.8. Picogreen analysis

The DNA damage was measured through the Picogreen test. The Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent (Invitrogen®) is a fluorescent reagent ultra-sensible for quantification DNA ribbons doubles in solution, which can detect very small concentrations of DNA up to 25 pg/ml. This technique can be used for the quantification of DNA released into the middle due to cell apoptosis and to genotoxicity when you use the pure DNA molecule exposed to a particular compound. The

technique was applied as described by Ha et al., 2011.

2.9. Ala16ValMnSOD polymorphism analysis

The Ala16ValMnSOD polymorphism genotyping was performed using the Polymerase Chain Reaction followed by the Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) techniques. Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using a DNA Mini Kit Purification (Mo Bio). MnSOD Ala16Val SNP was detected by PCR-RFLP according to [Taufers et al. \(2005\)](#) PCR amplifications were performed in a total volume of 50 μ l containing 5 μ l of $10\times$ buffer, 1 μ l of 25 mM MgCl₂, 1.25 μ l of 10 mM dNTP, 0.5 μ l of Taq Polymerase (Gibco Inc., Co.), 1 μ l of each primer (40 pmol), 3 μ l of genomic DNA (0.25 μ g), and 34.5 μ l of ddH₂O. The amplification primers (Gibco Inc., Co.) for a 110-bp fragment of the human MnSOD gene were 5'-ACCAGCAGGCAGCTGGCGCCG-3' (sense strand) and 5'-GCGTTGATGTGAGGTCCAG-3' (antisense strand) with the following thermocycler parameters: an initial cycle of 95 °C for 5 min followed by 35 cycles at 95 °C for 1 min and 61 °C for 1 min. The final cycle was followed by an extension period of 2 min at 72 °C. The PCR product (10 μ l) was digested with *Hae* III (15 U; 37 °C, 6 h, Gibco. Inc., Co.). Digested products (23 and 85 bp) were visualized on a 4% agarose gel (Amersham Biosciences Inc., Co.) stained with ethidium bromide. A mutation was introduced by a primer mismatch to create a restriction cut site for *Hae* III in the -9 codon, and the following genotypes were observed: -9Ala/Ala (23 and 85 bp); -9Ala/Val (23, 85 and 110 bp); and -9Val/Val (110 bp).

2.10. Statistical analysis

Data were analyzed by analysis of variance (two-way ANOVA) followed by Tukey's Multiple Comparison Test. Statistical analysis were performed using the SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) software in a PC-compatible computer. Correlation analyses were carried out using the Pearson correlation coefficient. Statistical significance was assumed when $p < 0.05$. Chi-square test was used for calculate genotype frequencies, sex, and age ([Tables 1 and 2](#)).

3. Results

3.1. Study population

The characteristics of the study population are described in [Table 1](#). In according to Chi-square analysis, no statistically difference was observed between epilepsy group and control group relating with sex ($p = 0.52$) and age ($p = 0.69$). Genotype frequency for the MnSOD gene Ala16Val polymorphism is presented in [Table 2](#). The genotype frequencies in epilepsy group were 31.9% for AA, 21.2% for AV, and 46.8% for VV. The frequencies for AA, AV, and VV genotypes were 39.5%, 32.5%, and 27.9% in control group, respectively. In according to Chi-square analysis, no statistically difference in genotype

Table 1
Characteristics of epilepsy and control groups.

Characteristic	Epilepsy group (n = 47)	Control group (n = 43)	p Value
Sex			
Male	22 (46.8%)	23 (53.4%)	$p = 0.52$
Female	25 (53.1%)	20 (46.5%)	
Mean age (years old)			
Male	36.5	39.6	$p = 0.69$
Female	33.6	42.5	
Mean period of onset (years old)	8 (23,25%)	-	
Antiepileptic drugs (AEDs)			
Monotherapy	15 (31.9%)		
Polytherapy	32 (68.1%)		

Table 2
MnSOD Ala16Val genotype frequencies in epilepsy and control groups.

MnSOD SNP	Epilepsy (%)	Control (%)	p Value
Genotypes			
AA	15 (31.9)	17 (39.5)	$p = 0.16$
AV	10 (21.2)	14 (32.5)	
VV	22 (46.8)	12 (27.9)	

frequencies of Ala16Val MnSOD polymorphism was observed between epilepsy group and control group ($p = 0.16$).

3.2. Elevated inflammatory, apoptotic parameters, and DNA damage marker are related with Ala16ValMnSOD polymorphism

The epilepsy group presented increased levels of TNF- α [F(2,72) = 8.4; $p < 0.0005$] and increased AChE activity [F(2,77) = 3.7; $p < 0.05$] when compared to control group. Besides, Post hoc analysis demonstrated that VV genotype of epilepsy group presented increased levels of TNF- α and AChE when compared to AA genotype from epilepsy group ($q = 5.6$; $q = 10.0$, respectively) and control group ($q = 15.8$; $q = 14.3$, respectively) ([Fig. 1](#)).

The epilepsy group demonstrated increased levels of caspase 8 when compared to control group [F(2,75) = 4.5; $p < 0.01$]. Post hoc analysis demonstrated that VV genotype of epilepsy group exhibited increased caspase-8 activation when compared to AA genotype from epilepsy ($q = 4.3$) and control ($q = 23.0$) group ([Fig. 2](#)).

The epilepsy group demonstrated increased levels of Picogreen when compared to control group [F(2,73) = 4.1; $p < 0.05$]. Post hoc demonstrated that the VV genotype exhibited increased Picogreen levels when compared to AA genotype from epilepsy ($q = 4.9$) and control ($q = 9.1$) group ([Fig. 3](#)).

3.3. Inflammatory, apoptotic, and DNA damage parameters are correlated with Ala16ValMnSOD polymorphism in the epilepsy group

The statistical analysis demonstrated an important correlation among Ala16ValMnSOD polymorphism (VV genotype): TNF- α vs. caspase 8 ($r = 0.51$; $p < 0.05$) and TNF- α vs. Picogreen ($r = 0.59$; $p < 0.05$) ([Table 3](#)). We did not observe significant correlation among other genotype and biochemistry parameters (data not shown).

3.4. Inflammatory and apoptotic parameters are correlated with Ala16ValMnSOD polymorphism in the epilepsy group with generalized seizures

The epilepsy group which presented generalized seizures demonstrated an interesting correlation among Ala16ValMnSOD polymorphism (VV genotype): TNF- α vs. caspase-8 ($r = 0.7$; $p < 0.05$) ([Table 3](#)). We did not observe significant correlation among other genotype and biochemistry parameters (data not shown).

3.5. Elevated metabolic parameter is related with Ala16ValMnSOD polymorphism in the epilepsy group

The epilepsy group presented increased levels of CHO [F(1,64) = 63.08; $p < 0.0001$] when compared to control group. Besides, Post hoc analysis demonstrated that the epilepsy group (AA, AV and VV genotypes) presented increased levels of CHO when compared to their respective control group ($q = 11.66$; $q = 4.63$; $q = 4.94$) respectively. (Data not shown).

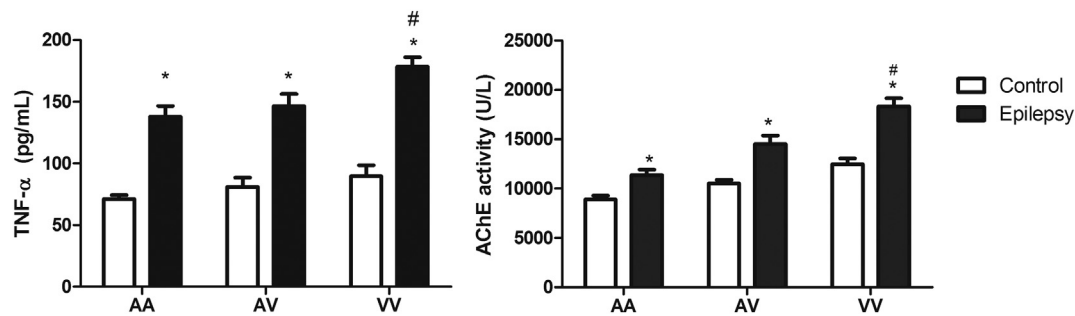


Fig. 1. Comparison of Ala16ValMnSOD polymorphism genotypes (AA, AV, and VV) from control and epilepsy groups in relation to inflammatory markers. The epilepsy group presented increased levels of TNF-α and increased AChE activity when compared to control group. *p < 0.05 when compared to respective control group; #p < 0.05 when compared the epilepsy group (VV genotype vs. AA genotype).

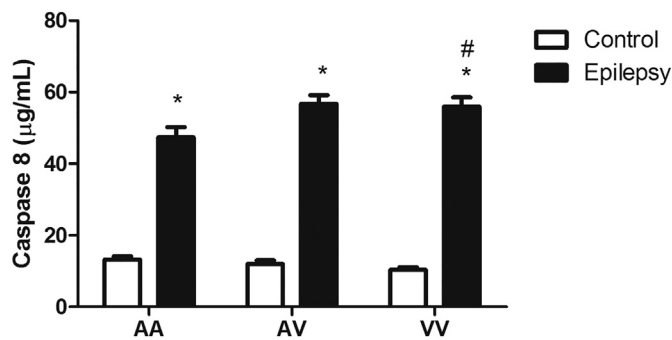


Fig. 2. Comparison of Ala16ValMnSOD polymorphism genotypes (AA, AV, and VV) from control and epilepsy groups in relation to caspase 8. The epilepsy group presented increased levels of caspase 8 when compared to control group. *p < 0.05 when compared to respective control group; #p < 0.05 when compared the epilepsy group (VV genotype vs. AA genotype).

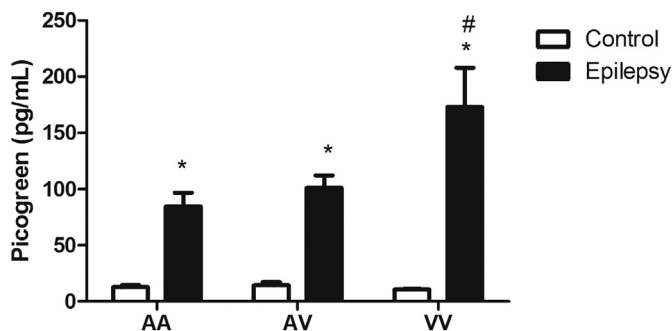


Fig. 3. Comparison of Ala16ValMnSOD polymorphism genotypes (AA, AV, and VV) from control and epilepsy groups in relation to DNA damage - Picogreen. The epilepsy group presented increased Picogreen levels when compared to control group. *p < 0.05 when compared to respective control group; #p < 0.05 when compared the epilepsy group (VV genotype vs. AA genotype).

Table 3

Correlation among inflammatory, apoptotic, and DNA damage parameters with VV genotype in the epilepsy group and epilepsy group with generalized seizures.

Correlation	r Value	p Value
VV genotype – epilepsy group		
TNF-α vs. Caspase-8	0.51	0.03
TNF-α vs. Picogreen	0.59	0.02
VV genotype – epilepsy group (generalized seizures)		
TNF-α vs. Caspase-8	0.75	0.01

3.6. Metabolic parameter is correlated with Ala16ValMnSOD polymorphism in the epilepsy group

The statistical analysis demonstrated in the epilepsy group, an important correlation among Ala16ValMnSOD polymorphism (VV genotype): CHO vs. TRI (r = 0.6; p < 0.01) (Data not shown). However, we did not observe significant correlation among other genotype and biochemistry parameters (data not shown).

4. Discussion

A new finding in this study is the important role of Ala16ValMnSOD polymorphism on inflammatory (TNF-α, AChE), apoptotic (Caspase 8), and DNA damage (Picogreen) parameters in the peripheral blood of epilepsy patients. Interestingly, we found that the VV genotype of epilepsy patients presented correlation with TNF-α, Caspase-8, and Picogreen levels, which suggests that the genotype may be related to major inflammatory responses and DNA damage in epilepsy patients.

The TNF-α elicits a particularly broad spectrum of cellular responses, such as apoptosis (Baud and Karin, 2001) and cell death (Thompson et al., 2011). By subsequently binding to the TNF-α receptor (TNFR1), TNF-α is able to induce apoptosis by Caspase-8 activation through the extrinsic pathway (Wang et al., 2008), leading to DNA damage (Budihardjo et al., 1999). In this sense, our findings suggest that Caspases-8 may be activated by an initial inflammatory response triggered by seizures and TNF-α release, culminating in DNA damage (Picogreen).

In fact, clinical and animal findings support significant involvement of inflammatory processes in epilepsy (Vezzani and Granata, 2005) since cytokines have increase synthesis during epileptic activity (Choi and Koh, 2008). TNF-α is an inflammatory factor whose expression is upregulated after seizures (Minami et al., 1991; Probert et al., 1997) and is mainly released by microglia in the brain (Renno et al., 1995). Furthermore, Fabene et al. (2010) demonstrated that cytokines, such as TNF-α, are found in other different biological specimens including cerebrospinal fluid (CSF) and peripheral blood mononuclear cells and plasma of epilepsy patients. In agreement, Gouveia et al. (2015) found elevated TNF-α levels in the blood of rats submitted to the pilocarpine model. Gao et al. (2016) also demonstrated increased TNF-α levels in the plasma of epilepsy patients, corroborating with our results. Interestingly, a correlation among inflammation, apoptosis, and DNA damage in epilepsy patients was also found in the present work. Nevertheless, regarding inflammation and epilepsy, another interesting factor is the role of acetylcholinesterase (AChE) (Kish et al., 1988; Nizri et al., 2006). This enzyme plays an important part in immune responses by rapidly hydrolyzing the neurotransmitter acetylcholine (ACh), which is known to suppress proinflammatory cytokine production (Borovikova et al., 2000; Kawashima and Fujii, 2003). In fact, AChE inhibitors reduce proinflammatory cytokine secretion (i.e TNF-α, IL-1β, and INF-γ) and may attenuate inflammation by increasing ACh concentration in

extracellular spaces (Nizri et al., 2006). In our study, increased AChE activity was observed in epilepsy patients, suggesting that this alteration may lead to decreased ACh levels, contributing to the proinflammatory status. According to our data, Kish et al. (1988) demonstrated increased AChE activity in surgical specimens after temporal lobectomy for intractable epilepsy. Additionally, Gnatek et al. (2012) reported increased AChE mRNA expression in mice 48 h after *status epilepticus*.

