

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Rafael Bremm Padilha

**EFEITO DE ANTI-INFLAMATÓRIO SOBRE O MODELO AGUDO DE
CONVULSÃO INDUZIDO POR PENTILENOTETRAZOL**

Porto Alegre

2018

Rafael Bremm Padilha

**EFEITO DE ANTI-INFLAMATÓRIO SOBRE O MODELO AGUDO DE
CONVULSÃO INDUZIDO POR PENTILENOTETRAZOL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Área de habilitação: Fisiologia

Orientador: Prof^a. Dr^a. Adriana Simon Coitinho

Porto Alegre

2018

“Car enfin, qu’est-ce que l’homme dans la nature? Un néant à l’égard de l’infini, un tout à l’égard du néant”.

(Blaise Pascal, Pensées, 1671, p. 47)¹

¹ Mas enfim, o que é o homem na natureza? Um nada em relação ao infinito, um todo em relação ao nada.

CIP - Catalogação na Publicação

Padilha, Rafael Bremm
Efeito de anti-inflamatório sobre o modelo agudo de
convulsão induzido por pentilenotetrazol / Rafael
Bremm Padilha. -- 2018.
57 f.
Orientadora: Adriana Simon Coitinho.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Epilepsia. 2. Convulsão. 3. Inflamação. 4.
Prednisolona. 5. Pentilenotetrazol. I. Coitinho,
Adriana Simon, orient. II. Título.

Rafael Bremm Padilha

**EFEITO DE ANTI-INFLAMATÓRIO SOBRE O MODELO AGUDO DE
CONVULSÃO INDUZIDO POR PENTILENOTETRAZOL**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovado em: 26 de maio de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª Patrícia Pereira - UFRGS

Prof. Dr. Alex Sander Da Rosa Araújo - UFRGS

Prof^ª. Dr^ª. Adriana Simon Coitinho - UFRGS

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todos envolvidos direta ou indiretamente na confecção deste trabalho. A lista é longa, mas tentarei ser breve.

Sou eternamente grato a minha orientadora, Prof^ª. Dra. Adriana Simon Coitinho, por todo apoio, dedicação, acolhimento, amizade e incentivo tanto na profissão quanto na elaboração deste trabalho. Muito obrigado pela oportunidade de participar deste grupo de pesquisa, por tirar minhas dúvidas independente do momento, pela confiança e pelo incentivo à carreira científica.

Aos colegas de laboratório, Gabriel Lima, Edson Guzzo e Amanda Domingues, meus singelos agradecimentos. Além de todo apoio e dedicação, tornaram-se excelentes amigos.

Saúdo todos os colegas de biomedicina, com os quais compartilhei minha vivência acadêmica ao longo desses cinco anos de curso.

Aos meus amigos da mais tenra idade, muito obrigado por todas as conversas, risadas e conselhos fornecidos.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento de bolsas de iniciação científica e, assim, permitir a realização deste projeto. Sou grato, também, por lutarem pelo desenvolvimento e manutenção da ciência.

Agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) por ser o berço de formação de vários profissionais que entraram ou entrarão no mercado de trabalho.

Agradeço à Nicolly Kasuga por todo amor, carinho, conversas, risadas e noites sem dormir. Ao seu lado, sinto-me mais forte.

Agradeço à minha família por todo apoio e carinho ao longo de toda minha vida; sem vocês, eu não seria nada.

Por fim, dedico esta obra a todos que lutam pelo desenvolvimento e manutenção da ciência e da educação. Aos professores, sou imensamente grato; sem vocês, esta obra não seria possível.

Abreviaturas, Siglas e Símbolos

ABE- Associação Brasileira de Epilepsia.

ACTH- Hormônio Adrenocorticotrófico

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BHE- Barreira Hematoencefálica.

CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

COX-2- Ciclo-Oxigenase do tipo 2.

cGCR- Receptor de Glicocorticoide Citosólico.

GABA- Ácido Gama-Aminobutírico.

GABA_A- Receptor do tipo A do neurotransmissor do Ácido Gama-Aminobutírico.

GABA_B- Receptor do tipo B do neurotransmissor do Ácido Gama-Aminobutírico.

GABA_C- Receptor do tipo C do neurotransmissor do Ácido Gama-Aminobutírico.

ICBS- Instituto de Ciências Básicas da Saúde.

ILEA- The International League Against Epilepsy.

IL-1- Interleucina 1.

IL-6- Interleucina 6.

SE- Status Epilepticus.

Kg- quilograma

LBE- Liga Brasileira de Epilepsia.

mg- miligrama.

mGCR- Receptor de Glicocorticoide ligado à membrana.

mRNA- Ácido Ribonucleico mensageiro.

N- número de elementos do dado amostral.

NaCl - Cloreto de Sódio.

PTZ- Pentilenotetrazol.

RT-PCR- Reação da Polimerase em Cadeia com Transcrição Reversa.

SBNec- Sociedade Brasileira para Neurociência e Comportamento.

SNC- Sistema Nervoso Central.

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral Alfa.

UFRGS- Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

WHO- World Health Organization.

RESUMO

A epilepsia é uma desordem neurológica caracterizada pela excessiva emissão de impulsos elétricos de certos tipos de células cerebrais, neurônios. As principais características são as descargas espontâneas, excessivas e hipersincrônicas recorrentes. Estima-se que 50 milhões de pessoas no mundo possuam epilepsia, tratando-se de uma das doenças neurológicas mais comuns. A convulsão, por sua vez, também é desencadeada por emissões elétricas de neurônios; todavia, alterações a níveis motores, mentais e até psíquicos também estão presentes. De certa forma, a manifestação de um quadro convulsivo ao longo da vida não caracteriza a epilepsia, mas dois ou mais, em um intervalo de tempo não longo, é um indício desta desordem. Nos últimos anos, evidências experimentais e clínicas sugerem que a manifestação de um processo inflamatório iniciado tanto a nível periférico quanto a nível neuronal pode ser uma das causas precursoras do desenvolvimento do *status epilepticus*. Neste trabalho, foram utilizados ratos Wistar para mimetizar o modelo animal de convulsão agudo induzido por pentilenotetrazol. A partir da análise da crise motora, proposta por Racine, avaliou-se o efeito de diferentes doses de um anti-inflamatório esteroidal, a prednisolona. Observou-se que o fármaco diminuiu a severidade das crises convulsivas nas duas doses avaliadas (1 e 5 mg/Kg), quando comparado ao grupo controle salina. Embora a prednisolona apresente, aparentemente, atividade anticonvulsivante, novos estudos são necessários para maior compreensão e elucidação desse efeito. Espera-se que novas alternativas terapêuticas possam auxiliar na redução e controle das crises convulsivas.

Palavras-chave: epilepsia, convulsão, inflamação, prednisolona, anti-inflamatório, pentilenotetrazol.

ABSTRACT

Epilepsy is a neurological disorder characterized by excessive emission of electrical impulses from certain types of brain cells, neurons. The main features are spontaneous, excessive and hypersynchronous recurrent discharges. It is estimated that 50 million people worldwide have epilepsy, being one of the most common neurological diseases. The seizure, in turn, is also triggered by electrical emissions from neurons; however, changes at motor, mental and even psychic levels are also present. In a way, the manifestation of a seizure crisis in lifelong does not characterize epilepsy, but two or more, over a non-long time interval, is an indication of this disorder. In recent years, experimental and clinical evidence suggests that the manifestation of an inflammatory process initiated both at the peripheral and neuronal level may be one of the precursors to the development of the status epilepticus. In this study, Wistar rats were used to mimic the animal model of acute seizure induced by pentylenetetrazole. From the analysis of the motor crisis, proposed by Racine, the effect of different doses of a steroidal anti-inflammatory agent, prednisolone. It was observed that the drug decreased the severity of seizures in the two doses evaluated (1 and 5 mg/kg) compared to the saline. Further studies are needed to elucidate this effect. It is expected that new therapeutic alternatives may help in the reduction and control of seizures.

Keywords: epilepsy, seizure, inflammation, prednisolone, anti-inflammatory, pentylenetetrazole.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Cascata fisiopatológica de eventos inflamatórios na epilepsia	19
Figura 2 – Representação esquemática do receptor GABA _A com suas quatro subunidades (2 α 2 β)	22
Figura 3 – Mecanismos de ações de um glicocorticoide.....	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 EPILEPSIA, CONVULSÃO E SISTEMA IMUNE.....	13
1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS	19
1.3 ESCALA DE RACINE	20
1.4 PENTILENOTETRAZOL.....	21
1.5 PREDNISOLONA	22
2 JUSTIFICATIVA.....	24
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	25
4 ARTIGO CIENTÍFICO.....	26
5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	35
REFERÊNCIAS.....	36
ANEXO A - NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA - EPILEPSYRESEARCH. 41	

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia, convulsão e sistema imune

A epilepsia pode ser caracterizada por excessivas descargas elétricas anormais de caráter reversível e temporário das células cerebrais, neurônios. Por um certo período de tempo, as células neuronais emitem sincronicamente sinais elétricos incorretos os quais podem acarretar a perda brusca ou não da consciência, crises motoras (características das convulsões) e perda da sensibilidade corporal. Dependendo da área onde se inicia a emissão da descarga elétrica, a epilepsia pode ser focal ou parcial, quando a emissão se restringe a uma local específico do cérebro; ou também pode se estender por toda a região cerebral, denominando-se, então, de crise generalizada (Fischer et al, 2017).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WHO-World Health Organization), aproximadamente cinquenta milhões de pessoas no mundo todo possuem epilepsia, tratando-se de uma das doenças neurológicas mais comuns². Por sua vez, dados da Associação Brasileira de Epilepsia (ABE) revelam que a cada mil pessoas, quatro a dez possuem epilepsia.³ Já a Liga Brasileira de Epilepsia (LBE) aponta que cerca de três milhões de brasileiros possuem essa doença⁴.

