

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - UVV**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**KEFIR E ANTIEPILÉPTICOS: NEUROPROTEÇÃO EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE CRISES CONVULSIVAS**

**EDUARDA DE SOUZA BELISÁRIO**

**VILA VELHA-ES**  
**FEVEREIRO / 2023**

**UNIVERSIDADE VILA VELHA - UVV**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**KEFIR E ANTIEPILÉPTICOS: NEUROPROTEÇÃO EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE CRISES CONVULSIVAS**

Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas.

**EDUARDA DE SOUZA BELISÁRIO**

**VILA VELHA**  
**FEVEREIRO / 2023**

Catálogo na publicação elaborada pela Biblioteca Central / UVV-ES

B431k

Belisário, Eduarda de Souza.

Kefir e antiepilépticos : neuroproteção em modelo experimental de crises convulsivas / Eduarda de Souza Belisário – 2023.

74 f.: il.

Orientadora: Bianca Prandi Campagnaro e Rafaela Aires.  
Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Vila Velha, 2023.

Inclui bibliografias.

1. Farmacologia Terapêutica. 2. Epilepsia. 3. Antioxidante.  
4. Estresse oxidativo. 5. Probióticos. I. Campagnaro, Bianca  
Prandi. II. Aires, Rafaela. III. Universidade Vila Velha. IV. Título.

CDD 615

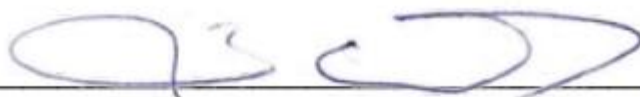
**EDUARDA DE SOUZA BELISÁRIO**

**KEFIR E ANTIEPILÉPTICOS: NEUROPROTEÇÃO EM MODELO  
EXPERIMENTAL DE CRISES CONVULSIVAS**

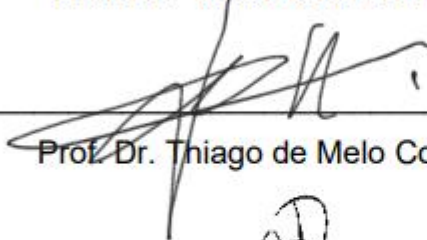
Dissertação apresentada à Universidade Vila Velha como pré-requisito do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 13 de fevereiro de 2023.

**Banca examinadora:**



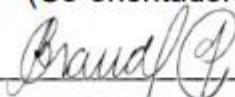
Prof. Dr. Breno Valentim Nogueira - (UFES)



Prof. Dr. Thiago de Melo Costa Pereira - (UVV)



Dra. Rafaela Aires - (UVV)  
(Co-orientadora)



Profa. Dra. Bianca Prandi Campagnaro - (UVV)  
(Orientadora)

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus que me permitiu passar por tantos momentos enriquecedores durante minha trajetória.

Ao meu pai Izaldino, minha mãe Juzelda e meu irmão Kauã pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Aos meus amigos e demais familiares que sempre caminharam juntos, incentivaram e acreditaram no meu potencial.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por todo o aprendizado dessa jornada, sempre me mostrando que tudo acontece no seu tempo, me ajudou e acalmou meu coração diante das dificuldades, me permitindo concluir essa etapa.

A professora Dra. Bianca Prandi Campagnaro que me aceitou como sua aluna desde a iniciação científica, comprou minha ideia de realizar este projeto promissor. Obrigada pela paciência, dedicação, disponibilidade, orientação e por todo crescimento acadêmico. Eterna admiração e gratidão.

À Dr<sup>a</sup>. Rafaela Aires pelo conhecimento transmitido, sugestões pertinentes, sempre disposta a ajudar.

Agradeço as minhas amigas Larissa Zambom, Glaucimeire Carvalho, Maria Eduarda Uliana pela contribuição científica, suporte emocional e amizade.

Aos alunos de iniciação científica, em especial Alisson Siqueira, Amanda Nunes, Guilherme Pinheiro, Júlia Maioli, Juliana Martins e Victoria Guimarães pela colaboração e dedicação ao projeto.

À Ezio Henrique pela parceria com a histologia e ao professor/coordenador Dr. Breno Valentim Nogueira do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) da Universidade Federal do Espírito Santo pela colaboração permitindo a finalização do trabalho.

Aos integrantes do nosso Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Translacional pelo companheirismo e troca de conhecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Vila Velha (PPGCF-UVV) pela oportunidade de estudo, e aos professores por todo ensinamento.

Agradeço a parceria da Universidade Federal do Espírito Santo e Instituto Federal do Espírito Santo, que permitiram a realização de alguns experimentos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), CNPq e Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES), pela bolsa de estudos concedida e apoio financeiro.

A banca examinadora composta pelos professores Dr. Breno Valentim Nogueira e Dr. Thiago de Melo Costa Pereira pela disponibilidade, todas críticas construtivas e sugestões.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho. Gratidão.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	17
1.1 Epilepsia	19
1.2 Epileptogênese	20
1.3 Farmacologia na Epilepsia	22
1.4 Eixo bidirecional: Intestino-cérebro	24
1.5 Probiótico kefir	25
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	27
<b>3. OBJETIVOS</b>	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos	28
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	29
4.1. Desenho experimental	29
4.2. Animais	29
4.3. Tratamentos experimentais	30
4.3.1 Kefir artesanal	30
4.3.2 Kefir comercial	30
4.4. Indução das crises convulsivas	31
4.5. Análise comportamental	31
4.5.1. Gravação dos vídeos	31
4.5.2. Escala de Raccini Modificada	32
4.6. Análise sistêmica e neural	32
4.6.1. Obtenção do sangue e cérebro	32
4.6.2. Isolamento das células cerebrais	33
4.6.3. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)	33
4.6.4. Análise da viabilidade e apoptose celular	34
4.6.5. Determinação de produtos de oxidação proteica (AOPP)	34
4.6.6 Análises de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	35
.....	35



4.6.7 Análise Histológica .....	35
4.6.8. Coloração de Nissl para substância de Nissl no citoplasma do Neurônio.....	36
4.7. Análise estatística .....	36
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
5.1 Análise do peso corporal.....	38
5.2 Análise comportamental segundo a Escala de Raccine Modificada.....	39
5.3 Análise da oxidação de proteínas e peroxidação lipídica plasmática.....	41
5.4 Análise do estresse oxidativo cerebral .....	42
5.5 Análise da viabilidade e apoptose cerebral .....	43
5.6 Análise da oxidação de proteínas e peroxidação lipídica cerebral.....	44
5.7 Quantificação histológica e neurônios pela coloração de Nissl.....	46
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>55</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>74</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Desenho experimental do estudo.....	30
<b>Figura 2:</b> Análise da média do peso corporal dos grupos de tratamento entre o 1º e 6º dia de experimento.....	38
<b>Figura 3:</b> Efeitos do probiótico kefir em convulsões induzidas por PTZ..	40
<b>Figura 4:</b> Efeitos do probiótico kefir em convulsões induzidas por PTZ..	41
<b>Figura 5:</b> Alterações em macromoléculas plasmáticas..	42
<b>Figura 6:</b> Análise do estresse oxidativo por DCF..	43
<b>Figura 7:</b> Análise de apoptose celular. ....	44
<b>Figura 8:</b> Alterações em macromoléculas cerebrais.....	45
<b>Figura 9:</b> Quantificação histológica pela coloração de Nissl da parte frontal do cérebro. .....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Escala de Raccini Modificada.....	32
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

AOPP	Produtos de oxidação proteica
AVE	Acidente vascular encefálico
BAA	Bactérias do ácido acético
BAL	Bactérias do ácido láctico
BHE	Barreira hematoencefálica
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CAT	Catalase
DCFH-DA	2'7'-diacetato de dicloro fluoresceína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
FAEs	Fármacos antiepiléticos
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GSH	Glutaciona
GST	Glutaciona transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HHA	Hipotálamo-hipófise-adrenal
IL 1B	Interleucina 1B
IL 6	Interleucina 6
IL 8	Interleucina 8
ILAE	International League Against Epilepsy
K <sup>+</sup>	Potássio
Na <sup>+</sup>	Sódio
NMDA	N-metil-D-aspartato
PBS	Tampão fosfato-salino
PFA 4%	Paraformaldeído 4 %
PI	Propidium Iodide
PTZ	Pentilenotetrazol
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
SNA	Sistema nervoso autônomo

SNC Sistema nervoso central  
SNE Sistema nervoso entérico  
SOD Superóxido dismutase  
TBA Ácido tiobarbitúrico  
TCE Traumatismo cranioencefálico  
TNF $\alpha$  Fator de necrose tumoral  $\alpha$

## RESUMO

BELISÁRIO, Eduarda de Souza, M.Sc; Universidade de Vila Velha-ES, fevereiro de 2023. **Kefir e antiepilépticos: Neuroproteção em modelo experimental de crises convulsivas.** Orientadora: Prof. Dra. Bianca Prandi Campagnaro, Co-orientadora: Dra. Rafaela Aires.

A epilepsia é uma doença neurológica com alta prevalência global caracterizada por alterações paroxísticas anormais na atividade elétrica dos neurônios com consequências cognitivas, sensoriais, motoras e psiquiátricas. A etiologia multifatorial está relacionada ao aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), consequente aumento de citocinas inflamatórias e estresse oxidativo cerebral favorecendo à disfunção neuronal. Embora os fármacos antiepilépticos (FAEs) combaterem os fatores causais das convulsões o seu uso não impossibilita o desenvolvimento da epilepsia. Os resultados insatisfatórios são provenientes da refratariedade ao tratamento, aumento da taxa de morbidade, mortalidade e, mais recentemente, tem-se observado a participação da disbiose intestinal. Neste contexto, a busca por terapias coadjuvantes não farmacológicas com probióticos se demonstra promissora, especialmente através da modulação da microbiota intestinal. Assim, o probiótico kefir - um nutracêutico com comprovadas ações antioxidantes e anti-inflamatórias- hipotetizamos ser importante para auxiliar o tratamento da epilepsia. Logo, este estudo translacional teve como objetivo avaliar se o consumo de kefir isolado e associado aos FAEs poderia reduzir a quantidade, severidade e período de latência das crises convulsivas em um modelo experimental de epilepsia induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) em camundongos. Noventa camundongos C57 machos, foram distribuídos aleatoriamente em 9 grupos (n=10), que receberam diazepam (10mg/Kg), levetiracetam (50mg/kg), kefir artesanal (300µL/Kg), kefir comercial (300µL/Kg), kefir e diazepam (300µL/Kg; 10 mg/Kg); kefir e levetiracetam (300µL/Kg; 50 mg/Kg); kefir comercial e diazepam (300µL/Kg; 10mg/Kg); kefir comercial e levetiracetam (300µL/Kg; 50mg/Kg), à exceção do grupo controle, que recebeu apenas solução salina. O tratamento foi realizado por um período de 5 dias antes da administração do PTZ (60 mg/Kg). No sexto dia, após a administração, foram realizadas as filmagens (30min) e interpretadas pela Escala de Raccini modificada, quantificando os scores, total de crises, período de latência e tipos de crises. Após a eutanásia, o sangue total e cérebro foram coletados para análise de estresse oxidativo, apoptose, oxidação proteica, peroxidação lipídica e quantificação de neurônios. Como resultado, os camundongos submetidos ao tratamento com probióticos atenuou as crises convulsivas, aumentou o período de latência, reduziu a geração de espécies reativas de oxigênio e apoptose, além de reduzir a expressão de oxidação de proteínas e peroxidação lipídica cerebral e plasmática evidenciando os efeitos neuroprotetores do probiótico kefir. Portanto, o consumo de probióticos demonstrou ser promissor como coadjuvante na atuação com antiepilépticos.

**PALAVRAS CHAVES:** Epilepsia. Probiótico. Antioxidante. Estresse oxidativo. Disbiose.

## **ABSTRACT**

BELISÁRIO, Eduarda de Souza, M.Sc; University of Vila Velha-ES, February 2023.

### **Kefir and antiepileptics: Neuroprotection in an experimental model of seizures.**

Advisor: Prof. Dra. Bianca Prandi Campagnaro, Co-advisor: Dra. Rafaela Aires.

Epilepsy is a neurological disease with a high global prevalence characterized by abnormal paroxysmal changes in the electrical activity of neurons with cognitive, sensory, motor and psychiatric consequences. The multifactorial etiology is related to increased permeability of the blood-brain barrier (BBB), consequent increase in inflammatory cytokines and cerebral oxidative stress, favoring neuronal dysfunction. Although antiepileptic drugs (AEDs) combat the causative factors of seizures, their use does not preclude the development of epilepsy. Unsatisfactory results result from refractoriness to treatment, increased morbidity and mortality rates and, more recently, intestinal dysbiosis has been observed. In this context, the search for non-pharmacological adjuvant therapies with probiotics is promising, especially through the modulation of the intestinal microbiota. Thus, the probiotic kefir - a nutraceutical with proven antioxidant and anti-inflammatory actions - is hypothesized to be important in helping the treatment of epilepsy. Therefore, this translational study aimed to evaluate whether the consumption of kefir alone and associated with AEDs could reduce the amount, severity and latency period of seizures in an experimental model of epilepsy induced by pentylenetetrazole (PTZ) in mice. Ninety male C57 mice were randomly distributed into 9 groups (n=10), which received diazepam (10mg/Kg), levetiracetam (50mg/kg), homemade kefir (300µL/Kg), commercial kefir (300µL/Kg), kefir and diazepam (300µL/Kg; 10 mg/Kg); kefir and levetiracetam (300µL/Kg; 50 mg/Kg); commercial kefir and diazepam (300µL/Kg; 10mg/Kg); commercial kefir and levetiracetam (300µL/Kg; 50mg/Kg), except for the control group, which received only saline solution. The treatment was carried out for a period of 5 days before the administration of PTZ (60 mg/Kg). On the sixth day, after administration, filming (30 minutes) was performed and interpreted using the modified Raccini Scale, quantifying the scores, total seizures, latency period and types of seizures. After euthanasia, whole blood and brain were collected for analysis of oxidative stress, apoptosis, protein oxidation, lipid peroxidation and quantification of neurons. As a result, mice submitted to treatment with probiotics attenuated convulsive crises, increased the latency period, reduced the generation of reactive oxygen species and apoptosis, in addition to reducing the expression of protein oxidation and cerebral and plasma lipid peroxidation, evidencing the effects neuroprotectors of the probiotic kefir. Therefore, the consumption of probiotics proved to be promising as an adjunct in the performance of antiepileptic drugs.

**Keywords:** Epilepsy. Probiotic. Antioxidant. Oxidative stress. Dysbiosis.



## 1. INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma desordem multifatorial do sistema nervoso central (SNC) com prejuízos neurobiológicos, cognitivos, psicológicos e sociais provenientes das convulsões (Bortolini et al., 2009; Hernández et al., 2013; Fisher et al., 2014; Beghi 2020). De caráter “democrático”, cerca de 70 milhões de pessoas em todo o mundo de qualquer idade, raça e classe social são afetadas (Singh 2016; Devinsky et al., 2018; CLöscher et al., 2020). Atualmente a etiologia multifatorial e complexidade das crises convulsivas tornam mais difícil o diagnóstico e tratamento farmacológico adequado (Chang 2003; Bagheri et al. 2019; CLöscher et al. 2020).

No SNC, os fármacos antiepilépticos (FAEs) reduzem a excitabilidade neuronal e, conseqüentemente o desencadeamento das crises epiléticas, através da modulação de neurotransmissores (GABA, glutamato) e de canais iônicos ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ) (Chang 2003; Bagheri et al. 2019). Apesar de combaterem os fatores causais das convulsões o uso de FAEs não impossibilita o desenvolvimento da epilepsia (Bagheri et al. 2019). Além disso, as crises epiléticas recorrentes podem ser geradas por respostas inflamatórias sistêmicas induzidas por esses fármacos, levando a efeitos deletérios e injúrias cerebrais (Choi 2008; Aronica et al. 2011; Vezzani et al. 2011). Outro problema atrelado ao uso crônico deve-se a indução do sistema de biotransformação provocada por muitos dos FAEs (fenobarbital, fenitoína, carbamazepina), culminando com mais rápida depuração do fármaco, repercutindo em redução da concentração sérica destes e recidiva das crises (Stępień 2012; Zhang et al. 2013).

Recentemente, as alterações na microbiota intestinal foram associadas à suscetibilidade a convulsões (Dahlin 2019). É importante ressaltar que a disbiose intestinal está diretamente associada a distúrbios neurológicos como autismo (Mulle 2013), esclerose múltipla (Jangi et al 2016), doença de Parkinson (Parashar 2017) e mal de Alzheimer (Jiang et al. 2017; Ton et al. 2019). Diante disso, especula-se que alterações na microbiota intestinal exerçam influência direta sobre a fisiologia e a neuroquímica do SNC e, desta forma, terapias capazes de reduzir a disbiose contribuam para a melhora de sintomas como alterações do comportamento, cognição, humor, ansiedade e depressão (Cryan 2012).

A microbiota intestinal e o cérebro podem se comunicar bidirecionalmente através dos sistemas nervoso central e entérico (Chen et al. 2015). O sistema nervoso entérico (SNE) responde a estímulos das vias simpática e parassimpática ao mesmo tempo em que fornece informações ao SNC por meio de circuitos neurais ascendentes (Chen et al. 2015). Além disso, cérebro e intestino se conectam através de vias endócrinas, imunológicas e metabólicas (Grenham et al. 2011).

Portanto, o eixo intestino-cérebro fornece à microbiota intestinal e seus metabólitos vias potenciais através das quais acessar o cérebro (Mayer, 2011). Este eixo integra um sistema de comunicação constituindo a sinalização neural, hormonal e imunológica, além de participar do desenvolvimento neuronal, função cerebral, regulação cognitiva e envelhecimento (Mayer, 2011).

É crescente a busca por novas terapias alternativas que possam auxiliar na redução das crises epiléticas. Neste contexto, os probióticos surgem como uma fonte promissora devido à importância da modulação da microbiota intestinal e o eixo intestino cérebro (Ton et al. 2019; Lemos et al. 2021).

O probiótico kefir é um leite fermentado produzido a partir de grãos, formados por bactérias do ácido láctico (BAL) leveduras e bactérias do ácido acético (BAA) (Amorim et al. 2019; Kim et al. 2019). O kefir é um alimento funcional utilizado há décadas como fonte nutritiva através da modulação da microbiota intestinal, trazendo diversos benefícios à saúde (Jalali et al. 2016; Rosa et al. 2017; Wilkins et al. 2017; Amorim et al. 2019).

Nosso grupo de pesquisa estuda o probiótico kefir há quase uma década. Durante este tempo, observamos os benefícios do consumo do kefir em doenças cardiovasculares (Friques et al. 2015; Klippel et al. 2016), do trato gastrointestinal (Barbosa et al. 2018) e em doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer (Ton et al. 2019). De forma inédita, observamos melhora cognitiva em pacientes com doença de Alzheimer avançado após o consumo de kefir durante 90 dias e que este resultado estava associado às propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias do probiótico (Ton et al. 2019).