Despite the role of the cholinergic system in epilepsy still being unclear, alterations in AChE activity support the view that this system contributes to regulating immune responses (Shaked et al., 2009). In line of this, studies suggest that AChE directly antagonizes vagal cholinergic signaling at macrophage levels, promoting a systemic inflammatory and apoptotic effect (Borovikova et al., 2000; Kawashima and Fujii, 2003). In fact, the loss of cholinergic neurons is associated with the occurrence of seizures and mental retardation in some diseases, such as congenital ornithine transcarbamylase deficiency (Ratnakumari et al., 1994).

Moreover, another particular and interesting piece of data found here corresponds to the association of Ala16ValMnSOD polymorphism (VV genotype) with inflammatory and apoptotic factors.

The human MnSOD gene express a polymorphism localized in exon 2 Val16Ala variation (rs 4880). It results in a valine (Val) to alanine (Ala) substitution, causing a conformational change from a β -sheet to an α -helix. The Ala variant is more efficiently imported into mitochondria than the Val variant, resulting in a 30–40% increase in mitochondrial SOD activity (Sutton et al., 2003). The VV (Val/Val) genotype was proposed to be related to some diseases, including non-alcoholic steatohepatitis (Namikawa et al., 2004), metabolic disorders, and their complications (Chen et al., 2012; Jones et al., 2010). However, no published studies of the association between Ala16ValMnSOD polymorphism with epilepsy were found. Thus, this is the first study of the potential effect of Ala16ValMnSOD polymorphism on inflammatory and apoptotic parameters in epilepsy patients. Our results demonstrate significant increased levels of the analyzed parameters (TNF- α , caspase-8, and Picogreen) when compared epilepsy group (VV genotype) to patients with AA genotype in the epilepsy and control groups (AA, AV, and VV).

According to several authors, MnSOD is an anti-inflammatory enzyme (Droy-Lefaix et al., 1991; Salvemini et al., 1996; Li and Zhou, 2011). This contributes to the understanding that the presence of Val allele affects the cellular action of MnSOD, compromising mitochondria behavior (Bresciani et al., 2013), which may be associated to the increased parameters (TNF- α , caspase-8, and Picogreen) observed here.

Knowing that epilepsy patients demonstrated increased levels of inflammatory and apoptotic parameters, this study also analyzed the association of Ala16ValMnSOD polymorphism (VV genotype) with TNF- α and Caspase-8 in epilepsy patients with generalized seizures.

In this manner, a correlation of Ala16ValMnSOD polymorphism (VV genotype) with TNF- α and Caspase-8 (Table 3) in epilepsy patients with generalized seizures was found. In fact, some authors describe that inflammatory activity is worse in generalized seizures (Lehtimäki et al., 2004, 2007), which corroborates with our results. A possible explanation is that generalized seizures may cause changes in the nervous tissue microenvironment, resulting in cytokines glial cell release (Lehtimäki et al., 2007) and caspase pathways activation (Skeldon et al., 2014). Regarding generalized seizures, it is possible that these changes are widespread throughout the nervous system (Woermann et al., 1998), resulting in more robust increases of these parameters in the peripheral blood.

Results also revealed increased levels of CHO in the epilepsy group (VV) when compared to control group (AA, AV, and VV). A correlation between CHO vs. TRI levels in the epilepsy group (VV) was also observed, corroborating with studies that already associated the VV genotype with hypercholesterolemia (Duarte et al., 2010). Indeed, Adibhatla and Hatcher (2008) reported that neuronal injury in epileptic

seizures affects cholesterol homeostasis in the brain. Although there is no relevant published work involving MnSOD polymorphism with epilepsy, Flores et al. (2017) demonstrated the relation between MnSOD and metabolic markers in post-stroke patients. Together with the present data, it is possible to propose that genetic polymorphism may be related to increased inflammatory and lipid levels in epilepsy patients, contributing to increased cardio and neurovascular risks in this group. These data have considerable clinical importance since V allele carries (VV genotype) when compared to A allele (AA genotype) people are more resistant to statin treatment (Duarte et al., 2016).

5. Conclusion

In conclusion, our results suggest that the Ala16ValMnSOD polymorphism has an important association with inflammatory, apoptotic and metabolic parameters in epilepsy patients. Therefore, since patients (VV genotype) have a less MnSOD efficiency, they maybe could present more susceptibility to establish inflammatory disorders and vascular complications. However, this proposal is speculative and more studies are required to investigate this relation in a larger population.

Declaration of Competing Interest

The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Acknowledgments

The work was supported by CNPq (grant: 500120/2003-0), M.R. Figuera, L.F. F. Royes, I. B. M da Cruz, are the recipients of CNPq fellowships. The A. Kegler and E. T. Pascotini are the recipient of CAPES fellowships.

Author's contribution

All authors contributed equally in the study. All authors read and approved the final manuscript.

References

- Adibhatla, R.M., Hatcher, J.F., 2008 Apr. Altered lipid metabolism in brain injury and disorders. *Subcell Biochem* 49, 241–268 (PubMed PMID: 18751914).
- Aronica, E., Crino, P.B., 2011. Inflammation in epilepsy: clinical observations. *Epilepsia* 52 (Suppl. 3), 26–32 May. (PubMed PMID: 21542843).
- Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol.* 2001 Sep;11(9):372–7. PubMed PMID: (11514191).
- Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W., et al., 2010. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE commission on classification and terminology, 2005–2009. *Epilepsia* 51 (4), 85–676.
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature.* 2000 May 25;405(6785):458–62. PubMed PMID: (10839541).
- Bresciani G, Cruz IB, de Paz JA, Cuevas MJ, Gonzalez-Gallego J. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. *Free Radic. Res.* 2013 Oct;47(10):781–92. PubMed PMID: (23952573).
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1999;15:269–90. PubMed PMID: (10611963).
- Chen H, Yu M, Li M, Zhao R, Zhu Q, Zhou W, et al. Polymorphic variations in manganese superoxide dismutase (MnSOD), glutathione peroxidase-1 (GPX1), and catalase (CAT) contribute to elevated plasma triglyceride levels in Chinese patients with type 2 diabetes or diabetic cardiovascular disease. *Mol. Cell. Biochem.* 2012 Apr;363(1–2):85–91. PubMed PMID: (22167619).
- Choi, J., Koh, S., 2008. Role of brain inflammation in epileptogenesis. *Yonsei Med. J.* 49 (1), 1–18 Feb 29. (PubMed PMID: 18306464. PubMed Central PMCID: 2615265).
- Cramer JA, French J. Quantitative assessment of seizure severity for clinical trials: a review of approaches to seizure components. *Epilepsia.* 2001 Jan;42(1):119–29. PubMed PMID: (11207795).
- Droy-Lefaix, M.T., Drouet, Y., Geraud, G., Hosford, D., Braquet, P., 1991. Superoxide dismutase (SOD) and the PAF-antagonist (BN 52021) reduce small intestinal damage induced by ischemia-reperfusion. *Free Radic. Res. Commun.* 12-13 (Pt 2), 725–735 (PubMed PMID: 2060844).

- Duarte MM, Moresco RN, Duarte T, Santi A, Bagatini MD, Da Cruz IB, et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. *Clin. Biochem.* 2010 Sep;43(13-14):1118-23. PubMed PMID: (20627099).
- Duarte T, Da Cruz IB, Barbisan F, Capelletto D, Moresco RN, Duarte MM. The effects of rosuvastatin on lipid-lowering, inflammatory, antioxidant and fibrinolytic blood biomarkers are influenced by Val16Ala superoxide dismutase manganese-dependent gene polymorphism. *Pharmacogenomics J.* 2016 Nov;16(6):501-506. PubMed PMID: (26882122).
- Fabene PF, Bramanti P, Constantin G. The emerging role for chemokines in epilepsy. *J. Neuroimmunol.* 2010 Jul 27;224(1-2):22-7. PubMed PMID: (20542576).
- Flores AE, Pascotini ET, Kegler A, Gabbi P, Bochi GV, Barbisan F, et al. ALA16VAL-MnSOD gene polymorphism and stroke: association with dyslipidemia and glucose levels. *Gene.* 2017 Sep 5;627:57-62. PubMed PMID: (28552711).
- Friedman A, Kaufer D, Heinemann U. Blood-brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: novel targets for the prevention of epilepsy. *Epilepsy Res.* 2009 Aug;85(2-3):142-9. PubMed PMID: 19362806. Pubmed Central PMCID: (3615244).
- Gao, F., Gao, Y., Zhang, S.J., Zhe, X., Meng, F.L., Qian, H., et al., 2017. Alteration of plasma cytokines in patients with active epilepsy. *Acta Neurol. Scand.* 135, 663-669. <https://doi.org/10.1111/ane.12665>. Epub 2016 Sep 4.
- Gnatek, Y., Zimmerman, G., Goll, Y., Najami, M., Soreg, H., Friedman, A., 2012. Acetylcholinesterase loosens the brain's cholinergic anti-inflammatory response and promotes epileptogenesis. *Front. Mol. Neurosci.* 15 (5), 66 May. (PubMed PMID: 22639569).
- Gouveia, T.L., Vieira de Sousa, P.V., de Almeida, S.S., Nejm, M.B., Vieira de Brito, J.M., Cysneiros, R.M., et al., 2015. High serum levels of proinflammatory markers during epileptogenesis. Can omega-3 fatty acid administration reduce this process? *Epilepsy Behav.* 51, 300-305 Oct. (PubMed PMID: 26318793).
- Gozzelino, R., Sole, C., Llecha, N., Segura, M.F., Moubarak, R.S., Iglesias-Guimaraes, V., et al., 2008. BCL-XL regulates TNF-alpha-mediated cell death independently of NF-kappaB, FLIP and IAPs. *Cell Res.* 18 (10), 1020-1036 Oct. (PubMed PMID: 18591962).
- Greenwood, J., Etienne-Manneville, S., Adamson, P., Couraud, P.O., 2002. Lymphocyte migration into the central nervous system: implication of ICAM-1 signalling at the blood-brain barrier. *Vasc. Pharmacol.* 38 (6), 315-322 Jun. (PubMed PMID: 12529926).
- Gou, K., Janigro, D., 2013. New immunological approaches in treating and diagnosing CNS diseases. *Pharm. Patent Anal.* 2 (3), 71-361 PubMed PMID: 24237062. Pubmed Central PMCID: (3900298).
- Ha, T.T., Huy, N.T., Murao, L.A., Lan, N.T., Thuy, T.T., Tuan, H.M., Nga, C.T., Tuong, V.V., Dat, T.V., Kikuchi, M., Yasunami, M., Morita, K., Huong, V.T., Hirayama, K., 2011 Oct. Elevated levels of cell-free circulating DNA in patients with acute dengue virus infection. *PLoS One* 6 (10), e259-69 (PubMed PMID: 22016795).
- Jones DA, Prior SL, Tang TS, Bain SC, Hurel SJ, Humphries SE, et al. Association between the rs4880 superoxide dismutase 2 (C > T) gene variant and coronary heart disease in diabetes mellitus. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2010 Nov;90(2):196-201. PubMed PMID: (20728955).
- Kalb, A., von Haefen, C., Siffringer, M., Tegethoff, A., Paeschke, N., Kostova, M., et al., 2013. Acetylcholinesterase inhibitors reduce neuroinflammation and -degeneration in the cortex and hippocampus of a surgery stress rat model. *PLoS One* 8 (5), e62679 (PubMed PMID: 23671623. Pubmed Central PMCID: 3643957).
- Kawashima K, Fujii T. The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. *Life Sci.* 2003 Dec 26;74(6):675-96. PubMed PMID: (14654162).
- Kish, S.J., Olivier, A., Dubeau, F., Robitaille, Y., Shermin, A.L., 1998. Increased activity of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in actively epileptic human cerebral cortex. *Epilepsy Res.* 2 (4), 227-231 Jul-Aug.
- Lehtimäki KA, Keranen T, Huhtala H, Hurme M, Ollikainen J, Honkaniemi J, et al. Regulation of IL-6 system in cerebrospinal fluid and serum compartments by seizures: the effect of seizure type and duration. *J. Neuroimmunol.* 2004 Jul;152(1-2):121-5. PubMed PMID: (15223244).
- Lehtimäki KA, Keranen T, Palmio J, Makinen R, Hurme M, Honkaniemi J, et al. Increased plasma levels of cytokines after seizures in localization-related epilepsy. *Acta Neurol. Scand.* 2007 Oct;116(4):226-30. PubMed PMID: (17824899).
- Li, C., Zhou, H.M., 2011. The role of manganese superoxide dismutase in inflammation defense. *Enzym. Res.* 2011, 387176 (PubMed PMID: 21977313. Pubmed Central PMCID: 3185262).
- Lucas, S.M., Rothwell, N.J., Gibson, R.M., 2006. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br. J. Pharmacol.* 147 (Suppl. 1), S232-S240 Jan. (PubMed PMID: 16402109. Pubmed Central PMCID: 1760754).
- Mao, L.Y., Ding, J., Peng, W.F., Ma, Y., Zhang, Y.H., Fan, W., 2013 Sep. Interictal interleukin-17A levels are elevated and correlate with seizure severity of epilepsy patients. *Epilepsia* 54 (9), e142-e145 (PubMed PMID: 23944193).
- McCoy MK, Tansey MG. TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J. Neuroinflammation.* 2008 Oct 17;5:45. PubMed PMID: 18925972. Pubmed Central PMCID: (2577641).
- Meller R, Clayton C, Torrey DJ, Schindler CK, Lan JQ, Cameron JA, et al. Activation of the caspase 8 pathway mediates seizure-induced cell death in cultured hippocampal neurons. *Epilepsy Res.* 2006 Jul;70(1): 3-14. PubMed PMID: (16542823).
- Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor-1 mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell.* 2003 Jul 25;114(2):181-90. PubMed PMID: (12887920).
- Minami, M., Kuraishi, Y., Satoh, M., 1991. Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 beta, IL-6, TNF alpha and LIF in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176 (2), 593-598 Apr 30. (PubMed PMID: 1709015).
- Namikawa C, Shu-Ping Z, Vyselaar JR, Nozaki Y, Nemoto Y, Ono M, et al. Polymorphisms of microsomal triglyceride transfer protein gene and manganese superoxide dismutase gene in non-alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* 2004 May;40(5):781-6. PubMed PMID: (15094225).
- Nizri E, Hamra-Amity Y, Sicsic C, Lavon I, Brenner T. Anti-inflammatory properties of cholinergic up-regulation: a new role for acetylcholinesterase inhibitors. *Neuropharmacology.* 2006 Apr;50(5):540-7. PubMed PMID: (16336980).
- Probert L, Akassoglou K, Kassiotis G, Pasparakis M, Alexopoulou L, Kollias G. TNF-alpha transgenic and knockout models of CNS inflammation and degeneration. *J. Neuroimmunol.* 1997 Feb;72(2):137-41. PubMed PMID: (9042105).
- Puttachary, S., Sharma, S., Stark, S., Thippeswamy, T., 2015. Seizure-induced oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Biomed. Res. Int.* 2015, 745613 (PubMed PMID: 25650148. Pubmed Central PMCID: 4306378).
- Ratnakumari L, Qureshi IA, Butterworth RF. Regional amino acid neurotransmitter changes in brains of spf/Y mice with congenital ornithine transcarbamylase deficiency. *Metab. Brain Dis.* 1994 Mar;9(1):43-51. PubMed PMID: (7914668).
- Renno, T., Krakowski, M., Piccirillo, C., Lin, J.Y., Owens, T., 1995. TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. *J. Immunol.* 154 (2), 944-953 Jan 15. (PubMed PMID: 7814894).
- Salvemini D, Wang ZQ, Bourdon DM, Stern MK, Currie MG, Manning PT. Evidence of peroxynitrite involvement in the carrageenan-induced rat paw edema. *Eur. J. Pharmacol.* 1996 May 15;303(3):217-20. PubMed PMID: (8813572).
- Shaked I, Meerson A, Wolf Y, Avni R, Greenberg D, Gilboa-Geffen A et al. MicroRNA-132 potentiates cholinergic anti-inflammatory signaling by targeting acetylcholinesterase. *Immunity.* 2009 Dec 18;31(6):965-73. PubMed PMID: (20005135).
- Skeldon AM, Faraj M, Saleh M. Caspases and inflammasomes in metabolic inflammation. *Immunol. Cell Biol.* 2014 Apr;92(4):304-13. PubMed PMID: (24518981).
- Sutton, A., Khoury, H., Prip-Buus, C., Cepanec, C., Pessayre, D., Degoul, F., 2003 Mar. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics* 13 (3), 145-157 (PubMed PMID: 12618592).
- Sutton A, Imbert A, Igoudjil A, Descatoire V, Cazanave S, Pessayre D, et al. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. *Pharmacogenet. Genomics.* 2005 May;15(5):311-9. PubMed PMID: (15864132).
- Taufel M, Peres A, de Andrade VM, de Oliveira G, Sá G, do Canto ME, et al. Is the Val16Ala manganese superoxide polymorphism associated with the aging process? *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2005 Apr;60(4):432-8. PubMed PMID: (15933380).
- Thompson, S.J., Ashley, M.D., Stör, S., Schindler, C., Li, M., McCarthy-Culpepper, K.A., et al., 2011. Suppression of TNF receptor-1 signaling in an in vitro model of epileptictolerance. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* 3 (2), 120-132 (PubMed PMID: 21760970).
- Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia.* 2005 Nov;46(11):1724-43. PubMed PMID: (16302852).
- Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat. Rev. Neurol.* 2011 Jan;7(1):31-40. PubMed PMID: 21135885. Pubmed Central PMCID: (3378051).
- Wang, Y., Qin, Z.H., 2010 Nov. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis* 15 (11), 1382-1402 (PubMed PMID: 20213199).
- Wang L, Du F, Wang X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell.* 2008 May 16;133(4):693-703. PubMed PMID: (18485876).
- Wetherington J, Serrano G, Dingleline R. Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron.* 2008 Apr 24;58(2):168-78. PubMed PMID: 18439402. Pubmed Central PMCID: (4124883).
- Woermann, F.G., Sisodiya, S.M., Free, S.L., Duncan, J.S., 1998 Sep. Quantitative MRI in patients with idiopathic generalized epilepsy. Evidence of widespread cerebral structural changes. *Brain* 121 (Pt9), 1661-1667 (PubMed PMID: 9762955).
- Yang, F., Liu, Z.R., Chen, J., Zhang, S.J., Quan, Q.Y., Huang, Y.G., et al., 2010. Roles of astrocytes and microglia in seizure-induced aberrant neurogenesis in the hippocampus of adult rats. *J. Neurosci. Res.* 88 (3), 519-529 Feb 15. (PubMed PMID: 19774666).