O diagnóstico de epilepsia é estabelecido conforme certas especificações definidas pela Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE- The International League Against Epilepsy). Segundo a própria liga: (1) pelo menos duas crises não provocadas⁵ (ou duas crises reflexas⁶) ocorrendo em um intervalo superior a 24 horas, (2) uma crise não provocada (ou uma crise reflexa) com chance de uma nova crise estimada em pelo menos 60% (Fischer et al, 2014). Todavia, a própria liga e pesquisadores consideram a definição ainda um pouco equivocada, porque os termos “não provocada” e “reflexa” soam imprecisamente porque nunca podemos ter certeza de que não houve fator provocativo (Fischer et al, 2014).

Existem vários tipos de epilepsia e sua etiologia é variada, complexa e muitas vezes desconhecida (López-Hernández et al, 2005). Entretanto, podemos afirmar que traumas, infecções, tumores, estresse, privação de sono, fármacos, abuso de drogas, febre, má

² Disponível em <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>, consultado em 19 de agosto de 2018.

³ Disponível em <http://www.epilepsia.org.br/duvidas-frequentes>, consultado em 19 de agosto de 2018.

⁴ Disponível em <http://epilepsia.org.br/mitos-e-verdades-de-epilepsia/>, consultado em 19 de agosto de 2018.

⁵ Ausência de um fator clínico.

⁶ Ocasionalmente por algum estímulo externo; como, por exemplo, luz, som, movimentos, etc.

formações congênitas, alterações hormonais e genéticas podem acarretar, posteriormente, um processo epiléptico (Rang e Dale, 2016).

A convulsão, por sua vez, também é caracterizada por descargas elétricas excessivas, anormais e hipersincrônicas do córtex cerebral. Todavia, as principais características são as alterações em nível de tonicidade muscular (gerando contrações involuntárias da musculatura, como movimentos desordenados, ou outras reações anormais como desvio dos olhos e tremores), alterações do estado mental, ou outros sintomas psíquicos (Blume et al, 2001). Pode-se afirmar que a convulsão é um tipo particular de epilepsia (Fischer et al, 2005) quando ocorre de forma não-traumática, infecciosa, tumoral, ou por nenhuma patologia conhecida e com recidiva precoce. Portanto, toda convulsão, quando ocorre nessas condições, é epiléptica, mas nem toda epilepsia acarreta necessariamente um quadro convulsivo (Fischer et al, 2005). Define-se que a principal característica da epilepsia é a recorrência (Fischer et al, 2005).

Embora dentro da definição de epilepsia, a convulsão possa ser desencadeada por vários fatores como febre, epilepsia primária, malformação cerebral, infecção no sistema nervoso central, tumor cerebral, traumatismo cranioencefálico, hemorragia cerebral e hipóxia. Também pode ser desencadeada por intoxicações exógenas, distúrbios metabólicos, como hipoglicemia, hipocalcemia, hipo ou hipernatremia, hipomagnesemia, síndromes neurocutâneas, erros inatos do metabolismo e encefalopatias crônicas progressivas (Brito, Vasconcelos e Almeida, 2017).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde, estima-se que 10% da população mundial terá pelo menos uma crise convulsiva ao longo da vida. No Brasil, embora apresente poucos estudos epidemiológicos, acredita-se que sejam registrados aproximadamente 340 mil casos novos ao ano (estimativa de incidência anual de 190/100.000) (Neto & Marchetti, 2005). Em um estudo populacional em Porto Alegre, Da Costa et al. (1982) estimaram que 0,2 a 2% da população devem apresentar uma ou mais crises durante a vida.

Apesar de existirem uma longa lista de fármacos anticonvulsivantes, aproximadamente um terço dos indivíduos não responde a medicação (Perucca et al, 2007). Além disso, muitos dos fármacos apenas impedem ou diminuem a ocorrência ou a manifestação da epilepsia, mas não a cura definitiva (López-Hernández et al.,2005). Também é importante salientar que os efeitos colaterais de tolerância, dependência, risco de morte, lesão (devido aos episódios), dano cerebral e indução de reações psicóticas se tornam um problema para o tratamento

clínico (Kwan and Brodie, 2000; Löscher, 2002). Portanto, existe a necessidade urgente de encontrar novas terapias satisfatórias que além de garantir um método efetivo de cura também possam contribuir para diminuição dos riscos aos indivíduos submetidos ao tratamento.

Nos últimos anos, surgiram fortes evidências experimentais e clínicas de que os processos inflamatórios no cérebro possam constituir um mecanismo crucial no aspecto fisiopatológico das convulsões e das epilepsias (Minami et al, 1991; De Simoni et al, 2000; Jankowsky & Patterson, 2001; Vezzani & Granata, 2005; Choi et al, 2008, 2009; Broekaart, 2018).

Os primeiros estudos relacionando inflamação à epilepsia partiram de experimentos usando esteroides e outros anti-inflamatórios para tratar espasmos infantis (Riikonen, 2004). Anteriormente, Holtzman (1981) verificou que a hipertermia ambiental acarretava convulsões em filhotes de ratos semelhantes àquelas convulsões em crianças pequenas. Sabe-se que a febre está intrinsicamente relacionada com a liberação de citocinas e outros mediadores inflamatórios (Alheim e Bartfai, 1998; Cartmell et al, 1999). Além disso, verifica-se que muitas convulsões, principalmente em crianças, ocorrem devido ao estado febril (Hauser, 1994). Posteriormente, diversos estudos em roedores foram realizados na tentativa de buscar uma relação entre convulsões febris e o desenvolvimento de crises epiléticas (Dubé et al, 2007); entretanto, os resultados são divergentes (Dubé et al, 2007). Enquanto em alguns estudos, as convulsões febris curtas ou simples não parecem ter consequências significativas sobre o desenvolvimento de epilepsia; outros, todavia, relatam que a estimulação de convulsões febris longas acarreta em um pequeno número de animais o desenvolvimento de epilepsia (Dubé et al, 2007). Mas, ainda é um mistério se a convulsão febril é um fator causal no desenvolvimento de epilepsia ou se fatores pré-existentes sejam responsáveis por desencadear a convulsão febril e epilepsia (Dubé et al, 2007).

Vezzani e Granatta (2005) relatam que alguns estudos experimentais realizados em roedores mostraram que as reações inflamatórias no cérebro podem aumentar a excitabilidade neuronal, prejudicar a sobrevivência celular e aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica às moléculas e células transmitidas pelo sangue. Além disso, verificaram que alguns tratamentos com anti-inflamatórios reduzem as convulsões em modelos experimentais e em alguns casos clínicos de epilepsia.

Chama-se sistema imunológico o conjunto de barreiras, células, mediadores químicos, tecidos e órgãos responsáveis pelo desencadeamento da resposta protetora, estabilizadora ou

destrutiva, contra agentes (seres vivos, toxinas, alérgenos⁷) externos considerados potencialmente prejudiciais ao organismo. Além disso, o sistema imune pode reconhecer estruturas próprias (internas) do organismo as quais podem ser anormais, no caso de tumores, ou normais: autoimunidade (Abbas, 2015).

Basicamente, subdivide-se o sistema imune em: inato e adaptativo. O sistema inato compõe-se de barreiras física ou mecânicas como, por exemplo, a pele e mucosas; as barreiras fisiológicas e químicas, temperatura corporal, acidez estomacal e mediadores químicos (sistema complemento, lisosimas); a barreira celular composta por neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, basófilos, naturais killers e microbiota natural. O sistema adaptativo, por sua vez, é caracterizado pelas respostas humoral, mediada pela produção e secreção de anticorpos, e celular, que envolve não só as células da imunidade inata como também os linfócitos T e B (Abbas, 2015).

A resposta inflamatória é a reação do organismo contra uma infecção, entrada de microrganismos agressores, ou lesão tecidual causada por traumas, variações de temperatura, agentes químicos e radioativos, isquemia e autoimunidade. O processo envolve células e um conjunto de moléculas químicas⁸ responsáveis pelas alterações vasculares, nocicepção, quimiotaxia, diferenciação celular e destruição celular, caracterizando, assim, os cinco sinais da inflamação: edema, dor, perda de função, calor, vermelhidão (Robbins & Cotran, 2010).