O relato de caso de um paciente com encefalite de Rasmussen feito pelo nosso grupo foi o gatilho para o desenvolvimento desta dissertação. Lemos e colaboradores (2021) observaram que o kefir pode ser um potencial adjuvante no tratamento da

encefalite de Rasmussen, pois levou à diminuição no número e intensidade de crises epiléticas, além da redução importante nos níveis de biomarcadores de estresse oxidativo e de inflamação (Lemos et al. 2021).

Diante desses resultados, decidimos verificar se o consumo do probiótico kefir associado aos tratamentos antiepiléticos convencionais poderia auxiliar na redução da inflamação e estresse oxidativo sistêmico e local, contribuindo para diminuição das crises epiléticas. Portanto, a fim de buscar novas alternativas terapêuticas e diminuir os efeitos deletérios das crises epiléticas, o presente estudo translacional investigou o efeito neuroprotetor do probiótico kefir em modelo experimental de epilepsia induzido pelo antagonismo da via GABAérgica.

## 1.1 Epilepsia

A *International League Against Epilepsy* (ILAE) define a epilepsia como a ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas com atividade neuronal anormal excessiva ou síncrona no cérebro, caracterizada por predisposição duradoura levando ao surgimento de crises epiléticas (Fisher et al. 2005; Trinka et al. 2015). As crises epiléticas estão ligadas a eventos paroxísticos pelo desequilíbrio das redes neurais excitatórias e inibitórias, através de convulsões espontâneas e recorrentes favorecendo as perturbações neurológicas (Goldberg 2013; Gómez-Eguílaz et al. 2018).

A epilepsia é determinada pelas seguintes condições: 1- ocorrência de duas crises epiléticas não provocadas ou reflexas em um intervalo maior que 24h; 2- ocorrência de uma crise epilética não provocada ou reflexa, com probabilidade de ocorrência de novas crises epiléticas semelhantes ao risco geral, que é em torno de 60%, após duas crises não provocadas nos últimos 10 anos; e 3- quando for diagnosticada síndrome epilética (Fisher et al. 2014; Scheffer et al. 2016).

O diagnóstico da epilepsia engloba uma série de condições clínicas caracterizadas por alteração transitória da consciência e/ou comportamento, história clínica detalhada, exames de imagem e observações das crises (Stafstrom 2015). Apesar dos avanços científicos, a identificação das crises epiléticas ainda pode ser incerta e/ou inconclusiva, pois o indivíduo pode apresentar desde mioclonias

palpebrais e movimentos tônico-clônicos até crises de ausência (Berkovic 2015; Pardo et al. 2004).

As crises epiléticas podem ser de origem genética, que correspondem às alterações nos receptores GABAérgicos (Stafstrom 2015; Gómez-Eguílaz et al. 2018) e nos canais iônicos da membrana neuronal (Berkovic 2015), ou adquirida quando desencadeada por febre alta, acidente vascular encefálico (AVE), traumatismo cranioencefálico (TCE) (Berkovic 2015), entre outros. Porém, em muitos casos a etiologia é desconhecida (Devinsky et al. 2018).

As crises epiléticas podem se evidenciar de forma focal (simples e complexas) e generalizadas (alterações bilaterais) (Gómez-Eguílaz et al. 2018). No caso da focal, ela é determinada pela atividade neuronal anormal em uma ou mais regiões cerebrais localizadas no mesmo hemisfério (Scheffer et al. 2016), porém, quando disseminado em ambos os hemisférios são denominadas generalizadas (Scheffer et al. 2016; Fisher et al. 2014). Vale destacar que uma crise de início focal pode desencadear uma do tipo generalizada (Fisher et al. 2014; Elger 2008; Cascino et al. 2008; Scheffer et al. 2016).

As crises epiléticas recorrentes estimulam focos de epileptogênese adicionais através do aumento do estresse oxidativo que participa de vias que levam à neurodegeneração (Nemade 2010; Goldberg 2013). Conseqüentemente, é comum a progressão de declínios cognitivos, comportamentais, psicológicos (ansiedade, depressão, espectro de autismo) (Dichter 2006), e inclusive direto impacto socioeconômico para os pacientes e seus familiares (Bagheri et al. 2019; Helmstaedter 2017; Bergey et al. 2015).

## **1.2 Epileptogênese**

Os mecanismos de epileptogênese são marcados pelo início das alterações patológicas até o desenvolvimento da epilepsia (Helmstaedter 2017). Embora sua fisiopatologia seja pouco compreendida, evidências sugerem que entre os fatores principais na etiopatogenia da epilepsia estão os distúrbios da barreira hematoencefálica (BHE) (Pearson-Smith 2017), estresse oxidativo (Pitkänen 2009), inflamação (Pitkänen 2009), hipóxia (Bar-Klein et al. 2017) e alterações em

neurotransmissores (Löscher 2010), favorecendo o desenvolvimento e recorrência de convulsões com danos cerebrais (Aroniadou-Anderjaska et al. 2017; Aronica 2011; Choi 2008).

A BHE é essencial para a manutenção da homeostase cerebral (Martinc 2011; Sweeney et al. 2019; Varatharaj 2017). Ela é formada essencialmente por células endoteliais, células epiteliais escamosas, membrana basal, pés perivasculares dos astrócitos fibrosos e astrócitos protoplasmáticos (Martinc 2011; Sweeney et al. 2019). Seus componentes estruturais importantes são as múltiplas junções estreitas entre células adjacentes dos capilares vasculares, parênquima cerebral e regiões anatômicas distintas do cérebro, como o neocórtex (Martinc 2011; Sweeney et al. 2019; Varatharaj 2017; Lukiw 2020).

A BHE regula seletivamente os compartimentos intracelulares do SNC, assim, isola-se das rápidas mudanças bioquímicas e biofísicas que podem ocorrer na circulação sistêmica (Sweeney et al. 2019; Tulkens et al. 2018; Logsdon et al. 2018; Varatharaj 2017). Logo, o excesso de estresse oxidativo e inflamação sistêmica e/ou neural provenientes da convulsão afeta as junções endoteliais, aumentando a permeabilidade da BHE e o surgimento de novas convulsões (Kazm et al. 2020).

O estresse oxidativo desempenha um papel significativo na patogênese e progressão da epilepsia (Etemad et al., 2019; Khodayar et al., 2019). Seu excesso produz espécies reativas de oxigênio (ROS) induzindo o aumento da concentração de  $Ca^{2+}$ , super ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e depleção de antioxidantes (GSH, GST, SOD, CAT) (Fisher 2017). Além disso, contribuem para as alterações na estrutura da membrana lipídica, proteínas celulares e DNA (Khodayar et al., 2019). (Fisher 2017).

A atividade excessiva dos receptores de NMDA ativam neurônios com concentrações potencialmente tóxicas pelo influxo de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) e sódio (Pitkänen 2002; Fabene et al. 2008). As interações excessivas de glutamato-NMDA levam à excitotoxicidade, promovendo também apoptose, que podem estar intimamente envolvidas na fisiopatologia da epilepsia. Por outro lado, o bloqueio excessivo do glutamato em vários distúrbios, via NMDA também pode ser deletéria (Feigenbaum et al. 1989; Larkin 2011). Além disso, também há evidências de que o desequilíbrio entre o inibidor do GABA e a neurotransmissão estimuladora do glutamato promove a perda

seletiva de neurônios inibitórios (GABAérgicos) (Janigro 2013; Trinka 2011; Zibell et al. 2008; Aronica et al. 2012).

Outro fator importante na epileptogênese é a inflamação (sistêmica e neural) que afeta a excitabilidade neural (Manford 2017). As citocinas inflamatórias agravam a resposta imune como também a regulação da hiperexcitabilidade neuronal pró e antiepiléptica (Iori 2016). A elevação dos níveis de citocinas promove disfunções celulares com hiperexcitabilidade e excitotoxicidade, contribuindo para crises epiléticas, morte neuronal e déficits cognitivos (Kobylareck et al. 2019). Alguns autores sugerem que os mecanismos imunológicos também estejam implicados na etiologia de certas epilepsias, como a encefalite límbica (Vezzani 2011), encefalite de Rasmussen e até mesmo as epilepsias comuns (Dalmau et al. 2008; Ramaswamy 2013).

Dentro dos modelos experimentais para estudo da epilepsia destaca-se a indução por pentilenotetrazol (PTZ) (Picot et al. 2008; Shimada 2018; Dahlin 2019). O PTZ é um antagonista do receptor GABA-a que bloqueia as ações do neurotransmissor inibitório (GABA) endógeno removendo o tônus inibitório normal (Shimada 2018; Schmidt 1987). Essa indução é um método simples denominado *kindling* químico que provoca convulsões repetidas nos animais, e se assemelha à fisiopatologia da epilepsia, permitindo observar a vulnerabilidade às convulsões e agravamento das crises, assim como investigar danos neuronais após crises epiléticas (Squires 1984; Tourov et al. 1996; Bragin et al. 2005; Karim et al 2018).

### **1.3 Farmacologia na Epilepsia**

A terapêutica farmacológica atual é realizada por meio de fármacos antiepiléticos (FAE's) que tem como objetivo a prevenção de convulsões e atenuar os efeitos negativos no bem-estar geral, incluindo cognição, humor e função endócrina (Jacob 2016; Liu 2017). A escolha do FAE é realizada de acordo com a qualidade das evidências obtidas no diagnóstico que favorecem uma prescrição individualizada, baseada no tipo de crise, presença de síndrome epilética, uso de outros medicamentos, comorbidades, estilo de vida, idade, status fisiológico, condições financeiras e preferência do paciente (Liu 2017).

Apesar da disponibilidade de diferentes FAE's no mercado, alguns são considerados antiepilépticos tradicionais, como por exemplo, clonazepam, flurazepam, clobazam e diazepam (Guerreiro 2016, Abou-Khalil 2016). Quando iniciado o tratamento é recomendada a farmacoterapia (monodroga) mais adequada antes das possíveis combinações. Esta conduta visa alcançar o controle total das crises com o mínimo de impacto dos efeitos adversos que possam interferir na qualidade de vida do indivíduo e inclusive na adesão terapêutica (Ohno et al. 2010; Helmstaedter 2017; Mutanana 2020).

Apesar de apresentarem boas respostas na redução das crises epiléticas por mecanismos distintos, os FAEs apresentam efeitos indesejados, tais como fadiga, indisposição estomacal, náuseas, tonturas, visões turvas, retenção urinária, disfunção sexual, reações alérgicas (erupções cutâneas), sonolência, desatenção, inquietação (Perucca 2007; Lalonde et al. 2007), além de afetar a memória, linguagem, planejamento, raciocínio, causar mudanças de humor, ansiedade, distúrbios do sono e no ritmo circadiano (Wahab 2010; Karceski 2007). Os efeitos adversos descritos acima estão associados à interrupção e descontinuidade do tratamento (Karceski 2007; Chamberlain et al. 2020).

Ao restringirem apenas os sintomas da convulsão e não descaracterizarem o desenvolvimento da epilepsia, os FAEs favorecem o surgimento dos efeitos deletérios sistêmicos pelo uso crônico como disbiose intestinal, perda de peso e aumento do estresse oxidativo (Bialer 2010; Chamberlain et al. 2020). Além disso, cerca de 30% dos pacientes são resistentes ao tratamento com FAEs e 30% continuarão apresentando crises refratárias (Kwan 2000; Chang 2003; Liu 2017).

A lacuna de tratamento varia de 10% nos países desenvolvidos a 75% nos países em desenvolvimento, sendo este um problema de saúde pública (Meyer et al. 2010; Bergey et al. 2015). Estes dados mostram o desafio que os FAE's enfrentam diante da complexidade da doença, sua causa multifatorial e os vários mecanismos alterados (Helmstaedter 2017; Bergey et al. 2015).

Atualmente, o levetiracetam, fármaco de segunda geração com boas repercussões científicas, tem sido muito indicado para epilepsias focais em pacientes adultos como monoterapia, e como terapia adjuvante em crianças (Patanwala,2016; Ito 2016; Liu 2017). O seu mecanismo de ação não age de forma direta na atividade

neurotransmissora inibitória e excitatória, mas parece estar confinado às membranas plasmáticas sinápticas no SNC, sem ocorrência de ligação no tecido periférico (Kawicka 2013; Pohlmann-Eden et al; 2016; Nevitt 2017). Outros autores afirmam que o levetiracetam atua inibindo o disparo em surto sem afetar a excitabilidade neuronal normal (efeito uso-dependente), o que sugere que pode prevenir seletivamente a hipersincronização do disparo em surto epileptiforme e a propagação da atividade convulsiva (Bialer 2010; Chamberlain et al. 2020).

Outra proposta de fármaco é o diazepam, um benzodiazepínico ansiolítico de ação rápida e de longa duração comumente utilizado para tratar transtornos de ansiedade, convulsões agudas recorrentes, espasmos musculares graves e espasticidade associada a distúrbios neurológicos (Dhaliwal 2022). Os benzodiazepínicos exercem seus efeitos facilitando a atividade do ácido gama-aminobutírico (GABA) em vários locais, especificamente, ligam-se a um sítio alostérico na interface entre as subunidades alfa e gama nos canais iônicos de cloreto do receptor GABA-A. Com isso, aumenta a abertura de canais de cloreto gerando uma hiperpolarização da membrana neuronal e diminuindo, portanto, a excitabilidade neuronal minimizando as crises (Calcaterra 2014; Nutt 2001; Dhaliwal 2022).

#### **1.4 Eixo bidirecional: Intestino-cérebro**

A microbiota intestinal é composta por 10-100 trilhões de microrganismos que residem no trato gastrointestinal e interagem com o hospedeiro de forma crucial e protetora para manter um equilíbrio microbiano e a integridade da barreira intestinal (Qin et al. 2010; Faith et al. 2013; Caporaso et al. 2011; ChatziKonstantinou, 2012). Além disso, atua na digestão dos alimentos, fornecimento de nutrientes essenciais ao corpo, proteção contra patógenos e controle do crescimento e diferenciação das células epiteliais intestinais (Guarner & Malagelada 2003; Tremaroli & Backhed 2012).

Contudo, este ambiente está constantemente exposto a perturbações ambientais devido a ingestão de diferentes alimentos, exposição constante a novos microrganismos e protozoários, medicamentos e doenças existentes. Essas perturbações afetam a composição da microbiota enquanto ela produz metabólitos



que podem alterar a fisiologia do hospedeiro com desequilíbrio associado a disfunções, considerado estado de disbiose (Javier et al. 2016; Sittipo et al. 2018).

A existência desse eixo bidirecional fornece à microbiota intestinal e seus metabólitos vias aferentes para acessar o cérebro (Sommer et al. 2017). Entre estas vias, destacam-se as conexões neurais (Wang et al. 2002; Meyer 2011), o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), a biossíntese de neurotransmissores por bactérias intestinais, o sistema imunológico intestinal (Browne et al. 2011), além da interconexão entre a barreira intestinal e a BHE (Diamond et al. 2011; Erny et al. 2015). Neste contexto, uma microbiota intestinal saudável e estável desempenha um papel vital na manutenção da integridade da BHE (Chatzikonstantinou 2021), assim como da função, metabolismo (Nicholson et al. 2012; Shi et al. 2017) e imunidade intestinal (Velagapudi et al. 2010), sendo inclusive capaz de regular o eixo intestino-cérebro (Olszak et al. 2012).

### **1.5 Probiótico kefir**

O probiótico kefir é originário do Cáucaso, passado de geração a geração pelos seus diversos benefícios, proveniente do Keif eslavo, que significa “bem-estar” ou “viver bem” (Rosa et al. 2017; Kabak 2011; Lopitz et al. 2006). O kefir é um leite fermentado com ação probiótica, ou seja, uma bebida que contém microrganismos vivos capazes de fornecer benefícios à saúde, modulando a microbiota intestinal do hospedeiro (Mayer 2011; Pavlov 2015; Pereira et al. 2022). Devido à sua composição, tem sido descrito como uma bebida probiótica natural (Lopitz et al. 2006; Pimenta et al 2020).

Os grãos de kefir apresentam diâmetros que variam entre 1 a 15 mm (Souza et al. 1984) e consiste em uma mistura de espécies microbianas pertencente ao grupo de bactérias do ácido láctico (*Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Leuconostoc*), leveduras (*Kluyveromyces*, *Saccharomyces* e *Torula*) (Rathore 2012; Marsh et al. 2013), ligados a uma matriz de polissacarídeos, denominada kefiran (Ahmed et al. 2013; Nalbantoglu et al. 2014). O leite fermentado a partir destes grãos apresenta consistência cremosa e sabor levemente ácido, além da presença de

pequenos níveis de álcool, ácido acético, vitaminas (B1, B12 e K, ácido fólico) (Fahmy & Ismail 2015; Yilmaz-Ersan et al. 2017) minerais e aminoácidos,

Este probiótico tem demonstrado vários efeitos como ação antimicrobiana (Hong et al. 2009; Slaterry et al. 2019), imunomodulatória (Wei-Sheng 2010), ação antitumoral (Anselmo et al 2010), antimutagênica (Wei-Sheng 2010; Guzel-Seydim et al. 2006), antígenotóxica (Grishina et al. 2011), antioxidante (Jalali et al. 2016; Chen et al. 2019; Pimenta et al 2020; Ton et al 2020) e anti-inflamatória (Chen et al. 2019; Pimenta et al 2020). Além disso, cada vez mais estudos demonstram o efeito do consumo de kefir, associado à melhora na cicatrização de feridas (Young-In 2006), em alergias (Huseini et al. 2012), como, redução do colesterol (Anselmo et al 2010), glicemia (Young-In 2006) e pressão arterial (Friques et al. 2015; Klippel et al. 2016).

Historicamente, o consumo de kefir tem sido associado à saúde. Alguns países recomendam que pessoas saudáveis consumam o leite fermentado a partir dos grãos de kefir para diminuir o risco de desenvolvimento de algumas doenças, (St-Onge et al. 2002; Farnworth & Mainville 2003; Dobson et al. 2011). Considerando a importante relação intestino-cérebro, estudos do nosso grupo e de outros apontam que o consumo de kefir tem sido associado à diminuição da inflamação e do estresse oxidativo e poderia ter ação na epilepsia (Anselmo et al 2010; Friques et al. 2015; Klippel 2016; Ton et al 2020).

## 2. JUSTIFICATIVA

Embora o tratamento farmacológico para epilepsia não seja recente, ainda se mostra insuficiente para conter as crises epiléticas em muitos pacientes. Além disso, é um tratamento de alto custo, muitas vezes ineficaz como monoterapia, com risco de efeitos adversos graves incluindo o comprometimento da cognição, comportamento e produtividade do indivíduo, o que leva à descontinuidade do tratamento por muitos pacientes. Neste contexto, investigar tratamentos alternativos naturais que atuem de forma sinérgica com o FAEs disponíveis reduzindo os efeitos adversos, prolongando a monoterapia e aceitação do tratamento torna-se extremamente oportuna, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil.