Apoptotic markers are increased in epilepsy patients: a relation with manganese superoxide dismutase Ala16Val polymorphism and seizure type through IL-1 β and IL-6 pathways

Aline Kegler^{a,b}, Ana Letícia Fornari Caprara^a, Eduardo Tanuri Pascotini^{a,d}, Josi Arend^d, Patricia Gabbi^d, Marta M. M. F. Duarte^d, Ana Flavia Furian^d; Mauro Schneider Oliveira^d; Luiz Fernando Freire Royes^{b,c,d}, Michele Rechia Fighera^{a,b,c,d*}

Author affiliations:

^aCentro de Ciências da Saúde, Departamento de Neuropsiquiatria, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

^bCentro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

^cCentro de Educação Física e Desportos, Laboratório de Bioquímica do Exercício (BIOEX), Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

^dCentro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding author:

Michele Rechia Fighera, MD, PhD
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Neuropsiquiatria
Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900
Santa Maria, RS, Brasil
FAX: +55 55 3220 8018
e-mail: mfighera@yahoo.com.br

Abstract

The MnSODAla16Val single nucleotide polymorphism (SNP) has been associated with different diseases. However, there are scarcely studies relating this SNP in epilepsy, a neurologic disease that involves some interacting pathways, such as apoptotic and inflammatory factors. In this sense, we decided to investigate the relationship of MnSODAla16Val SNP with apoptotic markers in epilepsy and its relation with inflammatory pathway and seizure type. Ninety subjects were evaluated (47 epilepsy; 43 controls) by questionnaires and laboratorial exams. We observed an increased proportion of VV genotype in epilepsy group when compared to control group. IL-1 β , IL-6, caspase-1, and caspase-3 levels were increased in epilepsy group (VV genotype). Furthermore, an important correlation between IL-1 β vs. caspase-1, and IL-6 vs. caspase-3 was observed in the epilepsy group (VV genotype). The epilepsy group which presented generalized seizures also demonstrated a significant correlation among the analyzed biomarkers. Thus, it is plausible propose that epilepsy patients with VV genotype and generalized seizures present a worse inflammatory and apoptotic status. Our findings suggest that the knowledge of MnSODAla16Val polymorphism existence is important to evaluate molecular mechanisms associated to seizure and improves the treatment of these patients.

KEY WORDS: Apoptosis; Epilepsy; Inflammation; MnSOD Ala16Val polymorphism

INTRODUCTION

Epilepsy is one of the most common neurological disorders (Perucca et al., 2007) characterized by an enduring predisposition to generate seizures (Fisher et al., 2005) affecting more than 65 million people worldwide (Kwan et al., 2011). Despite progress in pharmacological and surgical treatments of epilepsy, it is not clear about the processes leading to the generation of seizures, and about the mechanisms whereby a healthy brain is rendered epileptic (Vezzani et al., 2011). Apoptosis (Liou et al., 2003) neuroinflammation (Vezzani et al., 2011) and oxidative stress (Shin et al., 2011) are some relevant

factors implicated in epilepsy pathophysiology. Many works have acknowledged the role of neuroinflammation in the pathogenesis of seizures but little is known about the mechanisms that start the inflammatory process in epilepsy (da Fonseca et al., 2014). The microglia constitute the primary CNS immune cells and are quickly activated in response to an insult. However, the excessive activation of microglia may be harmful, promoting the development of neuronal diseases by producing large amounts of inflammatory molecules, such as IL-6 (Li et al., 2011), IL-1 β , and reactive oxygen species (ROS) (Ishihara et al., 2015). In epilepsy, there is a complex cascade of molecular and cell mechanisms involved in excitotoxicity (Cho, 2013), oxidative stress (Pearson-Smith and Patel, 2017), and inflammation (Vezzani et al., 2011) beyond cytotoxicity mediated by cytokines (Li et al., 2011) and cell death pathway activation (Henshall and Meldrum, 2012). In fact, when the brain is affected by brain diseases (i.e. epilepsy), the microglia cells are activated (Nakajima et al., 2001) and this activation may lead to production of inflammatory cytokines as IL- β (Vezzani and Baram, 2007), and IL-6 (Rana and Musto, 2018). Interestingly, some antioxidant molecules were reported to decrease the levels of proinflammatory mediators by scavenging ROS (Godbout et al., 2004). Therefore, the redox balance is thought to regulate a series of neuroinflammatory processes mediated by microglia (Ishihara et al., 2015). Manganese superoxide dismutase (MnSOD) antioxidant enzyme is the only known major defense against reactive oxygen species within mitochondria (Bresciani et al., 2013). Furthermore, MnSOD is reportedly induced in the CNS under inflammatory conditions (Ishihara et al., 2015). Regarding the relevance of MnSOD, numerous factors can impact on the effectiveness of antioxidant enzymes, including enzymatic polymorphism (Crawford et al., 2012). Two main MnSOD SNP have been described in literature, one of which is Ala16Val (Bresciani et al., 2013). The change of alanine (Ala) to valine (Val) at the 16th amino acid (Ala16Val) of the signal sequence of MnSOD is suggested to change the structure of the protein. The alanine-to-valine substitution produces a β -sheet secondary structure instead of α -helix structure, decreasing the enzyme transport efficiency into the mitochondria, compromising the antioxidant potential (Shimoda-Matsubayashi et al., 1996). The Ala16Val MnSOD SNPs generates three possible genotypes: AA, AV, and VV. Sutton et al. (2005) reported that the Val allele results in reduced expression and production of an unstable mRNA, affecting the import of SOD2 into the mitochondria. In accordance, Montano et al. (2012) demonstrated that the VV and AV peripheral blood mononuclear cells (PBMC) presented increased levels of inflammatory cytokines as IL-1 β and IL-6.

There are studies reporting the association of inflammatory and apoptotic parameters with MnSOD Ala16Val SNP in diseases as stroke (Flores et al., 2017; Pascotini et al., 2018) and cancer (Wang et al., 2018). However, there are few evidences of involvement of Ala16Val MnSOD SNP in epilepsy (Kegler et al., 2019). In this sense, the aim of this study was to investigate caspases activation and relationship between Ala16Val MnSOD SNP with interleukins in epilepsy patients. Additionally, we have also investigated the relation of seizure type (partial or generalized) and duration time (minutes) of seizures with parameters aforementioned. This study is of such interest in view that an enzymatic polymorphism has an important role in inflammatory and apoptotic pathway, and the obtained results can contribute to a better understand about the epilepsy disease and its mechanisms, maybe providing support to novel approaches of pharmacotherapy.

MATERIALS AND METHODS

Study population

A total of 90 subjects were recruited and allocated into two groups: epilepsy group (n=47) and control group – healthy group (n=43). No etiology was found after detailed history, physical, laboratory, and imaging studies. Major exclusion criteria were: history of autoimmune, liver, kidney, and inflammatory diseases, allergic response, immune deficiency disorder, diabetes, psychiatric illness, malignancy, smoking or a systemic or central nervous system (CNS) infection 2 weeks before sample collection. Epilepsy was diagnosed by two experienced neurologists according to the 2010 International League Against Epilepsy (ILAE) Classification (Berg et al. 2010). All patients were evaluated for seizure frequency using seizure diaries (Cramer and French, 2001). The study protocol was approved by the local institutional review boards at the authors' affiliated institutions. Informed written consent was obtained from all the subjects or their legal surrogates. The work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki).

Epilepsy group

The seizure type from epilepsy group (n=47) was confirmed through interviews with patients and their relatives as well as EEG analysis and tomography or magnetic resonance imaging (MRI). Forty-five patients were in remission except for two patients who were diagnosed with refractory epilepsy. All

epilepsy patients had normal neurological examinations except for one who presented tetra paresis secondary to spinal cord lesion. All epilepsy had normal 1.5T MRI imaging; one patient had right and left hippocampal sclerosis.

Laboratory analyses

Samples were collected at least 7 days from the last seizure attack (Mao et al., 2013). After 12 h of overnight fasting, blood samples were collected by venipuncture using purple, green and red top Vacutainers® (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes with ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA), heparin or no anticoagulants, respectively. The specimens were routinely centrifuged within 1 h of collection for 15 min at 2500 g and aliquots of the serum samples and the supernatant was saved and stored at -80°C for subsequent laboratory analysis, according specific methods.

Protein Carbonyl (PC)

The analysis of protein carbonyl was in according with Reznick & Packer, 1994.

Manganese Superoxide dismutase (MnSOD)

The manganese superoxide dismutase activity was performed in according with Spitz & Oberley, 1989.

Caspases determination

Caspase-1 and caspase-3 activities were determined by Fluorimetric Assay Kits (BioVision, Mountain View, CA). The fluorescence intensity was recorded at wavelength of 400 nm for excitation, and at wavelength of 505 nm for emission for both. The activity was then calculated as Fluorescence intensity (FI)/min/ml= $\Delta FI / (t \times v)$, where ΔFI =difference in fluorescence intensity between time zero and time t minutes, t=reaction time in min, and v=volume of sample in mL.

