

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

**Viviane Nogueira de Zorzi**

**EFEITO DO FLAVONOIDE GALANGINA SOBRE A  
SUSCEPTIBILIDADE ÀS CONVULSÕES INDUZIDAS POR  
PENTILENOTETRAZOL NA PRESENÇA DE PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub>**

Santa Maria, RS  
2018

Viviane Nogueira de Zorzi

**EFEITO DO FLAVONOIDE GALANGINA  
SOBRE A SUSCEPTIBILIDADE ÀS CONVULSÕES INDUZIDAS POR  
PENTILENOTETRAZOL NA PRESENÇA DE PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub>**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Michele Rechia Fighera

Santa Maria, RS  
2018

de Zorzi, Viviane

Efeito do flavonoide galangina sobre a susceptibilidade às convulsões induzidas por pentilenotetrazol na presença de prostaglandina E2 / Viviane de Zorzi.- 2018.  
87 p.; 30 cm

Orientadora: Michele Fighera

Coorientador: Luiz Fernando Royes

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, RS, 2018

1. Susceptibilidade às crises convulsivas 2. Inflamação no sistema nervoso central 3. Plantas medicinais I. Fighera, Michele II. Royes, Luiz Fernando III. Título.

## AGRADECIMENTOS

No início desta dissertação de mestrado, não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que colaboraram para a realização deste trabalho, de maneira especial, agradeço:

Primeiramente a Deus, por sempre me abençoar e “andar comigo”.

A meus pais, Eloci e Adaleo José, por todo amor incondicional, apoio, confiança e motivação. Especialmente a minha mãe, que renova minhas forças a cada dia, não tenho palavras para expressar tamanha gratidão e admiração por essa mulher.

Manifesto a minha gratidão e admiração pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Michele, orientadora desta dissertação, agradeço pela oportunidade que me deu de efetuar este trabalho, pela orientação e por me possibilitar “aprendizagens únicas”. Agradeço-lhe carinhosamente por ser uma referência profissional e pessoal para meu crescimento. Agradeço também ao Prof. Dr. Luiz Fernando que cedeu o laboratório para que o trabalho fosse realizado, por todo aprendizado científico e de vida durante esses quatro anos.

À família BioEx, por tornarem os meus dias mais alegres e divertidos, por toda ajuda e irmandade que jamais faltou, em especial ao Gustavo pelo constante apoio, sem “tempo ruim”, com certeza é um exemplo de persistência para mim e o levarei no coração. Ao Godinho, melhor IC, mais aprendi com ele do que ensinei com toda a certeza. Agradeço a Alinow pela motivação de cada dia, sempre me ajudando e aconselhando s2, e a Fê, que só pode ter sido meu anjo da guarda que colocou ela no meu caminho justo no momento mais difícil para mim, não tenho palavras para descrever o quanto foram essenciais nessa etapa para mim. À Cissa, sou tão grata por todo aprendizado e com certeza te levarei no coração pra toda a vida. Nai e May suas lindas, obrigada pela amizade e parceria!

Às minhas amigas, Ananda e Simona, meus presentes da graduação, muito obrigada!

Ao meu namorado Jeronimo, pelo positivismo invejável, apoio e motivação, sempre me incentivando e tornando meus dias mais fáceis e alegres.

Aos animais, parte fundamental do trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência. Agradeço, também, à CAPES pelo apoio financeiro.

Finalmente, gostaria de agradecer à Universidade Federal de Santa Maria por proporcionar o conhecimento científico através da sua pós-graduação.

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

## RESUMO

### EFEITO DO FLAVONOIDE GALANGINA SOBRE A SUSCEPTIBILIDADE ÀS CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL NA PRESENÇA DE PROSTAGLANDINA E<sub>2</sub>

AUTORA: Viviane Nogueira de Zorzi  
ORIENTADORA: Michele Rechia Fighera

A epilepsia é uma das doenças neurológicas crônicas mais comuns, caracterizadas por crises epiléticas recorrentes, onde um terço dos pacientes são refratários aos tratamentos existentes. Evidências tem revelado estreita associação entre neuroinflamação e o aumento da susceptibilidade às crises epiléticas, uma vez que existe pronunciada expressão de mediadores inflamatórios, como a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) durante as crises. Como demonstrado, a PGE<sub>2</sub> é capaz de estimular a liberação de glutamato bem como inibir a enzima Na + K + -ATPase, o que de fato pode aumentar a excitabilidade neuronal, contribuindo para as crises epiléticas. Sabendo do papel importante da inflamação durante as crises e a existência da refratariedade ao tratamento anticonvulsivante, o objetivo inicial do presente estudo foi investigar se PGE<sub>2</sub> aumenta a susceptibilidade a convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ). Posteriormente, avaliamos se o composto isolado da planta *Piper aleyreanum*, nomeado Galangina, que demonstrou efeito anti-inflamatório e protetor em modelo de nocicepção induzido por glutamato e PGE<sub>2</sub>, poderia apresentar atividade anticonvulsivante neste estudo. Para isso, no experimento 1, os camundongos foram injetados com PGE<sub>2</sub> (100ng/2 µl; i.c.v) e quinze minutos depois foram injetados com uma dose subefetiva de PTZ (35mg/kg, i.p.) para avaliação da susceptibilidade a convulsões. No experimento 2, os camundongos foram injetados com Galangina (30mg/kg; i.p.) quinze minutos antes da injeção de PGE<sub>2</sub>, e quinze minutos após injeção de PGE<sub>2</sub>, os camundongos foram injetados com PTZ, nas mesmas doses. Nossos resultados mostraram que o grupo tratado com PGE<sub>2</sub> aumentou a susceptibilidade ao PTZ, causando crises mioclônicas e generalizadas, aumentando a duração das crises bem como a amplitude de ondas eletroencefalográficas. Além disso, análise estatística mostrou que o tratamento com PGE<sub>2</sub> ou PGE<sub>2</sub> e PTZ em combinação aumentou o imunocontéudo de IBA-1 (marcador microglial), GFAP (marcador astrocítico), 4-HNE (marcador de peroxidação lipídica), VCAM-1 (molécula de adesão de celular vascular 1) e da enzima p-PKAI $\alpha$  (proteína cinase dependente de AMPc- fosforilada). No entanto, nem o tratamento com PGE<sub>2</sub> ou com PTZ alterou o imunocontéudo dos receptores de PGE<sub>2</sub> (EP1, EP2 e EP3). De fato, o pré-tratamento com Galangina preveniu o comportamento convulsivo e diminuiu a amplitude de ondas eletroencefalográficas, bem como impediu o aumento da produção de espécies reativas, a ativação microglial e astrocítica, diminuiu o imunocontéudo da VCAM-1 e o estado de fosforilação da enzima PKAI $\alpha$  induzidos por PGE<sub>2</sub>/PTZ. Portanto, este estudo sugere que o composto Galangina apresentou atividade anticonvulsiva e anti-inflamatória contra as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas pela administração de PGE<sub>2</sub> e PTZ. No entanto, estudos adicionais são necessários para investigar as implicações clínicas desses achados e seus mecanismos subjacentes.

**Palavras-chave:** Neuroinflamação. Prostaglandina E<sub>2</sub>. Susceptibilidade. Crises epiléticas. Galangina. Córtex cerebral.

## ABSTRACT

### EFFECT OF FLAVONOID GALANGIN ON SUSCEPTIBILITY TO SEIZURES PENTYLENETETRAZOLE- INDUCED IN PRESENCE PROSTAGLANDIN E<sub>2</sub>

AUTHOR: Viviane Nogueira de Zorzi

ADVISOR: Michele Rechia Figuera

Epilepsy is one of the most common chronic neurological diseases, characterized by recurrent epileptic seizures, where one-third of patients are refractory to existing treatments. Evidences have revealed association between neuroinflammation and increased susceptibility to seizures since there is a pronounced increase in the expression of key inflammatory mediators, such as prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) during seizures. The PGE<sub>2</sub> has been demonstrated to stimulate the release of glutamate and to inhibit Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> -ATPase enzyme, which in fact may increase neuronal excitability, contributing to seizure. Knowing the important role of inflammation during seizures and existence of refractory to anticonvulsant treatment, the purpose initial of the present study was to investigate whether PGE<sub>2</sub> increases to susceptibility to seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ). Subsequently, we evaluate whether a compound isolated from the *Piper aleyreanum* plant, named Galangin, proved to be anti-inflammatory and protective in a nociception model induced by glutamate and PGE<sub>2</sub>, could have anticonvulsive activity in this study. For this, in the experiment 1, the mice were injected with PGE<sub>2</sub> (100ng/2μl; intracerebroventricular (i.c.v.) and fifteen minutes later were injected with a subeffective PTZ dose (35mg/kg, intraperitoneal (i.p) for evaluation of susceptibility to seizures. In the experiment 2, the mice were injected with Galangin (30mg/kg; i.p.) fifteen minutes before PGE<sub>2</sub> injection, fifteen minutes later were injected with PTZ, in the same doses. Our results showed that the group treated com PGE<sub>2</sub> increased the susceptibility to PTZ, causing myoclonic and generalized seizures, increasing the seizures duration and electroencephalographic wave amplitude. Furthermore, statistical analyzes showed that the treatment with PGE<sub>2</sub> or PGE<sub>2</sub> and PTZ combined increased IBA-1 (microglial marker), GFAP (astrocytic marker), 4-HNE (lipid peroxidation marker), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) and p-PKAI $\alpha$  (phosphorylated cAMP-dependent protein kinase) immunocontents. However, nor PTZ or PGE<sub>2</sub> treatment changed the immunocontent of receptors of PGE<sub>2</sub> (EP1, EP2 and EP3). Indeed, pre-treatment with Galangin prevented the convulsive behavior and decreased electroencephalographic wave amplitude as well as prevented reactive species production, microglial and astrocytic activation, decreased VCAM-1 immunocontent and phosphorylation state of PKAI $\alpha$  induced by PGE<sub>2</sub>/PTZ. Therefore, this study suggests that the compound Galangin presented anticonvulsive and anti-inflammatory activities against the behavioral and neurochemical changes induced by administration of PGE<sub>2</sub> and PTZ. However, further studies are needed to investigate the clinical implications of these findings and their underlying mechanisms.