Deste modo, nossa hipótese é que o probiótico kefir possa ser promissor como adjuvante no tratamento da epilepsia devido à diversidade de efeitos benéficos demonstrados em várias doenças, inclusive neurológicas. Além disso, por ser um nutracêutico de baixo custo para o paciente e de alta relevância científica, o kefir surge como um potencial adjuvante no tratamento da epilepsia, especialmente pela sua ação antioxidante e anti-inflamatória.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito neuroprotetor do probiótico kefir como adjuvante do tratamento farmacológico em modelo experimental de epilepsia.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Comparar o efeito neuroprotetor do kefir comercial e artesanal na epilepsia;
- Comparar o efeito neuroprotetor do probiótico kefir associado ao anticonvulsivante;
- Avaliar a frequência, intensidade e latência das crises convulsivas de acordo com a Escala de Raccine Modificada nos diferentes grupos experimentais;
- Determinar o efeito dos tratamentos sobre:
  - O estresse oxidativo neural;
  - A viabilidade e apoptose neural;
  - As alterações em macromoléculas sistêmico e neural;
  - As alterações da citoarquitetura neural.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

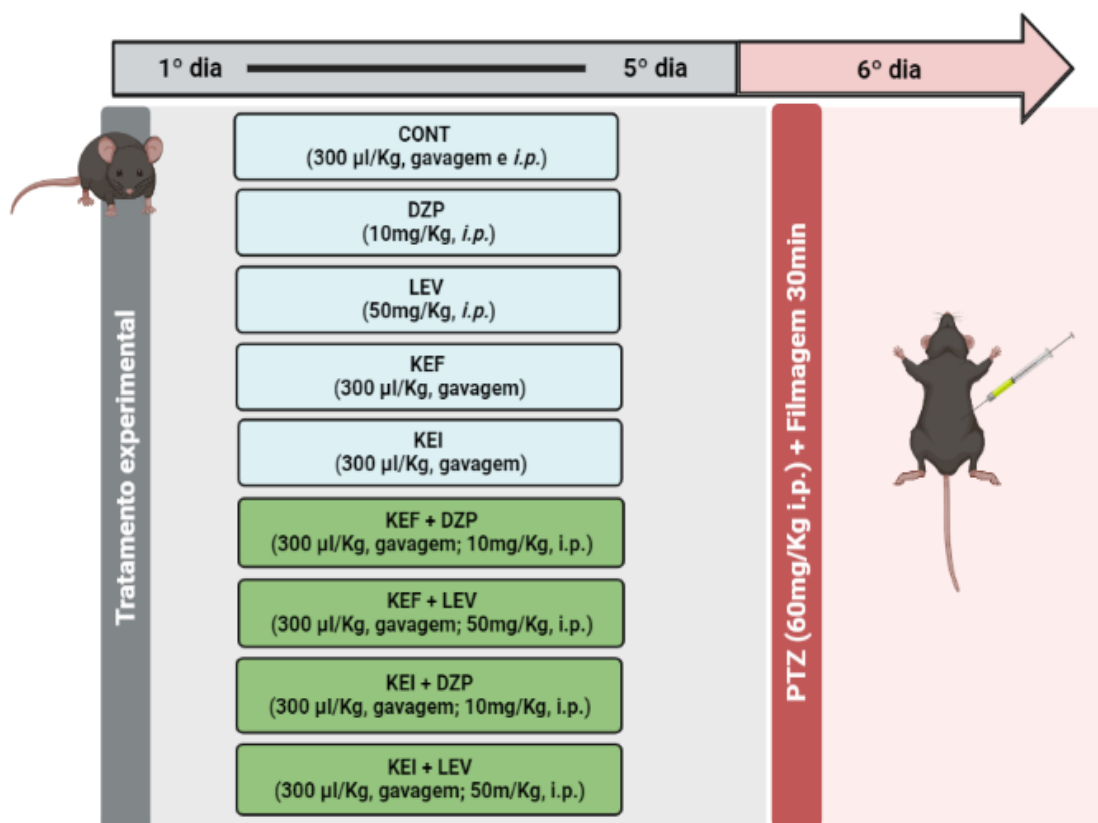
### 4.1. Desenho experimental

Este estudo experimental randomizado foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Vila Velha- ES (CEUA UVV: n°6012021) respeitando as diretrizes éticas recomendadas pela *National Institute of Health* (NIH). Para este estudo foram utilizados 90 camundongos machos da linhagem C57BL/6, pesando 25-35g, originários do Biotério da Universidade Vila Velha. Os animais foram mantidos em gaiolas com no máximo 03 animais, com água e comida *ad libitum*, mantendo o ciclo de claro/escuro.

### 4.2. Animais

Os animais foram divididos aleatoriamente em nove grupos (n=10): Controle (CONT - solução salina); Diazepam TEUTO® (DZP - 10mg/Kg); Levetiracetam Etira® (LEV – 50mg/Kg); Kefir artesanal (KEF 300µL/Kg); Kefir comercial (KEI – 300µL/Kg); Kefir e diazepam TEUTO® (KEF - 300µL/Kg; DZP 10 mg/Kg); Kefir e levetiracetam Etira® (KEF - 300µL/Kg; LEV – 50 mg/Kg); Kefir comercial e diazepam TEUTO® (KEI - 300µL/Kg; DZP - 10mg/Kg); Kefir comercial e levetiracetam Etira® (KEI 300µL/Kg; LEV - 50mg/Kg). Os medicamentos foram administrados por via intraperitoneal (*i.p*) e os probióticos por gavagem.

Os animais foram tratados diariamente por 5 dias, e no sexto dia foi administrado pentilenotetrazol (60mg/Kg *i.p* - PTZ Sigma-Aldrich) para indução das crises convulsivas (Shimada & Yamagata, 2018; Hamed Shafarood et al.2018).



**Figura 1:** Desenho experimental do estudo. Criado pela própria autora em Bio.Render.com.

### 4.3. Tratamentos experimentais

#### 4.3.1 Kefir artesanal

A preparação do kefir de leite foi realizada no Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Transacional da Universidade Vila Velha, já previamente estudado e suas cepas e peptídeos bioativos bioativos já identificados (Friques et al. 2015; Amorim et al. 2019). Os grãos de kefir foram incubados com leite UHT (concentração do kefir: 4%) e mantidos em temperatura ambiente por 24 horas, após, foram coados e o produto filtrado mantido por mais 24 horas a  $-4^{\circ}\text{C}$ , foram realizadas alíquotas de 1 mL e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até sua utilização. O kefir foi administrado por gavagem aos grupos KEF, KEF+DZP e KEF+LEV por um período de cinco dias consecutivos.

#### 4.3.2 Kefir comercial

O kefir comercial (Keiff®) é feito com leite fresco, rica fonte de proteínas, vitaminas (cálcio, fósforo e magnésio) livre de conservantes, sem adição de açúcar, zero glúten e lactose. Composto por 14 tipos de microrganismos vivos benéficos à saúde, sendo eles: *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactococcus lactis subsp. Cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, *Lactococcus lactis subsp. biovar diacetylactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Streptococcus thermophilus*, *Debarymyces hansenii*. Para praticidade no tratamento foram realizadas alíquotas de 1 mL e congeladas a -20°C até sua utilização. Foi administrado por gavagem aos grupos KEI, KEI+DZP e KEI+LEV por um período de cinco dias consecutivos.

#### **4.4. Indução das crises convulsivas**

No sexto dia, os animais foram colocados em gaiolas individuais com água e comida *ad libitum*, e as crises epiléticas foram induzidas em dose única com PTZ (60mg/Kg *i.p* - em salina 0,9%) (Hamed Shafarood et al. 2018; Shimada & Yamagata 2018).

#### **4.5. Análise comportamental**

##### **4.5.1. Gravação dos vídeos**

Após a indução das crises convulsivas por PTZ, os camundongos foram isolados em gaiolas de forma individual e as filmagens realizadas e captadas via smartphone posicionado na horizontal, por 30 minutos. Após 30 minutos, os animais foram eutanasiados com tiopental sódico (60mg/Kg *i.p*) para coleta de amostras biológicas.

#### 4.5.2. Escala de Raccini Modificada

As análises das filmagens foram realizadas cegamente por um único avaliador pela Escala de Raccini modificada (Erum et al. 2019). Foram quantificados os estágios das crises convulsivas, período de latência até a primeira crise leve, crise grave e morte do animal (Tab. 1).

**Tabela 1: Escala de Raccini Modificada.**

---

Estágio “0” (zero)	Sem resposta.
Estágio “1” (um)	Hiperatividade, inquietação e vibração.
Estágio “2” (dois)	Movimentos verticais repetidos, mioclonias.
Estágio “3” (três)	Clônus em patas uni ou bilateral.
Estágio “4” (quatro)	Crises clônicas em patas dianteiras.
Estágio “5” (cinco)	Movimentos tônico-clônicos generalizados com queda.
Estágio “6” (seis)	Extensão das patas traseiras.
Estágio “7” (sete)	Morte.

---

#### 4.6. Análise sistêmica e neural

##### 4.6.1. Obtenção do sangue e cérebro

Após a ausência total de reflexos, a coleta de sangue foi realizada por punção intracardíaca, em seguida, a amostra foi transferida para um microtubo contendo o anticoagulante EDTA. Para o isolamento do plasma, o microtubo foi centrifugado a 200 G por 10 minutos, o plasma coletado e armazenado a -80°C até análise. Após a retirada do escalpo, foi removida a calota craniana, para a obtenção do cérebro e isolamento das células cerebrais. O cérebro dos animais destinados a histologia foi armazenado em PFA a 4% para análise posterior.



#### **4.6.2. Isolamento das células cerebrais**

Após a retirada do cérebro foi realizado um corte coronal expondo a região frontal cerebral. Este tecido foi colocado em uma placa de Petri gelada, coberta com PBS. As amostras teciduais foram cuidadosamente cortadas com uma lâmina de bisturi, depois transferidas para malha de separação de células e centrifugadas a 200 G por 10 minutos, no final, o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 1 mL de solução de armazenamento (95% de SFB e 5 % de DMSO), colocadas no -20°C por 24 horas e armazenadas no Ultrafreezer -80°C até a análise (Lee, 2013).

#### **4.6.3. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)**

A produção de  $H_2O_2$  foi estimado através da fluorescência emitida pela diclorofluoresceína (DCF), que é um produto da oxidação de DCFH-DA, um éter não fluorescente, internalizado pelas células e que se incorpora às regiões hidrofóbicas. Após entrar na célula, sofre ação de esterases intracelulares, resultando na formação de um composto intermediário (DCFH), que pode ser oxidado pelo peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) formando um composto fluorescente diclorofluoresceína (DCF), que por ser apolar fica aprisionado no interior da célula (Campagnaro et al. 2013).

Para a preparação das amostras de células cerebrais isoladas foram ressuspensas em 1mL de PBS na concentração de  $1 \times 10^8$  células/mL e incubadas, no escuro, com DCF-DA (20 mM/L) por 30 minutos à 37°C. Para controle positivo, as amostras foram incubadas por 5 minutos com 50 mM  $H_2O_2$ . As células então foram lavadas e ressuspensas com PBS e mantidas no gelo e protegidas da luz até a aquisição dos dados no citômetro de fluxo. Então, este corante foi adicionado à suspensão das células cerebrais e incubado a 37°C por 180 minutos no escuro. Os dados foram adquiridos usando o citômetro de fluxo FACSCanto II (BD) e analisado pelo Software FCS Express.

#### **4.6.4. Análise da viabilidade e apoptose celular**

Para determinar a viabilidade e apoptose das células neurais foi realizada a marcação com o reagente Annexin V-FITC Detection Kit® (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), composto da proteína anexina V conjugada Pa fluoresceína (FITC) e do corante intracitoplasmático de propídeo (PI: Propidium Iodide), seguida de análise em citômetro de fluxo. Este ensaio consiste na ligação eficiente da proteína anexina V aos resíduos do fosfolípido fosfatidilserina. O PI, marcador padrão de viabilidade, é usado para distinguir células viáveis de não-viáveis, já que as células viáveis e com membrana intacta não são coradas. Além disso, PI é usado em conjunto com anexina V para permitir a identificação de células em estágio inicial e final de apoptose. Os dados foram adquiridos usando citômetro de fluxo FACSCanto II (BD) e analisado pelo Software FCS Express (De Novo) (Campagnaro et al. 2013; Barbosa et al. 2018).

#### **4.6.5. Determinação de produtos de oxidação proteica (AOPP)**

Com o plasma e as células cerebrais isoladas foi realizado o ensaio de produtos avançados de oxidação proteica (AOPP), considerado um marcador indireto de estresse oxidativo. Witko-Sarsat et al. descreveram pela primeira vez um produto protéico de oxidação avançada (AOPP), formado pela ação do estresse oxidativo sobre proteínas e aminoácidos, pela ação de oxidantes clorados, principalmente ácido hipocloroso e cloraminas. Esses oxidantes são produzidos pela mieloperoxidase liberada pelos neutrófilos ativados, pelo desequilíbrio nos mecanismos antioxidantes como ações inadequadas de enzimas antioxidantes, auto-oxidação e acúmulo de metabólitos não eliminados pelos fagócitos. Como consequência, esses radicais livres e ROS agem sobre as proteínas produzindo AOPP (Witko-Sarsat et al. 1996).

Para análise de oxidação de proteínas, as amostras de plasma e cérebro foram descongeladas e diluídas em solução tampão (PBS) 1:50. Em seguida, são pipetados 40µL de amostra em uma placa de 96 poços em duplicatas e adicionado 160 µL de PBS, 10µL de iodeto de potássio 1,6 mol/L e 20µL de ácido acético glacial P.A. A

placa é agitada (Orbital Shaker-70rpm) por 6 minutos e realizada a leitura 340 nm no leitor Elisa (Spectramax-190; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) e comparada com a curva padrão de cloramina T por mg de proteína. As proteínas totais são quantificadas pelo método de Bradford (Witko-Sarsat et al 1996).

#### **4.6.6 Análises de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

O ensaio espectrofotométrico do TBARS baseia-se na reação entre o malondialdeído (MDA) e o ácido tiobarbitúrico (TBA), um marcador de peroxidação lipídica. Para análise de peroxidação lipídica foram utilizadas amostra de plasma e tecido cerebral. Foram pipetados 50 µL da amostra (1:10) misturados em 200 µL de 1% de TBA. Após a diluição os tubos foram dispostos no bloco do termo shaker (Kasvi – K80-220) e condicionados por 1 hora a 95° C e após esse tempo resfriados a ~ 22 ° C. Em seguida 80µL foram adicionados em microplaca de 96 poços e a leitura foi realizada a 532 nm usando um espectrofotômetro (Spectra-MAX-190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Este parâmetro foi quantificado como 44 nmol de MDA/mg de proteína, usando o método de Bradford (Ohkawa et al., 1979; Coutinho et al 2017).

#### **4.6.7 Análise Histológica**

Os cérebros dos animais foram dissecados, clivados longitudinalmente e fixados em formol 10% tamponado para análises histológicas. A preparação histológica para inclusão em parafina ocorreu em processador de tecidos automatizado (Lupetec PT05). O material biológico foi desidratado, por 60 minutos, em soluções crescentes de álcool (70-100%), clarificados em três banhos de xilol por 30 minutos cada, embebidos e emblocados em parafina com auxílio de uma central de inclusão em parafina (Lupetec CI 2014). Em seguida, os blocos foram seccionados em micrótomo rotativo (Leica RM2125 RTS). Os cortes, com espessura de 5 µm, foram coletados em lâminas de vidro e submetidos às seguintes técnicas de coloração de hematoxilina de Harris e coloração de Nilss (Junqueira 1983).

#### **4.6.8. Coloração de Nissl para substância de Nissl no citoplasma do Neurônio**

O método de Nissl é utilizado para coloração de células nervosas com finalidade evidenciar a substância cromófila ou tigróide, que está presente nos corpos celulares e dendritos dos neurônios. Essa técnica revela os corpos celulares dos neurônios por corar em azul púrpura os núcleos e substância de Nissl.

As secções foram desparafinizadas, desidratadas e mantidas na solução de cresil violeta 1% por 60 minutos e posteriormente lavadas em água destilada. Os neurônios em 4 zonas do lobo frontal, em um aumento de 400X, foram contados por dois observadores cegos para o histórico de tratamento. Em ambas as técnicas, as lâminas foram montadas em meio de montagem DPX (Distrene Plasticiser Xylene) (Sigma) e analisadas cegamente e foto documentadas sob microscópio óptico (AX70, Olympus Corporation, Japão) equipado com câmera fotográfica (AxioCam ERc5s, Carl Zeiss, Alemanha).

#### **4.7. Análise estatística**

Para início do estudo, a randomização simples foi usada para atribuir cada animal a um grupo de tratamento específico. A aquisição e análise de dados foram feitas às cegas. Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Todos os conjuntos de dados foram primeiro analisados para determinar se os valores foram derivados de uma distribuição gaussiana pelo teste de normalidade D'Agostino-Pearson. Os dados que não atenderam aos critérios de normalidade foram analisados usando um teste de Kruskal-Wallis.