Cytokines determination

The cytokines were assessed by ELISA using commercial kits for human IL-1 β and IL-6 (eBIOSCIENCE, San Diego, USA).

DNA damage

The alkaline DNA comet assay as described by Pereira, 2013. Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using a DNA Mini Kit Purification (Mo Bio).

MnSOD Ala16Val genotyping

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using a DNA Mini Kit Purification (Mo Bio). MnSOD Ala16Val SNP was detected by PCR-RFLP according to Taufer et al., 2005.

STATISTICAL ANALYSIS

Data were analyzed by analysis of variance (two-way ANOVA) followed by Tukey's Multiple Comparison Test. Statistical analysis were performed using the SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) software in a PC-compatible computer. Correlation analyses were carried out using the Pearson correlation coefficient. Statistical significance was assumed when $p < 0.05$. Chi-square test was used to calculate sex, age, and genotype frequencies.

RESULTS

Baseline characteristics of the participants are described in Table 1. In according to Chi-square analysis, no statistically difference was observed between epilepsy group and control group relating with sex ($p=0.5$) and age ($p=0.6$).

Analysis of the Ala16Val MnSOD gene yielded three variants of the genotype: AA (wild-type), AV (heterozygous), and VV (homozygous). The Ala16Val MnSOD genotype frequencies were calculated and are presented in Table 2. In the epilepsy group, the genotype frequencies were 31.9% for AA, 21.2% for AV, and 46.8% for VV. The frequencies for AA, AV, and VV genotypes were 39.5%, 32.5%, and

27.9%, respectively, in control group. In according to Chi-square analysis, no statistically difference in Ala16Val MnSOD genotypes frequencies was observed ($p=0.1$).

Table 1. Characteristics of Epilepsy and Control groups

Characteristic	Epilepsy (n=47)	Control (n=43)	<i>p Value</i>
Gender			
Male	22 (46,8%)	23 (53,4%)	0.5
Female	25 (53,1%)	20 (46,5%)	
Mean age (years old)			
Male	36	39	0.6
Female	33	42	
Antiepileptic drugs (AEDs)			
Monotherapy	15 (31,9%)		
Polytherapy	32 (68,1%)		

Table 2: MnSOD Ala16Val genotype frequencies in epilepsy and control groups

MnSOD SNP	Epilepsy	Control	<i>p Value</i>
<i>Genotypes</i>			
AA	15 (31.9%)	17 (39.5%)	
AV	10 (21.2%)	14 (32.5%)	0.1
VV	22 (46.8%)	12 (27.9%)	

Protein Carbonyl (PC)

A two-way ANOVA demonstrated increased protein carbonyl levels in epilepsy group when compared to control group [$F(1,84) = 36.48$; $p < 0.0001$]. *Post hoc* analysis with Tukey's test for multiple comparisons revealed increased levels of PC in epilepsy group (AA, AV and VV genotypes) when compared to their respectively genotypes from control group (Figure 1).

Manganese Superoxide dismutase (MnSOD)

A two-way ANOVA demonstrated increased MnSOD enzyme activity in epilepsy group when compared to control group [$F(1,81) = 617.5$; $p < 0.0001$]. *Post hoc* analysis with Tukey's test for multiple comparisons revealed increased MnSOD activity in epilepsy group (AA, AV and VV genotypes) when compared to their respectively genotypes from control group. Furthermore, in the epilepsy group, the homozygous VV genotype presented decreased enzyme activity when compared to AA genotype (Figure 2).

IL-1 β

A two-way ANOVA demonstrated increased IL-1 β levels in epilepsy group when compared to control group [$F(2,85) = 6.2$; $p < 0.01$]. *Post hoc* analysis with Tukey's test for multiple comparisons revealed increased IL-1 β levels in epilepsy group (AA, AV and VV genotypes) when compared to their respectively genotypes from control group. Furthermore, in the epilepsy group, the homozygous VV genotype presented increased levels when compared to AV and AA genotypes (Figure 3).

IL-6

A two-way ANOVA demonstrated increased IL-6 levels in epilepsy group when compared to control group [$F(2,77) = 4.6$; $p < 0.05$]. *Post hoc* analysis with Tukey's test for multiple comparisons revealed increased IL-6 levels in epilepsy group (AA, AV and VV genotypes) when compared to their respectively genotypes from control group. Furthermore, in the epilepsy group, the homozygous VV genotype presented increased levels when compared to AA genotype (Figure 4).

Caspase-3 and Caspase-1

A two-way ANOVA demonstrated increased Caspase-3 levels in epilepsy group when compared to control group [$F(2,77) = 6.9$; $p < 0.01$]. *Post hoc* analysis with Tukey's test for multiple comparisons revealed increased Caspase-3 levels in epilepsy group (AA, AV and VV genotypes) when compared to their respectively genotypes from control group. Furthermore, in the epilepsy group, the homozygous VV genotype presented increased levels when compared to AA genotype (Figure 5). A two-way ANOVA demonstrated increased Caspase-1 levels in epilepsy group when compared to control group [$F(2,77) = 3.8$; $p < 0.05$]. *Post hoc* analysis with Tukey's test for multiple comparisons revealed increased Caspase-1 levels in epilepsy group (AA, AV and VV genotypes) when compared to their respectively genotypes from control group. Furthermore, in the epilepsy group, the homozygous VV genotype presented increased levels when compared to AA genotype (Figure 6).

Comet assay

A two-way ANOVA demonstrated increased amount of DNA damage in epilepsy group when compared to control group [$F(1,84) = 1282$; $p < 0.0001$]. *Post hoc* analysis with Tukey's test for multiple comparisons revealed increased amount of DNA damage in epilepsy group (AA, AV and VV genotypes) when compared to their respectively genotypes from control group (data not shown).

Correlations

IL-1 β vs. caspase-1 and IL-6 vs. caspase-3

The Pearson's analysis demonstrated an interesting correlation between IL-1 β and caspase-1 ($r=0.7$; $p < 0.001$) in the epilepsy group (VV genotype). (Table 3). The Pearson's analysis demonstrated an interesting correlation between IL-6 and caspase-3 ($r=0.5$; $p < 0.05$) in the epilepsy group (VV genotype). (Table 3).

Seizure type vs. polymorphism

The Pearson's analysis demonstrated in the epilepsy group which presented generalized seizures (VV genotype) an interesting correlation between inflammatory and apoptotic parameters: IL-1 β vs. caspase-1 ($r=0.7$; $p < 0.05$) and IL-6 vs. caspase-3 ($r=0.6$; $p < 0.05$). Furthermore, the results demonstrated an increased in caspase-1 levels in the epilepsy group which presented generalized seizures (VV genotype) ($t = 2.89$; $p < 0.05$). The other parameters did not demonstrate significant alteration in relation to generalized or partial seizures (data not shown) (Table 3).

Seizures duration time (minutes)

The statistical analysis revealed that the epilepsy group which presented generalized seizures (VV genotype) presented longer seizure time (minutes) than the epilepsy group which presented partial seizures (VV genotype) ($t=2.46$; $p < 0.05$).

Table 3. Correlation among inflammatory, apoptotic, and DNA damage parameters with VV genotype in the epilepsy group and epilepsy group with generalized seizures.

Correlation	r Value	p Value
VV genotype – epilepsy group		
IL-1 β vs. caspase-1	0.7	< 0.001
IL-6 vs. Caspase-3	0.5	< 0.05
VV genotype – epilepsy group (generalized seizures)		
IL-1 β vs. caspase-1	0.7	< 0.05
IL-6 vs. Caspase-3	0.6	< 0.05

DISCUSSION

The novel finding of the study is the influence of Ala16Val MnSOD gene polymorphism -VV genotype on inflammatory (IL-6, IL-1 β), apoptotic (Caspases -1, -3) and antioxidant enzyme (MnSOD) in epilepsy. Of such interest we observed an interesting correlation (caspase-1 vs. IL-1 β) and (caspase-3 vs. IL-6) in VV epilepsy patients. Furthermore, the generalized seizures were impacted by the VV genotype in relation to the referred parameters and with relation to seizures duration time. The burst firing neurons associated with epileptic discharges could lead to changes with events of cascades at the cellular level (Chen et al., 2010). The complex mechanism of epileptogenesis remains largely unclear. However, oxidative stress by free radical generation does indeed plays a role in mitochondrial dysfunction (Menon et al., 2012). Furthermore, the oxidative stress can alter/influence factors leading to neuronal death and consequently the DNA damage (Ikonomidou and Kaindl, 2011). The intense seizure activity can lead to cytotoxic effects mediated by oxidative stress. The superoxide anion (O₂⁻) is the central mediator of oxidative stress, influencing both physiological and pathological processes (Patel and Li, 2003). While there are some evidences confirming that oxidative stress manifest as a consequence of the first insult, which turns out later to become the cause of epileptogenesis (Patel, 2004), other studies support the influence of oxidative stress in epilepsy. In according to Patel (2004), oxidative stress is cause or consequence of epileptic seizures.

Protein oxidation is an irreversible oxidative damage, considered to be a marker for severe oxidative stress (Reznick and Packer, 1994). Our results demonstrated increased levels of protein carbonyl when compared the epilepsy vs. control group. In according, Sudha et al. (2001) described protein carbonyl increased levels in epilepsy patients than in controls. Of such importance, when analyzed MnSOD, the results suggested that the polymorphism plays an influence on its performance, in view that the homozygous VV epilepsy group demonstrated decreased activity when compared to AV and AA genotypes. The apoptotic pathway occurs primarily through the extrinsic and intrinsic pathways (Cavalluci et al., 2011). In relation to intrinsic (or mitochondrial) pathway the apoptosis can be initiated by cytokines such as IL-6. In this pathway, the mitochondria release cytochrome *c*, activating the caspase-3, leading to cell death (Liu et al., 1997). Of note, our results demonstrated increased IL-6 and caspase-3 levels in epilepsy group when compared to control group. In according, Peltola et al. (1998) reported increased levels of IL-6 in plasma and cerebrospinal fluid (CSF) of epilepsy patients when compared to non-epilepsy patients. Increased caspase-3 in brain tissues have been found in animal models of epilepsy (Henshall and Meldrum, 2012) and epilepsy patients (Henshall et al., 2000). Studies also relate increased serum caspase-3 with traumatic brain injury (TBI). However, caspase-3 has been scarcely explored in blood of epilepsy patients (Lorente et al., 2015). The Ala16Val MnSOD polymorphism also revealed a significant importance when associated with the genotype: the VV epilepsy group demonstrated increased levels of IL-6 and caspase-3 when compared to other genotypes (AV and AA). In this context, an interesting correlation between IL-6 vs. caspase-3 was observed. When compared to seizure type, a positive correlation was obtained when related to generalized seizures. Our results suggest that the Val allele has less efficiency, in view that the analyzed parameters were increased in VV epilepsy group. Particularly, in the brain, these proteins can lead to the activation of caspase-3, inducing cell damage,

such as DNA fragmentation (Galluzzi, 2009). In this study, we could also observe that in the epilepsy group, Caspase-1 and IL-1 β presented increased levels when compared to control group. In accordance, Shi et al. (2017) published a study relating that the cytokine IL-1 β has also been found to be significantly increased within the CSF in epilepsy pediatric population when compared to control group, suggesting the cytokine's important role in epilepsy initiation and progression. Of such interest, in view that the IL-1 β has proconvulsant actions, it is likely that this cytokine is released by cells following an inciting event. In this sense, a complex activation, which includes the caspase-1 is a crucial step required for IL-1 β release (van de Veerdonk et al., 2011). In accordance, our results demonstrated an interesting correlation between IL-1 β and caspase-1 in epilepsy group – generalized seizures (VV genotype), corroborating with previous studies, emphasizing the great importance of Ala16Val MnSOD SNP seizure type in the obtained results. Still regarding to seizure type, it comes important in view that in generalized seizures the disorders would be widespread throughout the brain (Woermann et al., 1998). When related to genetic polymorphism of MnSOD, we found some important results when analyzed AA, AV, and VV genotypes in epilepsy group. It was observed a decreased MnSOD activity in VV epilepsy group when compared to AA epilepsy group. In this sense, our results are in accordance with that the ValVal could be less efficient than the AlaAla genotype to control the oxidative stress (Bresciani et al., 2013). The V allele presents increased superoxide radical levels than the A allele due its lower efficiency to dismutate this molecule into H₂O₂ (Sutton et al., 2003). In accordance, the superoxide anion (O₂⁻) is the central mediator of oxidative stress, this anion could lead to mitochondrial destabilization resulting in cell apoptosis activation (Clément et al., 1998). Although the small sample size of the study, there are few studies indicating the association/influence of Ala16Val MnSOD polymorphism in epilepsy (Ogusu et al., 2014; Kegler et al., 2019). We found some important associations with inflammatory, apoptotic and oxidative stress biomarkers, suggesting that the Ala16Val MnSOD polymorphism has an important role on neuroinflammation maintenance and its consequences. Finally, the result demonstrated influence of Ala16ValMnSOD polymorphism, mainly of VV genotype in epilepsy patients. According, studies have shown that the polymorphism of some genes may be related to the efficacy, tolerability and action of antiepileptic drugs (Löscher et al., 2009, Ercegovac et al. 2015).

In this sense, prolonged seizures or status epilepticus in epilepsy patients can become a serious problem due to their consequences on the quality life from this population (Ashrafi et al., 2017). Seizures can have devastating consequences and, as result, suffer bodily injury requiring hospitalization. Others have shortened life span due to the increased risk of unexpected sudden death that is associated with uncontrolled seizures (Brodie, 2005; French, 2007; Ashrafi et al., 2017). Studies have shown that patients with epilepsy can be significant neuropsychological, psychiatric, and social impairments that limit employment, reduce marriage rates, and decrease quality of life (Brodie, 2005; French, 2007; Arend et al., 2018). Thus, genetic polymorphism becomes an “ally” to help discover the cause of drug refractoriness and provide insight into the type and magnitude of clinic-laboratorial manifestations may have across individuals, helping to determine the best treatment and improve the quality of life of patients with neurological diseases, such as epilepsy.