**Keywords:** Neuroinflammation. Prostaglandin E<sub>2</sub>. Susceptibility. Seizures. Galangin. Cerebral cortex.

## LISTA DE GRÁFICOS

### Introdução:

Figura 1-Resposta da micróglia e dos astrócitos após insulto cerebral.....	21
Figura 2-Cascata da biossíntese de prostaglandinas e tromboxano A2 .....	23

### Resultados:

#### Manuscript

Figure 1- Chemical structure of Galangin (3,5,7-trihydroxyflavone) .....	57
Figure 2- Representation of experimental design .....	58
Figure 3- Effect of administration of PGE <sub>2</sub> (100ng/2µl i.c.v.) on seizure susceptibility with PTZ (35 mg/kg, i.p). Data from latency to the first myoclonic seizure (A), first tonic-clonic seizure (B), time spent in generalized tonic-clonic seizure (C), and Racine scale (D) .....	59
Figure 4- Effect of acute administration of PGE <sub>2</sub> (100ng/2µl i.c.v.) prior to subconvulsive dosage of PTZ (35 mg/kg, i.p) on immunoreactivity of IBA-1 (A) and GFAP (B).....	59
Figure 5- Effect of acute administration of PGE <sub>2</sub> (100ng/2µl i.c.v.) prior to subconvulsive dosage of PTZ (35 mg/kg, i.p) on immunoreactivity of 4-HNE(A) and VCAM-1 (B).....	60
Figure 6- Effect of acute administration of PGE <sub>2</sub> (100ng/2µl i.c.v.) prior to subconvulsive dosage of PTZ (35 mg/kg, i.p) on immunoreactivity EP1(A), EP2 (B), EP3(C) and the ratio p-PKA/PKA (D).....	60
Figure 7- Effect of Galangin administration (30 mg/kg, i.p.) on the increase seizure susceptibility elicited by PGE <sub>2</sub> (100ng/2µl i.c.v.) prior to PTZ injection (35 mg/kg, i.p.). Latency to the first myoclonic seizure (A), first tonic-clonic seizure (B), and Racine scale (C), wave amplitude analysis (D) Representative electroencephalographic recordings of animals treated with PGE <sub>2</sub> (E), PTZ (F), PGE <sub>2</sub> + PTZ (G) and Galangin + PGE <sub>2</sub> + PTZ (H) .....	61
Figure 8- Effect of Galangin administration (30 mg/kg, i.p.) on increase of immunoreactivity of IBA-1 (A) and GFAP (B) PGE <sub>2</sub> and/or PGE <sub>2</sub> /PTZ-induced.....	62
Figure 9- Effect of Galangin administration (30 mg/kg, i.p.) on the increase of immunoreactivity 4 -HNE (A) and VCAM-1 (B) PGE <sub>2</sub> or PGE <sub>2</sub> /PTZ induced...	62

Figure 10- Effect of Galangin administration (30 mg/kg, i.p.) on the increase phosphorylation at Ser96 of PKA II $\alpha$  subunit PGE<sub>2</sub>/PTZ induced ..... 63

Table 1- Effects of acute administration of PGE<sub>2</sub> prior to PTZ and treatment with Galangin on duration of tonic-clonic seizures.....63



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-HNE	4-hidroxinonenal
BHE	Barreira hemato-encefálica
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
cPGES	Prostaglandina Sintase citosólica
EEG	Eletroencefalografia
EP	Receptor de prostaglandina E2
ER	Espécies reativas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
IBA-1	Molécula adaptadora de ligação ao cálcio ionizado 1.
ILAE	Liga Internacional Contra a Epilepsia
INOS	Óxido nítrico sintase induzida
LPS	Lipopolissacarideo
mPGES	Prostaglandina Sintase Microsomal
NMDA	N-metil D-Aspartato
OMS	Organização Mundial da Saúde
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF $\alpha$	Prostaglandina F <sub>2</sub> alfa
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandina G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PKA	Proteína cinase dependente de AMPc
PKC	Proteína cinase C
PTZ	Pentilenotetrazol
RNA	Ácido ribonucléico
SNC	Sistema Nervoso Central
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1

## SÚMARIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.</b> .....	15
2.1	EPILEPSIA .....	15
2.2	CRISES EPILÉPTICAS E A INFLAMAÇÃO .....	19
2.3	CICLOOXIGENASE-2 E CRISES EPILÉPTICAS .....	23
2.4	PENTILENOTETRAZOL (PTZ).....	26
2.5	PLANTAS MEDICINAIS.....	27
2.6	FLAVONOIDES E CRISES EPILÉPTICAS .....	28
2.7	GALANGINA.....	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>31</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	32
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO .....	32
<b>4</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	<b>33</b>
4.1	MANUSCRITO .....	35
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>64</b>
	<b>REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>67</b>
	<b>ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	<b>87</b>

---

---

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma doença neurológica crônica caracterizada por uma predisposição persistente do cérebro em gerar crises epiléticas, e as consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais desta condição (FISHER, 2015). Estima-se que existam cerca de 70 milhões de pessoas com epilepsia no mundo, sendo que aproximadamente 80% delas vivem em países em desenvolvimento (MEGIDDO et al., 2016).

Há evidências suficientes sobre a associação entre neuroinflamação e o aumento da susceptibilidade às crises epiléticas. De fato, uma regulação anormal das funções gliais, como a ativação de astrócitos e microglia pode causar crises epiléticas e consequentemente epileptogênese (WETHERINGTON et al., 2008). De acordo, os processos inflamatórios, incluindo elevada produção de citocinas pró-inflamatórias e prostaglandinas, bem como aumento da expressão de moléculas de adesão, estão bem descritos em pacientes com epilepsia e em modelos experimentais (MARCHI et al., 2007; HANISCH e KETTENMANN, 2007; FABENE et al., 2008; VEZZANI et al., 2011, FABENE et al., 2013; LUO et al., 2014). Essas condições prejudiciais estão intimamente relacionadas ao aumento da susceptibilidade às convulsões (VEZZANI e GRANATA, 2005).

Nessa linha, entre as principais vias inflamatórias estudadas até agora para uma possível contribuição à epileptogênese está a ciclooxigenase-2 (COX-2) (RAVIZZA et al., 2011). A ciclooxigenase (COX) é a enzima marca-passo na via metabólica em que o ácido araquidônico é convertido em prostaglandinas, sendo a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) seu principal produto (SANG et al, 2005). Esta enzima está localizada em dendritos de neurônios excitatórios no córtex cerebral (KAUFMANN et al., 1996) e no hipocampo (YAMAGATA et al., 1993), onde a produção de PGE<sub>2</sub> é responsável pela regulação da excitabilidade neuronal (CHEN e BAZAN, 2005). No entanto, sob estímulos patológicos como as crises epiléticas, a COX-2 é induzida e níveis maiores de PGE<sub>2</sub> são produzidos no tecido (OKADA et al., 2001a; DESJARDINS et al., 2003; TAKEMIYA et al., 2003). Conforme o estudo de Oliveira et al. (2008) o anti-inflamatório celecoxib (inibidor seletivo de COX-2) aumentou a latência para convulsões induzidas por pentilenotetrazol em ratos e este efeito protetor foi revertido pela administração de PGE<sub>2</sub> (10ng/2 µl, intracerebroventricular). No entanto, apesar do papel importante da PGE<sub>2</sub> no controle da excitabilidade neuronal, pouco ainda sabe-se sobre sua função durante as crises.

Dessa forma, considerando que a terapia com anticonvulsivantes promove o controle de crises em cerca de 70% dos pacientes (PERUCCA et al., 2007), um número significativo de indivíduos permanece refratário aos fármacos antiepilépticos. Assim sendo, produtos de origem natural podem desempenhar um papel importante na descoberta e desenvolvimento de novas drogas antiepilépticas (SAKLANI e KUTTY, 2008). Neste contexto, a espécie *Piper Aleyreanum* foi estudada. Esta planta é membro da família Piperaceae, localizada no sudeste da região amazônica. É popularmente conhecido como "João-Brandinho", pimenta longa e / ou cobra de cobra (FACUNDO e MORAIS, 2003) comumente usada como imunomodulador, analgésico e antiinflamatório pela medicina popular.