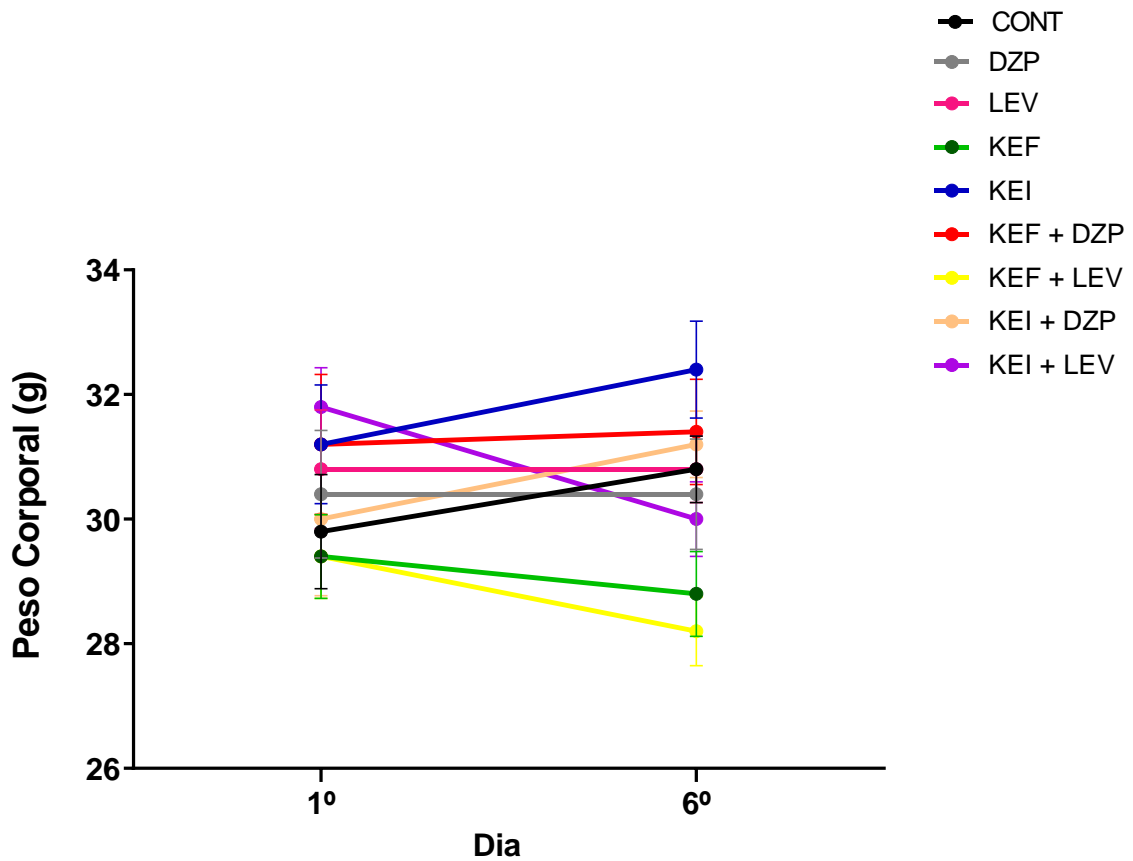
Para identificar os efeitos do tratamento foi realizada análise de variância (ANOVA), uma via, seguido de teste post hoc de Tukey, usando o software Prisma (Prisma 8.0, GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). A gravidade ou a latência das convulsões entre os grupos de tratamento foram comparadas com um teste de Mann-Whitney ou um teste *t* não pareado. A incidência de fenômenos convulsivos

individuais foi comparada primeiro com  $\chi^2$  - testar as tendências e, posteriormente, os grupos de tratamento usando um teste exato de Fisher. Os resultados de período de latência, total de crises e os demais protocolos foram expressos como média  $\pm$  EPM. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Análise do peso corporal

Observamos que ao longo dos 6 dias de experimento a média de peso corporal entre o 1º e 6º dia não foi diferente entre o grupo controle (30±1g) e os grupos tratado (DZP 30±1g; LEV 30±1g; KEF 29±1g; KEI 32±1g; KEF+DZP 31±1g; KEF+LEV 29±1g; KEI+DZP 31±1g e KEI+LEV 30±1g).



**Figura 2:** Análise da média do peso corporal dos grupos de tratamento entre o 1º e 6º dia de experimento (n=10). O resultado do peso do 1º e 6º dia é expresso pela média ± erro padrão da média. (ANOVA-1 way, Tuckey post hoc test).

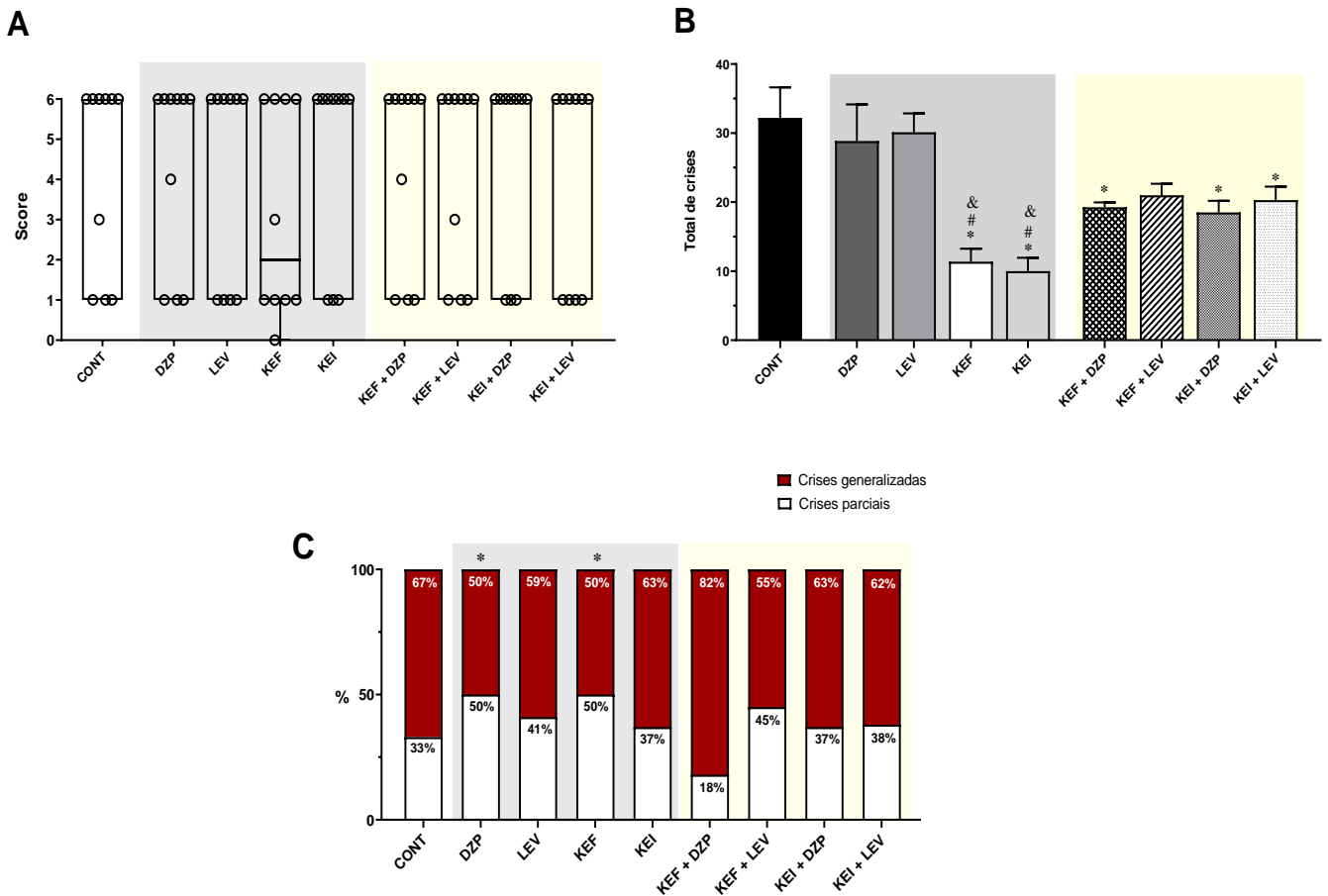
## 5.2 Análise comportamental segundo a Escala de Racine Modificada

Nosso estudo evidenciou (Figura 3A) que após o tratamento com kefir, 6 animais do grupo KEF apresentaram score menor que “6” na escala de Racine modificada comparados aos animais dos outros grupos (CONT, DZP, LEV, KEF+DZP, KEF+LEV e KEI+LEV apresentaram 6 animais com score “6”; KEI e KEI+DZP 7 animais com score “6”). É importante destacar que um animal do grupo KEF não apresentou nenhum tipo de crise, marcando o score “0”.

Ao analisar o total de crises convulsivas (Figura 3B) foi possível evidenciar que os grupos tratados com kefir artesanal (KEF,  $11 \pm 2$  crises) e comercial (KEI,  $10 \pm 2$  crises) apresentaram uma redução significativa no total de crises em relação aos grupos CONT ( $32 \pm 4$  crises), DZP ( $29 \pm 5$  crises) e LEV ( $30 \pm 3$  crises). Logo observamos que os grupos associados com probióticos (KEF+DZP,  $19 \pm 1$  crises; KEI+LEV,  $19 \pm 2$  crises e KEI+LEV,  $20 \pm 2$  crises) demonstrou ser promissores comparados com o CONT ( $32 \pm 4$  crises). Além disso, vale destacar que o grupo KEF ( $11 \pm 2$  crises) não apresentou diferença aos seus respectivos grupos associados KEF+DZP ( $19 \pm 1$  crises) e KEF+LEV ( $21 \pm 2$  crises), assim como o grupo KEI ( $10 \pm 2$  crises) e os grupos KEI+DZP ( $19 \pm 2$  crises) e KEI+LEV ( $20 \pm 2$  crises).

Ao aprofundarmos no total de crises, analisamos a incidência do tipo de crises convulsivas nos grupos experimentais. Identificamos que as crises generalizadas se mantiveram  $\geq 50\%$  em todos os grupos de tratamento, porém, os grupos CONT (60%) e LEV (60%) apresentaram a maior porcentagem de crises generalizadas (Figura 3 – C) assim como o total de crises (Figura 3B).

Correlacionando a figura 3 (A-B-C) identificamos que o grupo KEF atingiu menores escores da escala, menor número total de crises e incidência de 50% de crises parciais e 50% de crises generalizadas.

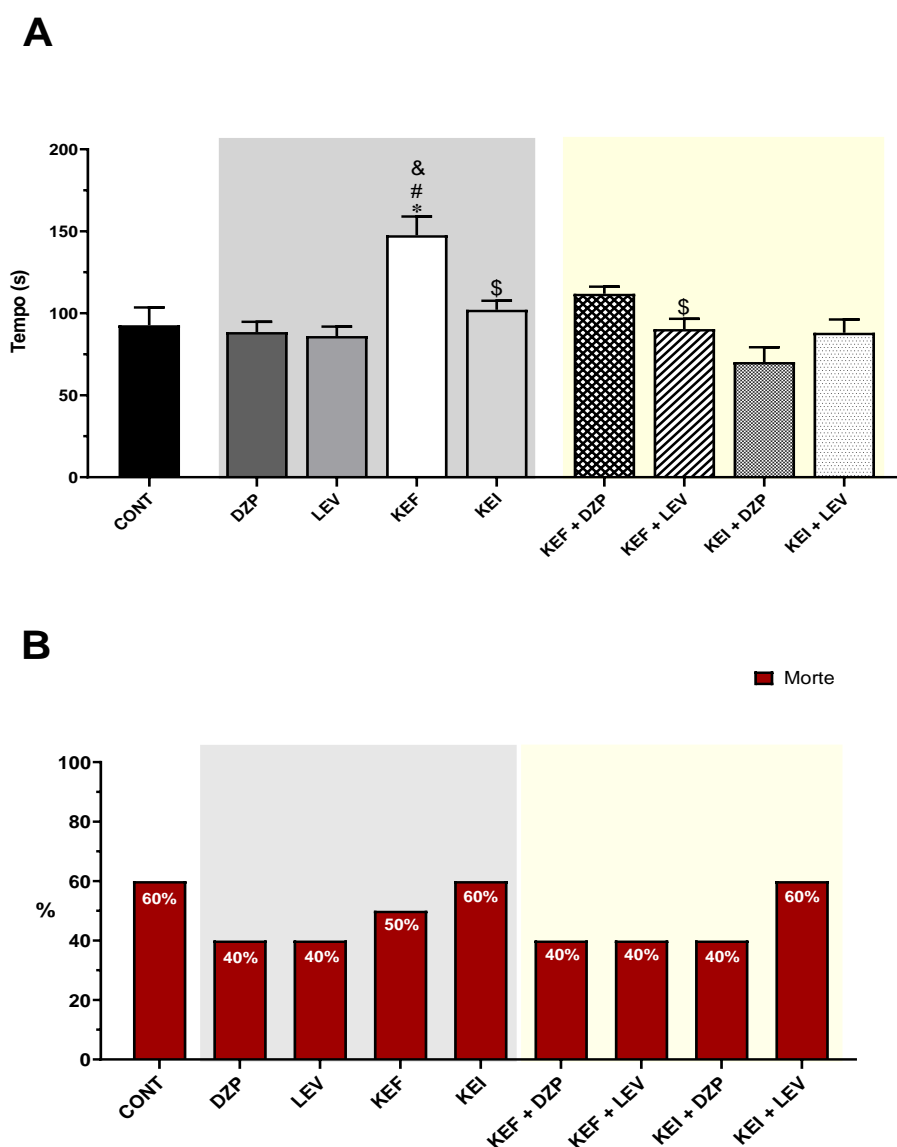


**Figura 3:** Efeitos do probiótico kefir em convulsões induzidas por PTZ (n=10). Foi analisada a gravidade da crise convulsiva (A), total de crises convulsivas por grupo (B) e incidências de crises parciais e generalizadas (C). O resultado do score é expresso pela mediana e o total de crises é expresso pela média ± EPM. CONT \*p < 0.05, DZP # p < 0.05 e LEV & p < 0.05 (ANOVA-1 way, Tuckey post hoc test).

Em nosso estudo foi possível observar que o tratamento com kefir artesanal isolado (KEF: 148±11 s) foi capaz de aumentar o período de latência (Figura 4 – A) quando comparado com os demais grupos (CONT: 93±11; DZP: 89±6; LEV: 86±6; KEI: 102±5; KEF+DZP: 112±4; KEF+LEV: 90±6 s).

Os grupos CONT, KEI e KEI+LEV (6 animais – 60%) apresentaram maior mortalidade quando comparado com o grupo KEF (5 animais – 50%). Os grupos DZP (4 animais – 40%), KEF+DZP (4 animais – 40%), LEV (4 animais – 40%), KEF+LEV (4 animais – 40%) e KEI+DZP (4 animais – 40%) apresentaram menor mortalidade após a indução com PTZ.





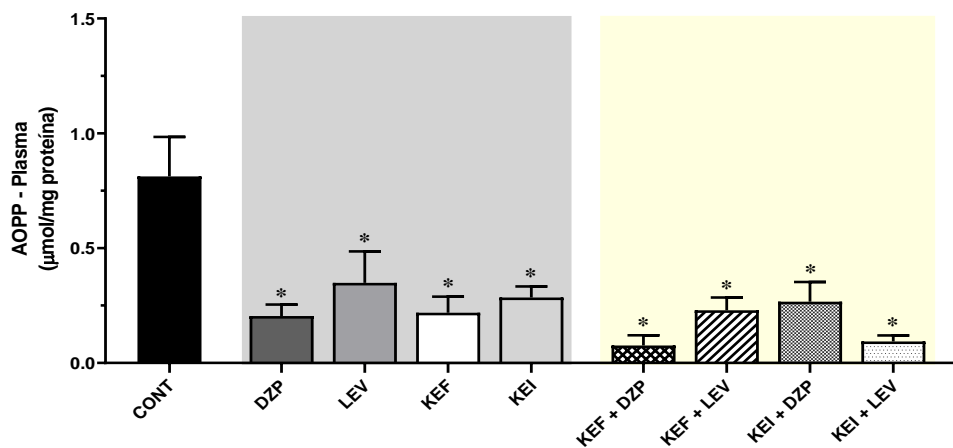
**Figura 4:** Efeitos do probiótico kefir em convulsões induzidas por PTZ (n=10). Foi analisado o período de latência (A) e mortalidade (B). O resultado do período de latência é expresso pela média  $\pm$  EPM. CONT \*p < 0.05, DZP # p < 0.05, LEV & p < 0.05 e KEF \$ p < 0.05 (ANOVA-1 way, Tuckey post hoc test).

### 5.3 Análise da oxidação de proteínas e peroxidação lipídica plasmática

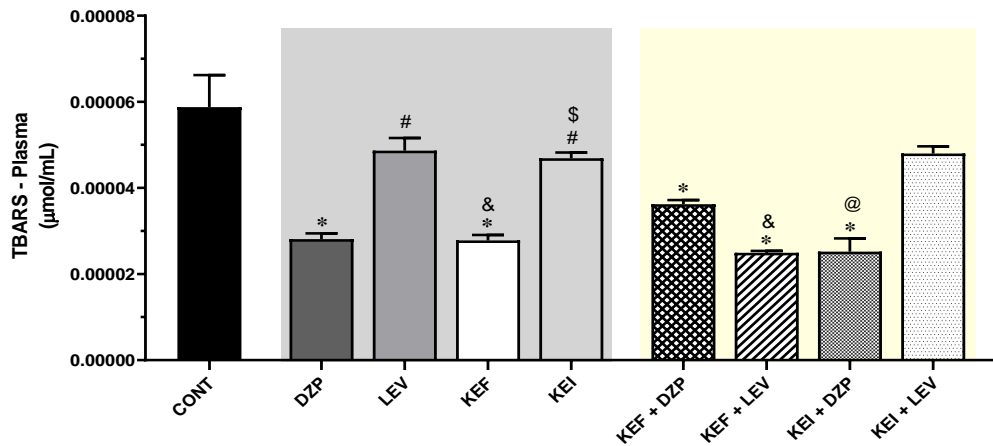
Ao longo de 5 dias de tratamento os grupos DZP ( $0,20 \pm 0,5 \mu\text{mol/mg}$ ), LEV ( $0,34 \pm 0,13 \mu\text{mol/mg}$ ), KEF ( $0,21 \pm 0,07 \mu\text{mol/mg}$ ), KEI ( $0,28 \pm 0,4 \mu\text{mol/mg}$ ), KEF+DZP ( $0,07 \pm 0,04 \mu\text{mol/mg}$ ), KEF+LEV ( $0,22 \pm 0,05 \mu\text{mol/mg}$ ), KEI+DZP ( $0,26 \pm 0,8 \mu\text{mol/mg}$ ), KEI+LEV ( $0,02 \pm 0,02 \mu\text{mol/mg}$ ) apresentaram menor oxidação de proteínas

plasmáticas em relação ao grupo CONT ( $0,81 \pm 0,17 \mu\text{mol/mg}$ ). Simultaneamente, os mesmos grupos apresentaram diminuição da peroxidação lipídica sistêmica (DZP:  $2,80 \times 10^{-5} \pm 1,35 \times 10^{-6}$ ; KEF:  $2,78 \times 10^{-5} \pm 1,25 \times 10^{-6}$ ; KEF+DZP:  $3,62 \times 10^{-5} \pm 9,61 \times 10^{-7}$ ; KEF+LEV:  $2,49 \times 10^{-5} \pm 4,78 \times 10^{-7}$ ; KEI+DZP:  $2,52 \times 10^{-5} \pm 3,27 \times 10^{-6} \mu\text{mol/mL}$ ).