REFERENCES

- Perucca, E. et al. Development of new antiepileptic drugs: challenges, incentives, and recent advances. *Lancet Neurol.* 2007; 9:793-804. PubMed PMID: 17706563.
- 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.* 2005; (4):470-2. PubMed PMID: 15816939
- Kwan, P. et al. 2011. Drug-resistant epilepsy. *N Engl J Med.* 2011; 10:919-26. PubMed PMID: 21899452
- Vezzani, A. et al. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol.* 2011; 1:31-40. PubMed PMID: 21135885
- Liou, A.K. et al. To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. *Prog Neurobiol.* 2003; 69:103-42. PubMed PMID: 12684068
- Shin, E.J. et al. Role of oxidative stress in epileptic seizures. *Neurochem Int.* 2011; (2):122-37. PubMed PMID: 21672578
- da Fonseca, A.C. et al. The impact of microglial activation on blood-brain barrier in brain diseases. *Front Cell Neurosci.* 2014; 8:362. PubMed PMID: 25404894
- Li, G. et al. Cytokines and epilepsy. *Seizure.* 2011; 3:249–256. PubMed PMID: 21216630
- Ishihara, Y. et al. Dual role of superoxide dismutase 2 induced in activated microglia: oxidative stress tolerance and convergence of inflammatory responses. *J Biol Chem.* 2015; 37:22805-22817. PubMed PMID:26231211

Cho, C.H. New mechanism for glutamate hypothesis in epilepsy. *Front Cell Neurosci.* 2013; 7:127. eCollection 2013. PubMed PMID: 23964202

Pearson-Smith, J.N.; Patel, M. Metabolic Dysfunction and Oxidative Stress in Epilepsy. *Int J Mol Sci.* 2017; 8;18(11). pii: E2365. PMID: 29117123

Henshall, D.C.; Meldrum, B.S. Cell death and survival mechanisms after single and repeated brief seizures. 2012. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies.* 4th edition. PubMed PMID:22787605

Nakajima, K.; Kohsaka, S. Microglia: activation and their significance in the central nervous system. *J. Biochem.* 2001. 169–175. PubMed PMID: 11481032

Vezzani, A.; Baram, T.Z. New roles for interleukin-1 Beta in the mechanisms of epilepsy. *Epilepsy Curr.* 2007. (2):45-50. PubMed PMID: 17505552

Rana, A.; Musto, A.E. The role of inflammation in the development of epilepsy. *J Neuroinflammation.* 2018; 15: 144. PubMed PMID: 29764485

Godbout, J. P. et al. α -Tocopherol reduces lipopolysaccharide-induced peroxide radical formation and interleukin-6 secretion in primary murine microglia and in brain. *J. Neuroimmunol.* 2004; 149:101-109. PubMed PMID: 15020070

Bresciani, G. et al. 2013. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. *Free Radic Res.* 2013; (10):781-92. PubMed PMID: 23952573

Crawford, A. et al. Relationships between single nucleotide polymorphisms of antioxidant enzymes and disease. *Gene.* 2012; 501(2):89-103. PubMed PMID: 22525041

Shimoda-Matsubayashi, S. et al. Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; (2):561-5. PubMed PMID: 8806673

Sutton, A. et al. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. *Pharmacogenet Genomics.* v. 15, p. 311-179, 2005. PubMed PMID: 15864132.

Montano, M.A. et al. Inflammatory cytokines in vitro production are associated with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism of peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine.* 2012; 1:30-33. PubMed PMID: 22688013

Flores, A.E. et al. ALA16VAL-MnSOD gene polymorphism and stroke: Association with dyslipidemia and glucose levels. *Gene.* 2017; 627:57-62. PubMed PMID: 28552711.

Pascotini, E. T. et al. Brain-Derived Neurotrophic Factor Levels are Lower in Chronic Stroke Patients: A Relation with Manganese-dependent Superoxide Dismutase ALA16VAL Single Nucleotide Polymorphism through Tumor Necrosis Factor- α and Caspases Pathways. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2018 (11):3020-3029. PubMed PMID: 30150066.

Wang, P. et al. Association between *MnSOD* Val16Ala Polymorphism and Cancer Risk: Evidence from 33,098 Cases and 37,831 Controls. *Dis Markers.* 2018. 3061974. PubMed PMID: 30245752

Kegler, A. et al. Involvement of MnSOD Ala16Val polymorphism in epilepsy: A relationship with seizure type, inflammation, and metabolic syndrome. *Gene.* 2019; 711:143924. PubMed PMID: 31212050

Berg, A.T. et al., 2010. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE commission on classification and terminology, 2005–2009. *Epilepsia.* 2010; (4):676-85. PubMed PMID: 20196795

Cramer, J.A.; French, J. Quantitative assessment of seizure severity for clinical trials: a review of approaches to seizure components. *Epilepsia.* 2001; (1):119–29. PubMed PMID: 11207795

Reznick, A.Z.; Packer, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994; 233:357-63. PubMed PMID: 8015470. Spitz, D.R.; Oberley, L.W. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem.* 1989; 179(1):8-18. PubMed PMID: 2547324. Chen, S.D. et al. The potential role of mitochondrial dysfunction in seizure-associated cell death in the hippocampus and epileptogenesis. *J Bioenerg Biomembr.* 2010; (6):461-5. PubMed PMID: 21153870.

Menon, B. et al. Oxidative stress in patients with epilepsy is independent of antiepileptic drugs. *Seizure.* 2012; 10:780-784. PubMed PMID: 23031823.

Ikonomidou, C.; Kaindl, A.M. Neuronal death and oxidative stress in the developing brain. *Antioxid Redox Signal.* 2011;14(8):1535-50 PubMed PMID: 20919934.

Patel, M.; Li, Q. Y. Age dependence of seizure-induced oxidative stress. *Neuroscience.* 2003; 118, 431–437. PubMed PMID: 12699779.

Patel, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radical Biol Med.* 2004; (12):1951–1962. PubMed PMID: 15544915.

Sudha, K. et al. Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. *Clin. Chim. Acta.* 2001; 303:19–24.

PubMed PMID: 11163018.

Cavallucci, V.; D'Amelio, M. Matter of life and death: the pharmacological approaches targeting apoptosis in brain diseases. *Curr Pharm Des.* 2011; 17:215–29. PubMed PMID: 21348825.

Liu, X. et al. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell.* 1997; 89:175-84. PubMed PMID: 9108473.

Peltola, J. et al. Elevated levels of interleukin-6 may occur in cerebrospinal fluid from patients with recent epileptic seizures. *Epilepsy Res.* 1998; 2:129-33. PubMed PMID: 9714504.

Henshall, D.C. et al. Alterations in bcl-2 and caspase gene family protein expression in human temporal lobe epilepsy. *Neurology.* 2000; 2:250-7. PubMed PMID: 10908900.

Lorente, L. et al. Serum caspase-3 levels and mortality are associated in patients with severe traumatic brain injury. *BMC Neurol.* 2015; 15:228. PubMed PMID: 26545730.

Galluzzi, L. et al. Targeting post-mitochondrial effectors of apoptosis for neuroprotection. *Biochim Biophys Acta Bioenerg.* 2009; 1787-402-413. PubMed PMID: 18848916.

Shi, L. et al. Cerebrospinal fluid neuron specific enolase, interleukin-1 β and erythropoietin concentrations in children after seizures. *Childs Nerv Syst.* 2017; (5):805–811. PubMed PMID: 28236069.

Woermann, F.G. et al. Quantitative MRI in patients with idiopathic generalized epilepsy. Evidence of widespread cerebral structural changes. *Brain.* 1998; (Pt 9):1661-7. PubMed PMID: 9762955.

Sutton, A. et al. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics.* 2003; 13:145–157. PubMed PMID: 12618592.

Clément, M.V. et al. Apoptosis induced by hydrogen peroxide is mediated by decreased superoxide anion concentration and reduction of intracellular milieu. *FEBS Lett.* 1998; (1-2):13-8. PubMed PMID: 9862415.

Ogusu, N. et al. Impact of the Superoxide Dismutase 2 Val16Ala Polymorphism on the Relationship between Valproic Acid Exposure and Elevation of γ -Glutamyltransferase in Patients with Epilepsy: A Population Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Analysis. *PLoS One.* 2014; 9(11): e111066. PubMed PMID: 25372290.

Löscher, W. et al. The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. *Epilepsia.* 2009; 1-23. PubMed PMID: 18627414.

Ercegovac, M. et al. GSTA1, GSTM1, GSTP1 and GSTT1 polymorphisms in progressive myoclonus epilepsy: A Serbian case–control study. *Seizure.* 2015; 32, 30-36. PubMed PMID: 26552558.

Ashrafi, M.R. et al. The efficacy of the ketogenic diet in infants and young children with refractory epilepsies using a formula-based poder. *Acta Neurol Belg.* 2017; 117:175-182, PubMed PMID: 27928725.

Brodie, M.J. Diagnosing and predicting refractory epilepsy. *Acta Neurol Scand.* 2005; Suppl 181; 36-39, PubMed PMID: 16238707.

French, J.A. Refractory epilepsy: clinical overview. *Epilepsia.* 2007; 48(Suppl 1):3–7.10. PubMed PMID: 17316406.

Arend, J. et al. Depressive, inflammatory, and metabolic factors associated with cognitive impairment in patients with epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2018; 86:49-57, PubMed PMID: 30077908.

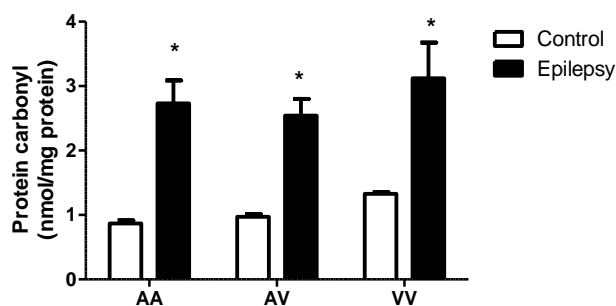


Figure 1. Comparison of Ala16ValMnSOD polymorphism genotypes (AA, AV, and VV) from control and epilepsy groups in relation to oxidative stress biomarker. The epilepsy group presented increased levels of protein carbonyl when compared to control group. * $p < 0.05$ when compared to respective control group.

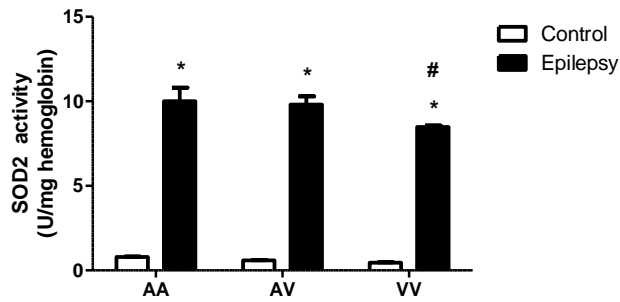


Figure 2. Comparison of Ala16ValMnSOD polymorphism genotypes (AA, AV, and VV) from control and epilepsy groups in relation to SOD2 activity.

The epilepsy group presented increased SOD2 activity when compared to the respective control group. The epilepsy group (VV) presented a decreased SOD2 activity when compared to epilepsy group (AA). * $p < 0.05$ when compared to respective control group; # $p < 0.05$ when compared the epilepsy group (VV vs. AA).

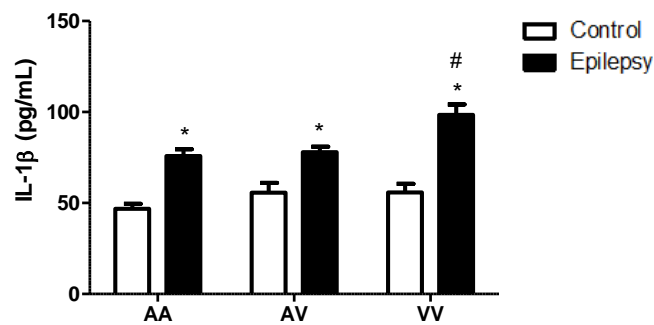


Figure 3. Comparison of Ala16ValMnSOD polymorphism genotypes (AA, AV, and VV) from control and epilepsy groups in relation to IL-1 β . The epilepsy group presented increased levels of IL-1 β when compared to control group. * $p < 0.05$ when compared to respective control group; # $p < 0.05$ when compared the epilepsy group (VV vs. AV and AA).

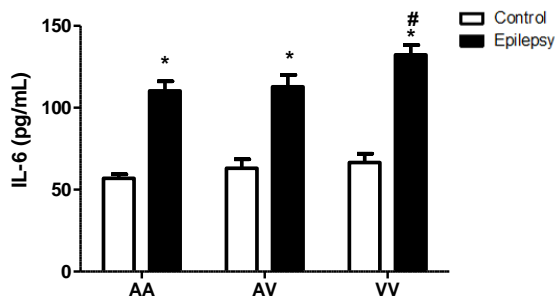


Figure 4. Comparison of Ala16ValMnSOD polymorphism genotypes (AA, AV, and VV) from control and epilepsy groups in relation to IL-6. The epilepsy group presented increased levels of IL-6 when compared to control group. * $p < 0.05$ when compared to respective control group; # $p < 0.05$ when compared the epilepsy group (VV vs. AA).

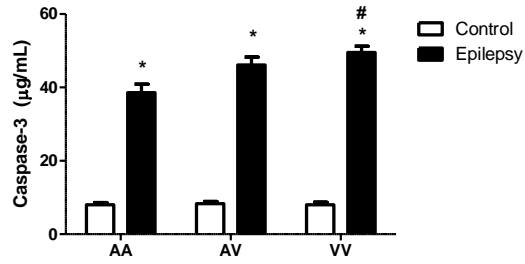


Figure 5. Comparison of Ala16ValMnSOD polymorphism genotypes (AA, AV, and VV) from control and epilepsy groups in relation to caspase-3. The epilepsy group presented increased levels of caspase-3 when compared to control group. * $p < 0.05$ when compared to respective control group; # $p < 0.05$ when compared the epilepsy group (VV vs. AA).