O composto Galangina (3,5,7-trihidroxi-flavona) é um flavonóide extraído do extrato etanólico das folhas da planta *Piper alyreanum*. De fato, estudos utilizando o flavonóide Galangina demonstraram importante efeito anti-inflamatório, visto que diminuiu expressão da COX-2 e iNOS (óxido nítrico sintase induzida), bem como os níveis de óxido nítrico e PGE<sub>2</sub> (RASO et al., 2001; O'LEARY et al., 2004; HONMORE et al., 2016) e mostrou efeitos protetores em modelos de nocicepção induzida por PGE<sub>2</sub> e glutamato (LIMA, 2012). De acordo, evidências demonstram que muitos fármacos antiepilépticos são potencialmente utilizados no controle da dor, como a dor neuropática, devido à similaridade de mecanismos envolvendo ambas as doenças (MENDLIK e URITSKY, 2015). Ainda, existem diversos estudos demonstrando o efeito anticonvulsivante de vários compostos com propriedades flavonóides (TAIWE et al., 2016b, CITRARO et al., 2016, ADEOLUWA et al., 2016a), corroborando a importância de testar a possível atividade anticonvulsivante do composto Galangina. Portanto, o objetivo desta presente dissertação de mestrado é investigar se a PGE<sub>2</sub> é capaz de potencializar o efeito de uma dose subefetiva de PTZ, gerando convulsões e posteriormente avaliar se o flavonoide Galangina demonstra efeito anticonvulsivante em camundongos.

---

---

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 2 REVISÃO BIVLIOGRÁFICA

### 2.1 EPILEPSIA

A palavra epilepsia é de origem grega,  $\epsilon\pi\lambda\{\epsilon\nu$  epi = em cima e  $\lambda\epsilon\psi\epsilon\mu$  leptom = abater, significa fulminar, abater com surpresa, ser atacado, algo que vem de cima e abate o indivíduo (WALZ, 2004). A primeira descrição formal da epilepsia como doença deve ser atribuído a Hipócrates, considerado o pai da medicina, que em torno de 460-375 a.C passou a afirmar que a epilepsia não tinha uma origem divina, sagrada ou demoníaca como até então se disseminava, mas que o cérebro era responsável por essa doença. Apesar disso, as crenças em torno da epilepsia como possessão, maldição ou castigo perpetuaram por muito tempo (MAGIORKINIS et al., 2010).

A epilepsia é uma doença crônica que afeta pessoas de todas as idades, sendo considerada a segunda condição neurológica mais frequentemente encontrada, ficando atrás apenas do acidente vascular cerebral (AMUDHAN et al., 2015). De acordo, aproximadamente 70 milhões de pessoas atualmente vivem com epilepsia em todo o mundo (PREUX et al., 2015). A proporção estimada da população geral com epilepsia ativa (ou seja, com crises epiléticas contínuas ou com a necessidade de tratamento) em um determinado momento é entre 4 e 10 a cada 1000 pessoas. Além disso, estima-se que 80% das pessoas com epilepsia vivem em países de baixa e média renda (MEGIDDO et al, 2016). De acordo, alguns estudos sugerem que a proporção nesses países em desenvolvimento é muito maior, entre 7 e 14 a cada 1000 pessoas, sendo que, aproximadamente três quartos dessas pessoas afetadas não recebem tratamento (WHO, 2018).

No Brasil, os estudos epidemiológicos sobre epilepsia são limitados. Isso pode estar relacionado a dificuldade inerente de classificação das crises epiléticas, bem como ao acesso da maioria da população mais carente ao diagnóstico e tratamento (SANDER, 2003). Apesar disso, estima-se que a prevalência brasileira da doença seja de 1,4% da população em geral, no entanto somente 10% a 40% recebem algum tratamento medicamentoso ou tratamento cirúrgico (FERREIRA IDE e TABOSA E SILVA, 2009). De acordo, o mesmo estudo mostrou que 32.655 óbitos decorrentes de epilepsia no Brasil foram registrados no período de 1980 a 2003. Ainda, a mortalidade proporcional por epilepsia, segundo a região brasileira, mostrou que ocorreram 1.300 óbitos (3,98%) na região Norte; 5.643 óbitos (17,28%) na região Nordeste; 16.661 óbitos (51,02%) na região Sudeste; 6.759 óbitos (20,70%) na região

Sul; e 2.292 óbitos (7,02%) na região Centro-Oeste (FERREIRA IDE e TABOSA E SILVA, 2009).

Em conformidade com a proposta mais recente da Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE), a epilepsia é uma doença neurológica crônica caracterizada por uma predisposição persistente do cérebro em gerar crises epiléticas, e as consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais desta condição (FISHER, 2015). Como definição, crise epilética se caracteriza pela ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas gerados por uma atividade neuronal sincrônica ou excessiva no encéfalo. Posto que, crise convulsiva é a manifestação comportamental e/ou motora da crise epilética (FISHER et al., 2005). Assim, a crise é um evento e epilepsia é a doença, que envolve crises recorrentes não provocadas (FISHER et al., 2014).

Conforme definido pela ILAE, a epilepsia é caracterizada por qualquer uma das seguintes condições: (1) Pelo menos duas crises epiléticas espontâneas (ou reflexas) ocorrendo em um intervalo maior de 24 horas; (2) uma crise espontânea (ou reflexa) e uma probabilidade de novas crises semelhante ao risco geral de recorrência (pelo menos 60 %), ocorrendo ao longo dos próximos 10 anos; (3) diagnóstico de uma síndrome da epilepsia. De acordo, a epilepsia pode ser considerada resolvida em indivíduos que permaneceram livres de crises nos últimos 10 anos, e sem uso de medicamentos anticonvulsivantes, pelo menos nos últimos 5 anos (FISHER et al., 2014).

Em relação a semiologia das crises epiléticas, a classificação pode ser: (1) generalizadas, conceituadas como originárias em algum ponto dentro de redes neuronais distribuídas bilateralmente, envolvendo os dois hemisférios cerebrais. Essas redes neuronais bilaterais podem incluir estruturas corticais e subcorticais, mas não necessariamente o córtex inteiro; (2) focais, conceituadas como originárias dentro das redes neuronais limitadas a um hemisfério, sendo discretamente localizadas ou amplamente distribuídas; (3) desconhecidas (BERG et al., 2010).

No que diz respeito a etiologia, a epilepsia divide-se em três categorias: a epilepsia genética, em que um defeito genético contribui diretamente para a epilepsia, o melhor exemplo são as canalopatias; a epilepsia estrutural/metabólica, a qual é o resultado secundário de uma condição causada por distúrbio estrutural e/ou metabólico cerebral, como a malformação cerebral, infecção, tumor, acidente vascular cerebral, trauma, entre outros; e a epilepsia com etiologia desconhecida, onde a natureza do fator etiológico não é reconhecido e identificado até o momento (BERG e SCHEFFER, 2011).



Todavia, diversas críticas surgiram na literatura ante a proposta de classificação de 2010. E ainda em 2013, foi lançado um novo relatório da Comissão da ILAE sobre classificação e terminologia das epilepsias (SCHEFFER et al., 2013) e que foi revisado em 2017 (SCHEFFER et al., 2017). Nesse documento, alguns termos foram revisados ou mais bem definidos e a epilepsia passou a ser classificada em: genética (a epilepsia que é diretamente resultante de um defeito genético conhecido ou presumido), estrutural (epilepsia em que uma lesão estrutural é visível na neuroimagem e concordante com os achados eletroclínicos, sugerindo uma relação direta entre a lesão e a epilepsia), metabólica (defeito metabólico com sintomas sistêmicos que levam também ao desenvolvimento de epilepsia), imunológica (epilepsia em que há evidência de um processo autoimune ocasionando inflamação do sistema nervoso central), infecciosa (epilepsia desencadeada por um processo infeccioso, como neurocisticercose, toxoplasmose, HIV) e desconhecida (a causa da epilepsia não pode ser determinada) (SCHEFFER et al., 2013; 2017)

Em todas as revisões terminológicas realizadas até o presente pelas Comissões da ILAE, presumia-se que a classificação deveria ser constantemente revisada para refletir, de forma clara, todos os avanços obtidos na pesquisa básica e clínica em epilepsia, permitindo, assim, sua incorporação na prática clínica. Desse modo, em paralelo ao avanço das pesquisas na área da epileptologia, a Comissão da ILAE de Classificação e Terminologia 2013-2017, recentemente revisou a classificação e está desenvolvendo uma nova proposta para a classificação das crises epiléticas. Segundo os autores, a nova proposta tem como objetivo tornar mais fácil e preciso o diagnóstico e a classificação das crises, e espera-se que essa nova versão seja mais completa (FISCHER et al., 2017). De acordo com a nova proposta, a reclassificação das crises baseia-se em três características principais: o local de origem das crises, o nível de “consciência” (awareness) durante uma crise, e, por fim, em outras características da crise (como os sintomas e os movimentos). E as mesmas passaram a ser classificadas de acordo com o seu início em: focal, generalizada, início desconhecido e não classificável (FISHER et al., 2017).