**A**



**B**

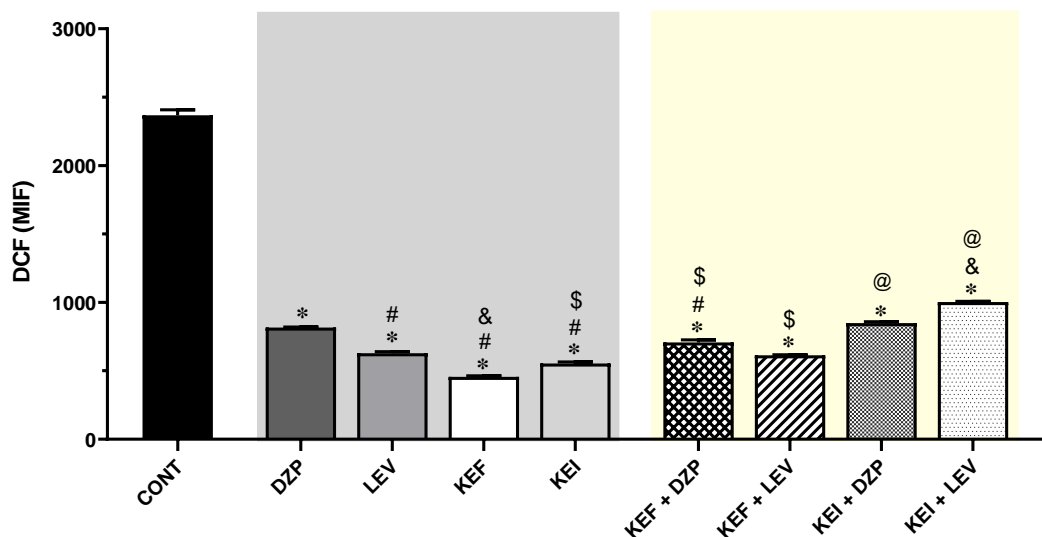


**Figura 5:** Alterações em macromoléculas plasmáticas. **A)** Oxidação de proteínas **B)** Peroxidação lipídica. O resultado é expresso pela média  $\pm$  EPM. CONT \* $p < 0,05$ , DZP # $p < 0,05$ , LEV & $p < 0,05$ , KEF \$ $p < 0,05$  e KEI @  $p < 0,05$ . (ANOVA-1 way, Tuckey post hoc test).

#### 5.4 Análise do estresse oxidativo cerebral

Foi possível observar que os grupos que receberam algum tipo de tratamento (DZP 815,9±3,9; LEV 628,9±10,7; KEF 456,4±7,2; KEI 553,2±11,1; KEF+DZP 707,5±18,3; KEF+LEV 613,5±4,5; KEI+DZP 848,3±10,4 e KEI+LEV 1003±5,2 a.u.) apresentaram redução da produção de ROS quando comparados ao grupo controle (CONT: 2368±40,3 a.u.).

Em nosso estudo a administração de kefir isolado (KEF: 456,4±7,2 a.u.) mostrou diminuição importante na produção de ROS em relação aos grupos controle (2368±40,3 a.u.), kefir comercial (KEI: 553,2±11,1 a.u.), anticonvulsivantes isolados (DZP 815,9±3,9; LEV 628,9±10,7 a.u.) e associações (KEF+DZP: 707,5±18,3; KEF+LEV 613,5±4,5 a.u.).

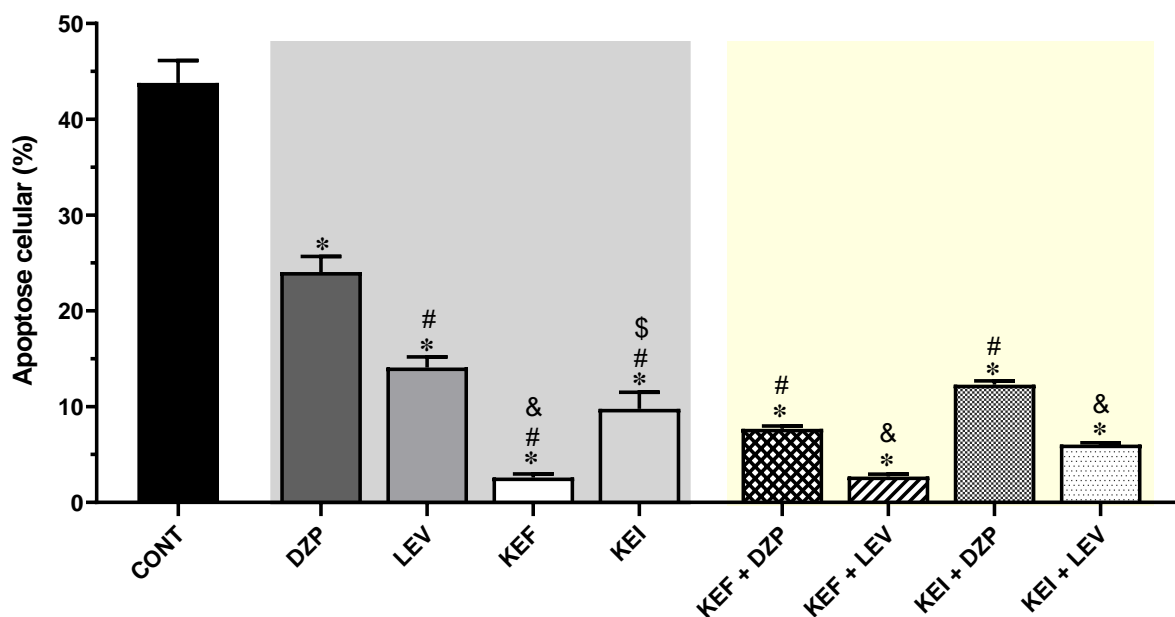


**Figura 6:** Análise do estresse oxidativo por DCF. O resultado é expresso pela média ± erro padrão da média CONT \*p < 0.05, DZP # p < 0.05, LEV & p < 0.05, KEF \$ p < 0.05 e KEI @ p < 0.05 (ANOVA-1 way, Tuckey post hoc test).

### 5.5 Análise da viabilidade e apoptose cerebral

Na figura 6 observamos que os tratamentos foram capazes de diminuir a morte de células cerebrais (DZP 24±1,6; LEV 14±1,1; KEF 2,6±0,4; KEI 9,8±1,7; KEF+DZP

7,7±0,3; KEF+LEV 2,7±0,25; KEI+DZP 12,3±0,4 e KEI+LEV 6±0,2 %) quando comparado com o grupo CONT (43,8±2,3 %). Na figura 6 destaca-se a baixa porcentagem de apoptose no grupo tratado com kefir artesanal isolado.



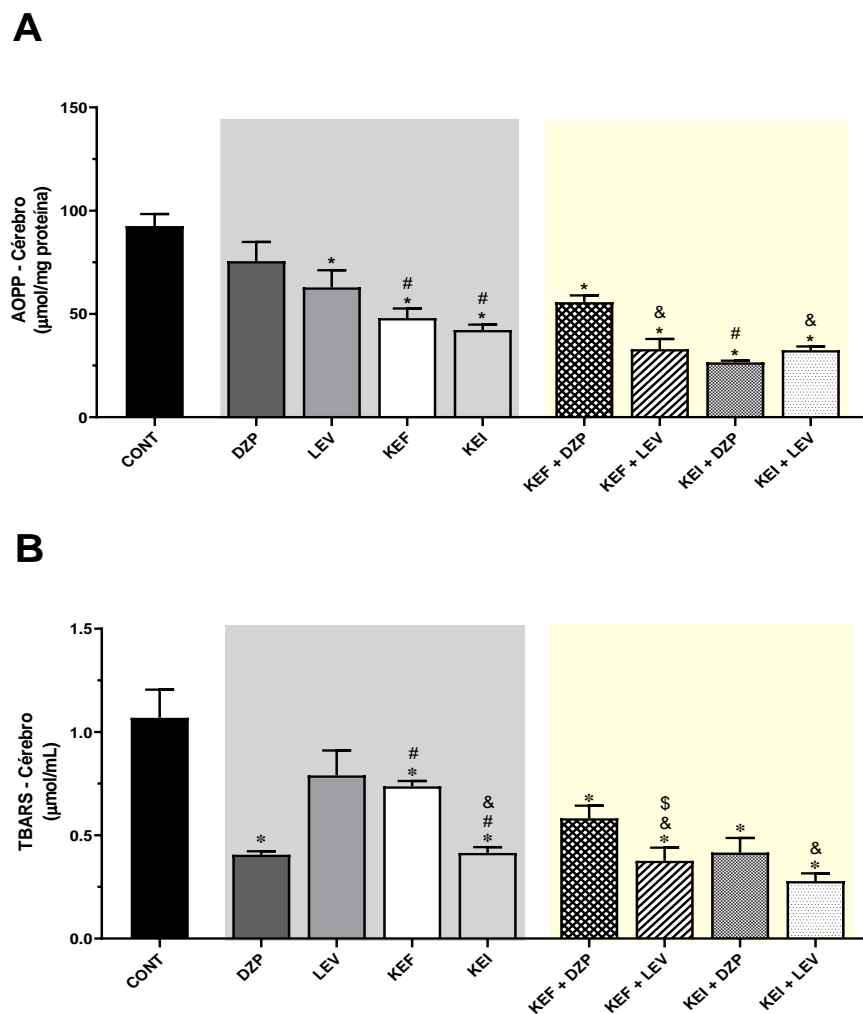
**Figura 7:** Análise de apoptose celular. O resultado é expresso pela média ± erro padrão da média. CONT \*p < 0.05, DZP # p < 0.05, LEV & p < 0.05, KEF \$ p < 0.05 e KEI @ p < 0.05 (ANOVA-1 way, Tuckey post hoc test).

## 5.6 Análise da oxidação de proteínas e peroxidação lipídica cerebral

Ao longo de 5 dias de tratamento os grupos LEV (62,8±8,3 µmol/mg), KEF (47,9±4,7 µmol/mg), KEI (42,1±2,6 µmol/mg), KEF+DZP (55,7±3,2 µmol/mg), KEF+LEV (32,9±4,9 µmol/mg), KEI+DZP (26,6±0,7 µmol/mg), KEI+LEV (32,4±1,8 µmol/mg) diminuíram a oxidação de proteínas em células cerebrais após a indução com PTZ em relação aos grupos CONT (92,5±5,8 µmol/mg) e DZP (75,5±9,3 µmol/mg).

Além disso, os grupos DZP ( $0,40 \pm 0,01 \mu\text{mol/mL}$ ), KEF ( $0,73 \pm 0,02 \mu\text{mol/mL}$ ), KEI ( $0,41 \pm 0,02 \mu\text{mol/mL}$ ), KEF+DZP ( $0,58 \pm 0,06 \mu\text{mol/mL}$ ), KEF+LEV ( $0,37 \pm 0,06 \mu\text{mol/mL}$ ), KEI+DZP ( $0,41 \pm 0,7 \mu\text{mol/mL}$ ), KEI+LEV ( $0,27 \pm 0,03 \mu\text{mol/mL}$ ) apresentaram redução significativa do marcador de peroxidação lipídica em relação ao grupo CONT ( $1,1 \pm 0,13 \mu\text{mol/mL}$ ) e LEV ( $0,79 \pm 0,01 \mu\text{mol/mL}$ ).

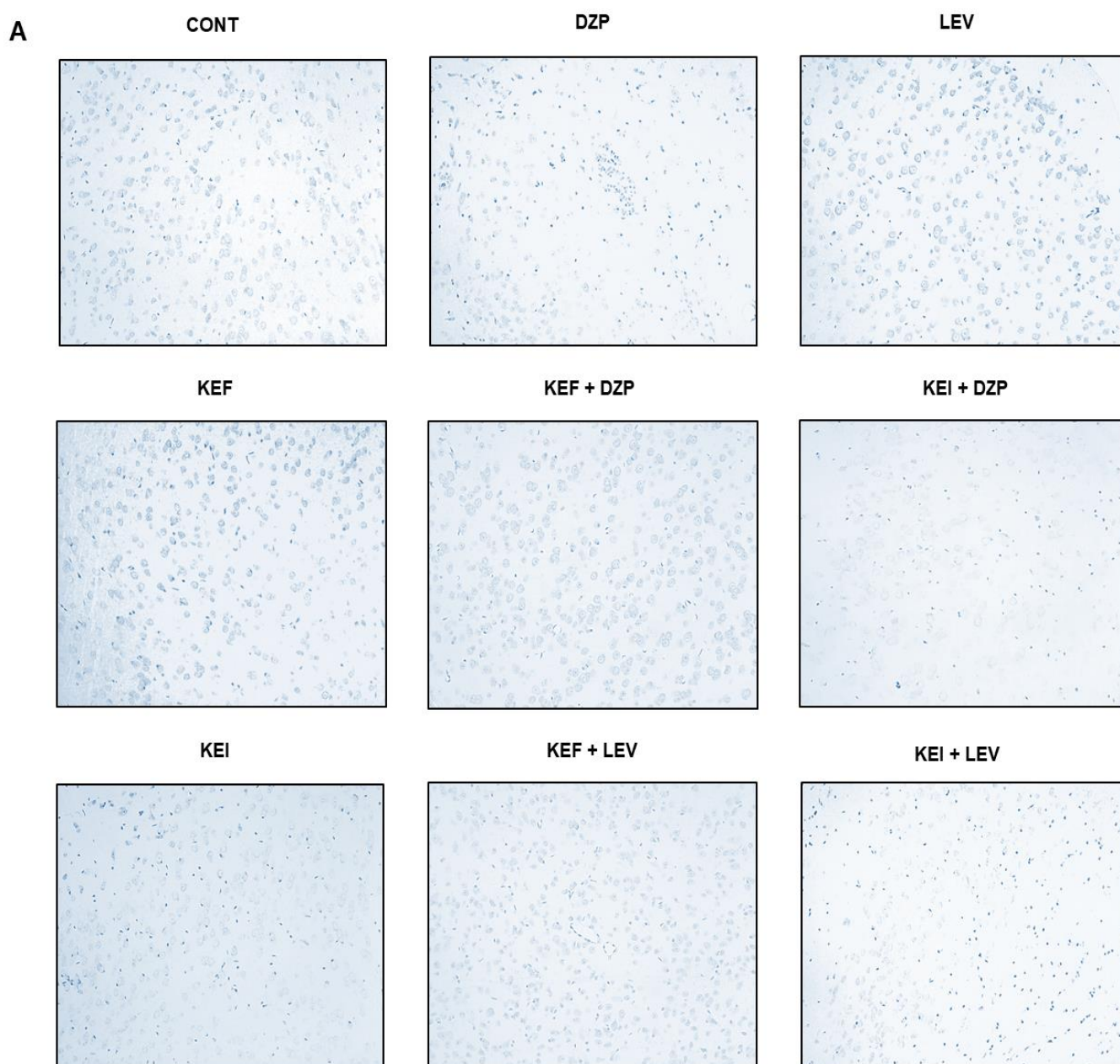
É importante ressaltar que nossos dados mostram que os grupos isolados e associados ao probiótico kefir demonstram redução significativa tanto na oxidação de proteínas como na peroxidação lipídica.

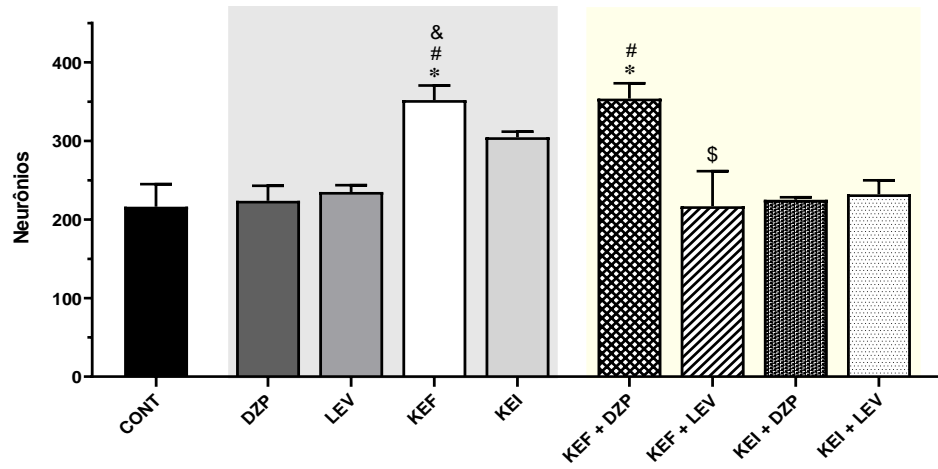
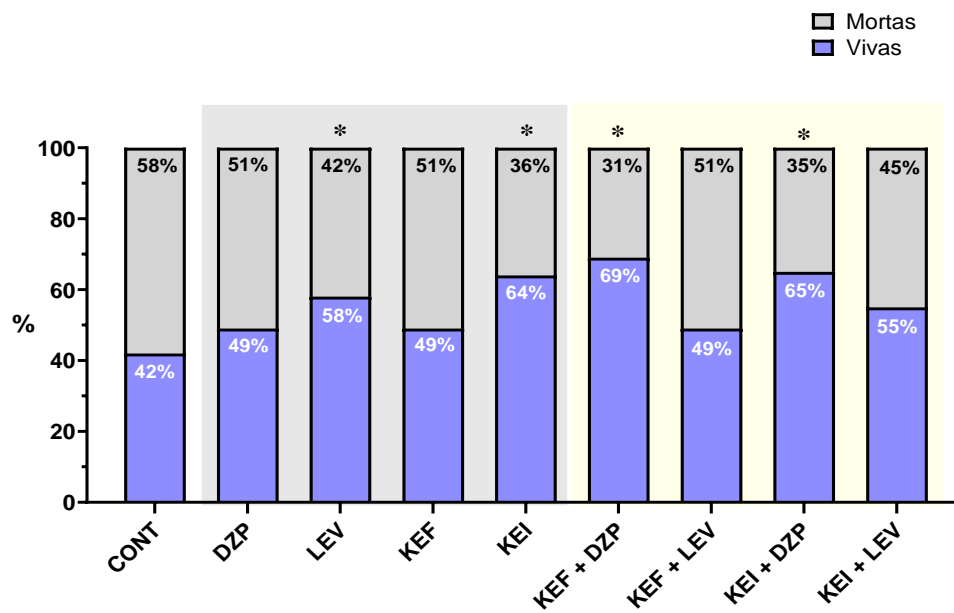


**Figura 8:** Alterações em macromoléculas cerebrais. **A)** Oxidação de proteínas **B)** Peroxidação lipídica. O resultado é expresso pela média  $\pm$  EPM. CONT \* $p < 0.05$ , DZP # $p < 0.05$ , LEV & $p < 0.05$  e KEF \$ $p < 0.05$ . (ANOVA-1 way, Tuckey post hoc test).

## 5.7 Quantificação histológica e neurônios pela coloração de Nissl

Os grupos KEF ( $352\pm 19$ ) e KEF+DZP ( $354\pm 20$ ) apresentaram maior número de neurônios viáveis em relação aos grupos CONT ( $216\pm 28$ ) e DZP ( $223\pm 19$ ). Entretanto os grupos que mantiveram porcentagem a cima de 60% de neurônios vivos foram os KEF+DZP (69% vivas), KEI+DZP (65%) e KEI (64%).



**B****C**

**Figura 9:** Quantificação histológica pela coloração de Nissl da parte frontal do cérebro. **A)** Coloração de neurônios da região frontal do cérebro. **B)** Quantidade de neurônios. **C)** Porcentagem de neurônios vivos e mortos. O resultado é expresso pela média  $\pm$  erro padrão da média. CONT \* $p < 0.05$ , DZP # $p < 0.05$ , LEV & $p < 0.05$  e KEF \$ $p < 0.05$ . (ANOVA-1 way, Tuckey post hoc test).