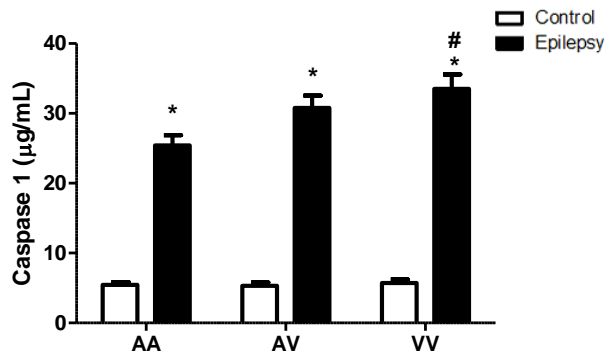


Figure 6. Comparison of Ala16ValMnSOD polymorphism genotypes (AA, AV, and VV) from control and epilepsy groups in relation to caspase-1. The epilepsy group presented increased levels of caspase-1 when compared to control group. * $p < 0.05$ when compared to respective control group; # $p < 0.05$ when compared the epilepsy group (VV vs. AA).

4. DISCUSSÃO

No presente estudo mostramos que o polimorfismo da MnSOD Ala16Val está associado aos parâmetros inflamatórios, apoptóticos, de estresse oxidativo e metabólicos nos pacientes com epilepsia. Os pacientes com o genótipo VV apresentaram maiores níveis de citocinas e dos parâmetros glicolipídicos, assim como, as caspases, dano ao DNA e atividade da AChE, sugerindo que este polimorfismo pode ser um fator agravante da doença nesta população. Interessantemente, os marcadores inflamatórios e as caspases foram correlacionados com as crises generalizadas nos pacientes com genótipo VV. Além disso, para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a investigar a influência da MnSOD Ala16Val SNP na epilepsia e sua relação com os marcadores metabólicos, inflamatórios, de estresse oxidativo e dano de DNA. Neste sentido, este estudo reforça a necessidade atual de entender as influências genéticas associadas aos fenótipos, e sugere uma possível associação do polimorfismo da MnSOD Ala16Val relacionado às crises epiléticas.

Os principais processos mitocondriais incluem a produção de mais de 90% de trifosfato de adenosina celular (ATP) na cadeia de transferência de elétrons, entre outros (WATTS et al., 2013). No entanto, durante a respiração mitocondrial, os complexos I e III são responsáveis pela produção do íon superóxido (O_2^-), o primeiro ROS produzido (LESZESK et al., 2016). Embora os ROS apresentem papéis fisiológicos relevantes, o aumento das concentrações que levam ao estresse oxidativo tem sido relacionado a várias condições patológicas (SIMS e MUYDERMAN, 2010) como a epilepsia (TERRONE et al., 2019). Isto ocorre principalmente devido ao cérebro ser especialmente propenso a danos mediados pelas espécies reativas, que está relacionado ao alto consumo de O_2 , ácidos graxos poli-insaturados e à redução das defesas antioxidantes (LESZESK et al., 2016). Nesse sentido, estudos mostram que a falência das defesas antioxidantes, como a MnSOD agrava o dano cerebral após insulto isquêmico (HUANG et al., 2012) e o polimorfismo MnSOD Ala16Val está associado a um risco aumentado de lesão cerebral (FLORES et al., 2017; PASCOTINI et al., 2018). De fato, nossos dados corroboram com a ideia que o polimorfismo da MnSOD está relacionado com condições patológicas do SNC, como a epilepsia, uma vez que o genótipo VV dos pacientes está associado a um aumento do dano oxidativo e inflamatório. Dessa forma, podemos sugerir que o acúmulo de O_2 pode conduzir a uma desestabilização mitocondrial, ativação da via inflamatória e da cascata de apoptose celular (WATTS et al., 2013). Na verdade, as mudanças na estabilidade mitocondrial, resultando na liberação de proteínas, são fundamentais para a ativação da via intrínseca apoptótica. No cérebro, estas proteínas levam à ativação de caspase-3, que por sua

vez induz a danos celulares, tais como a fragmentação do DNA (GALLUZZI et al., 2007; KROEMER et al., 2009). Além disso, os ânions superóxido ativam as caspases em vários tecidos (CONDE DE LA ROSA et al., 2006, PARK et al., 2010) e têm a sua atividade inibida pela ação da SOD. Em nosso estudo, observamos o aumento das caspases -1, -8 e -3 em pacientes VV, provavelmente devido a uma desestabilização mitocondrial e um aumento na liberação de fatores inflamatórios, o que pode provocar danos nas células e induzir a apoptose (CERNE et al., 2013).

A neuroinflamação tem sido descrita tanto como causa quanto como consequência da epilepsia (DEY et al., 2013). Estudos descrevem um aumento na expressão de IL-1 β , TNF- α e IL-6 em diferentes áreas cerebrais de modelos experimentais de convulsão tanto na geração como na propagação das crises epiléticas (VEZZANI et al., 2008). As citocinas sintetizadas relacionam-se à disfunção astrocitária e à hiperexcitabilidade neuronal, sendo estes alguns dos processos que podem contribuir para a geração de convulsões e disfunções neurológicas (VEZZANI e VIVIANI, 2015). A apoptose também está relacionada à epilepsia (BENGZON et al. 2002). O início da via apoptótica pode ocorrer através de mediadores inflamatórios, que através da sequência na cascata da apoptose irá culminar na ativação da caspase-3 (BOATRIGT e SALVENSEN, 2003). Neste estudo, os resultados demonstram o aumento dos níveis das citocinas inflamatórias IL-6, IL-1 β , TNF- α e marcadores apoptóticos: caspase-1, caspase-3 e caspase-8 no grupo epilepsia quando comparado ao grupo controle. Interessantemente, após análise e relação destes resultados com os genótipos (AA, AV e VV) do polimorfismo Ala16ValMnSOD, observou-se um aumento significativo das citocinas e caspases no grupo epilepsia com genótipo VV. Verificou-se também uma correlação entre TNF- α e caspase-8 e TNF- α vs. picogreen no grupo epilepsia (genótipo VV). Da mesma forma, foi observado uma correlação dos níveis de IL-6 vs. caspase 3 e IL-1 β vs. caspase 1 nos pacientes com epilepsia e genótipo VV. De acordo com nossos resultados, Henshall et al. (2010) também demonstraram aumento dos níveis de IL-1 β e ativação de caspase-1 em tecido cerebral de pacientes com epilepsia de lobo temporal refratários ao tratamento medicamentoso.

De suma importância, achados clínicos e experimentais suportam o envolvimento significativo de processos inflamatórios e apoptóticos na epilepsia (VEZZANI e GRANATA, 2005; AREND et al., 2018), uma vez que as citocinas têm uma síntese mais alta durante a atividade epilética (CHOI e KOH, 2008). As citocinas são fatores inflamatórios cuja expressão é regulada positivamente após convulsões (MINAMI et al., 1991; PROBERT et al., 1997) e são principalmente liberadas pela microglia no cérebro (RENNO et al., 1995). Além disso, Fabene et al. (2010) mostraram que citocinas, como o TNF- α e IL-1B, são encontradas em outras

amostras biológicas diferentes, incluindo líquido cefalorraquidiano (LCR) e células mononucleares do sangue periférico e plasma de pacientes com epilepsia. De acordo, Gouveia et al. (2015) encontraram níveis elevados de TNF- α no sangue de ratos submetidos ao modelo de pilocarpina. Gao et al. (2016) também demonstraram níveis mais elevados de TNF- α no plasma de pacientes com epilepsia, corroborando com nossos resultados.

Além disso, outro fator interessante em relação à inflamação é o papel da acetilcolinesterase (AChE) (KISH et al., 1988; NIZRI et al., 2006). Esta enzima desempenha um papel importante nas respostas imunes pela rápida hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), que é conhecido por suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (BOROVIKOVA et al., 2000; KAWASHIMA e FUJII, 2003). De fato, os inibidores da AChE reduzem a secreção de citocinas pró-inflamatórias (ou seja, TNF- α , IL-1 β e IL-6) e podem atenuar a inflamação aumentando a concentração de ACh nos espaços extracelulares (NIZRI et al., 2006). Em nosso estudo, observou-se aumento da atividade da AChE em pacientes com epilepsia, sugerindo que essa alteração pode levar à diminuição dos níveis de ACh, contribuindo para o estado pró-inflamatório. De acordo com nossos dados, Kish et al. (1988) mostraram aumento da atividade da AChE em pacientes após lobectomia temporal para epilepsia intratável. Além disso, Gnatek et al. (2012) relataram maior expressão de RNAm da AChE em camundongos 48 h após o *status epilepticus*.

Dessa forma, o aumento de marcadores inflamatórios e oxidativos nos pacientes com epilepsia possivelmente podem ter desencadeado o aumento na ativação de caspase-1, -3 e -8. De fato, ativação da caspase-1 pode ocorrer pelos seus substratos, como TNF- α e IL-1 β , e isso reflete em um aumento na resposta inflamatória celular, sendo que a ativação da caspase-1 também resulta no processamento e liberação de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e IL-18. Além disso, a caspase-8, combinada com sua capacidade de induzir apoptose através da via extrínseca, também desencadeia a via de apoptose intrínseca clivando os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 para iniciar apoptose induzida por mitocôndrias (GROSS et al., 1999; ZHAO et al., 2001). Estes eventos induzem um aumento de espécies reativas e liberação de fatores apoptogênicos mitocondriais para o citosol, levando conseqüentemente à ativação de caspase-3 e dano ao DNA (BUDIARDJO et al., 1999). Curiosamente, uma correlação entre inflamação, apoptose e danos no DNA em pacientes com epilepsia também foi encontrada no presente trabalho.

Outro resultado interessante é a correlação positiva dos marcadores inflamatórios e apoptóticos no grupo epilepsia (genótipo VV) com as crises generalizadas. Uma possível explicação estaria relacionada às alterações mais difusas no cérebro das crises generalizadas,

quando comparadas às crises focais (WOERMANN et al., 1998). Como consequência desses eventos, pode ocorrer uma maior síntese e liberação de mediadores inflamatórios e apoptóticos (LEHTIMÄKI et al., 2004; 2007).

As crises recorrentes e sucessivas podem induzir a um aumento na geração de espécies reativas no organismo (SHARMA et al., 2010) e além disso a redução dos mecanismos de defesa antioxidante em pacientes sob tratamento medicamentoso também está descrita (THOMAS et al., 2006). No presente estudo demonstrou-se um aumento significativo nos níveis de proteína carbonil e redução da atividade antioxidante da MnSOD no grupo epilepsia, corroborando com estudos previamente publicados (MENON et al., 2012; IZUO et al., 2015). Uma explicação para estes resultados pode estar relacionada à excitotoxicidade produzida pelas convulsões, com consequente produção de radicais livres, os quais podem aumentar o processo inflamatório (DEY et al., 2013). Além disso, outra hipótese possível para os resultados descritos, é que o genótipo VV apresenta um estrutura β -lâmina, consequentemente dificultando o transporte da isoforma MnSOD-Val para o espaço mitocondrial. Desta forma, a atividade antioxidante é reduzida, favorecendo o aumento da geração de espécies reativas (ROSENBLUM et al., 1996), contribuindo para a manutenção do estado inflamatório na epilepsia.

Outro resultado interessante foi o aumento dos níveis de colesterol e a correlação deste com os triglicerídeos nos pacientes com epilepsia que apresentam o genótipo VV. De acordo, Duarte et al. (2010) demonstraram uma associação entre pacientes com genótipo VV e hipercolesterolemia. De fato, Adibhatla e Hatcher (2008) relataram que a lesão neuronal em crises epiléticas afeta a homeostase do colesterol no cérebro. Embora não haja muitos trabalhos publicados envolvendo o polimorfismo da MnSOD na epilepsia, Flores et al. (2017) demonstraram a relação entre MnSOD e marcadores metabólicos em pacientes pós-AVC. Juntamente com os dados atuais, é possível propor que o polimorfismo genético pode estar relacionado a níveis inflamatórios e lipídicos mais elevados em pacientes com epilepsia, contribuindo para o aumento dos riscos cardiovasculares e neurovasculares nesse grupo. Esses dados têm considerável importância clínica, uma vez que os indivíduos que possuem o alelo V (genótipo VV) quando comparado ao alelo A (genótipo AA) são mais resistentes ao tratamento com estatina (DUARTE et al. 2016).

Finalmente, nossos resultados demonstraram a influência do polimorfismo Ala16ValMnSOD, principalmente do genótipo VV em pacientes com epilepsia. De acordo, estudos mostraram que o polimorfismo de alguns genes pode estar relacionado à eficácia, tolerabilidade e ação de drogas antiepiléticas (LÖSCHER et al., 2009, ERCEGOVAC et al.,

2015). Nesse sentido, convulsões prolongadas ou *status epilepticus* em pacientes com epilepsia podem se tornar um problema sério devido às suas consequências na qualidade de vida dessa população (ASHRAFI et al., 2017). As convulsões podem ter consequências devastadoras e, como resultado, sofrer lesões corporais que exigem hospitalização. Outros têm o tempo de vida reduzido devido ao aumento do risco de morte súbita inesperada que está associada a convulsões não controladas (BRODIE, 2005; FRENCH, 2007; ASHRAFI et al., 2017). Estudos ainda mostraram que pacientes com epilepsia podem ter alterações neuropsicológicas, psiquiátricas e sociais significativas que limitam o emprego, reduzem as taxas de casamento e diminuem a qualidade de vida (BRODIE, 2005; FRENCH, 2007; AREND et al., 2018). Assim, o polimorfismo genético se torna um “aliado” para ajudar a esclarecer a causa da refratariedade do medicamento e fornecer informações sobre o tipo e a magnitude das manifestações clínico-laboratoriais entre os indivíduos, ajudando a determinar o melhor tratamento e melhorar a qualidade de vida dos pacientes com doenças neurológicas, como a epilepsia.