Nesse sentido, uma porcentagem dos indivíduos acometidos por lesões adquiridas no tecido cerebral, como infecções, traumatismo cranioencefálico ou acidente vascular, desenvolverá epilepsia após certo período de tempo. Nesses casos, admite-se que a lesão induz uma reorganização dos circuitos cerebrais que, com o tempo, transforma-se em um foco gerador de descargas epiléticas. Esse processo através do qual um cérebro previamente

assintomático torna-se capaz de gerar crises epilépticas espontâneas é denominado epileptogênese (CAVALHEIRO et al., 1991).

Nesse contexto, na última década, evidências experimentais e clínicas têm sustentado a hipótese de que a presença de processos inflamatórios no cérebro pode constituir um mecanismo comum na fisiopatologia das convulsões e da epilepsia (VEZZANI et al., 2011), visto que diversas doenças, como meningites bacterianas e encefalites, podem aumentar o risco entre cinco a dez vezes para desenvolver epilepsia. (OLIVEIRA, 2006). De acordo, citocinas anti e pró-inflamatórias, prostaglandinas e moléculas relacionadas tem sido encontradas no SNC e no plasma, tanto em modelos de crises epilépticas quanto em casos clínicos de epilepsia. (VEZZANI e GRANATA, 2005; MARCHI et al., 2007; HANISCH e KETTENMANN, 2007). Portanto, estudos que visam determinar como os mediadores inflamatórios envolvidos no processo de neuroinflamação podem estar contribuindo e influenciando na susceptibilidade das crises epilépticas são extremamente importantes para o entendimento da epileptogênese.

## 2.2 CRISES EPILÉPTICAS E INFLAMAÇÃO

Está bem descrito que reações inflamatórias ocorrem no cérebro em doenças agudas e crônicas do sistema nervoso central (SNC), incluindo a epilepsia (CHOI, 2008). Dessa forma, a neuroinflamação é uma condição caracterizada pela presença de uma série de moléculas (mediadores estabelecidos da inflamação) que não são detectáveis ou são pouco detectáveis em condições fisiológicas (VEZZANI e GRANATA, 2005).

De acordo, evidências experimentais observam intensa ativação glial e a “up-regulation” (regulação positiva) de mediadores inflamatórios em modelos animais de epilepsia e/ou crises epilépticas (CHOI, 2008). Esses mediadores inflamatórios são classicamente produzidos por células do sistema imunológico em resposta a infecção ou vários tipos de ameaças patológicas, no entanto, está bem estabelecido que essas moléculas também são produzidos por células do parênquima cerebral (neurônios e células gliais) e células da barreira hematoencefálica (BHE), podendo exacerbar o processo lesivo e aumentar a excitabilidade neuronal (VEZZANI e GRANATA, 2005).

Nesse sentido, as células gliais são células especializadas do SNC relacionadas com a resposta imune. Elas subdividem-se em macroglia (astrócitos e oligodendrócitos) e micróglia, os conhecidos “macrófagos residentes” do SNC (RANSOHOFF e PERRY, 2009). As células microgлияis apresentam morfologia característica, com corpo celular picnótico, citoplasma perinuclear reduzido, além de processos celulares finos e longos, sendo tipicamente

encontradas em estágio de repouso, ou seja, condições nas quais o SNC se encontra livre de alterações patológicas (NIMMERJAHN et al., 2005).

De acordo, no estágio de repouso, a micróglia constantemente faz uma espécie de “varredura” do parênquima cerebral, monitorando o microambiente cerebral (NIMMERJAHN et al., 2005). Desse modo, a micróglia não possui uma resposta pré-determinada frente a um estímulo patológico, mas sim variável, que fundamentalmente depende do tipo de estímulo desencadeador, e do estado de ativação em que as células microgлияais encontravam-se no momento (GORDON, 2003). Dessa forma, um papel dual da micróglia é observado, visto que a sua ativação constitui-se uma importantíssima forma de defesa contra uma infecção, porém sua atividade exacerbada pode vir a contribuir para aumentar o dano (SCHWARTZ et al., 2006). De fato, a ativação de células microgлияais está bem relacionada com o alastramento da lesão evidenciado em diversas condições patológicas do SNC, incluindo a epilepsia (EKDAHL, 2003; BONDE et al., 2006; YANG et al., 2010) (Figura 1).

De acordo, diversos modelos experimentais de epilepsia demonstraram acentuada ativação microgлияal, incluindo o modelo experimental por pilocarpina (SHAPIRO et al., 2008), por abrasamento (BONDE et al., 2006) bem como por injeção de ácido cáinico (VEZZANI et al., 1999; AVIGNONE et al., 2008), onde essa hiperativação da micróglia mostrou exacerbar o processo danoso e aumentou a produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como de espécies reativas de oxigênio (KIM e VELLIS, 2005; SOMERA-MOLINA et al., 2007; CHOI et al., 2009; YANG et al., 2010), contribuindo para o aumento da susceptibilidade dos animais para apresentar crises epilépticas (SOMERA-MOLINA et al., 2007).

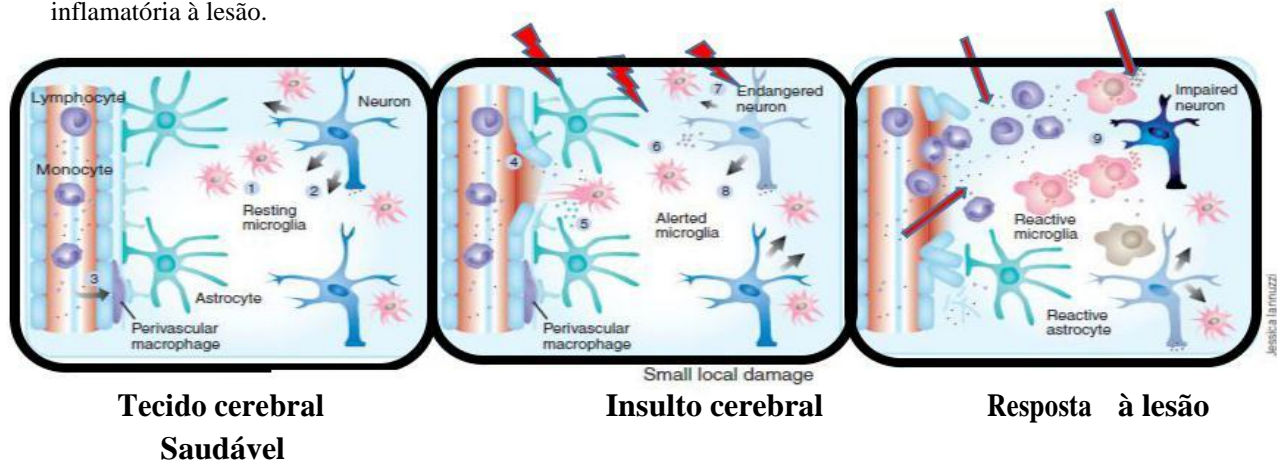
Paralelamente, o aumento do número de astrócitos também constitui um componente da neuroinflamação, sendo frequentemente uma característica da epilepsia do lobo temporal mesial e da maioria dos modelos animais de crises epilépticas (WETHERINGTON et al., 2008). Neste contexto, os astrócitos são células gлияais que se apresentam sob duas formas morfológicas: protoplasmáticos e fibrilares. Os astrócitos protoplasmáticos predominam na substância cinzenta. Têm prolongamentos mais numerosos, curtos, delicados e ramificados que os dos astrócitos fibrosos, que ocorrem na substância branca (RAIVICH et al., 1999).

Entre as principais funções dos astrócitos no cérebro adulto saudável, duas ganham destaque: (1) a manutenção de baixa concentração intersticial de glutamato, através da captação desse neurotransmissor, controlando a excitabilidade neuronal (WETHERINGTON et al., 2008), e (2) os astrócitos participam da barreira hemato-encefálica (BHE), atuando

como reguladores importantes do balanço entre estabilidade endotelial e permeabilidade da BHE (CHOI, 2008).

Neste contexto, estudos mostraram que vários insultos ao cérebro, incluindo crises prolongadas (RAIVICH et al., 1999; BINDER e STEINHÄUSER, 2006; RAVIZZA et al., 2008; BUFFO et al, 2010) resultam em gliose reativa, que é caracterizada por severas alterações morfológicas e bioquímicas dos astrócitos pré-existentes (BINDER e STEINHÄUSER, 2006; RAVIZZA et al., 2008), bem como a geração de novos astrócitos (BORGES et al., 2006). Uma vez ativados, eles irão contribuir para a resposta inflamatória, através da liberação de citocinas pró-inflamatórias (GOMES-LEAL et al., 2004) e da proliferação dessas células na região danificada, possivelmente formando a cicatriz glial (PROPERZI et al., 2003) (Figura1).