## 6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que o tratamento por 5 dias com o probiótico kefir protegeu os animais de danos neurais após indução de crises convulsivas agudas por PTZ, reduzindo o escore, a incidência, frequência das crises e aumento do tempo de latência. Além disso, observamos diminuição da produção de ROS e apoptose, conseqüentemente, redução da oxidação de macromoléculas biológicas e preservação de neurônios.

O uso de probióticos têm demonstrado reduzir a periodicidade das crises em 50% ou mais em pacientes com epilepsia resistente a medicamentos (Erum et al. 2019; Gómez-Eguílaz et al. 2018), corroborando com nossos achados que demonstraram que o tratamento com probiótico kefir artesanal (KEF) se destacou pela diminuição dos scores das crises clônicas e tônico-clônicas generalizadas com queda, além da redução do total de crises e aumento o período de latência até a primeira crise.

Pesquisas demonstram que o uso de probióticos possuem benefícios devido sua atividade antioxidante e anti-inflamatória para o tratamento de doenças agudas, crônicas, inflamatórias e neurológicas (Akkol, et al. 2017; Ritchie 2012; Dhiman 2013; Zhong 2014) o que pode justificar os resultados do nosso estudo. Além disso, Bagheri e colaboradores mostraram que a suplementação de probióticos isoladamente minimizou acentuadamente o desenvolvimento de crises convulsivas ou na gravidade das convulsões em um modelo de epilepsia em rato com PTZ corroborando com nossos achados em camundongos (Bagheri et al., 2019).

Outro estudo demonstrou que o pré-tratamento com probióticos por 14 ou 28 dias não demonstrou ser significativo na latência e duração das crises induzidas por PTZ (Sabouri et al. 2021). Entretanto, no presente estudo foi possível observar que ao longo de 5 dias de tratamento os animais que receberam probióticos isolados foram significativamente benéficos na redução das crises comparados aos grupos associados com antiepilépticos.

Além disso, mostramos que os grupos que receberam tratamentos associados com probióticos apresentaram efeitos benéficos durante as análises das crises convulsivas em relação aos grupos antiepilépticos e o controle. Uma das possíveis



justificativas é que o tratamento com probióticos aumenta a atividade GABA, reduz os fatores oxidantes e aumenta a capacidade antioxidante (Bagheri et al., 2019).

Este aumento da produção dos níveis de GABA são provocados pelas bactérias do ácido láctico (Dhakal et al., 2012) presentes na microbiota intestinal, além da produção de vários outros neurotransmissores como serotonina, melatonina, catecolaminas, histamina e acetilcolina (Barrett et al., 2012; Forsyth et al., 2010; Lyte, 2011; Yunes et al., 2016).

Evidências emergentes mostram que a microbiota intestinal além de suas funções sobre sistema gastrointestinal atua direta e indiretamente através do eixo microbiota-intestino-cérebro na modulação das funções neurológicas (Iannone et al. 2019; He et al. 2017; Wang 2016; Castelli et al. 2021; Strandwitz 2018). Estudos envolvendo animais livres de germes (GF) mostraram a importância da microbiota intestinal na fisiologia e a neuroquímica do SNC através da variação de neurotransmissores (por exemplo, NMDA e BDNF), além de, deficiências neurológicas no aprendizado, memória, reconhecimento e comportamento emocional (Liu et al. 2019; Cryan 2012; Citraro et al. 2021; Gong et al. 2020; De Caro et al. 2019).

Atualmente a disbiose da microbiota intestinal está interligada a uma gama de distúrbios neuropsiquiátricos e neurodegenerativos, como epilepsia, transtorno do espectro do autismo, doença de Parkinson e doença de Alzheimer (Iannone et al. 2019; Kilinc et al. 2021; Ton et al. 2019; Lemos et al. 2021). Estudos em animais e humanos descrevem a disbiose na relação causal da epilepsia, principalmente em crises refratárias aos fármacos (Wang 2016; Mayer 2015).

A presença da disbiose e ocorrência das convulsões favorecem lesões na barreira da mucosa intestinal e hematoencefálica (Chatzikonstantinou et al. 2021). O sistema imune da barreira intestinal aumenta a ofertas de citocinas inflamatórias sistêmicas como método de proteção, porém, os danos da integridade da barreira intestinal permitem a passagem de mediadores inflamatórios lesionando a barreira hematoencefálica e permeando no SNC (Chatzikonstantinou et al. 2021).

Neste contexto, estudos enfatizam a importância do consumo de probióticos que quando administrados em quantidade adequada, exercem efeitos benéficos a saúde do hospedeiro através da sua ampla composição e produção de metabólitos (Cahova 2017; Hill 2015; Kilinc et al. 2021). Estudos em animais demonstraram que a

microbiota intestinal pode ativar o nervo vago pela via aferente primária desempenhando um papel crucial na mediação de efeitos na função e no comportamento do cérebro pela transferência de informações microbianas e imunológicas do intestino para o SNC (Meier et al. 1998; Browning 2003; Mayer 2011; Pavlov 2015).

Outros autores corroboram que as bactérias probióticas no intestino dos consumidores de kefir são abundantes e estão correlacionadas com a melhoria da qualidade de vida devido suas propriedades promotoras de saúde provenientes principalmente das espécies de *Lactobacilli* e *Bifidobacteria* (Ahmed et al. 2013; Cotârlet et al. 2019). Essas espécies atuam nas disfunções do SNC e distúrbios neurológicos através de ampla gama de metabólitos neuroativos, incluindo neurotransmissores como GABA, norepinefrina e serotonina (Hill, et al. 2014; Bourrie 2016; Kwok et al. 2014; Kouchaki et al. 2017; Kilinc et al. 2021) que repercutem em reflexos nociceptivos (Mayer 2015), alimentação, comportamento emocional, social, resposta ao estresse e neuroquímica cerebral (Bercik et al. 2011; Bravo et al 2011).

A maturação e o desenvolvimento do SNC no humano são regulados por fatores intrínsecos e extrínsecos, assim como, o sistema imunológico. O sistema imune é responsável pela manutenção da relação simbiótica entre o hospedeiro e a microbiota intestinal (Iannone et al. 2019; He et al. 2017). A interrupção na interação imunomicrobiana dinâmica leva a efeitos profundos na saúde humana incluindo as alterações no SNC, resultando na progressão de vários distúrbios neurológicos (Iannone et al. 2019).

Quando a função de barreira intestinal está prejudicada pode resultar em uma resposta imune local ou sistêmica, degranulação de mastócitos, neuroinflamação e ativação do nervo vago aferente (Konig et al. 2016; Mohajeri et al. 2018; Maier et al. 2018), tais mudanças transitórias na microbiota influenciam na química do cérebro e no comportamento em camundongos. A desestabilização dessa microbiota provocada por mudanças mediadas de substâncias com origem microbiana age no cérebro do hospedeiro de forma direta e indireta (Collins 2012).

O cérebro é um órgão sensível ao estresse oxidativo e apresentam características que favorecem o aumento do mesmo, como: alta demanda de oxigênio, grande número de mitocôndrias, baixa capacidade de reparo, altas

concentrações de ácidos graxos poli-insaturados, baixos níveis de antioxidantes principalmente no hipocampo (Liu et al. 2019; Cryan 2012; Citraro et al. 2021).

O desequilíbrio do SNC pelas bactérias intestinais é determinado pela liberação de neurotransmissores (Serotonina [5-HT], GABA e glutamato) ou seus precursores (Triptofano) (Wang et al. 2002; O'Mahony et al 2015) além da sinalização neural excessiva do nervo vago comprometendo no equilíbrio das redes excitatórias e inibitórias favorecendo o aumento da inflamação (Browne et al. 2011; Blander et al. 2017). Assim como, a diminuição da biossíntese normal de ácidos graxos de cadeia curta como potente mecanismo de neuroinflamação secundária (Balosso et al. 2014).

Atualmente está bem esclarecido que o estresse oxidativo desempenha o papel fundamental em lesões neurológicas como convulsões (Pearson-Smith 2017), AVC (Zhang et al. 2017), TCE (Bhatti et al. 2018), Parkinson (Puspita 2017), Alzheimer (Cheignon et al. 2018; Wang et al. 2014), assim como, na epilepsia. Os danos cerebrais na epilepsia ocorrem após um insulto cerebral que favorece o aumento das espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo que contribuem para a morte neuronal e o desenvolvimento da doença (da Fonsêca et al. 2019).

A administração de PTZ em altas doses pode produzir alterações no comportamento de animais com movimentos espásticos mioclônicos, convulsões clônicas ou extensor tônico dos membros anteriores e posteriores (Kumar et al. 2014). Além disso, desencadeia a ativação de fosfolipases, proteases e nucleases de membrana, que causam degradação de fosfolipídios de membrana, proteólise de proteínas do citoesqueleto e fosforilação de proteínas (Singh 2021; Akula et al. 2009; Celikyurt et al. 2011; Shin et al. 2011).

Estudos comprovaram que casos de convulsão induzem a produção de ROS (Chuang 2010; Gluck 2000; da Fonsêca et al. 2019) aumentando o estresse oxidativo que resulta na modulação das funções de ácido nucléico, proteína e peroxidação lipídica, resultando em dano celular (Sies 2015). Os insultos epilépticos favorecem o acúmulo de estresse oxidativo e neuroinflamação, ambos contribuem na neuropatologia das convulsões em modelos humanos e animais de epilepsia (Wong-ekkabut 2007; Blair et al. 2004; Pitkanen et al 2009).

O acúmulo das espécies reativas de oxigênio é provenientes da sobrecarga de defesas antioxidantes, que perdem o equilíbrio entre a produção de oxidantes e

desintoxicação. Conseqüentemente, esse aumento favorecem a morte neuronal, diminuição da atividade enzimática e os ataques repetitivos de convulsões (da Fonsêca et al. 2019) corroborando com nossos achados no grupo controle.

O papel do estresse oxidativo no SNC foi bem demonstrado no modelo de convulsões agudas induzidas por PTZ que aumentam os radicais livres imediatamente (Kumar et al. 2014). A administração de PTZ induzida por convulsões que estabelece o papel dos radicais livres de oxigênio na fisiopatologia da epilepsia (Kumar et al. 2014). Assim, os antioxidantes atenuam a carga oxidativa, bem como a geração de convulsões.

Em nosso modelo de epilepsia com PTZ foi possível observar o efeito antioxidante e antiapoptótico dos tratamentos de antiepilépticos e probióticos com redução significativa do estresse oxidativo e apoptose cerebral em relação ao grupo controle. O tratamento com probiótico kefir artesanal (KEF) destaca-se pela redução significativa do estresse oxidativo e apoptose mostrando seus efeitos neuroprotetores.

Corroborando com nossos achados, estudos indicam que o consumo de probióticos inibem o estresse oxidativo através da redução da inflamação e aumento das enzimas antioxidantes (Lemos et al. 2021; Ton et al. 2019; D'souza et al. 2010). A restauração microbiota intestinal fornece atividades enzimáticas adicionais envolvidas na transformação de compostos dietéticos, levando ao aumento da biodisponibilidade de antioxidantes dietéticos (D'souza et al. 2010; Nardone et al. 2010; Forsyth et al. 2009).

A importante relação intestino-cérebro, sabe-se que o consumo de probiótico kefir tem sido associado a diminuição de inflamação e de estresse oxidativo (Hong et al. 2009; Wei-Sheng 2010; Huseini et al. 2012; Ton et al. 2019) Um relato de caso sobre Encefalite de Rasmusem (ER) demonstrou que o consumo de probiótico kefir durante 90 dias apresentou possível efeito neuroprotetor, com redução na severidade e intensidade das crises epilépticas do paciente (Lemos et al. 2021). Além do aumento de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, associada a redução de expressão de citocinas inflamatórias e estresse oxidativo, repercutindo em menor dano cognitivo, maior interação e participação em várias atividades escolares e em terapia (Lemos et al. 2021).

Já é bem esclarecido que crises epilépticas afetam a qualidade de vida do paciente, riscos de hospitalização, comprometimento cognitivo e motor, distúrbios psicológicos, perda progressiva de memória, estigmatização social e isolamento (Wilcox et al. 2013; Lemos et al. 2021). A necessidade de terapias adjuvantes ao tratamento da epilepsia que sejam eficazes não apenas para suprimir as convulsões, mas também para prevenir o desenvolvimento de epilepsia é alarmante.

Estudos relatam que o aumento do estresse oxidativo em pacientes epilépticos adultos é baseado no aumento dos níveis plasmáticos de malondialdeído (MDA), este um biomarcador da peroxidação lipídica (Zhu et al. 2015). O aumento da peroxidação lipídica e mecanismos antioxidantes deficientes favorece a atividade convulsiva (Rauca 1999; Menon 2012; Ercegovac et al. 2010; Nemade 2010). Além disso, refletem no acúmulo de proteínas disfuncionais, DNA nuclear e mitocondrial danificado.

O dano oxidativo às proteínas é um dos principais mecanismos subjacentes ao dano celular neuronal na epilepsia (Méndez-Armenta et al. 2014). O dano oxidativo pode ocorrer por várias vias incluindo a carbonilação, oxidação de grupos sulfidril críticos e nitrosilação, em consequência, geram alterações na membrana e função celular (Méndez-Armenta et al. 2014).

A modificação de proteínas funcionais presentes tem sido relacionada com as alterações nos canais iônicos, que participam diretamente nas redes neuronais excitatórias e inibitórias favorecendo o surgimento de convulsões (Méndez-Armenta et al. 2014). Logo, a carência de um sistema de defesa antioxidante local eficaz as alterações peroxidativas dos fosfolípidios plasmáticos pode levar a danos celulares graves (Kumar et al. 2014).

Além do dano oxidativo às proteínas, a peroxidação lipídica é uma das reações dos radicais livres biologicamente mais importantes (Kumar et al. 2014; Iannone et al. 2019; Kilinc et al. 2021). O metabolismo oxidativo aumentado, a ineficiência antioxidantes e a riqueza em ácidos graxos poliinsaturados, torna o cérebro altamente vulnerável aos danos dos radicais livres (Kumar et al. 2014; Iannone et al. 2019; Kilinc et al. 2021).

Estudos anteriores mostraram que a administração aguda de PTZ leva a um aumento no LPO no cérebro de camundongos (Iannone et al. 2019; Kilinc et al. 2021).

As convulsões são seguidas por um aumento de LPO no tecido cerebral levando à formação de ROS como superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (Iannone et al. 2019; Kilinc et al. 2021; Sabouri et al. 2021).

Em nosso estudo foi possível observar que o uso de probióticos isolados e associados com antiepilépticos protegem os danos neurais na oxidação de proteínas e peroxidação lipídica comparados ao controle, assim como os danos plasmáticos e apoptose dos neurônios.

O tratamento da epilepsia continua sendo um desafio, uma vez que existem altas taxas de refratariedade à terapia atual. A existência de várias drogas anticonvulsivantes disponíveis para o tratamento da epilepsia, cerca de 30% dos casos de epilepsia permanecem farmacorresistentes ou interrompem o tratamento devido seus efeitos colaterais graves (Schmidt 2014).

Recentemente foi descrito que o uso de levetiracetam inibe a progressão das crises convulsivas induzidas por PTZ, além de ter relatos clínicos e pré-clínicos benéficos ao surgimento de sintomas depressivos pacientes com epilepsia (de Souza et al. 2019). Em contextos clínicos, o LEV apresentou eficácia superior em comparação com o fenobarbital para a monoterapia inicial da epilepsia não síndrômica em lactentes em relação ao fenobarbital (McTague et al. 2018).

Entretanto no estudo atual o uso de levetiracetam não interferiu no surgimento das crises convulsivas e retardo delas, mas reduziu significativamente as espécies reativas de oxigênio, apoptose cerebral, danos a proteínas cerebrais e plasmáticas, e peroxidação lipídica plasmáticas. Apesar de seu mecanismo de ação não ser claro, uma das possíveis justificativas é a modulação da liberação de neurotransmissores sinápticos por meio da ligação à vesícula sináptica proteína SV2A no cérebro através de bloqueadores de canais de  $Na^+$  com canais de  $Na^+$  ativados por voltagem (de Souza et al. 2019).

Um estudo relata que o uso de levetiracetam causa redução acentuada a exploração do ambiente considerando um efeito ansiogênico da droga. Os sintomas neuropsiquiátricos podem ser iniciados ou agravados por alguns fármacos antiepilépticos (FAE's) (Morimoto et al. 2017). Ele tem sido associado à maior incidência de eventos psiquiátricos (16%), especialmente depressão (Morimoto et al. 2017).

## 7. CONCLUSÃO

Em nosso estudo ficou evidente que a suplementação com o probiótico kefir apresentou efeito neuroprotetor para a epilepsia, reduzindo o escore, a incidência e frequência das crises, com simultâneo aumento do tempo de latência. Além disso, observamos diminuição da produção de ROS e, conseqüentemente, oxidação de macromoléculas biológicas, com preservação de neurônios, sugerindo que o kefir pode ser um potencial adjuvante no tratamento de pacientes com epilepsia.

Desta forma, nosso estudo sugere que este probiótico, associado aos FAEs, pode ser utilizado como uma terapia complementar, minimizando os efeitos deletérios provocados pelas crises convulsivas. Acreditamos que a modulação da microbiota intestinal pelo kefir esteja diretamente relacionada com redução da disbiose e, conseqüentemente, menor estresse oxidativo no SNC levando à melhora na qualidade de vida do indivíduo, determinada pela redução das crises epilépticas. Porém, ainda são necessários estudos para identificar o mecanismo responsável pela modulação do eixo intestino-cérebro e validar o efeito do tratamento proposto em seres humanos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-KHALIL, B.W. **Antiepileptic Drugs**. *Continuum (Minneap Minn)* 2016; 22:132–56.

AHMED Z., et al. (2013). **Kefir and health: a contemporary perspective**. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53 422-434.

AKKOL, et. al; **Effects of Probiotic Consumption on Absence Seizures**. *Epilepsi: Journal of the Turkish Epilepsi Society*. 2017, vol. 23 Edição 2, p51-56. 6p.

AKULA, K.K.; DHIR A.; KULKARNI S.K. **Efeito de várias drogas antiepilépticas em um modelo de convulsão induzida por pentilenotetrazol em camundongos**. *Métodos Find Exp Clin Pharmacol*. 2009; 31 :423–32.

AMORIM FG, et al. **Identification of new bioactive peptides from Kefir milk through proteopeptidomics: Bioprospection of antihypertensive molecules**. *Food Chem*. 2019; 282:109-119.

ANSELMO RJ, et al. (2010). **Projeto antagônico do kefir sobre endosporas e células vegetativas de Bacillus cereus e Clostridium perfringens**. *Inf. Tecnol.* 21 131–138.

ARONIADOU-ANDERJASKA V.; FRITSCH B.; QASHU F.; BRAGA M.F. **Pathology and pathophysiology of amigdala in epileptogenesis and epilepsy**. *Epilepsy Res* 2017; 78:102.