Considera-se o sistema nervoso central (SNC) como sendo imunoprivilegiado, isto é, possuem baixa resposta imunológica, estando, portanto, fisiologicamente protegido da resposta inflamatória periférica devido ao alto risco de disfunção orgânica, presença da barreira hematoencefálica (BHE), falta de uma drenagem linfática e um tráfego aparentemente baixo de monócitos e linfócitos (Ransohoff et al, 2003; Vezzani e Granatta, 2005). Todavia, a melhor definição seria imunologicamente especializado (Ransohoff et al, 2003), pois foram definidas três rotas de migração de células imunes do sangue para o SNC: através do plexo coroide, através dos vasos meníngeos para o espaço subaracnoide e através dos espaços perivasculares do parênquima (espaços de Virchow–Robin) (Ransohoff et al, 2003; Negi & Das, 2017).

A inflamação no SNC, caracterizada pela presença de leucócitos e mediadores químicos como as citocinas (Vezzani & Granatta, 2005), é ocasionada, por exemplo, por infecções, traumas, isquemia, necrose, neurodegenerações e até mesmo por excitotoxicidade

⁷ Toda ou qualquer substância capaz de mediar uma resposta de hipersensibilidade.

⁸ Principalmente a histamina, a bradicinina, o sistema complemento, o óxido nítrico, os eicosanoides e as citocinas (interleucinas, quimiocinas, interferons, fatores de necrose tumoral).

neuronal (convulsões) (Zucker et al, 1983; Vezzani & Granatta, 2005; Robbins & Cotran, 2010). Também verificaram que a inflamação e a excitotoxicidade alteram os níveis de permeabilidade da barreira hematoencefálica (Zucker et al, 1983; Vezzani & Granatta, 2005).

Em diversos estudos experimentais sobre a sobrevivência neuronal, verificou-se que moléculas pró-inflamatórias (citocinas) regulam a captação, liberação e potencialização do glutamato aos seus receptores; auxiliam na produção de agentes oxidantes e antioxidantes; e também são responsáveis pela atenuação dos níveis de cálcio intracelular. Considera-se que o equilíbrio entre os mediadores pró e anti-inflamatórios e o tempo em que o tecido é exposto à inflamação sejam responsáveis pela consequência final do processo inflamatório (Vezzani & Granatta, 2005).

Em experimentos com roedores, verifica-se que a indução de convulsão química ou elétrica desencadeia uma resposta inflamatória proeminente nas áreas cerebrais estimuladas. Por exemplo, nos estudos de Minami et al (1990), verificaram os efeitos no cérebro da aplicação de ácido caínico e pentilenotetrazol (dois potentes agentes neuroexcitatórios) em doses convulsivas. Nos resultados, observaram que o mRNA da interleucina-1 beta (agente pró-inflamatório) foi induzido intensamente no córtex cerebral, tálamo, hipotálamo e hipocampo. Por sua vez, nos estudos de De Simoni et al (2000), houve indução de epilepsia límbica por corrente elétrica em ratos; pela análise de RT-PCR⁹ e Southern blot¹⁰, observaram que existe aumento da expressão de inúmeros agentes pró-inflamatórios, como: interleucina-1 beta, interleucina-6, fator de necrose tumoral alfa.

Em humanos, observaram-se que certos pacientes com convulsões recentes apresentam interleucina-6 (citocina pró-inflamatória) no plasma e no líquido cefalorraquidiano. Verifica-se também que em casos de epilepsia do lobo temporal e na esclerose tuberosa são observados processos inflamatórios, além disso, em diversos quadros clínicos como na encefalite de Rasmussen, convulsões febris e na síndrome de West, todos apresentam associações entre estados inflamatórios e epilepsia (Vezzani & Granatta, 2005).

Em outros estudos (Choi et al, 2008, 2009), verificando a histologia cerebral de crianças com diversos tipos de epilepsia, observaram a existência de estado inflamatório invariavelmente associado à perda neuronal, má formação do arcabouço cortical e gliose (cicatrização). Além disso, vários mediadores inflamatórios foram detectados em tecido

⁹ Do inglês, Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa) é uma técnica de biologia molecular aplicada para amplificar segmentos de DNA a partir do mRNA. A partir do RT-PCR, pode-se analisar a expressão de um determinado gene.

¹⁰ Técnica eletroforética em gel de agarose que permite verificar a presença de segmentos de DNA em uma amostra.

cerebral ressecado cirurgicamente de pacientes com epilepsias refratárias (Vezzani et al, 2011). Também, verificando que há alta incidência de convulsões em doenças autoimunes, levantou-se a sugestão de que mecanismos imunes e inflamatórios têm papéis em algumas formas de epilepsia (Choi et al, 2008; Vezzani et al, 2011).

Todavia, ainda permanece um mistério a iniciação do processo inflamatório no SNC, quando não há indução de infecção, traumatismo, tumor, etc. Acredita-se que até mesmo uma leve injúria cerebral possa desencadear processos inflamatórios crônicos (Vezzani & Grannata, 2005). Além disso, evidências experimentais mostram que a barreira hematoencefálica está crucialmente envolvida na mediação do recrutamento de componentes celulares do sistema imune adaptativo, e alterações das propriedades de barreira podem predispor o cérebro para a ocorrência de convulsões (Seiffert et al, 2004). De certa forma, acredita-se que o envolvimento de mediadores inflamatórios liberados não só por células cerebrais, mas também por células imunes periféricas possam estar envolvidas tanto em convulsões individuais como no processo epileptogênico (Vezzani et al, 2001).

Segundo Vezzani et al (2005), há duas hipóteses que sustentam o início da resposta inflamatória no cérebro: (1) a resposta inflamatória inicia-se dentro do cérebro e a infiltração de células imunitárias e mediadores inflamatórios transmitidas pelo sangue é uma resposta consequente a esse evento; (2) o SNC é o alvo de uma resposta inflamatória que se origina nos tecidos linfoides periféricos. No primeiro caso, anomalias do desenvolvimento cerebral provocadas, por exemplo, por mutações estão associadas a reações inflamatórias localizadas no tecido cerebral afetado pela patologia. De acordo com a pesquisadora, essas moléculas inflamatórias podem ser induzidas pelos constituintes celulares do córtex malformado ou refletir os efeitos das mutações gênicas; a partir disso, podem constituir um dos componentes da hiperexcitabilidade neuronal relacionada à epileptogênese. Além disso, uma resposta imune também pode ser desencadeada em tecido cerebral contra componentes de neurônios ou da glia expostos por lesões. No segundo caso, por sua vez, pode ocorrer quando a epilepsia evolui após doenças infecciosas sistêmicas, em inflamação crônica, doenças como a encefalopatia de Rasmussen, ou ainda em convulsões associadas à febre.

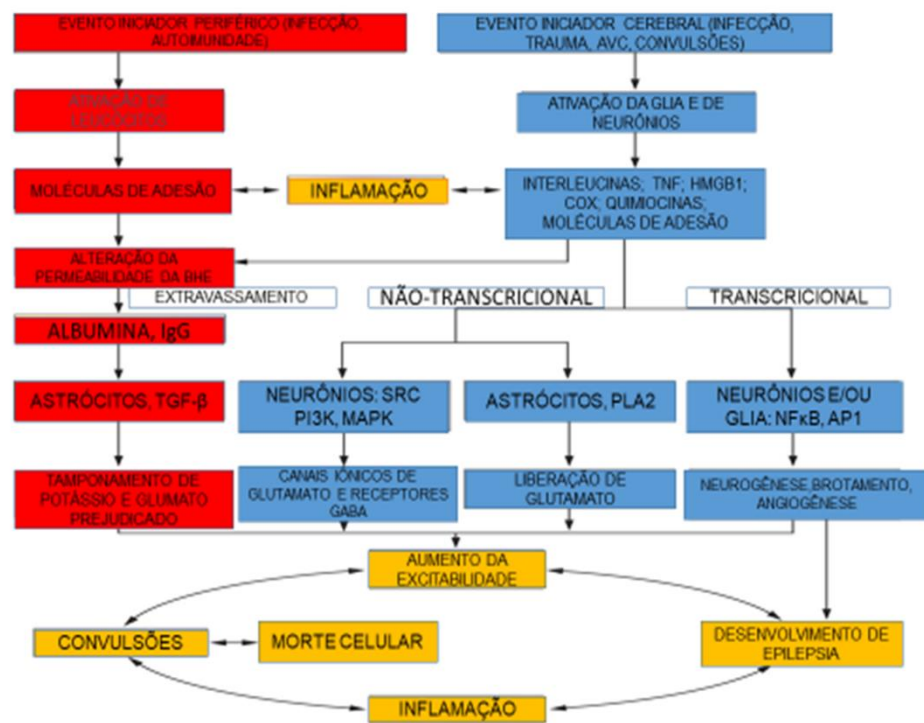


Figura 1: Cascata fisiopatológica de eventos inflamatórios na epilepsia.

Fonte: (Adaptado de Vezzani et al, Nar Rev Neurol, v. 7, n.1, p. 31-40, 2011).

Desta forma, tendo-se em vista diversas pesquisas relacionadas à área, surgiram fortes evidências de que a inflamação pode ser uma causa, bem como uma consequência da epilepsia, isto é, ainda não existe uma clara certeza de que a inflamação ocasiona a epilepsia ou se um quadro convulsivo desencadeia inflamação. Portanto, torna-se necessária uma maior compreensão do processo inflamatório ao nível periférico e neuronal, assim como a fisiopatologia da epilepsia; para que, futuramente, novas alternativas terapêuticas possam auxiliar na redução e controle das crises.