5. CONCLUSÃO

Biomarcadores de inflamação, estresse oxidativo, apoptose e glicolipídicos estão aumentados nos pacientes com epilepsia;

Parâmetros inflamatórios e apoptóticos apresentaram resultados mais elevados nos pacientes epiléticos com crises generalizadas;

Parâmetros inflamatórios e apoptóticos apresentaram resultados mais elevados nos pacientes epiléticos com crises generalizadas que apresentam o genótipo VV;

O genótipo VV do polimorfismo Ala16ValMnSOD relacionou-se com o aumento dos níveis dos marcadores de inflamação, estresse oxidativo, apoptose e parâmetros glicolipídicos;

Sugere-se uma associação entre o genótipo VV da MnSOD com biomarcadores de inflamação, estresse oxidativo, apoptose e glicolipídicos e também com o tipo de crise epilética.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K. et al. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro. **Elsevier**. 2008.
- ADIBHATLA, R. M; HATCHER, J.F. Altered Lipid Metabolism in Brain Injury and Disorders. *Subcell Biochem*. p. 241-268, 2008.
- ALLAN, S.M.; ROTHWELL, N.J. Cytokines and acute neurodegeneration. **Nat Rev Neurosci**. p. 734-744, 2001.
- ALLAN, S.M. et al. Interleukin-1 and neuronal injury. **Nat Rev Immunol**. p. 629-640, 2005.
- ANDRZEJCZAK, D. Epilepsy and pro-inflammatory cytokines. Immunomodulating properties of antiepileptic drugs. **Neurol Neurochir Pol**. v. 45, p. 275-285, 2011.
- APRIOKU, J. S. Pharmacology of free radicals and impact of reactive oxygen species on the testis. **J Reprod Infertil**. v.14, p.158-172, 2013.
- AREND, J. et al. Depressive, inflammatory, and metabolic factors associated with cognitive impairment in patients with epilepsy. **Epilepsy Behav**. v. 86, p. 49-57, 2018.
- ARSOV, T. et al. Glucose transporter 1 deficiency in the idiopathic generalized epilepsies. **Ann Neurol**. v. 72, p. 807-815, 2012.
- ASHRAFI, M.R. et al. The efficacy of the ketogenic diet in infants and young children with refractory epilepsies using a formula-based poder. **Acta Neurol Belg**. v.117, p. 175-182, 2017.
- BACHSTETTER, A.D.; VAN ELDIK, L.J. The p38 MAP Kinase Family as Regulators of Proinflammatory Cytokine Production in Degenerative Diseases of the CNS. **Aging Dis**. v. 1, n. 3, p. 199-211, 2010.
- BACHSTETTER, A.D. et al. Microglial p38 α MAPK is a key regulator of proinflammatory cytokine up-regulation induced by toll-like receptor (TLR) ligands or beta-amyloid (A β). **J Neuroinflammation**. v. 8, 2011.
- BALOSSO, S. et al. The dual role of TNF- α and its receptors in seizures. **Exp Neurol**. v. 247, p. 267-271, 2013.
- BASTIEN, D.; LACROIX, S. Cytokine pathways regulating glial and leukocyte function after spinal cord and peripheral nerve injury. **Exp Neurol**. v. 258, p. 62-77, 2014.
- BELL, G.S. et al. An unknown quantity - the worldwide prevalence of epilepsy. **Epilepsia**. v. 55, p. 958-962, 2014.
- BEN ASSAYAG, E. et al. Serum cholinesterase activities distinguish between stroke patients and controls and predict 12-month mortality. **Mol Med**. v. 16, p.278-286, 2010.
- BENGZON, J. et al. Neuronal apoptosis after brief and prolonged seizures. **Prog Brain Res**. v. 135, p.111-119, 2002.

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

BERNIK, T. R. et al. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. **J Exp Med**. v. 195, p. 781-788, 2002.

BLACK, R.A. et al. Generation of biologically active interleukin-1beta by proteolytic cleavage of the inactive precursor. **J Biol Chem**. v. 263, p. 9437-9472, 1988.

BLOCK, M.L. et al. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nat Rev Neurosci**. v.1, p.57-69, 2007.

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

BOROVIKOVA, L.V. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**. 2000.

BOUTIN, H. et al. The expanding interleukin-1 family and its receptors: do alternative IL-1 receptor/signaling pathways exist in the brain? **Mol Neurobiol**. v. 27, p. 239-248, 2003.

BRANCO, C. S. et al. Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentylenetetrazol-induced seizures in Wistar rats. **Brain Res Bull**. v. 92, p. 60-68, 2013.

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

BRIGGS, S.W.; GALANOPOULOU, A.S. Altered GABA signaling in early life epilepsies. **Neural Plasticity**. p. 16, 2011.

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

BRESCIANI, G. et al. The MnSOD Ala16Val SNP: relevance to human diseases and interaction with environmental factors. **Free Radic Res**. v. 47, p. 781-792, 2013.

BRODIE, M.J. et al. Enzyme induction with antiepileptic drugs: cause for concern? **Epilepsia**. v. 54, p. 11-27, 2013.

BRODIE, M.J. Diagnosing and predicting refractory epilepsy. **Acta Neurol Scand**. Suppl 181, p. 36-39, 2005.

BROPHY, G. M. et al. Guidelines for the evaluation and management of status epilepticus. **Neurocrit Care**. v. 1, p. 3-23, 2012.

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

- CABAL-HIERRO, L.; LAZO, P.S. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. **Cell Signal**. v. 24, p. 1297-1305, 2012.
- CAMPBELL, I.L. et al. Neurologic disease in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 90, p. 10061-10065, 1993.
- CÁRDENAS-RODRÍGUEZ, N. et al. Role of Oxidative Stress in Refractory Epilepsy: Evidence in Patients and Experimental Models. **Int. J. Mol. Sci**. v. 14, p. 1455-1476, 2013.
- CECHETTI, F. et al. Environmental enrichment prevents behavioral deficits and oxidative stress caused by chronic cerebral hypoperfusion in the rat. **Life Sci**. v. 91, p. 29-36, 2012.
- CERNE, J. Z. et al. Estrogen metabolism genotypes, use of long-term hormone replacement therapy and risk of postmenopausal breast cancer. **Oncol Rep**. v. 26, p. 479-485, 2011.
- CHANG, B.S.; LOWESTEIN, D.H. Epilepsy. **N Engl J Med**. v.25, p. 1257-1266, 2003.
- CHOI, J.; KOH, S. Role of Brain Inflammation in Epileptogenesis. **Yonsei Med J**. v. 1, p.1-18, 2008.
- CHU, W. M. Tumor necrosis factor. **Cancer Lett**. v. 328, p. 222-225, 2013.
- CHUANG, Y.C. et al. Effects of long-term antiepileptic drug monotherapy on vascular risk factors and atherosclerosis. **Epilepsia**. v. 53, p. 120-128, 2012.
- CHURCH, S.L. et al. Sublocalization of the gene encoding manganese superoxide dismutase (MnSOD/SOD2) to 6q25 by fluorescence in situ hybridization and somatic cell hybrid mapping. **Genomics**. v. 14, p. 823-825, 1992.
- COBB, C.A.; COLE, M.P. Oxidative and nitrate stress in neurodegeneration. **Neurobiol Dis**. v. 84, p. 4-21, 2015.
- COOPER, J.R. et al., 1991: The biochemical basis of neuropharmacology consequences. 6th ed. Oxford: **Oxford Univ Press**, 1991.
- COSTA-LOTUFO, L.V. et al. Attenuating effects of melatonina on pilocarpine-induced seizures in rats. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol**. v. 4, p. 521-529, 2002.
- COX, D.G. et al. Gene x Gene interaction between MnSOD and GPX-1 and breast cancer risk: a nested case-control study. **BMC Cancer**. 2006.
- DARDIOTIS, E. et al. Traumatic Brain Injury and Inflammation: Emerging Role of Innate and Adaptive Immunity. **Brain Injury - Pathogenesis, Monitoring, Recovery and Management** (Agrawal A). InTech (Editora) 2012.
- DeLORENZO, R.J. et al. Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: The calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. **Pharmacol Ther**. v. 105, p. 229-266, 2005.

De SIMONI, M.G. et al. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. **Eur J Neurosci.** v.12, p. 2623-2633, 2000.

DEY, A. et al. Anti-Inflammatory Small Molecules To Treat Seizures and Epilepsy: From Bench to Bedside. **Trends Pharmacol Sci.** v.37, p. 463-484, 2016.

DINARELLO, C.A. Interleukin-1 beta, interleukin-18, and the interleukin-1 beta converting enzyme. **Ann N Y Acad Sci.** v. 856, p.1-11, 1998.

DONG, Y.; BENVENISTE, E.N. Immune function of astrocytes. **Glia.** v. 36, p. 180-190, 2001.

DUARTE, M. M. et al. Oxidative stress in hypercholesterolemia and its association with Ala16Val superoxide dismutase gene polymorphism. **Clin Biochem.** v. 43, p. 1118-1123, 2010.

ERCEGOVAC, M. et al. GSTA1, GSTM1, GSTP1 and GSTT1 polymorphisms in progressive myoclonus epilepsy: A Serbian case-control study. **Seizure.** v. 32, p. 30-36, 2015.

ERTA, M. et al. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. **Int J Biol Sci.** p. 1254-1266, 2012.

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

FERREIRA, I.L.M; SILVA, T.P.T. Mortality from epilepsy in Brazil, 1980-2003. **Ciênc. saúde coletiva**[online]. v.14, p. 89-94, 2009.

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

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, p.470-472, 2005.

FISHER, R.S. et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia.** v. 4, p. 475-482, 2014.

FISHER, R.S. et al. Instruction manual for the ILAE 2017 operational classification of seizure types. **Epilepsia.** v. 4, p. 531-542, 2017.

FLORES, A. et al. ALA16VAL-MnSOD gene polymorphism and stroke: Association with dyslipidemia and glucose levels. **Gene.** 2017; v.627, p. 57-62, 2017.

FRENCH, J. A. Refractory epilepsy: clinical overview. **Epilepsia.** 2007; 48(Suppl 1):3-7.10.

GAILLARD, W.D. et al. Guidelines for imaging infants and children with recent-onset epilepsy. **Epilepsia.** v. 50, p. 2147-2153, 2009.

GALLUZZI, L. et al. Targeting post-mitochondrial effectors of apoptosis for neuroprotection. **Biochim Biophys Acta.** v. 1787, p. 402-413, 2009.

GAO, F. et al. Dendritic morphology, synaptic transmission, and activity of mature granule cells born following pilocarpine-induced status epilepticus in the rat. **Front Cell Neurosci.** 2015.

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

GREEN, L.A. et al. Endogenous Transmembrane TNF-Alpha protects against premature senescence in endothelial colony forming cells. **Circ Res.** v.118, p. 1512-1524, 2016.

GRIVICICH, I. et al. Morte celular por apoptose. **Rev Bras Cancerol.** v. 53, p. 335-343, 2007.

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

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

HENRETIG, F.M. et al. Hazardous chemical emergencies and poisonings. **N Engl J Med.** v. 380, p. 1638-1655, 2019.

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

HERTZ, L. et al. Astrocytes: Glutamate producers for neurons. **J Neurosci Res.** v.57, p. 417-428, 1999.

HOLLEY, A.K. et al. Manganese superoxide dismutase: guardian of the powerhouse. **Int J Mol Sci.** v. 10, p. 7114-62, 2011.

HOVATTA, I. et al. Oxidative stress in anxiety and comorbid disorders. **Neurosci Res.** v. 68, p. 261-275, 2010.

HOTCHKISS, R. S. et al. Cell death in disease: mechanisms and emerging therapeutic concepts. **N Engl J Med.** v. 361, p. 1570-1583, 2009.

IZUO, N. et al. Brain-Specific Superoxide Dismutase 2 Deficiency Causes Perinatal Death with Spongiform Encephalopathy in Mice. **Oxid Med Cell Longev.** 2015; 2015:238914.

JANKOWSKY, P.H.; PATTERSON, P.H. Cytokine and growth factor involvement in long-term potentiation. **Mol Cell Neurosci.** v.14, p.273-286, 1999.

JONAKAIT, G. M. The effects of maternal inflammation on neuronal development: possible mechanism. **Int J Dev Neurosci.** v. 25, p. 415-425, 2007.

JONES, D.A. Association between the rs 4880 superoxide dismutase 2 (C>T) gene variant and coronary heart disease in diabetes mellitus. **Diabetes Res Clin Pract.** v. 90, p. 196-201, 2010.

JONES, K.A.; THOMSEN, C. The role of the innate immune system in psychiatric disorders. **Mol Cell Neurosci.** v. 53, p. 52-62, 2013.

JURGENS, H.A.; JOHNSON, R.W. Dysregulated Neuronal-Microglial Cross-Talk during Aging, Stress and Inflammation. **Exp Neurol**. v. 233, p.40-48, 2012.

KIECHLE, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clin Chim Acta**. v. 326, p. 27-45, 2002.

KALUEFF, A. V. et al. Intranasal administration increases of IL-6 increased the severity of chemically induced seizures in rats. **Neurosci Lett**. v. 365, p. 106-110, 2004.

KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: oxidants, antioxidants, and disease mechanisms. **Redox Biology**. v.1, p. 244-257, 2013.

KÄRKKÄINEN, I. et al. Metalloprotease-disintegrin (ADAM) genes are widely and differentially expressed in the adult CNS. **Mol Cell Neurosci**. v. 15, p. 547-560, 2000.

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

KHAN, G.M. et al. Anticonvulsant effect and neurotransmitter modulation of focal and systemic 2-chloroadenosine against the development of pilocarpine-induced seizures. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 2418-2432, 2000.

KHANSARI, N. et al. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. **Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov**. v. 3, p. 73- 80, 2009.

KIM, G.W. et al. Manganese superoxide dismutase deficiency exacerbates cerebral infarction after focal cerebral ischemia/reperfusion in mice: implications for the production and role of superoxide radicals. **Stroke**. v. 3, p. 809-815, 2002.

KISH, S.J. et al. Increased activity of choline acetyltransferase and acetylcholinesterase in actively epileptic human cerebral cortex. **Epilepsy Res**. v.4, p. 227-231, 1988

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiol Rev**. v. 87, p. 99-163, 2007.