Figura 1: Resposta da micróglia e dos astrócitos após insulto cerebral. No estágio de repouso, a micróglia constantemente faz uma espécie de “varredura” do parênquima cerebral, monitorando o microambiente cerebral. Os astrócitos participam da barreira hemato-encefálica, atuando como reguladores importantes do balanço entre estabilidade endotelial e permeabilidade dessa barreira. Vários insultos ao cérebro são capazes de provocar a ativação da micróglia e dos astrócitos, que saem do seu estado de repouso, e são responsáveis pela resposta inflamatória à lesão.



Fonte: Adaptado de Hasnish (2007)

O papel dos astrócitos nas crises epiléticas ainda não está totalmente elucidado. No entanto, evidências comprovam que há um excesso de glutamato extracelular em tecido epileptogênico de humanos, possivelmente pela menor captação desse neurotransmissor pelos transportadores no astrócitos (GLASS e DRAGUNOW, 1995). Além disso, os astrócitos são capazes de liberar glutamato sob certas condições patológicas (KANG et al., 2005; FIACCO et al., 2007). De fato, mediadores inflamatórios como a prostaglandina E2, podem estimular a liberação de glutamato dos astrócitos (BEZZI et al.,1998), através de processos dependentes

de íon cálcio, e conseqüentemente causar despolarizações sincrônicas através do receptor N-metil D-aspartato NMDA em neurônios próximos (WETHERINGTON et al., 2008),

Comprovadamente, experimentos utilizando fatias de hipocampo mostraram que os astrócitos podem contribuir para a geração de atividade epileptiforme sendo essas descargas epileptiformes provocadas pela aplicação de bloqueador de canal de potássio (4-aminopiridina) ou antagonistas do receptor de GABAA (ácido gama-aminobutírico-A) (TIAN et al., 2005), agentes amplamente utilizados como modelos de crises convulsivas. Portanto, esses resultados declaram a importância da ativação astrocítica na geração de crises epiléticas.

Como anteriormente citado, a BHE está conjuntamente envolvida na resposta inflamatória do SNC. Nesse sentido, a BHE consiste de células endoteliais estreitamente unidas por “tight junctions” (junções apertadas), e sua manutenção depende do funcionamento normal dos pericitos, micróglia, astrócitos e da membrana basal. Sob condições normais, a BHE protege o SNC pois regula a entrada de substâncias presentes no plasma sanguíneo e células imune (BALLABH e NEDERGAARD, 2004).

No entanto, alterações transitórias tem sido demonstradas na fisiologia e estrutura da BHE em vários lesões do SNC, como infecções, eventos traumáticos e isquêmicos, bem como as crises epiléticas (ZUCKER et al., 1983; BALLABH e NEDERGAARD, 2004). Isto se deve em parte, pelo fato do processo inflamatório instalado no cérebro além de resultar na ativação das células microgliais e astrocíticas, citadas acima no texto, também estimula a “up regulation” (regulação positiva) das moléculas de adesão [(por ex.: molécula de adesão celular vascular (VCAM-1)] (ZHANG, et al 2000).

Essas moléculas de adesão são responsáveis pela estabilização das interações célula-célula e possuem importante papel no recrutamento de leucócitos da corrente sanguínea. Assim, a expressão das moléculas de adesão é induzida nas células endoteliais durante o processo inflamatório por diversos mediadores, incluindo espécies reativas de oxigênio (ABBOTT, 2000; SHLOSBERG et al., 2010; COOK-MILLS et al., 2011), como consequência, há um comprometimento da integridade endotelial da BHE (FABENE et al., 2008; SEWAL et al., 2017). Desse modo, essas moléculas de adesão podem promover a adesão e entrada dos leucócitos vindos do plasma, no espaço perivascular, líquido cerebrospinal e no parênquima cerebral. (PACHTER et al., 2003; LOSSINSKY e SHIVERS, 2004).

Além disso, estudos tem demonstrado que o tecido cortical humano com epilepsia tem quantidades de leucócitos maiores que o córtex saudável, em consonância, a quebra da BHE

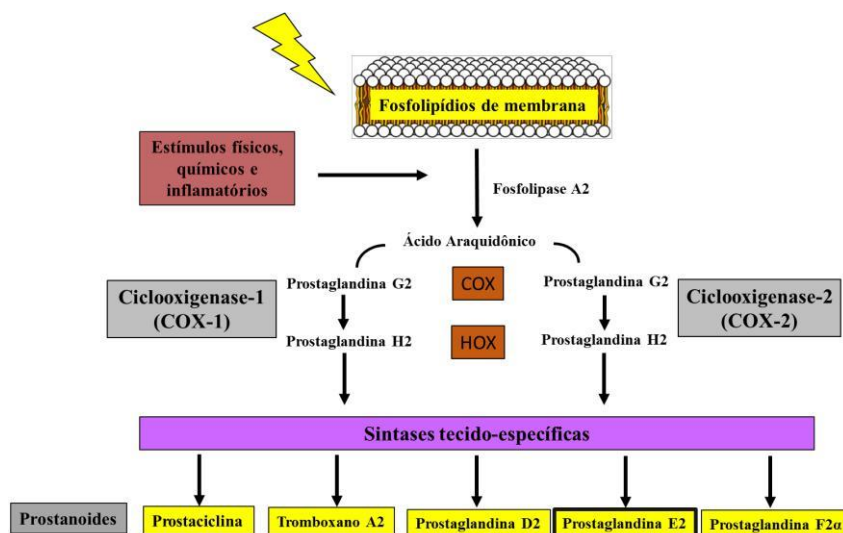
induz atividade epileptiforme (FABENE et al., 2008). De fato, os mecanismos subjacentes não são totalmente elucidados (LOSSINSKY e SHIVERS, 2004). Estes dados em conjunto, indicam uma associação estreita entre inflamação no sistema nervoso central e ocorrência de crises, e que mediadores da inflamação são agentes prováveis desta excitabilidade aumentada.

De fato, algumas vias são propostas e tradicionalmente descritas mais que outras no processo inflamatório que subjaz as crises epilépticas. Dessa maneira, entre as vias inflamatórias mais estudadas devido a sua contribuição para a epileptogênese, está a ciclooxigenase-2 (COX-2) (RAVIZZA et al., 2011).

### 2.3 COX-2 E CRISES EPILÉPTICAS

Ciclooxigenase (COX), também chamada de prostaglandina H2 sintase (PGHS) é a enzima marca-passo na rota metabólica onde o ácido araquidônico é convertido a prostaglandinas. Essa enzima possui dupla atividade catalítica. A atividade ciclooxigenase converte o ácido araquidônico a prostaglandina G2 (PGG2), e a sua atividade peroxidase reduz a PGG2 a prostaglandina H2 (PGH2). De acordo, PGH2 é rapidamente convertida por sintases e isomerases tecido-específicas a um dos cinco prostanoides: tromboxano A2, prostaglandina D2 (PGD2), prostaglandina E2 (PGE2), prostaciclina (PGI2) e prostaglandina F2alfa (PGF2 $\alpha$ ) (ROJAS, 2014) (Figura 2).

Figura 2: Cascata da biossíntese de prostaglandinas e tromboxano A2: Estímulos físicos, químicos e inflamatórios mobilizam o ácido araquidônico da membrana de fosfolípidios, permitindo seu metabolismo pelas ciclooxigenases. Essas enzimas exibem atividade de ciclooxigenases (COX) e hidropoxidases (HOX) e catalisam a reação sequencial até prostaglandina H2. Esta por sua vez, é mobilizada por sintases e isomerases, expressas com especificidade tecidual, gerando seus produtos: prostaciclina, tromboxano A2, prostaglandina D2, prostaglandina E2 e prostaglandina F2 $\alpha$ .



Fonte: Adaptado de FitzGerald (2003).

Existem três isoformas conhecidas da enzima ciclooxigenase: COX-1, COX-2 e COX-3. A isoforma COX-1 é constitutivamente expressa em quase todos os tecidos, sendo intensamente expressa na micróglia e neurônios do córtex e hipocampo no SNC (DEININGER e SCHLUESENER, 1999) e localizada na membrana do retículo endoplasmático e microsomal (KAUFFMAN et al., 1996). Ela é responsável por funções relacionadas com a manutenção da homeostase do organismo, agregação plaquetária, manutenção do tônus da musculatura lisa e proteção da mucosa gástrica (VANE et al., 1998). A COX-3 é considerada uma variante de splice COX-1, apresentando uma estrutura química semelhante, exceto pelo íntron 1, e embora possua RNA mensageiro abundante no córtex cerebral, sua atividade enzimática não foi observada (YAGAMI et al., 2016). A COX-2, assim como a COX-1 é encontrada na membrana do retículo endoplasmático e membrana microsomal, sendo a isoforma cuja expressão é induzida na maioria dos tecidos durante resposta inflamatória, contribuindo para a lesão (VANE et al., 1998).