1.2 MODELOS EXPERIMENTAIS

Nos últimos anos, com a necessidade da criação de um modelo para a compreensão mais detalhada da fisiopatologia da epilepsia e na busca de novas terapias efetivas, surgiram inúmeros modelos animais com o objetivo de mimetizar a condição neurológica do *status epilepticus*¹¹ (SE). Um modelo experimental é considerado válido quando consegue reproduzir uma série de características clínicas, de forma total ou parcial, de determinada

¹¹ Refere-se a repetidas crises epiléticas ou uma crise epilética prolongada capaz de provocar uma condição duradoura e invariável.

patologia (Garcia et al, 2010). No caso da epilepsia, o modelo experimental deve preencher os seguintes requisitos: demonstrar a presença de atividade epileptiforme, nos registros eletroencefalográficos e clinicamente, apresentar uma atividade semelhante àquelas observadas durante uma crise epiléptica (Mello et al., 1986). De maneira geral, o modelo experimental de epilepsia é classificado em agudo e crônico.

O modelo agudo está relacionado à estimulação elétrica ou à administração de substâncias convulsivantes, como, por exemplo, a penicilina, o pentilenotetrazol, a picrotoxina, a bicolina, a estriquina, a pilocarpina, etc, para obtenção de um quadro epiléptico instantâneo (Quintans-Junior et al, 2007). Trata-se de um modelo amplamente empregado para a análise de fármacos que possam inibir a convulsão. O modelo crônico, por sua vez, apesar de envolver um período de tempo mais longo e trabalhoso para mimetização do quadro epiléptico, é o que melhor caracteriza as crises convulsivas em humanos. Os principais modelos crônicos envolvem o método de abrasamento (*Kindling*)¹², estresse audiogênico, alterações genéticas, etc. É importante ressaltar que ambos os modelos podem auxiliar no estudo das crises focais ou generalizadas.

Portanto, podemos afirmar que a diversidade de modelos animais disponíveis oferece uma maior gama de oportunidade para o entendimento da fisiologia do processo epiléptico, além disso, auxilia no desenvolvimento e na descoberta de novas terapias.

1.3 ESCALA DE RACINE

A escala de Racine é uma categorização de estágios das crises convulsivas epilépticas proposta por Ronald J. Racine em 1972. A partir de estudos com roedores, Racine (1972) propôs um modelo de quantificação da severidade das convulsões utilizando estimulações elétricas em áreas cerebrais específicas.

No primeiro estudo, empregando eletrodos, Racine estimulou com intensidades variáveis a amígdala, o hipocampo e a formação reticular de roedores, observando alterações musculares visíveis (convulsões motoras). No segundo estudo, Racine relacionou a intensidade da estimulação elétrica com o limiar de crises motoras. No terceiro estudo, foram realizados experimentos destinados a estabelecer relações entre o sistema límbico com o desencadeamento de crises motoras.

¹² Deve-se destacar que além dos estímulos elétricos, as substâncias indutoras de crise aguda podem gerar crises crônicas pelo método de abrasamento.

Com base nos estudos de Racine, foi proposta uma escala de quantificação da severidade da convulsão. Trata-se de cinco estágios observados conforme a severidade da crise motora (Racine, 1972):

- 1) Automatismos faciais, movimento da boca e face.
- 2) Mioclonias da cabeça e pescoço.
- 3) Clonias das patas anteriores.
- 4) Clonias das patas posteriores.
- 5) Elevação e queda.

O animal necessariamente não precisa seguir a ordem proposta pelos cinco estágios.

1.4 PENTILENOTETRAZOL

O pentilenotetrazol (PTZ) é um agente convulsivante capaz de provocar crises generalizadas do tipo ausência ou mioclônica além de crises tônico-clônicas (Löscher, 1988; Schmidt, 2007). Trata-se de uma das substâncias químicas mais utilizadas para a pesquisa de novos fármacos anticonvulsivantes em modelos animais (Schmidt, 2007).

A administração de PTZ intraperitoneal ou subcutânea, em roedores, provoca desde minuciosos clonismos faciais até violentos espasmos corporais (Löscher, 1988; Schmidt, 2007). A ação do PTZ ocorre por antagonismo não competitivo de receptores ionotrópicos do tipo GABA_A; ao ligar-se nos receptores, o PTZ evita a adesão do neurotransmissor ácido gama amino-butírico (GABA) ao sítio de ligação (Macdonald, 1978; Huang et al, 2001).

O ácido gaba amino-butírico (GABA) é considerado um dos principais neurotransmissores inibitórios do sistema nervoso central (SNC) (Rang & Dale, 2012). Após se ligar em receptores transmembrana ionotrópicos (GABA_A e GABA_C) ou metabotrópicos (GABA_B), o neurotransmissor desencadeia uma série de alterações que implicam influxo e efluxo de íons entre os meios intracelular e extracelular de neurônios do SNC (Rang & Dale, 2012). O neurotransmissor GABA, por exemplo, ligando-se em receptores GABA_A na pós-sinapse promove alterações conformacionais que culminam na entrada de íons cloreto (Cl⁻) acarretando hiperpolarização neuronal (Huang et al, 2001). O PTZ atingindo o SNC age, devido a sua ação antagonista, inibindo a abertura de canais iônicos GABA_A. Deste modo,

desregula o equilíbrio inibição/excitação no SNC, provocando a hiperexcitabilidade neuronal e desencadeando crises convulsivas (De Cabo-de la Vega, 2006).

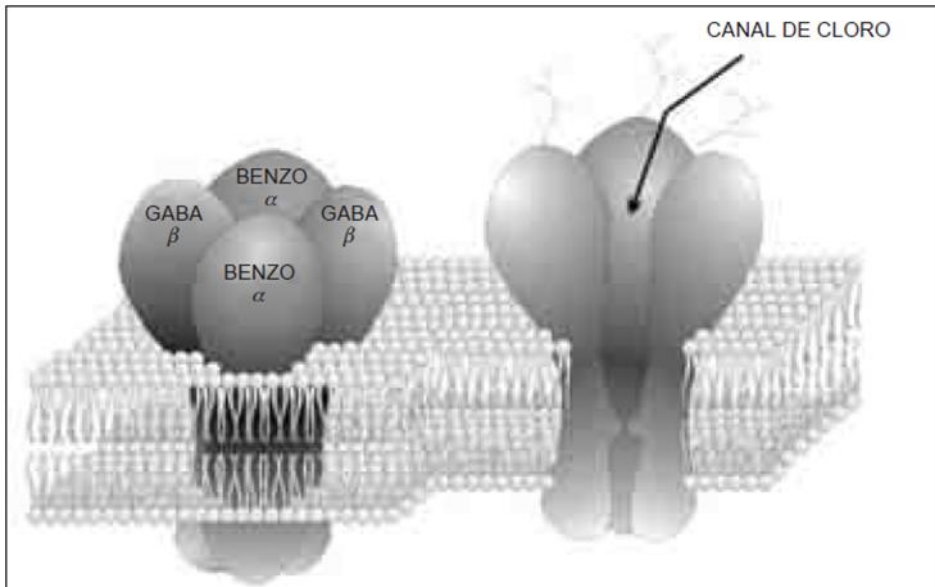


Figura 2: Representação esquemática do receptor GABA_A com suas quatro subunidades (2α2β).

Fonte: (Hernandez, Rev Fac Med UNAM Vol.48 No.5 Septiembre-October, 2005).

1.5 PREDNISOLONA

A prednisolona é um composto esteroide adrenocortical sintético utilizado na redução dos processos inflamatórios ou imunológicos (Anvisa, 2017). É utilizado para reduzir a inflamação em doenças autoimunes ou de hipersensibilidade, em certos casos de déficits hormonais da glândula adrenal e para evitar o risco de rejeição a enxertos (Rang & Dale, 2012).

Acredita-se que o efeito terapêutico da prednisolona esteja relacionado a duas grandes categorias diferentes de mecanismos: genômicos e não genômicos (Buttergerit, 1998).