KUNZ, W.S. et al. Mitochondrial complex I deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy. **Ann Neurol**. v. 48, p. 766-773, 2000.

LEBOVITZ, R.M. et al. Neurodegeneration, myocardial injury and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 93, p. 9782-9787, 1996.

LEHTIMAKI, K. A. et al. Increased plasma levels of cytokines after seizures in localization-related epilepsy. **Acta Neurol. Scand**. p. 226–30, 2007.

LESZEK, J. et al. Inflammatory mechanisms and oxidative stress as key factors responsible for progression of neurodegeneration: Role of brain innate immune system. **CNS Neurol Disord Drug Targets**. v. 15, p. 329-336, 2016.

- LI, Y. et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. **Nat Genetics**. v.11, p, 376-381, 1995.
- LI, P. et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**. v. 91, p. 479-489, 1997.
- LI, J. et al. Human mesenchymal stem cell transplantation protects against cerebral ischemic injury and upregulates interleukin-10 expression in Macaca fascicularis. **Brain Res**. v. 1334, p. 65-72, 2010.
- LI, R. et al. Lipidomic characteristics and clinical findings of epileptic patients treated with valproic acid. **Cell Mol Med**. [Epub ahead of print]. 2019.
- LÖSCHER, W. et al. The clinical impact of pharmacogenetics on the treatment of epilepsy. **Epilepsia**. v. 1, p.1-23, 2009.
- LÖSCHER, W. et al. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. **Nat Rev Drug Discov**. v. 10, p.757-776, 2013.
- LUCAS, S.M. et al. The role of inflammation in CNS injury and disease. **Br J Pharmacol**. 147 Suppl 1: S232-40, 2006.
- LUGRIN, J. et al. The role of oxidative stress during inflammatory processes. **Biol Chem**. v. 395, p. 203-230, 2014.
- MANTEL-TEEUWISSE, A.K. Drug-Induced lipid changes: a review of the unintended effects of some commonly used drugs on serum lipid levels. **Drug Saf**. v. 24, p. 443-456, 2001.
- MAROSO, M. et al. Interleukin-1 type 1 receptor/Toll-like receptor signaling in epilepsy: the importance of IL-1beta and high-mobility group box 1. **J Intern Med**. v. 270, p.319-326, 2011.
- MARTINC, B. et al. The role of reactive species in epileptogenesis and influence on antiepileptic drug therapy on oxidative stress. **Curr Neuropharmacol**. v. 10, p. 328-343, 2012.
- MAO, C. et al. MnSODVal16Ala polymorphism and prostate cancer susceptibility: a meta-analysis involving 8,962 subjects. **J Cancer Res Clin Oncol**. v.163, p. 975-979, 2010.
- MATTSON, M.P.; MAGNUS, T. Aging and Neuronal Vulnerability. **Nat Rev Neurosci**. v.7, p. 278-294, 2013.
- MEHVARI, J. et al. Effects of Vitamin E on seizure frequency, electroencephalogram findings, and oxidative stress status of refractory epileptic patients. **Adv Biomed Res**. 2016.
- MELDRUM, B.; GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. **Trends Pharmacol Sci**. v. 11, p. 379-387, 1990.
- MÉNDEZ-ARMENTA, M. et al. Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy. **Oxid Med Cellular Longev**. p. 1-12, 2014.

MENON, B. et al. Oxidative stress in patients with epilepsy is independent of antiepileptic drugs. **Seizure**. 2012; 21:780-784.

MINAMI, M. et al. Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 beta, IL-6, TNF alpha and LIF in the rat brain. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 176, p. 593-598, 1990.

MITRUNEN, K.; HIRVONEN, A. Molecular epidemiology of sporadic breast cancer. The role of polymorphic genes involved in oestrogen biosynthesis and metabolism. **Mutat Res**. v. 544, p. 9-41, 2003.

NAVA-CASTRO, K. E. et al. The cytokine interleukin-6 (IL-6) as a neural and endocrine regulator. **Adv in Neuroimmune Biology**. v. Pre-press, pp. 1-14, 2018.

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

NOMURA, M. et al. Apoptotic cytosol facilitates Bax translocation to mitochondria that involves cytosolic factor regulated by Bcl-2. **Cancer Res**. v. 59, p. 5542–5548, 1999.

NORDBERG, J.; ARNÉR, J.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**. v. 31, p. 1287-1312, 2001.

OLESEN, J.B. et al. Effects of epilepsy and selected antiepileptic drugs on risk of myocardial infarction, stroke, and death in patients with or without previous stroke: a nationwide cohort study. **Pharmacoepidemiol. Drug Saf**. v. 20, p. 964-971, 2011.

PANDEY, S.; AGRAWAL, D.K. Immunobiology of Toll-like receptors: emerging trends. **Immunol Cell Biol**. v.84, p. 333-341, 2006.

PARK, S. et al. Superoxide is a potential culprit of caspase- 3 dependent endothelial cell death induced by lysophosphatidylcholine. **J Physiol Pharmacol**. v. 61, p. 375- 381, 2010.

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

PERUCCA, E.; TOMSON, T. The pharmacological treatment of epilepsy in adults. **Lancet Neurol**. v. 10, p. 446-456, 2011.

PELTOLA, J. et al. Elevated levels of interleukin-6 may occur in cerebrospinal fluid from patients with recente epileptic seizures. **Epilepsy Res**. v.31, p. 129-133, 1998.

PITKÄNEN, A.; LUKASIUK. Mechanisms of epileptogenesis and potential treatment targets. **Lancet Neurol**. v. 10, p. 173-186, 2011.

PITKÄNEN, A. et al. Epileptogenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**. (10): a022822, 2015.

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

POHLMANN-EDEN, B.; WEAVER, D.F. The puzzle(s) of pharmacoresistant epilepsy. **Epilepsia**. 2013.

PRADO, M.A. et al. Regulation of acetylcholine synthesis and storage. **Neurochem Int**.2002.

PUTIGNANO, D. et al. Antiepileptic drug use in Italian children over a decade. **Eur J Clin Pharmacol**. v. 73, p. 241-248, 2017.

RAVIZZA, T.; VEZZANI, A. Status epilepticus induces time-dependent neuronal and astrocytic expression of interleukin-1 receptor type I in the rat limbic system. **Neurosci**. v. 137, p. 301-308, 2006.

RAVIZZA, T. et al. Epilepsy: mechanisms, models, and translational perspectives. **CRC Press**. p. 45-59, 2010.

RENNO, T. et al. TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. **J Immunol**. v. 2, p. 944-953, 1995.

RIEDL, S. J; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature**. v. 5, p. 897-906, 2004.

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

ROSENBLUM, J.S. et al. On signal sequence polymorphisms and disease of distribution. **Proc Nat Acad Sci USA**. v. 93, p. 4471-4473, 1996.

ROTHWELL, N.; LUHESHI, G.N. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. **Trends Neurosci**. v. 23, p. 618-625, 2000.

SAEED, S. A. et al. Some new prospects in the understanding of the molecular basis of the pathogenesis of stroke. **Exp Brain Res**. v. 182, p. 1-10, 2007.

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, p. 176-187, 2003.

SANDER, J. W. The epidemiology of epilepsy revisited. **Curr Opin Neurol**. v. 16, p. 165-70, 2003.

SAVILL, J. et al. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nat Rev Immunol**. v. 2, p. 965-975, 2002.

SCHEFFER, I. E. et al. Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**. v.58, p. 512-521, 2017.

SCHERER, D. J.; PSALTIS, P. J. Future imaging of atherosclerosis: molecular imaging of coronary atherosclerosis with (18)F positron emission tomography. **Cardiovasc Diagn Ther**. v. 6, p. 354-67, 2016.

SCHNEIDER, H. et al. A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 95, p. 7778-7783, 1998.

SCHULTZ, L. B. et al. p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. **J Cell Biol**. v. 151, p. 1381-1390, 2000.

SERRANO-CASTRO, P. J. et al. Eslicarbazepine acetate and carotid intima-media thickness in epileptic patients. **Epilepsy Res**. p. 81-87, 2017.

SHARMA, V. et al. Antioxidant potential of curcumin against oxidative insult induced by pentylene-tetrazol in epileptic rats. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**. v. 32, p. 227-232, 2010.

SHIN, E.J. et al. Role of oxidative stress in epileptic seizures. **Neurochem Int**. v. 59, p. 122-137, 2011.

SIMS, N. R.; MUYDERMAN, H. Mitochondria, oxidative metabolism and cell death in stroke. **Biochim Biophys Acta**. v. 1802, p. 80-91, 2010.

SKILTON, M. R. et al. A comparison of the NCEP-ATPIII, IDF and AHA/NHLBI metabolic syndrome definitions with relation to early carotid atherosclerosis in subjects with hypercholesterolemia or at risk of CVD: evidence for sex-specific differences. **Atherosclerosis**, v. 190, p. 414-422, 2007.

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

SPANOS, S. et al. Caspase activity and expression of cell death genes during development of human preimplantation embryos. **Reproduction**. v. 124, p. 353-363, 2002.

SPOOREN, A. et al. Interleukin-6, a mental cytokine. **Brain Res Rev**. v. 67, p. 157-183, 2011.

SUTTON, A. et al. The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. **Pharmacogenetics**. v. 13, p. 145-157, 2003.

SUTTON, A. et al. The manganese superoxide dismutase Ala16Val dimorphism modulates both mitochondrial import and mRNA stability. **Pharmacogenet Genomics**. v. 15, p. 311-179, 2005.

TANSEY, M.G.; SZYMKOWSKI, D.E. The TNF superfamily in 2009: new pathways, new indications, and new drugs. **Drug Discov Today**. v. 14, p. 1082-1088, 2009.

TÉLLEZ-ZENTENO, J.F. et al. A validation of the new definition of drug-resistant epilepsy by the International League Against Epilepsy. **Epilepsia**. 2014.

TERRONE, G. et al. Inflammation and reactive oxygen species in status epilepticus: Biomarkers and implications for therapy. **Epilepsy Behav**. p. 30301-30304, 2019.

THOMAS, K. et al. Oxidative stress as a mechanism of valproic acid associated hepatotoxicity. **Drug Metab Rev**. v. 38, p. 627-639, 2006.

THURMAN, D.J. et al. Standards for epidemiologic studies and surveillance of epilepsy. **Epilepsia**. v. 52, p. 2-26, 2011.

TRINKA, E.; KÄLVIÄINEN, R. 25 years of advances in definition, classification and treatment of status epilepticus. **Seizure**. v. 44, p.65-73, 2017.

TUCEK, S. Choline acetyltransferase and the synthesis of acetylcholine. In V. P. Whittaker (Ed.), **Handbook of Experimental Pharmacology**. The Cholinergic Synapse. v. 86, p. 125-165, 1988.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **J Physiol**. v. 552, p. 335-344, 2003.

TUTANC, M. et al. Oxidative Status in Epileptic Children Using Carbamazepine, **Iran J Pediatr**. v.25, p. 1-4, 2015.

TUTTOLOMONDO, A. et al. Neuron protection as a therapeutic target in acute ischemic stroke. **Curr Top Med Chem**. v. 9, p. 1317-34, 2009.

VEZZANI, A. et al. Interleukin-1 β Immunoreactivity and Microglia Are Enhanced in the Rat Hippocampus by Focal Kainate Application: Functional Evidence for Enhancement of Electrographic Seizures. **J Neurosci**. v. 19, p. 5054-5065, 1999.

VEZZANI, A. et al. Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. **Epilepsia**. v. 43, p. 30-35, 2002.

VEZZANI, A.; GRANATA, T. Brain Inflammation in Epilepsy: Experimental and Clinical Evidence. **Epilepsia**. v.46, p. 1724-1743, 2005.

VEZZANI, A. et al. Glia as source of cytokines: implication for neuronal excitability and survival. **Epilepsia**. v. 49, p. 24-32, 2008.

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

VEZZANI, A.; VIVIANI, B. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. **Neuropharmacology**. v. 96, p. 70-82, 2015.

VEZZANI, A. et al. Infections, inflammation and epilepsy. **Acta Neuropathol**. v. 131, p. 211-234, 2016.

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

WATTS, L.T. et al. Stroke neuroprotection: Targeting mitochondria. **Brain Sci**. v. 3, p. 540-560, 2013.

WEE, Y.V. Inflammation in neurological disorders: a help or a hindrance? **Neuroscientist**. v. 4, p. 408-420, 2010.

WHITE, H.S. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. **Int Rev Neurobiol**. v. 81, p. 85-110, 2007.

WHO. World Health Organization. **World Health Statistics** 2015. Geneva; 2015.

WILCOX, K.S.; VEZZANI, A. Does brain inflammation mediate pathological outcomes in epilepsy? **Adv Exp Med Biol.** v. 813, p. 169-83, 2014.

WILLINGHAM, M. C. Cytochemical methods for detection of apoptosis. **J Histochem Cytochem.** v. 47, p.1101-1109, 1999.

WILSON, C.J.; FINCH, C.E.; COHEN, J.J. Cytokines and cognition – the case for a head-to-toe inflammatory paradigm. **J Am Geriatr Soc.** v. 50, p. 2041-2056, 2002.

WISPÉ, J.R. et al. Synthesis and processing of the precursor for human mangano-superoxide dismutase. **Biochim Biophys Acta.** v. 994, p. 30-36, 1989.

WOERMANN, F.G. et al. Quantitative MRI in patients with idiopathic generalized epilepsy. Evidence of widespread cerebral structural changes. **Brain.** 121 (Pt9), p. 1661-1667, 1998.

XAVIER, H. T. et al. V Diretriz brasileira de dislipidemias e prevenção de aterosclerose. **Arq Bras Cardiol,** v. 101, Supl. 1, p. 10, 2013.

YACUBIAN, E.M.T.; KOCHEN, S. **Crises epiléticas.** Leitura Médica Ltda. São Paulo. 2014.

ZELKO, I.N. et al. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. **Free Radic Biol Med.** v.33, p. 337-349, 2002.