Interessantemente, ao contrário da maioria dos tecidos, a COX-2 “induzível” é também constitutivamente expressa em várias regiões do cérebro, como o córtex cerebral, hipocampo e amígdala, propriamente no corpo celular e espinhas dendríticas de neurônios excitatórios (glutamatérgicos), onde ocorre a transmissão sináptica (YAMAGATA et al., 1993; KAUFFMAN et al., 1996; TAKEMIYA et al., 2007). No entanto, não foi observada expressão dessa enzima em interneurônios inibitórios no hipocampo (SERRANO et al., 2011).

No SNC, diferentemente da COX-1 que é acoplada preferencialmente com a enzima prostaglandina sintase citosólica (cPGES) para produzir prostaglandina E<sub>2</sub>, a COX-2 exibe co-localização com a enzima prostaglandina sintase microsomal-1 (mPGES-1) (YAMAGATA et al., 2001), além disso, foi observado que tanto a mPGES-1 quanto a COX-2 são induzidas sob estímulos inflamatórios (JAKOBSSON et al., 1999; MURAKAMI et al., 2000). Mais tarde, foi demonstrado que outra mPGES é também acoplada a COX-2, a enzima mPGES-2, no entanto ela não é essencial para a biossíntese de PGE<sub>2</sub> seguido de estímulo inflamatório (BOSETTI et al., 2004; JANIA et al., 2009).

De fato, a COX-2 expressa no cérebro tem um papel pivô relacionado a plasticidade sináptica (KAUFFMAN et al., 1996) e possui seus níveis basais no cérebro regulados pela atividade neuronal, sendo aumentados por estimulação em alta frequência associada a indução de potencialização de longa duração (YAMAGATA et al., 1993).

Nesse contexto, evidências demonstraram que a PGE2 sintetizada no neurônio pós-sináptico é o principal produto produzido pela COX-2, e funciona como um mensageiro retrógrado na transmissão sináptica excitatória, visto que aumenta a probabilidade de liberação de glutamato do neurônio pré-sináptico (SANG et al 2005). Além disso, uma vez produzida, a PGE2 pode interagir com seus receptores transmembrana acoplados a proteína G, são eles: EP1, EP2, EP3 e EP4, que exibem diferenças na transdução de sinal (SUGIMOTO e NARUMIYA, 2007). Nesse sentido, a ativação dos receptores EP2 e EP4 são relacionadas a aumentos de AMPc e possível ativação da enzima proteína cinase dependente de AMPc (PKA), a ativação do receptor EP1 tem sido observado por aumentar a concentração do íon cálcio no meio intracelular e subsequente ativação da proteína cinase (PKC) e o receptor EP3, por sua vez, diminui ou aumenta os níveis de AMPc intracelular, dependendo do seu acoplamento com uma proteína G inibitória ou estimulatória (SUGIMOTO e NARUMIYA, 2007).

Muitos estudos sugerem que a ativação dos receptores de prostaglandina E2 coordenam múltiplas funções no SNC, incluindo a febre, dor, ciclo sono-vigília, comportamento sexual, transmissão sináptica, plasticidade, regulação da excitabilidade neuronal e inflamação (BREYER et al., 2001; CHEN et al., 2002; AMATEAU e MCCARTHY, 2004; HAYAISHI e HUANG, 2004; MURAKAMI e KUDO, 2004; SIMMONS et al., 2004; CHEN e BAZAN, 2005a).

Apesar da importante função fisiológica em manter o controle da excitabilidade neuronal desempenhado pela PGE2 (CHEN e BAZAN, 2005a), seu acúmulo, através do aumento da expressão da COX-2, pode contribuir para a disfunção sináptica e levar a condições patológicas (SANG et al., 2005).

De fato, o papel da ciclooxygenase-2 nas consequências das crises epiléticas e na epilepsia, tem recebido muita atenção desde a descoberta que as crises epiléticas induzem COX-2 nos neurônios hipocámpais dentro de poucas horas (YAMAGATA et al., 1993; MARCHESELLI e BAZAN, 1996), através de uma via envolvendo receptores NMDA (YAMAGATA et al., 1993). De acordo, vários estudos demonstraram a sobreexpressão da enzima COX-2 tanto em pacientes epiléticos quanto em modelos experimentais utilizando camundongos geneticamente suscetíveis a convulsões (OKADA et al., 2001a; DESJARDINS et al., 2003), comprovando ainda mais o papel chave dessa enzima nas crises epiléticas e epilepsia.

Nesse contexto, apesar de resultados conflitantes, vários estudos utilizando antiinflamatórios inibidores seletivos da COX-2 tem mostrado efeito protetor contra crises



epilépticas provocadas por eletrochoque, cainato, pilocarpina e PTZ (BAIK et al., 1999; KIM e JANG, 2006, JUNG et al., 2006, TEMP et al., 2017). De acordo, o antiinflamatório inibidor seletivo da COX-2 (celecoxib) aumentou a latência para convulsões induzidas por pentilenotetrazol (60mg/kg) em ratos, e que esse efeito protetor foi revertido pela injeção intracerebroventricular de PGE2 (10ng/2µl, i.c.v.) (OLIVEIRA et al., 2008). Um estudo do mesmo grupo demonstrou que a PGE2 é capaz de inibir a enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP-ase, que tem função primordial no reestabelecimento do potencial de membrana após despolarizações neuronais (OLIVEIRA et al., 2009). Interessantemente, a PGE2 também pode modular a liberação de glutamato nos astrócitos, de modo cálcio-dependente (BEZZI et al., 1998), e a inibição da COX-2 é capaz de prevenir esse efeito (CALI et al., 2014).

Nesse sentido, esses resultados corroboram com a ideia de que a superexpressão da COX-2 e consequente aumento da produção de PGE2 induzidas por estímulos patológicos, como as crises epilépticas, podem estar fortemente relacionadas com o aumento da excitabilidade neuronal apresentada nessas condições.

Assim, os mecanismos pelos quais a PGE2 produzida pela COX-2 pode estar influenciando o surgimento e a manutenção das crises epilépticas são de extrema valia ser estudados. Nesse contexto, modelos animais de crises convulsivas e epilepsia têm desempenhado um papel fundamental no avanço da compreensão dos mecanismos subjacentes à epileptogênese e são considerados instrumentos na descoberta e desenvolvimento pré-clínico de novos fármacos anticonvulsivantes (LOSCHER, 2011).

#### 2.4 PENTILENOTETRAZOL (PTZ)

A descoberta de novos fármacos antiepilépticos exige a seleção de compostos, modelos animais mais fáceis de executar, tempo e custo-eficiente, e deve ser preditiva de atividade clínica. Essas características explicam o porquê do modelo de indução de crise convulsiva por PTZ, desenvolvido há mais de sessenta anos, ainda ser um dos modelos mais utilizados, amplamente empregado na busca de novos fármacos (BIALER e WHITE, 2010).

Além do seu alto valor preditivo, uma vantagem do uso do modelo de crises convulsivas por PTZ, é o fato que este pode ser utilizado como modelo de crise generalizada dos tipos ausência, crises mioclônicas e tônico-clônicas (OLIVEIRA et al., 2001), sendo também utilizado em modelos de limiares, para determinar o efeito de uma substância sobre o limiar de crise convulsiva de animais, em termos de susceptibilidade a essas crises. O efeito dessa droga pode ser anticonvulsivo, aumentando o limiar da crise, ou pró-convulsivante, fazendo exatamente o oposto (LOSCHER e SCHMIDT, 1988).

Neste contexto, o PTZ é um derivado tetrazol com atividade convulsivante, sendo utilizado tanto em modelos experimentais agudos quanto crônicos (LOSCHER, 2009). Existe grande variabilidade no que diz respeito as doses de PTZ administradas nos modelos animais de crises epiléticas. Quando o objetivo é testar a susceptibilidade dos animais a crises convulsivas, doses baixas (subconvulsivantes), de 20 a 40 mg/kg, de PTZ são administradas intraperitonealmente, enquanto doses maiores podem resultar em crises clônicas, tônicas e tônico-clônicas (O. C SNEAD, 1998). Além disso, quando o objetivo é induzir crises epiléticas repetidas como no modelo do *abrasamento químico* (do inglês, chemical kindling), doses subconvulsivantes repetidas são administradas, em diferentes intervalos de tempo como de 24 em 24 ou de 48 em 48 horas. O tratamento varia de 2 a 8 semanas ( PAVLOVA et al., 2006; PEDLEY, 2008).

Farmacologicamente, o PTZ atua como antagonista não-competitivo do receptor GABA<sub>A</sub> (ácido gama-aminobutírico), um receptor ionotrópico permeável ao íon cloreto, cuja ativação provoca hiperpolarização localizada na membrana neuronal que torna o neurônio refratário a estímulos despolarizantes (LOSCHER, 1998). Comprovadamente, fármacos utilizados clinicamente como etossuximida, trimetadiona e valproato, assim como os benzodiazepínicos, foram identificados com atividade anticonvulsivante a partir de estudos utilizando PTZ (LOSCHER e SCHMIDT, 1988; LOSCHER, 2002).