Em relação aos mecanismos genômicos, que são predominantemente responsáveis pela imunomodulação (Buttgerit et al, 2004), a prednisolona liga-se a certos receptores citosólicos denominados receptores de glicocorticoides (cGCR). A ligação entre o receptor e o glicocorticoide, prednisolona, interagirá com regiões genéticas específicas, principalmente aquelas envolvidas com a resposta inflamatória, promovendo, desse modo, o controle da expressão gênica (Boumpas, 1993). Atuando dessa forma, a prednisolona é responsável por reduzir a transcrição de mediadores inflamatórios como citocinas/interleucinas, enzimas

indutíveis durante o processo inflamatório como a COX-2 e de moléculas de adesão (Rang & Dale, 2012)

Os efeitos não genômicos, também conhecidos como efeitos rápidos dos glicocorticoides, são mediados através de receptores de glicocorticóides ligados à membrana (mGCR), por receptores citosólicos (cGCR) e por interações diretas com a membrana plasmática (Buttgereit, 2002). Embora ainda não totalmente compreendidos, acredita-se que a via não genômica também é responsável pela redução da atividade imunológica e inflamatória (Buttgereit, 2004)

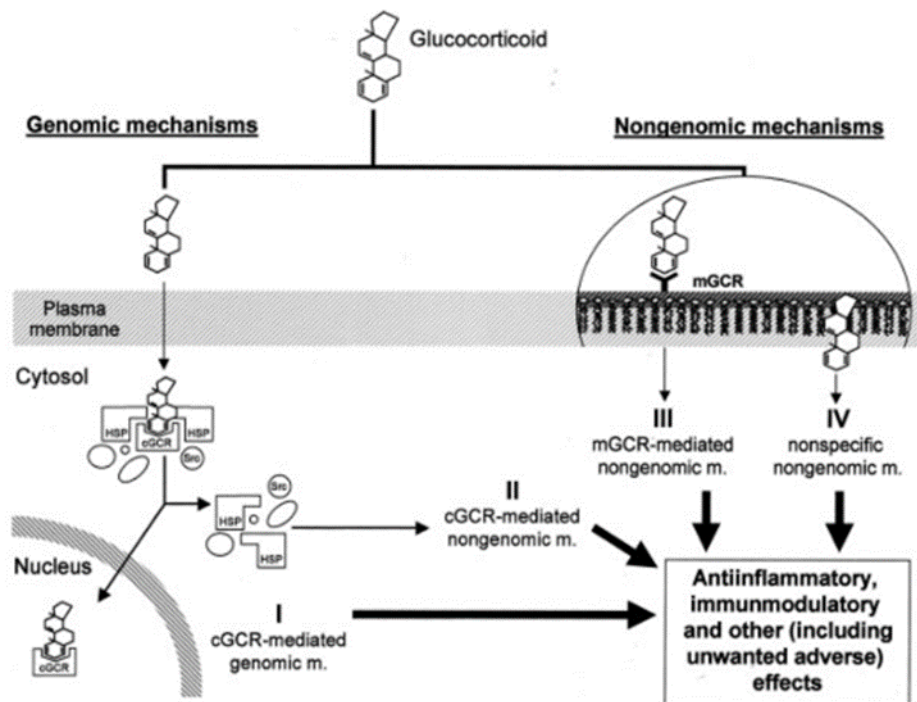


Figura 3: Mecanismos de ações de um glicocorticoide.

Fonte: (BUTTGEREIT, *Arthritis & Rheumatism*. Vol. 50, No. 11, November 2004, p. 3410).

2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que grande parte dos fármacos anticonvulsivantes não são eficazes a uma parcela significativa dos indivíduos que apresentam epilepsia. Além disso, estudos demonstram que inúmeros efeitos indesejados, como déficits cognitivos, diminuição da resposta motora, ataxia, sonolência, náuseas, arritmia, hepatotoxicidade e anemia aplásica, podem agravar ainda mais a qualidade de vida do paciente.

Em conjunto, nos últimos anos, a partir de estudos relacionando os processos inflamatórios com possíveis quadros convulsivos e epiléticos, torna-se necessário uma investigação mais minuciosa da resposta inflamatória em associação com a epilepsia.

Portanto, este trabalho, visa não somente a encontrar subsídios que sustentem a correlação dos processos inflamatórios com a epilepsia, mas também a buscar novos caminhos para a farmacoterapia.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da prednisolona, um fármaco anti-inflamatório esteroide, no modelo animal de convulsão agudo induzido por pentilenotetrazol.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito agudo da prednisolona sobre a severidade das crises convulsivas induzidas pelo PTZ.
- Testar diferentes concentrações do fármaco nos parâmetros a serem investigados.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Short communication

EFEITO DE ANTI-INFLAMATÓRIO SOBRE O MODELO AGUDO DE CONVULSÃO INDUZIDO POR PENTILENOTETRAZOL

EFFECT OF ANTI-INFLAMMATORY ON THE ACUTE MODEL OF CONVULSION INDUCED BY PENTILENOTETRAZOLE

Rafael Bremm Padilha^a, Gabriel de Lima Rosa^a, Edson Fernando Muller Guzzo^c, Adriana Simon Coitinho^{b, c, d}

^aAcadêmico do curso de Biomedicina, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

^cPrograma de Pós-Graduação em Farmacologia e Terapêutica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

^dDepartamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

Corresponding author at: Departamento de Microbiologia, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail addresses: adriana.simon@ufrgs.br, acoitinho@yahoo.com.br (A.S. Coitinho).

Abstract

A epilepsia é uma desordem neurológica caracterizada pela excessiva emissão de impulsos elétricos de certos tipos de células cerebrais, neurônios. As principais características são as descargas espontâneas, excessivas e hipersincrônicas recorrentes. Nos últimos anos, evidências experimentais e clínicas sugerem que a manifestação de um processo inflamatório iniciado tanto a nível periférico quanto a nível neuronal pode ser uma das causas precursoras do desenvolvimento do *status epilepticus*. Neste trabalho, foram utilizados ratos Wistar para mimetizar o modelo animal de convulsão agudo induzido por pentilenotetrazol. A partir da análise da crise motora, avaliou-se o efeito de diferentes doses de um anti-inflamatório esteroidal, a prednisolona. Observou-se que o fármaco diminuiu a severidade das crises convulsivas nas duas doses avaliadas (1 e 5 mg/Kg), quando comparada ao grupo controle salina. Novos estudos são necessários para maior compreensão e elucidação desse efeito. Espera-se que novas alternativas terapêuticas possam auxiliar na redução e controle das crises convulsivas.

Palavras-Chave: epilepsia, convulsão, inflamação, prednisolona, anti-inflamatório, pentilenotetrazol.

1. INTRODUÇÃO

A epilepsia pode ser caracterizada por excessivas descargas elétricas anormais de caráter reversível e temporário das células cerebrais, neurônios. Dependendo da área onde se inicia a emissão da descarga elétrica, a epilepsia pode ser focal ou parcial, quando a emissão se restringe a uma local específico do cérebro; ou também pode se estender por toda a região cerebral, denominando-se, então, de crise generalizada (Fischer et al, 2017). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WHO-World Health Organization), aproximadamente cinquenta milhões de pessoas no mundo todo possuem epilepsia, tratando-se de uma das doenças neurológicas mais comuns (WHO, 2018).

Apesar de existirem uma longa lista de fármacos anticonvulsivantes, aproximadamente um terço dos indivíduos não responde a medicação (Perucca et al, 2007). Portanto, existe a necessidade urgente de encontrar novas terapias satisfatórias que além de garantir um método efetivo de cura também possam contribuir para diminuição dos riscos aos indivíduos submetidos ao tratamento.

Nos últimos anos, surgiram fortes evidências experimentais e clínicas de que os processos inflamatórios no cérebro possam constituir um mecanismo crucial no aspecto fisiopatológico das convulsões e das epilepsias (Minami et al, 1991; De Simoni et al, 2000; Jankowsky & Patterson, 2001; Vezzani & Granata, 2005; Choi et al, 2008, 2009; Broekaart, 2018).

Em diversos estudos experimentais sobre a sobrevivência neuronal, verificou-se que moléculas pró-inflamatórias (citocinas) regulam a captação, liberação e potencialização do glutamato aos seus receptores; auxiliam na produção de agentes oxidantes e antioxidantes; e também são responsáveis pela atenuação dos níveis de cálcio intracelular. Verifica-se também que em casos de epilepsia do lobo temporal e na esclerose tuberosa são observados processos inflamatórios. (Vezzani & Grannata, 2005).

Desta forma, tendo-se em vista diversas pesquisas relacionadas à área, surgiram fortes evidências de que a inflamação pode ser uma causa, bem como uma consequência da epilepsia. A partir disso, o objetivo deste trabalho foi analisar o efeito de um anti-inflamatório, a prednisolona, sobre o modelo animal agudo de convulsão induzido por pentilenotetrazol. Analisando a severidade convulsiva, espera-se compreender um pouco mais dos efeitos de um anti-inflamatório sobre quadros convulsivos para que, futuramente, novas alternativas terapêuticas possam auxiliar na redução e controle das crises.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Neste estudo, foram utilizados 40 ratos Wistar machos, com 3 meses de idade, pesando aproximadamente 300 g. Os ratos foram mantidos no biotério setorial do departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS até o momento do experimento. Os animais tiveram livre acesso à água e comida e foram mantidos em caixas de polipropileno medindo: 41 cm de comprimento, 34 cm de largura e 16 cm de altura. Foram mantidos 4 animais por caixa, em um ambiente com ciclos de claro-escuro de 12h a uma temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Os procedimentos para o cuidado e uso dos animais foram adotados de acordo com as regulamentações publicadas pela Sociedade Brasileira para Neurociência e Comportamento (SBNec).

2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para a realização do experimento, os animais foram distribuídos em quatro grupos (10 animais por grupo) sendo os grupos 1 e 2 os controles e os grupos 3 e 4 os experimentais. Cada grupo recebeu, intraperitonealmente, as respectivas doses: salina (0,9 g%) (controle, grupo 1), o diazepam (controle, grupo 2), prednisolona 1 mg/Kg e 5 mg/Kg (experimentais, grupos 3 e 4 respectivamente).

2.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS DO MODELO AGUDO

O Pentilenotetrazol (PTZ) é um dos principais agentes químicos utilizados para obtenção de modelos agudo de convulsão (Quintans-Junior et al, 2007). Os animais, foram submetidos (30 minutos após os tratamentos) à administração de PTZ (50 mg/Kg) intraperitonealmente. Um resumo esquemático dos procedimentos realizados pode ser observado na figura 1.