ARONICA E., CRINO P.B. **Inflammation in epilepsy: clinical observations**. *Epilepsia*. 2011 May;52 Suppl 3:26-32.

ARONICA E, et al. (2012) **Astrocyte immune responses in epilepsy**. *Glia* 60:1258–1268.

BAGHERI S, et al. **Effect of probiotic supplementation on seizure activity and cognitive performance in PTZ-induced chemical kindling**. *Epilepsy Behav.* 2019 Jun; 95:43-50.

BALOSSO S, et al. **Disulfide-containing high mobility group box-1 promotes N-methyl-D-aspartate receptor function and excitotoxicity by activating toll-like receptor 4- dependent signaling in hippocampal neurons**. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21:1726–40.



BARBOZA K.R.M; et al. **Gastroprotective effect of oral kefir on indomethacin-induced acute gastric lesions in mice: impact on oxidative stress.** *Life Sci* 2018; 209:370-376

BAR-KLEIN G, et al. **Imaging blood-brain barrier dysfunction as a biomarker for epileptogenesis.** *Brain* 2017; 140, 1692-705.

BEGHI E. **The Epidemiology of Epilepsy.** *Neuroepidemiology.* 2020;54(2):185-191.

BERGEY GK, et al. **Tratamento de longo prazo com estimulação cerebral responsiva em adultos com crises parciais refratárias.** *Neurologia.* 2015; 84 : 810–7.

BERKOVIC, S.F. **Genetics of epilepsy in clinical practice.** *Epilepsy Curr* 2015; 15(4): 192-196.

BHATTI J., et al. **Systematic Review of Human and Animal Studies Examining the Efficacy and Safety of N-Acetylcysteine (NAC) and N-Acetylcysteine Amide (NACA) in Traumatic Brain Injury: Impact on Neurofunctional Outcome and Biomarkers of Oxidative Stress and Inflammation.** *Front. Neurol.* 2018;8:744.

BIALER M., WHITE H.S. **Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs.** *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Jan;9(1):68-82.

BLAIR R.E., et al. **Epileptogenesis causes acute and chronic increases in GABA A receptor endocytosis that contribute to the induction and maintenance of seizures in the hippocampal culture model of acquired epilepsy.** *J. Pharmacol. Exp. Lá.* 2004; 310 :871–880.

BLANDER J.M., et al. **Regulation of inflammation by microbiota interactions with the host.** *Nat Immunol.* 2017;18:851–60.

BORTOLINI L.G.C., et al. **Efeitos endócrinos e metabólicos das drogas antiepilépticas.** *Arqui Bras Endocrinol Metab.* 2009; 53(7).

BOURRIE B.C., WILLING B.P., COTTER P.D. **The Microbiota and Health Promoting Characteristics of the Fermented Beverage Kefir.** *Front Microbiol.* 2016;7:647. Published 2016 May 4.

BRADFORD M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.

BRAGIN A, et al. **Análise de início de convulsão crônica após injeção intrahipocampal de ácido cainico em ratos que se movem livremente.** *Epilepsia.* 2005; 46 (10): 1592–1598

BROWNE CA, et al. **An effective dietary method for chronic tryptophan depletion in two mouse strains illuminates a role for 5-HT in nesting behaviour.** *Neuropharmacology.* 2012 Apr;62(5-6):1903-15.

BROWNING K.N., MENDELOWITZ D. **Musings on the wanderer: what's new in our understanding of vago-vagal reflexes?: II. Integration of afferent signaling from the viscera by the nodose ganglia.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003 Jan;284(1):G8-14.

CAHOVA M., BRATOVA M., WOHL P. **Parenteral Nutrition-Associated Liver Disease: The Role of the Gut Microbiota.** *Nutrients* 2017;9(9):987.

CALCATERRA N.E., BARROW J.C. **Clássicos em neurociência química: diazepam (valium).** *ACS Chem Neurosci.* 16 de abril de 2014; 5 (4):253-60.

CAMPAGNARO B.P., et al. **Renovascular Hypertension Leads to DNA Damage and Apoptosis in Bone Marrow Cells.** *DNA and Cell Biology.* 2013;32(8):458-466.

CAPORASO, J. G. et al. **Moving pictures of the human microbiome.** *Genome Biol.* 12, R50 (2011).

CASCINO G.D. **Neuroimaging in epilepsy: diagnostic strategies in partial epilepsy.** *Semin Neurol.* 2008;28(4):523- 32.

CELIKYURT I.K., et al. **Gabapentina, um análogo do GABA, melhora o desempenho cognitivo em camundongos.** *Neurosci Lett.* 2011; 492 :124–8.

CHAMBERLAIN, James & Kapur, et al. (2020). **Efficacy of levetiracetam, fosphenytoin, and valproate for established status epilepticus by age group (ESETT): a double-blind, responsive-adaptive, randomised controlled trial.** *The Lancet.* 395.

CHANG B.S., LOWENSTEIN D.H. **Practice parameter: antiepileptic drug prophylaxis in severe traumatic brain injury Report of the Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology.** *Neurology* 2003; 60:10–6.

CHATZIKONSTANTINOOU, S. et al. **“The gut microbiome in drug-resistant epilepsy.”** *Epilepsia open* vol. 6,1 28-37. 13 Jan. 2021

CHEIGNON C., et al. **Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer’s disease.** *Redox Biol.* 2018;14:450–464.

CHEN H.-L., et al. **Os peptídeos de kefir aliviam a inflamação pulmonar induzida por material particulado <4 µm (PM 4.0) ao inibir a via de NF-κB usando camundongos transgênicos luciferase.** *Sci. Rep.* 2019; 9 (1): 1–13.

CHEN, C.H., Lin, C.L. and Kao, C.H., 2015. **Irritable bowel syndrome increases the risk of epilepsy: a population-based study.** *Medicine* 94: e1497.

CHOI J, KOH S. (2008). **Role of brain inflammation in epileptogenesis.** *Yonsei Med J* 49:1–18.

CHUANG Y.C. **Disfunção mitocondrial e estresse oxidativo na morte celular neuronal induzida por convulsões.** *Acta Neurol. Taiwanica.* 2010; 19 :3–15.

CLÖSCHER W, et al. **Drug Resistance in Epilepsy: Clinical Impact, Potential Mechanisms, and New Innovative Treatment Options.** *Pharmacol Rev.* 2020; 72(3):606-638

COLLINS S.M., SURETTE M., BERCIK P. **The interplay between the intestinal microbiota and the brain.** *Nat Rev Microbiol.* 2012 Nov; 10(11):735-42.

COTÂRLET, M.; et al. **Colostrum-derived bioactive peptides obtained by fermentation with kefir grains enriched with selected yeasts.** *Ann. Univ. Dunarea Jos Galati Fascicle VI–Food Technol.* 2019, 43, 54–68.

COUTINHO PN, et al. **Chronic administration of antioxidant resin from *Virola oleifera* attenuates atherogenesis in LDLr (-/-) mice.** *J Ethnopharmacol.* 2017 Jul 12;206:65-72.

CRYAN J.F., O'MAHONY S.M. **The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior.** *Neurogastroenterol Motil.* 2011 Mar;23(3):187-92.

DA FONSÊCA, Diogo Vilar et al. **“Anticonvulsant Essential Oils and Their Relationship with Oxidative Stress in Epilepsy.”** *Biomolecules* vol. 9,12 835. 6 Dec. 2019, doi:10.3390/biom9120835

DA ROS PERUCH B, et al. **Low Doses of G-CSF Prevent Cerebral Infarction and Maintain Muscle Strength in an Experimental Model of Global Ischemic Stroke.** *Curr Pharm Biotechnol.* 2018;19(6):514-519.

DAHLIN M., PRAST-NIELSEN S. **The gut microbiome and epilepsy.** *EBioMedicine.* 2019 Jun; 44:741-746.

DALMAU J, et al (2008) **Anti-NMDA receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies.** *Lancet Neurol* 7:1091–1098.

DE SOUZA A.G, et al. **Prevention of pentylenetetrazole-induced kindling and behavioral comorbidities in mice by levetiracetam combined with the GLP-1 agonist liraglutide: Involvement of brain antioxidant and BDNF upregulating properties.** *Biomed Pharmacother.* 2019;109:429-439.

DEVINSKY O, et al. (2018) **Epilepsy.** *Nat Rev Dis Primers.*

DHALIWAL JS, ROSANI A, SAADABADI A. **Diazepam.** 2022 Sep 3. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan–. PMID: 30725707.)

DHIMAN R.K. **Gut microbiota and hepatic encephalopathy.** *Metab Brain Dis* 2013;28(2):321–6.

DIAMOND B, et al. **It takes guts to grow a brain: Increasing evidence of the important role of the intestinal microflora in neuro- and immune-modulatory functions during development and adulthood.** *Bioessays.* 2011 Aug;33(8):588-91. doi: 10.1002/bies.201100042. Epub 2011 Jun 16.

DIAS A.T., et al. **Sildenafil ameliorates oxidative stress and DNA damage in the stenotic kidneys in mice with renovascular hypertension.** *J Transl Med* 2014; 6: 12-35

DIAZ HEIJTZ R., et al. **Normal gut microbiota modulates brain development and behavior.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011 Feb 15;108(7):3047-52.

DICHTER M.A. **Models of epileptogenesis in adult animals available for antiepileptogenesis drug screening.** *Epilepsy Res* 2006; 68:31–5.

DOBSON, A. et al., 2011. **High-throughput sequence-based analysis of the bacterial composition of kefir and an associated kefir grain.** *FEMS Microbiol. Lett.* vol. 320, pp. 56-62.

D'SOUZA A, et al. **Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on messenger RNA expression of caveolin-1, NOS, and genes regulating oxidative stress in the terminal ileum of formula-fed neonatal rats.** *Pediatr Res* 2010;67:526.

ELGER CE, SCHMIDT D. **Modern management of epilepsy: a practical approach.** *Epilepsy Behav.* 2008;12(4):501- 39.

ERCEGOVAC M, et al. **Byproducts of protein, lipid and DNA oxidative damage and antioxidant enzyme activities in seizure.** *Seizure* 2010;19:205–10.

ERNY, D., et al. **Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS.** *Nat Neurosci* **18**, 965–977 (2015).

ERUM J, et al. **PTZ-induced seizures in mice require a revised Racine scale.** *Epilepsy Behav.* 2019 Jun;95:51-55.

FABENE, P. et al. **A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy.** *Nature Med.* 14 1377–1383 (2008).

FAHMY H.A., ISMAIL A.F.M. **Gastroprotective effect of kefir on ulcer induced in irradiated rats.** *J of Photochem and Photobiol B* 2015; 144: 85-93.

FAITH, J. J. et al. **The long-term stability of the human gut microbiota.** *Science* 341, 1237439 (2013).

FARNWORTH E.R., MAINVILLE I. (2003). **"Kefir: um produto de leite fermentado "**, no *Handbook of Fermented Functional Foods*, ed. Farnworth ER (Boca Raton, FL: CRC Press ;), 77-112.

FEIGENBAUM J.J., et al (1989) **Nonpsychotropic cannabinoid acts as a functional N-methyl-Daspartate receptor blocker.** *Proc Natl Acad Sci USA* 86:9584–9587

FEIGIN V.L., et al. **Carga global, regional e nacional de distúrbios neurológicos durante 1990–2015: uma análise sistemática para o estudo da carga global de doenças 2015.** *The Lancet Neurology* . 2017; 16 (11):877–897.

FISHER R.S, et al. **A practical clinical definition of epilepsy.** *Epilepsy* 2014; 55(4): 475-482.

FISHER R.S., 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(4): 522-530

FISHER R.S., et al. **Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE).** *Epilepsia* 2005

FORSYTH C.B., et al. A. **Lactobacillus GG treatment ameliorates alcohol-induced intestinal oxidative stress, gut leakiness, and liver injury in a rat model of alcoholic steatohepatitis.** *Alcohol* 2009;43:163–72.

FOSTER J.A., et al. **Gut Microbiota and Brain Function: An Evolving Field in Neuroscience.** *Int J Neuropsychopharmacol.* 2016;19(5):pyv114.

FOSTER J.A., McVey Neufeld KA. **Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression.** *Trends Neurosci.* 2013 May;36(5):305-12.

FRIQUES A.G., et al. **Chronic administration of the probiotic kefir improves the endothelial function in spontaneously hypertensive rats.** *Journal of Translational Medicine.* 2015; 13 (1): 390.

GLUCK M.R., et al. **Estresse oxidativo Haroutunian V. CNS associado ao modelo de epilepsia experimental em roedores com ácido caínico.** *Epilepsia Res.* 2000; 39 :63–71.

GOLDBERG, E.M; COULTER, D.A. **Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction.** *Nat Rev Neurosci* 2013 May;14(5):337–49

GÓMEZ-EGUÍLAZ M, et al. **The beneficial effect of probiotics as a supplementary treatment in drug-resistant epilepsy: a pilot study.** *Benef Microbes* 2018 Sep 10:1–8.

GRENHAM S, et al. **Brain-gut-microbe communication in health and disease.** *Front Physiol* 2011 Dec 7; 2:94.

GRISHINA A., et al. (2011). **Antigenotoxic effect of kefir and ayran supernatants on fecal water-induced DNA damage in human colon cells.** *Nutr. Câncer* 63 73-79.

GUARNER, F. and Malagelada, J.R. 2003. **Gut flora in health and disease.** *Lancet* 361, 512–519.

GUERREIRO, C.A. **Epilepsy: Is there hope?** *Indian J Med Res.* 2016 Nov;144(5):657-660.

GUZEL-SEYDIM ZB, et al. (2006). **Determination of the antimutagenic properties of fermented milk extracted with acetone and alterations in the total fatty acid profile, including conjugated linoleic acids.** *Int. J. Dairy Technol.* 59 209-215.

HELMSTAEDTER, C. and WITT, J.A. 2017. **Epilepsy and cognition — a bidirectional relationship?** *Seizure.* Vol. 49, pp. 83-89.

HILL J.M., LUKIW W.J. **Microbial-generated amyloids and Alzheimer's disease (AD).** *Front Aging Neurosci.* 2015; 7:9.

HONG W.S., et al. (2009). **Effects of kefir supernatant and lactic acid bacteria isolated from kefir grain on macrophage cytokine production.** *Int. Dairy J.* 19 244–251.

Human Microbiome Project Consortium. **Structure, function and diversity of the healthy human microbiome.** *Nature* 486, 207–214 (2012).

HUSEINI H.F., et al. (2012). **Evaluation of healing activities of kefir products.** *Queimaduras* 38 719-723.

IORI V., FRIGERO F., VEZZANI A. **Modulation of neuronal excitability by immune mediators in epilepsy.** *Curr Opin Pharmacol* 2016; 26: 118-123.

ITO S., et al. **Population pharmacokinetic modeling of levetiracetam in pediatric and adult patients with epilepsy using routinely monitored data.** *Ther Drug Monit.* 2016

JACOB, SHERY, and Anroop B Nair. **“An Updated Overview on Therapeutic Drug Monitoring of Recent Antiepileptic Drugs.”** *Drugs in R&D* vol. 16,4 (2016): 303-316.

JALALI F., SHARIF M., SALEHI R. **Kefir induces apoptosis and inhibits cell proliferation in human acute erythroleukemia.** *Med Oncol.* 2016;33(1):7

JANGI S, et al. **Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis.** *Nat Commun.* 2016 Jun 28;7:12015.

JANIGRO D, et al. (2013) **A role for inflammation in status epilepticus is revealed by a review of current therapeutic approaches.** *Epilepsia* 54:30–32.

JAVIER R. C., et al. **“The Microbiota and Gut-Brain Axis: Contributions to the Immunopathogenesis of Schizophrenia”**, *Current Pharmaceutical Design* (2016) 22: 6122.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: *Editora Santos*, 1983.

KABAK, B.; DOBSON, A.D.W. **An Introduction to the Traditional Fermented Foods and Beverages of Turkey**. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2011, 51, 248–260.

KARCESKI S.C. **Medicamentos para apreensão e seus efeitos colaterais**. *Neurology*. 2007; 69 (22).

Karim M. et al. **Neuroprotective mechanisms of sildenafil and selenium in PTZ-kindling model: implications in epilepsy**, *European Journal of Pharmacology*, 2018

KAWICKA A, REGULSKA-ILOW B. **How nutritional status, diet and dietary supplements can affect autism**. A review. *Rocz Panstw Zakl Hig* 2013;64(1):1–12.

KAZMI, Z., et al. (2020). **Anti-epileptic activity of daidzin in PTZ-induced mice model by targeting oxidative stress and BDNF/VEGF signaling**. *NeuroToxicology*, 79, 150–163.

KIM DH, et al. **Modern perspectives on the health benefits of kefir in next generation sequencing era: Improvement of the host gut microbiota**. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2019; 59(11):1782-179

KLIPPEL, B.F.; **Kefir effects on cardiac autonomic tone and baroreflex control of blood pressure in spontaneously hypertensive rats** / Brunella Faro Klippel – 2016. 74

KOBYLARECK D, et al. **Advances in the potential biomarkers of epilepsy**. *Frontiers in Neurology* 2019; 10: 685.

KONIG J, et al. (2016) **Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease**. *Clin Transl Gastroenterol* 7(10):e196.

KOUCHAKI E, et al. **Clinical and metabolic response to probiotic supplementation in patients with multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial**. *Clin Nutr* 2017;36:1245–9

KUMAR, A. et al. **“Hesperidin potentiates the neuroprotective effects of diazepam and gabapentin against pentylenetetrazole-induced convulsions in**



mice: Possible behavioral, biochemical and mitochondrial alterations.” *Indian journal of pharmacology* vol. 46,3 (2014): 309-15.

KWAN, P. and BRODIE, M.J., 2000. **Early identification of refractory epilepsy.** *New England Journal of Medicine* 342: 314-319.

KWOK L, et al. **A pilot study on the effect of Lactobacillus casei Zhang on intestinal microbiota parameters in Chinese subjects of different age.** *Benefic Microbes* 2014;5:295–304.

LALONDE R.L, et al. **Gold (1)-catalyzed enantioselective intramolecular hydroamination of allenes.** *Journal of the American Chemical Society.* 2007;129(9):2452–2453.

LARKIN G.L., BEAUTRAIS A.L. (2011) **A preliminary naturalistic study of low-dose ketamine for depression and suicide ideation in the emergency department.** *Int J Neuropsychopharmacol* 14:1127–1131.

LEE, Jae-Kyung, and Malú G Tansey. **“Microglia isolation from adult mouse brain.”** *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* vol. 1041 (2013): 17-23.

LEMOES V.R., AIRES R., CÔCO L.Z., et al. **Benefits of multi-day supplementation with probiotic kefir in Rasmussen encephalitis: the first case report.** *Nutr Neurosci.* 2022;25(11):2390-2397. doi:10.1080/1028415X.2021.1970299

LIU G, SLATER N, PERKINS A. **Epilepsy: Treatment Options.** *Am Fam Physician.* 2017 Jul 15;96(2):87-96.