Nesse contexto, é bem descrito que as crises epiléticas são controladas com sucesso com drogas antiepiléticas em aproximadamente dois terços dos indivíduos com epilepsia, porém, isso resulta em um terço de pacientes refratários aos tratamentos atualmente disponíveis (LAXER et al., 2014). Para estes pacientes com crises não controladas, a taxa de mortalidade é de 2 a 3 vezes superior à da população geral (GAITATZIS e SANDER, 2004). Dessa forma, é extremamente importante a concepção de terapêuticas eficazes para controlar as crises epiléticas e/ou que apresente caráter modificador da doença. Portanto, pesquisas sobre novos medicamentos com potencial anticonvulsivante podem contribuir para melhorar o tratamento e a qualidade de vida de pacientes com epilepsia.

## 2.5 PLANTAS MEDICINAIS

Sob perspectiva histórica, há registros do uso de plantas em manuscritos suméricos desde 5000 anos a.C (RASKIN E RIPOLL 2004). De acordo, a utilização de produtos naturais, principalmente de plantas com propriedades farmacológicas é uma forma tradicional de tratamento no mundo todo (DUTRA et al., 2016). Utiliza-se plantas ou partes das mesmas, contendo substâncias ativas, capazes de preservar, modular ou ativar processos fisiológicos,

com aplicação na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças (DUTRA et al., 2016; ZUNIC e DOBRACA, 2017).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, estimado entre 20–22% de todas as espécies conhecidas. No entanto, apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e o mercado de fitoterápicos representa menos de 5% do mercado de medicamentos no Brasil (DUTRA et al., 2016). Estes dados demonstram claramente a necessidade de investimentos em pesquisa de fitoterápicos pertencentes às espécies da flora brasileira (CARVALHO et al., 2008; MIOTO, 2010), principalmente no que se refere a pesquisas utilizando esses produtos de origem vegetal com propósito controlador de crises epiléticas, devido a alarmante refratariedade apresentada por pacientes epiléticos aos fármacos antiepiléticos existentes (LAXER et al., 2014).

## 2.6 FLAVONOIDES E CRISES EPILÉTICAS

Os flavonoides representam uma classe de constituintes naturais que são amplamente distribuído em plantas com diversas propriedades farmacológicas, incluindo propriedades anticonvulsivas. Desse modo, diversos estudos tem comprovado essa afirmação. A apigenina, por exemplo, é um flavonoide que mostrou efeito anticonvulsivo em modelo de crises convulsivas induzidas por picrotoxina (AVALLONE et al., 2000) da mesma forma, wogonina foi capaz de bloquear as crises convulsivas, em ambos modelos, de PTZ e eletrochoque (PARK et al., 2007). Ainda, os flavonoides linarina, acacetina e galotanina também mostraram serem capazes de exercer atividade anticonvulsivante (SUGAYA et al., 1991; NUGROHO et al., 2013).

Corroborando com esses resultados, um estudo mostrou que o flavonoide fisetina possui efeito anticonvulsivante tanto em modelo crônico, demonstrado através da redução de crises epiléticas induzidas por kindling elétrico, quanto em modelos agudos induzidos por PTZ e estriçnina, sendo esses efeitos atribuídos à proteção do nível endógeno de enzimas, ao aumento nos níveis do neurotransmissor GABA no cérebro e também à diminuição do dano oxidativo (RAYGUDE et al., 2012). Além desses compostos, vários glicosídeos flavonoides tem demonstrado efeitos anticonvulsivantes. Como exemplo, a baicalina possui potente atividade anticonvulsivante e efeitos neuroprotetores frente aos status epilético induzido por pilocarpina em ratos (LIU et al., 2012).

De acordo com a literatura, compostos flavonoides interagem com o sítio de ligação benzodiazepínico dos receptores GABAA e, assim, modulam o fluxo de cloreto através do

canal de cloreto que é formado pelo complexo receptor GABAA (ROBERTS et al., 2012). Em linha, um estudo demonstrou que o flavonoide vitexina teve efeito anticonvulsivante no modelo de crises convulsivas induzidas por PTZ, provavelmente através da sua ligação no sítio benzodiazepínico do receptor GABAA (ABBASI et al., 2012). Além disso, Medina et al (1990) encontrou que o flavonoide denominado crisina foi capaz de prevenir das crises convulsivas tonico-clônicas induzidas por PTZ, e esse efeito central também foi mediado por receptores benzodiazepínicos.

Da mesma forma, o flavonoide rutina demonstrou efeito anticonvulsivante frente ao PTZ, porém seu efeito foi abolido pelo pré-tratamento com flumazenil, um antagonista benzodiazepínico a nível central, revelando que o sítio benzodiazepínico do receptor GABAA também pode ser o alvo desse flavonoide (NASSIRI-ASL et al., 2008). Portanto, os estudos de compostos flavonoides são extremamente bem-vindos, no que diz respeito à pesquisa de sua possível atividade anticonvulsiva.

## 2.7 GALANGINA

Considerando que produtos de origem natural podem desempenhar um papel importante na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, a espécie *Piper Aleyreanum* tem sido estudada. Esta planta é um membro pertencente a família Piperaceae, é uma pequena árvore que é amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais, sendo localizada em comunidades do sudeste da região Amazônica. Ela é popularmente conhecida como: Pimenta-de-cobra, Pimenta-longa-da Mata, “pani-nixpu” “João-Brandinho”, (FACUNDO e MORAIS, 2003). Além disso, essa planta é comumente utilizada como imunomodulador, analgésico e anti-inflamatório pela medicina popular (LIMA et al., 2012).

Supreendentemente, até o ano de 2012 não existiam estudos acerca das propriedades farmacológicas dessa planta. Dessa forma, um estudo utilizando o óleo essencial obtido das folhas da *Piper Aleyreanum* demonstrou que a planta possui efeito antinociceptivo sobre a dor induzida por formalina em camundongos, modelo clássico de nocicepção química. Importante salientar que o óleo essencial foi antinociceptivo tanto na fase neurogênica (primeira fase) quanto na resposta inflamatória (fase tardia) causadas pela injeção de formalina (LIMA et al, 2012). Ainda, o mesmo estudo também observou que o óleo da planta resultou em efeito anti-inflamatório contra a inflamação pleural induzida por carragenina. A resposta pleural neste modelo provoca a liberação de mediadores químicos como histamina, bradicinina, substância P e prostaglandinas, que é seguida de exsudação e infiltração de leucócitos no local inflamatório (MENEGAZZI et al., 2008; TOMLINSON et al., 1994; SALEH et al., 1997).

Esses resultados sugerem que a planta tem um papel crítico no controle de eventos inflamatórios agudos (LIMA et al., 2012).

Nesse sentido, a substância Galangina (3,5,7-trihidroxi-flavone) foi isolada do extrato etanólico das folhas da planta *Piper Aleyreanum* e apresentou teste positivo para flavonoides. Neste contexto, galangina, além de possuir propriedades antioxidantes, também vem demonstrando ter potente efeito anti-inflamatório (RASO et al., 2001; HONMORE et al., 2016). De fato, o flavonoide galangina inibiu acentuadamente a produção de prostaglandina E2 e óxido nítrico induzidos por tratamento de lipopolissacarídeo (LPS). Além disso, esse flavonoide também inibiu a expressão da enzima COX-2 (O'LEARY et al., 2004) e da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), ambas induzidas por LPS, sendo este mecanismo sugerido ser responsável pelo efeito anti-inflamatório apresentado pelo composto (RASO et al., 2001). Essa suspeita foi confirmada por Honmore et al. (2016), onde o estudo de “docking” (encaixe) molecular revelou que esse composto tem afinidade com o sítio ativo da COX-2, podendo ser explorado como inibidor seletivo de COX-2 e tratar doenças envolvendo condições inflamatórias.

Além disso, galangina (30mg/kg i.p.) demonstrou efeito protetor em modelos de nocicepção com componentes inflamatórios envolvidos, tal como nocicepção induzida por formalina, glutamato e prostaglandina E2 (LIMA, 2012). Nessa perspectiva, é bem descrito na literatura que diversos fármacos antiepilépticos são potencialmente utilizados no controle da dor, principalmente da dor neuropática devido à similaridade de mecanismos envolvendo ambas doenças (MENDLIK e URITSKY, 2015).

Como descrito anteriormente, diversas evidências comprovam o efeito anticonvulsivante de vários compostos flavonoides, muitos em modelos utilizando PTZ (TAIWE et al., 2016b; CITRARO et al., 2016; ADEOLUWA et al., 2016a), corroborando a importância de testar a atividade anticonvulsivante do composto Galangina. Diante desses dados, e frente ao fato de que a inflamação está associada a fisiopatologia das crises epiléticas, a presente dissertação foi realizada com o intuito de investigar se a prostaglandina E2 é capaz de potencializar o efeito de uma dose subefetiva de PTZ, gerando crises convulsivas e subsequentemente examinar se Galangina, flavonoide com atividade antinociceptiva e anti-inflamatória descritas, demonstra efeito anticonvulsivante neste modelo em camundongos.

---

**3 OBJETIVOS**

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta dissertação é avaliar se a injeção de prostaglandina E2 aumenta a susceptibilidade às crises convulsivas induzidas por dose subfética de PTZ, e posteriormente investigar se o flavonoide galangina possui atividade anticonvulsivante nesse modelo em camundongos Swiss machos.