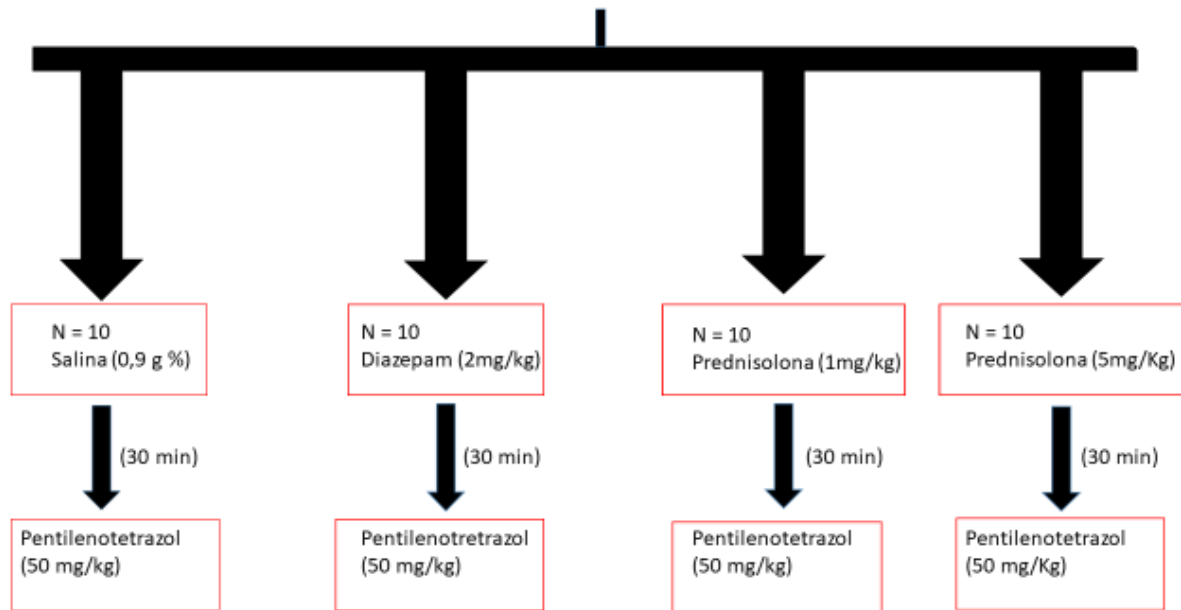


Figura 1: Esquemática dos procedimentos realizados.

2.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

Logo após administração do PTZ, cada animal foi observado durante 30 minutos. As análises ocorreram em uma caixa de polipropileno transparente. Analisou-se a severidade da convulsão, graduada de acordo com a escala de Racine e adaptada por Vieira e colaboradores (Vieira et al, 2016).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram apresentados como média e erro padrão. Após a definição dos subgrupos, foi realizada a análise estatística utilizando a Kruskal Wallis seguido pelo teste Mann-Whitney. Foram considerados estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se um banco de dados que foi montado no pacote estatístico SPSS versão 17.

3. RESULTADOS

Com base na severidade convulsiva, observamos que os animais tratados apenas com salina tendem, de acordo com a escala de Racine (0 a 5), a desenvolver os estágios mais elevados quando comparados aos grupos controle (diazepam) e experimental (prednisolona 1mg/kg e 5mg/kg); ou seja, a prednisolona nas doses 1 mg/kg e 5 mg/kg atenua a severidade convulsiva (Figura 2).

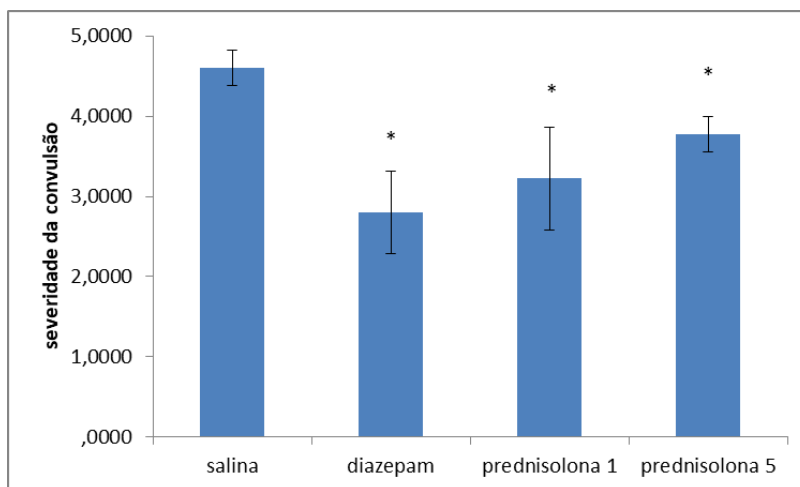


Figura 2: Efeito da prednisolona sobre a severidade convulsiva induzida por pentilenotetrazol. Os dados foram apresentados como a média ± erro padrão de cada grupo experimental (* $p < 0,05$; Kruskal Wallis seguido por Mann-Whitney).

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, demonstrou-se que um anti-inflamatório esteroide (prednisolona) contribuiu para a diminuição da severidade convulsiva no modelo agudo de convulsão induzido pelo pentilenotetrazol, quando comparado ao grupo controle (salina), apresentando a dose de 1mg/kg uma tendência de maior eficácia. O modelo experimental agudo de convulsão é amplamente utilizado na pesquisa de novos fármacos anticonvulsivantes (Quintans-Junior et al, 2007). Neste experimento, verificamos que a prednisolona, em ambas as doses, atuou na diminuição da severidade da convulsão induzida por pentilenotetrazol.

Ultimamente evidências experimentais e clínicas sugerem que um processo inflamatório ao nível periféricos ou cerebral possa estar relacionado ao desencadeamento de um quadro convulsivo e/ou epiléptico (Vezzani & Granata, 2005; Choi et al, 2008, 2009;

Broekaart, 2018). Ou seja, um dano cerebral pode acarretar um quadro inflamatório invariante que, por sua vez, implica crises convulsivas regulares, caracterizando a epilepsia. Além disso, observa-se que inúmeras doenças autoimunes, infecções e inflamações cerebrais apresentam quadros convulsivos e epiléticos como uma característica clínica (Choi et al, 2008). Desta forma, a inflamação possa ser uma das etiologias dessa desordem cerebral.

No estudo do nosso grupo de pesquisa realizado por Vieira e colaboradores (2016) observou-se que tanto a severidade convulsiva quanto os níveis de IL-6 e TNF- α apresentaram diminuição após o tratamento com o fármaco não-esteroidal diclofenaco de sódio. Além disso, estudos com outros anti-inflamatórios como a aspirina e o paracetamol sobre o modelo convulsivo induzido por pentilenotetrazol ou eletrochoque também mostraram eficácia anticonvulsivante (Vezzani & Grannata, 2005).

Em relação aos anti-inflamatórios esteroidais, embora os estudos experimentais ainda sejam escassos, existem muitos relatos e pesquisas clínicas baseadas em um grupo pequeno e heterogêneo de pacientes em relação às variáveis amostrais como tipo e duração da epilepsia, idade, frequência das crises e duração do tratamento, exceto sobre o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) o qual apresenta maiores relatos e estudos. Outro estudo recente do nosso laboratório, demonstrou que a dexametasona também apresenta característica anticonvulsivante no modelo do kindling induzido pelo PTZ. Observou-se que esse fármaco promoveu uma diminuição da severidade convulsiva além de uma redução dos níveis de TNF- α e interleucina 1 (agentes pró-inflamatórios) no hipocampo e dos níveis de TNF- α no soro (Guzzo et al, 2018).

Portanto, de acordo com este estudo, observamos que a severidade convulsiva é reduzida com a administração de prednisolona; observamos que a dose de 1mg/kg apresentou uma tendência de maior eficácia. Todavia, ainda não existe uma consonância sobre a dose efetiva. Estudos clínicos divergem entre 0,2 a 2 mg/kg. Apesar de verificarmos a redução da severidade convulsiva outros parâmetros deverão ser analisados para maior compreensão do processo.

5. CONCLUSÃO

A partir deste experimento, verificamos que um fármaco anti-inflamatório esteroidal, prednisolona, em duas doses distintas (1mg/kg e 5mg/kg), possui um efeito atenuante sobre a severidade das crises convulsivas induzidas por pentilenotetrazol.

Podemos concluir que a prednisolona apresenta um efeito aparentemente neuromodular, uma vez que contribui para a diminuição da severidade convulsiva. Portanto, para maior compreensão do efeito anti-inflamatório da prednisolona torna-se imprescindível analisar outros parâmetros comportamentais e bioquímicos

Agradecimento

Este trabalho foi financiado pela Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPESQ) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e contou com o apoio do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), da mesma universidade.

Conflitos de interesses

Não há.

REFERÊNCIAS

BROEKAART, D. W. M.; ANINK, J. J.; BAAYEN, J. C.; IDEMA, S.; DE VRIES, H.E.; ARONICA, E.; GORTER, J. A.; VAN VLIET, E. A. Activation of the innate immune system is evident throughout epileptogenesis and is associated with blood-brain barrier dysfunction and seizure progression. *Epilepsia*. 2018 Sep 8.