LOGSDON A.F., et al. (2018). **Reações intestinais: como a barreira hematoencefálica conecta o microbioma e o cérebro.** *Exp. Biol. Med.* 243, 159-165.

LOPITZ F.O, et al. (2006). **Kefir: uma comunidade simbólica de bactérias e leveduras com propriedades saudáveis.** *Rev. Iberoam. Micol.* 23 67-74.

LÖSCHER W, BRANDT C. **Prevention or modification of epileptogenesis after brain insults: experimental approaches and translational research.** *Pharmacol Rev* 2010; 62(4): 668-700.

LUKIW W.J. (2020). **Potent Neuro-Inflammatory Signals of Neurotoxins Derived by Gastrointestinal (GI) Microbiomes From the GI Tract Through the Systemic Circulation into the Brain.** *Fronteiras na microbiologia celular e de infecção*, 10, 22.

MAIER L, et al. **Extensive impact of non-antibiotic drugs on human gut bacteria.** *Nature* 2018 Mar 29;555(7698): 623–8

MAIER S.F, et al. **The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication.** *Ann N Y Acad Sci.* 1998 May 1;840:289-300.

MANFORD M. **Recent advances in epilepsy.** *J Neurol.* 2017 Aug;264(8):1811-1824.

MARQUES T.M., et al. **Programming infant gut microbiota: influence of dietary and environmental factors.** *Curr Opin Biotechnol.* 2010 Apr;21(2):149-56.

MARSH A.J., O’SULLIVAN O., HILL R.P., COTTER P.D. **Sequencing-based analysis of the bacterial and fungal composition of kefir grains and milks from multiple source.** *Plos ONE* 2013; 8(7): e69371.

MARTINC B., GRABNAR I., VOVK T. **Antioxidants as a preventive treatment for epilepsy process: a review of currents satatus.** *atual Neurofarmacol.* 2014; 12 :527–550.

Mayer, E. A. **Gut feelings: the emerging biology of gut–brain communication.** *Nature Rev. Neurosci.* 12, 453–466 (2011)

MCTAGUE, AMY et al. **“Manejo medicamentoso para convulsões tônico-clônicas agudas, incluindo estado de mal epiléptico convulsivo em crianças.”** O banco de dados *Cochrane de revisões sistemáticas* vol. 1,1 CD001905. 10 de janeiro de 2018.

MENON B., RAMALINGAM K., KUMAR R.V. **Oxidative stress in patients with epilepsy is independent of antiepileptic drugs.** *Seizure* 2012;21:780–4.

MEYER AC, et al. **Disparidades globais na lacuna do tratamento da epilepsia: uma revisão sistemática.** *Bull World Health Organ.* 2010; 88 : 260–6.

MOHAJERI MH, et al. **The role of the microbiome for human health: from basic science to clinical applications.** *Eur J Nutr.* 2018;57(Suppl 1):1-

MORIMOTO M, et al. **A study of oxidative stress and the newer antiepileptic drugs in epilepsy associated with severe motor and intellectual disabilities.** *J Chin Med Assoc.* 2017;80(1):19-28.

MUTANANA N., TSVERE M., CHIWESHE M.K. **General side effects and challenges associated with anti-epilepsy medication: A review of related literature.** *Afr J Prim Health Care Fam Med.* 2020;12(1):e1-e5.

NAJM I., YING Z., JANIGRO D. **Mechanisms of epileptogenesis.** *Neurol Clin* 2001; 19: 237– 50.

NALBANTOGLU U., et al. (2014). **Análise metagenômica da comunidade microbiana em grãos de kefir.** *Microbiol de alimentos.* 41 42-51.

NARDONE G, et al. **Protective effects of Lactobacillus paracasei F19 in a rat model of oxidative and metabolic hepatic injury.** *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010;299:G669–76.

NEMADE ST, MELINKERI R. **Effect of antiepileptic drugs on antioxidant status in epilepsy.** *Curr Neurobiol* 2010; 1:109–12.

Nevitt SJ, et al. **Antiepileptic drug monotherapy for epilepsy: a network meta-analysis of individual participant data.** *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017.

NICHOLSON J.K, et al. **Host-gut microbiota metabolic interactions.** *Science.* 2012 Jun 8;336(6086):1262-7.

NUTT D.J, MALIZIA A.L. **Novas percepções sobre o papel do receptor GABA(A)-benzodiazepínico no transtorno psiquiátrico.** *Br J Psiquiatria.* novembro de 2001

O'MAHONY S.M, et al. **Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut- microbiome axis.** *Behav Brain Res.* 2015;15(277):32–48.

OHKAWA H, OHISHI N, YOGI K. **Ensaio para peróxidos lipídicos em tecidos animais por reação com ácido tiobarbitúrico.** *analista Bioquim.* 1979; **95** :351–358.

OHNO Y, et al. **Antiepileptogenic and anticonvulsive actions of levetiracetam in a pentylenetetrazole kindling model.** *Epilepsy Res.* 2010;89(2-3):360-364.

OLMOS-HERNÁNDEZ A, et al. **La epilepsia como um problema de discapacidad.** *Investigation em Discapacidad* 2013; 2(3): 122-130.

OLSZAK T, et al. **Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function.** *Science.* 2012 Apr 27;336(6080):489-93.

PARDO C.A, et al. **The pathology of Rasmussen Syndrome: stages of cortical involvement and neurophatological studies in 45 hemispherectomies.** *Epilepsia* 2004; 45(5) 516-526

PATANWALA A.E., KURITA A., TRUONG E. **Levetiracetam em baixa dose para profilaxia de convulsão após lesão cerebral traumática.** *Injeção cerebral* 2016; 30 (2):156–158.

PATEL, M. **Targeting Oxidative Stress in Central Nervous System Disorders.** *Trends Pharmacol. Sci.* 2016;37:768–778.

PAVLOV V.A., TRACEY K.J. **Neural circuitry and immunity.** *Immunol Res.* 2015 Dec;63(1-3):38-57.

PEARSON-SMITH J.N., PATEL M. **Metabolic Dysfunction and Oxidative Stress in Epilepsy.** *Int. J. Mol. Sci.* 2017;18:2365.

PEARSON-SMITH JN, et al. **Oxidative Stress Contributes to Status Epilepticus Associated Mortality.** *Neurochem Res.* 2017;42(7):2024-2032. doi:10.1007/s11064-017-2273-1

PEREIRA T.M.C, et al. **The Emerging Scenario of the Gut-Brain Axis: The Therapeutic Actions of the New Actor Kefir against Neurodegenerative Diseases.** *Antioxidants (Basel).* 2021 Nov 20;10(11):1845. doi: 10.3390/antiox10111845.

PERUCCA E, FRENCH J, BIALER M. **Development of new antiepileptic drugs: Challenges, incentives and recent advances.** *Lancet Neurol.* 2007;6:793–804.

PICOT, M.C., et al. 2008. **The prevalence of epilepsy and pharmaco-resistant epilepsy in adults: a population-based study in a Western European country.** *Epilepsia* 49: 1230-1238.

PIMENTA F.S., et al. **Mechanisms of Action of Kefir in Chronic Cardiovascular and Metabolic Diseases.** *Cell Physiol Biochem.* 2018;48(5):1901-1914. doi: 10.1159/000492511.

PITKÄNEN A., LUKASIUK K. **Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy.** *Epilepsy Behav* 2009; 14(Suppl): 16-25. doi: 10.1016/j.yebeh.2008.09.023.

PITKÄNEN, A. & SUTULA, T.P. **Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy.** *Lancet Neurol.* 1, 173–181 (2002).

POHLMANN-EDEN B, et al. **Comparative effectiveness of levetiracetam, valproate and carbamazepine among elderly patients with newly diagnosed**

**epilepsy: subgroup analysis of the randomized, unblinded KOMET study.** *BMC Neurol.* 2016 Aug 23;16(1):149. doi: 10.1186/s12883-016-0663-7.

PUSPITA L., CHUNG S.Y., SHIM J.-W. **Oxidative stress and cellular pathologies in Parkinson's disease.** *Mol. Brain.* 2017;10:53. doi: 10.1186/s13041-017-0340-9.

QIN, J. et al. **A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing.** *Nature* 464, 59–65 (2010).

RAMASWAMY V., WALSH J.G., et al (2013) **Inflammasome induction in Rasmussen's encephalitis: cortical and associated white matter pathogenesis.** *J Neuroinflammation* 10:918. doi:10.1186/1742-2094-10-152

RATHORE S., SALMÉRON I., PANDIELLA S.S. **Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures.** *Food Microbiology* 2012; 30(1): 239-244.

RAUCA C., ZERBE R., JANTZE H. **Formation of free hydroxyl radicals after pentylentetrazol-induced seizure and kindling.** *Brain Res* 1999;847:347–51.

RITCHIE M.L., ROMANUK T.N. **A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases.** *PLoS One* 2012;7(4):e34938

ROSA D.D., et al. **Milk kefir: nutritional, microbiological and health benefits.** *Nutr Res Rev.* 2017; 30 (1):82-96. doi: 10.1017/S0954422416000275.

SABOURI S, et al. **Effects of probiotics on pentylentetrazol-induced convulsions in mice.** *Epilepsy Res.* 2021;176:106723.

SALOFF-COSTE, C.J. (1996). **Kefir. Benefícios nutricionais e de saúde de iogurte e leites fermentados.** *Dannone World Newsl.* 11 1–7.

SCHEFFER I.E., et al. **Classification of the epilepsies: new concepts for discussion and debate-special report of the ILAE Classification Task Force of the Commission for Classification and Terminology.** *Epilepsia Open.* 2016;1:37–44.

SCHMIDT D., SCHACHTER S.C. **Tratamento medicamentoso da epilepsia em adultos.** *Br. Med. J.* 2014; 348 :g254. doi: 10.1136/bmj.g254.

SCHMIDT J. **Mudanças na suscetibilidade a convulsões em ratos após a administração crônica de pentilenotetrazol.** *Biomed Biochim Acta.* 1987; 46 (4): 267–270.

SHI Y, et al. **ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy.** *Nature*. 2017 Sep 28;549(7673):523-527.

SHIMADA T, YAMAGATA K. **Pentylentetrazole-Induced Kindling Mouse Model.** *J Vis Exp*. 2018; (136): 56573. doi: 10.3791 / 56573

SIES H. **Oxidative stress: Um conceito em biologia redox e medicina.** *Redox Biol*. 2015; 4 :180–183. doi: 10.1016/j.redox.2015.01.002.

SINGH A, TREVICK S. **The Epidemiology of Global Epilepsy.** *Neurol Clin*. 2016 Nov;34(4):837-847.

SITTIPO P, et al. **Intestinal microbiota and the immune system in metabolic diseases.** *J Microbiol*. 2018 Mar;56(3):154-162.

SLATTERY C., COTTER P.D., O'TOOLE P.W. **Analysis of Health Benefits Conferred by Lactobacillus Species from Kefir.** *Nutrients*. 2019;11(6):1252. Published 2019 Jun 1. doi:10.3390/nu11061252

SOMMER F, et al. **The resilience of the intestinal microbiota influences health and disease.** *Nat Rev Microbiol*. 2017 Oct;15(10):630-638.

SOUZA, G.; GARCIA, S.; VALLE, J.L.C. **Kefir e sua tecnologia - aspectos gerais.** *Boletim ITAL. Campinas*, 21(2), 1984: 137-155.

SQUIRES RF, et al. **As potências convulsivas dos tetrazóis estão altamente correlacionadas com as ações nos complexos GABA / benzodiazepina / receptor de picrotoxina no cérebro.** *Life Sci*. 1984; 35 (14): 1439–1444.

STAFSTROM C.E., CARMANT L. **Seizures and epilepsy: na overview for neurocientists.** *Col Springs Harb Perspect Med* 2015; 5:a022426.

STĘPIEŃ KM, et al. **The multidrug transporter P-glycoprotein in pharmaco-resistance to antiepileptic drugs.** *Pharmacol Rep*. 2012;64(5):1011-1019. doi:10.1016/s1734-1140(12)70900-3

ST-ONGE MP, et al. (2002). **O consumo de kefir não altera os níveis lipídicos plasmáticos ou as taxas de síntese fracionada de colesterol em relação ao leite em homens hiperlipidêmicos: um estudo controlado randomizado.** *Complemento BMC. Altern. Med*. 2: 1 10.1186 / 1472-6882-2-1.

STRATI F., et al. **New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders.** *Microbiome*. 2017 Feb 22;5(1):24.

SWEENEY MD, et al. (2019). **Barreira hematoencefálica: da fisiologia às doenças e às costas.** *Physiol. Rev.* 99, 21–78. 10.1152 / physrev.00050.2017

TON A.M.M., CAMPAGNARO B.P., et al. **Oxidative Stress and Dementia in Alzheimer's Patients: Effects of Synbiotic Supplementation.** *Oxid Med Cell Longev.* 2020 Jan 13;2020:2638703. doi: 10.1155/2020/2638703.

TOUROV A. et al. **Morfologia do pico na epilepsia experimental parcial induzida por PTZ generalizada e induzida por cobalto.** *Funct Neurol.* 1996; 11 (5): 237–245.

TREMAROLI, V. and BACKHED, F. 2012. **Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism.** *Nature* 489, 242–249.

TRINKA E (2011) **What is the evidence to use new intravenous AEDs in status epilepticus?** *Epilepsia* 52:35–38. doi:10.1111/j. 1528-1167.2011.03232.x

TRINKA E, et al. **A definition and classification of status epilepticus—Report of the ILAE Task Force on classification of status epilepticus.** *Epilepsia* 2015.

TULKENS J., et al. (2018). **Níveis aumentados de vesículas extracelulares bacterianas sistêmicas positivas para LPS em pacientes com disfunção da barreira intestinal.** *Gut* 69, 191-193.

VARATHARAJ A., GALEA I. (2017). **A barreira hematoencefálica na inflamação sistêmica.** *Brain Behav. Immun.* 60, 1-12.

VELAGAPUDI VR, et al. **The gut microbiota modulates host energy and lipid metabolism in mice.** *J Lipid Res.* 2010 May;51(5):1101-12.

VEZZANI A, et al. (2011) **The role of inflammation in epilepsy.** *Nat Rev Neurol* 7:31–40.

VEZZANI A, VIVIANE B. **Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impacts on neuronal excitability.** *Neuropharmacology* 2018, 14:144.

WAHAB A. **Difficulties in treatment and management of epilepsy and challenges in new drug development.** *Pharmaceuticals (Basel).* 2010;3(7):2090–2110. 10.3390/ph3072090

WAHAB, DAYANG YASMIN et al. **“Review on Cross Talk between Neurotransmitters and Neuroinflammation in Striatum and Cerebellum in the**

**Mediation of Motor Behaviour.”** *BioMed research international* vol. 2019 1767203. 14 Nov. 2019, doi:10.1155/2019/1767203

WANG X, et al. **Evidences for vagus nerve in maintenance of immune balance and transmission of immune information from gut to brain in STM-infected rats.** *World J Gastroenterol* 2002; 8(3): 540-545

WANG X., et al. **Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer’s disease.** *Biochim. Biophys. Acta.* 2014; 1842:1240–1247.

WEI-SHENG H., YEN-PO C., MING-JU C. (2010). **The antiallergic effect of kefir Lactobacilli.** *J. Food Sci.* 75 244–253

WILCOX KS, et al. **Questões relacionadas ao desenvolvimento de novos tratamentos anticonvulsivantes.** *Epilepsia.* 2013; 54 :24–34.

WILKINS, T; et al. **Probióticos para condições gastrointestinais: um resumo das evidências.** 2017

WITKO-SARSAT V, et al. 1996. **Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia.** *Kidney Int.*, 49, 1304-1313.

WONG-EKKABUT J., et al. **Efeito da peroxidação lipídica nas propriedades das bicamadas lipídicas: um estudo de dinâmica molecular.** *Biophys. J.* 2007; 93 :4225–4236.

YILMAZ-ERSAN L, et al. **The antioxidative capacity of kefir produced from goat milk.** *International Journal of chemical engineering and applications* 2017; 7(1): 2.

YOUNG-IN K., APOSTOLIDIS E., SHETTY K. (2006). **Funcionalidade antidiabética do leite de soja fermentado mediado por cultura de kefir, suplementado com extratos de Rhodiola.** *Biotecnol alimentar.* 20 13-29. 10.1080 / 08905430500522055

ZHANG R., et al. **Nrf2—A Promising Therapeutic Target for Defensing Against Oxidative Stress in Stroke.** *Mol. Neurobiol.* 2017;54:6006–6017. doi: 10.1007/s12035-016-0111-0.

ZHANG C., CHANTEUX H., ZUO Z., KWAN P., BAUM L. **Potential role for human P-glycoprotein in the transport of lacosamide.** *Epilepsia.* 2013;54(7):1154-1160. doi:10.1111/epi.12158



ZHONG L., ZHANG X., COVASA M. **Emerging roles of lactic acid bacteria in protection against colorectal cancer.** *World J Gastroenterol* 2014;20(24):7878–86

ZHU X, et al. **NMDA receptor NR2B subunits contribute to PTZ-kindling-induced hippocampal astrocytosis and oxidative stress.** *Brain Res Bull* 2015;114:70–8

ZIBELL, G. et al. **Celecoxib prevents seizure-induced up-regulation of endothelial p-glycoprotein in the blood-brain-barrier.** *Abstract T158* (8th European Congress on Epileptology, Berlin, Germany, 2008).

## ANEXOS



**Universidade Vila Velha**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UVV)**

**PARECER DO RELATOR**

**Parecer Nº. 601-2021**

Pesquisador (a) responsável: **Bianca Prandi Campgnaro**

Finalidade: **Pesquisa**

Instituição onde será desenvolvido: **Universidade Vila Velha**

Situação: **APROVADO**

Ao analisar o projeto de pesquisa: **"Avaliação neuroprotetora do probiótico kefir em modelo experimental de Epilepsia"**, tendo como pesquisador (a) responsável **Bianca Prandi Campgnaro**, considero que o projeto se encontra adequado e satisfatoriamente de acordo com as exigências das Resoluções que regem esse Comitê. A duração do projeto é de **01/08/2021 a 01/06/2023**. Assim, mediante a importância social e científica que o projeto apresenta, a sua aplicabilidade e conformidade com os requisitos éticos, sou de parecer favorável à realização do projeto classificando-o como **60 (sessenta) Camundongo isogênico (linhagem C57bl6)**, pois o mesmo atende aos Requisitos Fundamentais da Normas de Conduta para a Utilização de Animais no Ensino, Pesquisa e Extensão na Universidade Vila Velha.

Vila Velha-ES, 09 de setembro de 2021.

**Moacir Carretta Júnior**

**Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA-UVV**

**Universidade Vila Velha**  
Rua Comissário José Dantas de Melo, 21, Boa Vista, Vila Velha-ES, CEP.: 29.102-920  
E-mail: ceua@uvv.br