CHOI, J.; KOH, S. Role of Brain Inflammation in Epileptogenesis. In: *Yonsei Medical Journal*. Feb 29; 49(1): 1–18, 2008.

CHOI, J.; NORDLI, D. R. JR.; ALDEN T. D.; DIPATRI, A. J. R.; LAUX L.; KELLEY, K.; ROSENOW, J.; SCHUELE S. U.; RAJARAM, V.; KOH, S. Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy. *Journal of Neuroinflammation*, 6:38, 2009.

DE SIMONI, M. G.; PEREGO, C.; RAVIZZA, T.; et al. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci* 2000; 12:2623–2633.

FISHER, R. S.; CROSS, J. H.; FRENCH, J. A.; et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission

for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017; 58:522–530. The new classification of seizure types.

<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>.

JANKOWSKY, J. L.; PATTERSON, P. H. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobiol* 2001; 63:125-149.

GUZZO, M. F. E.; LIMA, D. R.; VARGAS, R. C.; COITINHO, A. S. Effect of dexamethasone on seizures and inflammatory profile induced by Kindling Seizure Model. *Journal of Neuroimmunology*, december 15, 2018. Volume 325, Pages 92–98.

MINAMI, M.; KURASHI, Y.; YAMAGUCHI, T.; et al. Convulsants induce interleukin-1 beta messenger RNA in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 171:832–7.

PERUCCA, E., FRENCH, J.; BIALER, M. Development of new antiepileptic drugs: challenges, incentives, and recent advances. *Lancet Neurol.* 2007 Sep;6(9):793-804.

QUINTANS-JUNIOR, L. J.; LIMA, J. T.; ALMEIDA, J. R. G. S.; BEDOR, C. N. G.; JUNIOR, R. G. C. S. Modelos animais para avaliação de drogas anticonvulsivantes: uma revisão. *Animal models evaluation employed anticonvulsant drugs: a review. Rev. Bras. Farm.* 88(4): 163-166, 2007.

VEZANNI, A.; GRANATA, T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 46, p.1724–1743, 2005.

VIEIRA, V.; GLASSMANN, D.; MARAFON, P.; PEREIRA, P.; GOMEZ, R.; COITINHO, A. S. Effect of diclofenac sodium on seizures and inflammatory profile induced by kindling seizure model. *Epilepsy Res.* 2016, 127(1): 107-113.

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A partir deste experimento, verificamos que um fármaco anti-inflamatório esteroidal, prednisolona, em duas doses distintas (1mg/kg e 5mg/kg), possui um efeito atenuante sobre a severidade das crises convulsivas induzidas por pentilenotetrazol.

Podemos concluir que a prednisolona apresenta um efeito aparentemente neuromodular, uma vez que contribui para a diminuição da severidade convulsiva. Portanto, para maior compreensão do efeito anti-inflamatório da prednisolona torna-se imprescindível analisar outros parâmetros comportamentais e bioquímicos. Espera-se, posteriormente, como perspectivas futuras, avaliar:

- Mediadores inflamatórios a níveis sorológicos e cerebrais;
- Analisar o efeito de outros fármacos anti-inflamatórios em modelos crônicos de convulsão;
- Analisar outros parâmetros comportamentais.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. p. 1-11.

ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; KUMAR, V.; COTRAN, R. S.; ASTER, J. C.; ROBBINS, S. L. *Robbins e Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 138-170.

ALHEIM, K.; BARTFAI, T. The interleukin-1 system: receptors, ligands, and ICE in the brain and their involvement in the fever response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1998; 840:51–58.

BOUMPAS, D.T.; CHROUSOS, G.P.; WILDER, R.L.; CUPPS, T.R., BALOW, J. E. Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* 1993; 119:1198-208.

BRITO, R. A.; VASCONCELOS, M. M.; ALMEIDA, S. S. A. Convulsões Seizures. *Rev. Ped. SOPERJ*, v. 17, supl. 1, p. 56-62, dez. 2017.

BROEKAART, D. W. M.; ANINK, J. J.; BAAYEN, J. C.; IDEMA, S.; DE VRIES, H.E.; ARONICA, E.; GORTER, J. A.; VAN VLIET, E. A. Activation of the innate immune system is evident throughout epileptogenesis and is associated with blood-brain barrier dysfunction and seizure progression. *Epilepsia*. 2018, Sep 8.

BUTTGEREIT F.; SCHEFFOLD A. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. *Steroids*. Volume 67, Issue 6, 2002, p.: 529-534.

BUTTGEREIT, F.; STRAUB, R. H.; WEHLING, M.; BURMESTER, G. R. Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases: an update on the mechanisms of action. *Arthritis & Rheumatism*. 2004; 50:3408-3417.

BUTTGEREIT, F.; WEHLING, M.; BURMESTER, G. R. A new hypothesis of modular glucocorticoid actions: steroid treatment of rheumatic diseases revisited. *Arthritis & Rheumatism* 1998; 41(5): 761–7.

CARTMELL, T.; et al. Brain sites of action of endogenous interleukin-1 in the febrile response to localized inflammation in the rat. *J. Physiol.* 1999; 518:585–594.

CHOI, J.; KOH, S. Role of Brain Inflammation in Epileptogenesis. In: *Yonsei Medical Journal*. Feb 29; 49(1): 1–18, 2008.

CHOI, J.; NORDLI, D. R. JR.; ALDEN T. D.; DIPATRI, A. J. R.; LAUX L.; KELLEY, K.; ROSENOW, J.; SCHUELE S. U.; RAJARAM, V.; KOH, S. Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy. *Journal of Neuroinflammation*, 6:38, 2009.

DA COSTA, J. C.; OLIVEIRA, M. L. K.; PANTA, R. M. G. Epilepsia na Infância. *Acta Médica ATM*. 1982; 142:142-79.

DE CABO DE LA VEGA, C.; VILLANUEVA-HERNANDEZ, P., MARTIN-PRIETO, A. Neuroquímica de la epilepsia, neurotransmisión inhibitoria y modelos experimentales: nuevas perspectivas. *Rev Neurol*. 2006; 42:159-68.

DE SIMONI, M. G.; PEREGO, C.; RAVIZZA, T.; et al. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci* 2000; 12:2623–2633.

DUBÉ, C. M.; BREWSTER, A. L.; RICHICHI, C.; ZHA, Q.; BARAM, T. Z. Fever, febrile seizures and epilepsy. *Trends Neurosci*. 2007. 30, p.490-496.

FISHER, R. S.; CROSS, J. H.; FRENCH, J. A.; et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 2017; 58:522–530. The new classification of seizure types.

GUZZO, M. F. E.; LIMA, D. R.; VARGAS, R. C.; COITINHO, A. S. Effect of dexamethasone on seizures and inflammatory profile induced by Kindling Seizure Model. *Journal of Neuroimmunology*, december 15, 2018. Volume 325, Pages 92–98.

HAUSER, W. A. The prevalence and incidence of convulsive disorders in children. *Epilepsia*. 1994; 35 (Suppl2): S1–S6.

HOLTZMAN, D.; OBANA, K.; OLSON, J. Hyperthermia-induced seizures in the rat pup: a model for febrile convulsions in children. *SCIENCE*. 1981 Aug 28; 213(4511):1034-6.

<http://epilepsia.org.br/mitos-e-verdades-de-epilepsia>.

<http://www.epilepsiabrasil.org.br/duvidas-frequentes>.

<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>.

JANKOWSKY, J. L.; PATTERSON, P. H. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobiol* 2001; 63:125-149.

LÓPEZ-HERNÁNDEZ, E.; BRAVO, J.; SOLÍS, H. Epilepsia y antiepilépticos de primera y segunda generación. Aspectos básicos útiles en la práctica clínica. 2005. *Rev. Fac. Med. UNAM*, 48.

LÖSCHER, W.; SCHIMIDT, D. Which animal model should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. *Epilepsy Research*. 1988; 2:145-181.

LÖSCHER, W. Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. *Trends Pharmacol*. 2002. *Sci*. 23, 113–118.

KWAN, P.; BRODIE, M. J. Early identification of refractory epilepsy. *New Engl. J. Med*, 2000, 342.

MACDONALD, R.L.; BARKER, J.L. Specific antagonism of GABA-mediated postsynaptic inhibition in cultured mammalian spinal cord neurons: a common mode of convulsant action. *Neurology*, 1978 28:325–330.

MELLO, L. E.; BORTOLOTTI, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Modelos experimentais de epilepsias. Uma Revisão. *Neurobiologia*, 1986; 49:231-268.

MINAMI, M.; KURAISHI, Y.; YAMAGUCHI, T.; et al. Convulsants induce interleukin-1 beta messenger RNA in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 171:832–7.

NEGI, N.; DAS, B. K. CNS: Not an immunoprivileged site anymore but a virtual secondary lymphoid organ. *Int Rev Immunol* 2017; Vol. 0, NO. 0; 1-12.

NETO, J. G.; MARCHETTI, R. L. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia. *Rev. Bras. Psiquiatr.* [online]. 2005, vol.27, n.4, pp.323-328.

PERUCCA, E., FRENCH, J.; BIALER, M. Development of new antiepileptic drugs: challenges, incentives, and recent advances. *Lancet Neurol.* 2007 Sep;6(9):793-804.

QUINTANS-JUNIOR, L. J.; LIMA, J. T.; ALMEIDA, J. R. G. S.; BEDOR, C. N. G.; JUNIOR, R. G. C. S. Modelos animais para avaliação de drogas anticonvulsivantes: uma revisão. *Animal models evaluation employed anticonvulsant drugs: a review. Rev. Bras. Farm.* 88(4): 163-166, 2007.

RACINE, R. Modification of seizure activity by electrical stimulation. I. After-discharge threshold. *Electroenceph. clin. Neurophysiol*, 1972, 32: 269-279.

RACINE, R. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroenceph. clin. Neurophysiol*, 1972, 32: 291-294.

RACINE, R.; OKUJAVA, V.; CHIPASHVILI, S. Modification of seizure activity by electrical stimulation. III. Mechanismes. *Electroenceph. clin. Neurophysiol*, 1972, 32: 295-299.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: motor seizure. *Electroenceph Clin Neurophysiol* 1972; 32:281-92.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. *Farmacologia*. Editora Elsevier, RJ. 7a edição, 2012.

RANSOHOFF, R. M.; KIVISAKK, P.; KIDD, G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:569–81.

RIIKONEN, R. Infantile spasms: therapy and outcome. *Child Neurol*. 2004 Jun; 19(6):401-4.

SEIFFERT, E.; DREIER, P.; IVENS, S.; et al. Lasting blood-brain barrier disruption induces epileptic focus in the rat somatosensory cortex. *J Neurosci* 2004; 24:7829–36.

SMITH, M.; WILCOX, K. S.; WHITE, H. S. Discovery of antiepileptic drugs. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2007; 4:12-17.

VEZANNI, A.; FRENCH, J.; BARTFAI, T.; BARAM, TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nar Rev Neurol*, v.7, n.1, p. 31-40, 2011.

VEZANNI, A.; GRANATA, T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 46, p.1724–1743, 2005.

VIEIRA, V.; GLASSMANN, D.; MARAFON, P.; PEREIRA, P.; GOMEZ, R.; COITINHO, A. S. Effect of diclofenac sodium on seizures and inflammatory profile induced by kindling seizure model. *Epilepsy Res*. 2016, 127(1): 107-113.

ZUCKER, D. K.; WOOTEN, G. F.; LOTHMAN, E. W. Blood-brain barrier changes with kainic acid-induced limbic seizures. *Exp Neurol* 1983; 79: 422–433.

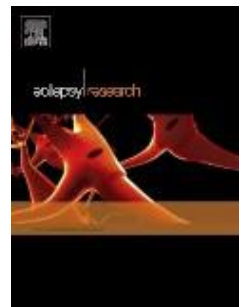
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO

O presente artigo foi redigido sob a formatação exigida pela revista *Epilepsy Research*



TABLE OF CONTENTS

- **Description** p.1
- **Audience** p.1
- **Impact Factor** p.1
- **Abstracting and Indexing** p.2
- **Editorial Board** p.2
- **Guide for Authors** p.4



ISSN: 0920-1211

DESCRIPTION

Epilepsy Research provides for publication of high quality articles in both basic and clinical **epilepsy** research, with a special emphasis on translational research that ultimately relates to epilepsy as a human condition. The journal is intended to provide a forum for reporting the best and most rigorous **epilepsy research** from all disciplines ranging from **biophysics** and **molecular biology** to **epidemiological** and **psychosocial** research. As such the journal will publish original papers relevant to epilepsy from any scientific discipline and also studies of a multidisciplinary nature. Clinical and experimental research papers adopting fresh conceptual approaches to the study of epilepsy and its treatment are encouraged. The overriding criteria for publication are novelty, significant clinical or experimental relevance, and interest to a multidisciplinary audience in the broad arena of epilepsy. Review articles focused on any topic of epilepsy research will also be considered, but only if they present an exceptionally clear synthesis of current knowledge and future directions of a research area, based on a critical assessment of the available data or on hypotheses that are likely to stimulate more critical thinking and further advances in an area of epilepsy research.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://service.elsevier.com>

AUDIENCE

Epileptologists, neurologists, clinical neurophysiologists, pharmacologists, psychiatrists.

IMPACT FACTOR

2017: 2.491 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2018

ABSTRACTING AND INDEXING

MEDLINE®

Current Contents/Life Sciences

Science Citation Index

Chemical Abstracts

EMBASE

Reference Update

Elsevier BIOBASE

Scopus

ScienceDirect

Google Scholar

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

D.M. Treiman, Newsome Chair in Epileptology, Professor of Neurology, Director, Comprehensive Epilepsy Center, Barrow Neurological Institute, Phoenix, AZ, USA

Associate Editors:

Clinical Research

H.P. Goodkin, Charlottesville, Virginia, USA

B. Lee, Busan, The Republic of Korea

Basic Research

M. Kokaia, Lund, Sweden

Editorial Board Members

C. Acevedo, Santiago Centro, Chile

C. Begley, Houston, Texas, USA

M. Bialer, Jerusalem, Israel

J.M. Blasco-Ibáñez, Burjassot, Valencia, Spain

Y. Bozzi, Trento, Italy

C. Brandt

E. Brodtkorb, Trondheim, Norway
J.E. Cavazos, San Antonio, Texas, USA
F. Cendes, Campinas, Brazil
H. Cross, London, UK
M. de Curtis, Milano, Italy
J.S. Duncan, London, UK
T. M. Ellmore, New York, New York, USA
D. Fujikawa, North Hills, California, USA
W.D. Gaillard, Washington, District of Columbia, USA
A. Galanopoulou, Bronx, New York, USA
O. Gröhn, Kuopio, Finland
C.L. Harden, New York, New York, USA
W.A. Hauser, New York, New York, USA
L. Iasemidis, Louisiana, USA
J.F. Kerrigan, Phoenix, Arizona, USA
M. Koepf, London, UK
R. Köhling, Rostock, Germany
P. Kwan, Parkville, Victoria, Australia
H.W. Lee, Seoul, The Republic of Korea
S.K. Lee, Seoul, The Republic of Korea
K. Lukasiuk, Warsaw, Poland
M.A. Mikati, Durham, North Carolina, USA
T.J. O'Brien, Parkville, Melbourne, Victoria, Australia
E. Perucca, Pavia, Italy
A. Pitkänen, Kuopio, Finland
H. Potschka, München, Germany
J Régis, Marseille, France
A. Represa, Marseille, France
L.L. Rocha, Mexico City, Mexico
M. Seeck, Geneva, Switzerland
E. So, Rochester, Minnesota, USA
G. Sperk, Innsbruck, Austria
H Stefan, Erlangen, Germany
W.H. Theodore, Bethesda, Maryland, USA
S. Thomas, Trivandrum-Kerala, India
L. Velisek, Valhalla, New York, USA
A. Vezzani, Milano, Italy
D. Zhou, Chengdu , Sichuan, , China

Previous Editors

F. Gilliam, Co-Editor 2007-2008
M. Koepf, Associate Editor 2012-2017
P. Kwan, Associate Editor 2015-2016
I.E. Leppik, Managing Editor 1985 - 2006
W. Löscher, Managing Editor 1985 - 2006
R.L. Macdonald, Managing Editor 1990 - 2006
R.W. Olsen, Managing Editor
1985 - 1989 A. Pitkänen, Co-
Editor 2007-2012
D. Schmidt, Managing Editor 1985 - 2006
W.H. Theodore, Co-Editor 2009-2012

GUIDE FOR AUTHORS

TYPES OF ARTICLE

The journal will publish full-length original articles, full-length feature reviews or mini-reviews and short communications. In general, it is the policy of Epilepsy Research to not publish case reports. Our focus is on the publication of hypothesis driven empirical quantitative research data. Letters to the Editor will be published at the Editors discretion.

Every effort will be made to notify authors about acceptance or rejection within 4 to 6 weeks. Categories of manuscripts include:

- 1) Full-length Papers: giving findings of original basic or clinical research in any area of epilepsy within the scope of the journal.
- 2) Short Communications: 1,500 words plus no more than 3 figures or tables in total 20 references.
- 3) Review Articles: on specialised topics within the scope of the journal. Prospective authors should contact the Editor-in-Chief or one of the Associate Editors beforehand.

Language (usage and editing services)

Please see the section below for full details [here](#).

SUBMISSION CHECKLIST

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
 - All figures (include relevant captions)
 - All tables (including titles, description, footnotes)
 - Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
 - Indicate clearly if color should be used for any figures in print
- Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed

- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex and gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Articles should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader, should contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of race, sex, culture or any other characteristic, and should use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, for instance by using 'he or she', 'his/her' instead of 'he' or 'his', and by making use of job titles that are free of stereotyping (e.g. 'chairperson' instead of 'chairman' and 'flight attendant' instead of 'stewardess').

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups throughout [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the [accepted manuscript](#) in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The [published journal article](#) cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peerreviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

Gold open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their researchfunder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 2900**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Please submit your article via <https://www.evise.com/profile/api/navigate/EPIRES>

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review](#).

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very

similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes](#).

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/epilepsy-research>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999).... Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)... Kramer et al. (2010) have recently shown ...'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci.*

Commun. 163, 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. *Heliyon.* 19, e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK.
<http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1.
<https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate

research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).