#### 3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- a) Determinar se a administração aguda de prostaglandina E2 anteriormente ao PTZ pode alterar a latência para crise mioclônica e tonico-clônica generalizada, bem como duração das crises e a amplitude de ondas eletroencefalográficas;
  - b) Avaliar se administração aguda de prostaglandina E2 previamente ao PTZ é capaz de causar ativação das células microgliais, bem como dos astrócitos;
  - c) Investigar se a administração aguda de prostaglandina E2 anteriormente ao PTZ aumenta a produção de espécies reativas e o imunoconteúdo da molécula de adesão celular vascular (VCAM-1);
  - d) Avaliar se o efeito da administração aguda de prostaglandina E2, previamente ao PTZ, pode modular o imunoconteúdo dos receptores de prostaglandina E2, bem como, pelo estado de fosforilação das enzimas envolvidas nessas vias;
  - e) Verificar se o flavonoide galangina exerce efeito anticonvulsivante neste protocolo, através da análise das latências para crise mioclônica e tonico-clônica generalizada, duração das crises generalizadas, bem como análises eletroencefalográficas;
  - f) Determinar se o composto galangina é capaz de proteger das alterações neuroquímicas induzidas por prostaglandina E2 administrada previamente ao PTZ.
-





**Galangin prevents the increase of susceptibility to pentylenetetrazol-induced seizures by prostaglandin E2-stimulated**

Viviane Nogueira de Zorzi<sup>a,b,c</sup>, Fernanda Haupenthal<sup>a,b</sup>, Alexandra Seide Cardoso<sup>a,b</sup>, Gustavo Cassol<sup>b</sup>, Valdir A. Facundo<sup>d</sup>, Laudir J. Bálico<sup>d</sup>, Daniella K.S. Lima<sup>d,e</sup>, Adair Roberto Soares Santos<sup>e</sup>, Ana Flavia Furian<sup>f</sup>, Mauro Schneider Oliveira<sup>f</sup>, Luiz Fernando Freire Royes<sup>b,c</sup>, Michele Rechia Fighera<sup>a,b,c\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Neuropsiquiatria, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratório de Bioquímica do Exercício, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>c</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

<sup>d</sup> Departamento de Química, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil

<sup>e</sup> Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>f</sup> Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

Work supported by CNPq, CAPES

\*Corresponding author: Dr<sup>a</sup>. Michele Rechia Fighera  
Centro de Ciências da Saúde  
Departamento de Neuropsiquiatria  
Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900  
Santa Maria, RS, Brasil  
FAX: 55 55 3220 8018  
e-mail: [mrfighera@yahoo.com.br](mailto:mrfighera@yahoo.com.br)

## Abstract

Epilepsy is one of the most common chronic neurological diseases, characterized by recurrent epileptic seizures, where one-third of patients are refractory to existing treatments. Evidences have revealed association between neuroinflammation and increased susceptibility to seizures since there is a pronounced increase in the expression of key inflammatory mediators, such as prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) during seizures. The purpose of the present study was to investigate whether PGE<sub>2</sub> increases the susceptibility to seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ). Subsequently, we evaluate whether a flavonoid isolated from the *Piper aleyreanum* plant (Galangin) could have anticonvulsive effect in this study. Our results showed that the group treated with PGE<sub>2</sub> increased the susceptibility to PTZ, causing myoclonic and generalized seizures, increasing the seizures duration and electroencephalographic wave amplitude. Furthermore, statistical analyzes showed that the treatment with PGE<sub>2</sub> and PTZ increased IBA-1 (microglial marker), GFAP (astrocytic marker), 4-HNE (lipid peroxidation marker), VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) and p-PKAI $\alpha$  (phosphorylated cAMP-dependent protein kinase) immunocontents. Indeed, galangin prevented the behavioral and electroencephalographic seizure, reactive species production, microglial and astrocytic activation as well as decreased VCAM-1 immunocontent and phosphorylation of PKAI $\alpha$  induced by PGE<sub>2</sub>/PTZ. Then, this study suggests that galangin presented anticonvulsive and anti-inflammatory activities against the behavioral and neurochemical changes induced by administration of PGE<sub>2</sub> and PTZ. However, further studies are needed to investigate the clinical implications of these findings and their underlying mechanisms.

**Keywords:** neuroinflammation, prostaglandin E<sub>2</sub>, seizures, pentylenetetrazol, galangin, cerebral cortex

## Introduction

There are approximately 70 million people with epilepsy in the world, approximately 80% living in developing countries [1]. The epilepsy is a chronic neurological disease characterized by a persistent predisposition to epileptic seizures [2] and is frequently associated with neuronal damage, synaptic reorganization, and mesial temporal sclerosis [3]. The abnormal regulation of glial functions may cause seizures and consequently epileptogenesis [4]. Glial abnormalities, such as activated astrocytes and microglia are most likely to induce epileptic foci in the brain [5]. According, inflammatory processes including microglial and astrocytic activation, production of cytokines proinflammatory, prostaglandins and increased adhesion molecules expression have been described in epilepsy patients and in experimental models [6, 7, 8, 9, 10, 11]. These impairing conditions are closely related to increased susceptibility to seizures [12].

Indeed, study showed that administration of LPS increased seizure susceptibility PTZ-induced and also cytokines and adhesion molecules levels after seizures, in both serum and brain samples in LPS treated rats, these results were attributed to increased permeability of the blood-brain barrier caused by LPS [13]. Another evidence of seizures and inflammation interaction comes from febrile seizures, which can be caused by an increase in proinflammatory markers [14].

In this line of view, among major inflammatory pathways studied so far for a possible contribution to epileptogenesis is the cyclooxygenase-2 (COX-2) [15]. The enzyme cyclooxygenase (COX) is rate-limiting step enzyme in the metabolic pathway where arachidonic acid is converted to prostaglandins, being PGE<sub>2</sub> its main product. The COX enzyme exists in two homologous isoforms: COX-1, which is constitutively expressed and mediates physiological responses and COX-2, which is inducible and also constitutively expressed in the central nervous system [16]. In relation to COX-2, it is located in dendrites of excitatory neurons in cerebral cortex and hippocampus [17,18], where PGE<sub>2</sub> production is responsible for the regulation of neuronal excitability [19]. Once produced by COX-2, the PGE<sub>2</sub> interacts with G-protein coupled receptors, which exhibits differences in signal transduction [20]. However, despite the important role of PGE<sub>2</sub> on the control of neuronal excitability, scarcely is known about its function during seizures.

Therefore, it is appropriate to propose that a COX-2 overexpression, as demonstrated in epileptic patients and experimental models [21,22] could raise PGE<sub>2</sub> levels and contribute

to the appearance and/or increase in the crises number [23]. Agreement, study showed that the anti-inflammatory celecoxib (selective COX-2 inhibitor) increased latency to seizures PTZ-induced in rats, and this protective effect was reversed by administration of PGE<sub>2</sub> [10 ng/2  $\mu$ l, intracerebroventricular (i.c.v.)] [24]. These results corroborate the idea that inflammatory mediators such as PGE<sub>2</sub> can be increased under pathological stimuli and be closely related to neuronal excitability.

Considering that anticonvulsive therapy promotes seizure control in about 70% of patients [25], a significant number of individuals remain refractory to antiepileptic drugs. Therefore, research about new drugs with anticonvulsant potential could contribute to improve the treatment and life quality of epilepsy patients. Thus, natural origin products may play an important role in discovery and development of new antiepileptic drugs [26]. In this context, the specie *Piper Aleyreanum* has been studied. This plant is a member of the Piperaceae family, located in the southeast of the Amazon region. It is popularly known as “João-Brandinho”, long pepper and/or snake pepper [27] common used as immunomodulator, analgesic and anti-inflammatory by folk medicine [28]. The flavonoid galangin (3,5,7-trihydroxyflavone) was isolated from leaves of *Piper alyreanum*. Indeed, studies have shown that Galangin exhibited anti-inflammatory and in-vitro antioxidant activity [29, 30, 31] and the molecular docking study revealed that these compound have affinity towards COX-2 active site [31]. Moreover, galangin demonstrated protective effects in models of nociception with inflammatory components involved, such as nociception induced by PGE<sub>2</sub> and glutamate [32]. In this line, it is well known that several antiepileptic drugs are potentially used in pain control due to similarity of mechanisms involving both diseases [33]. According, there are some evidences about anticonvulsant effect of several flavonoid compounds [34, 35, 36], corroborating the importance of testing the anticonvulsant activity of the galangin. Thus, the aim of the present study is to investigate whether PGE<sub>2</sub> is able to potentiate the effect of a subeffective dose of PTZ, generating seizures and subsequently to examine whether the flavonoid galangin demonstrate anticonvulsive effects in this animal model.

## **Experimental Procedures**

### **Animals and Reagents**

Adult male Swiss mice (25–30 g) were housed ten to a cage, maintained under controlled light and environment (12:12 h light-dark cycle, 24  $\pm$  1  $^{\circ}$ C, 55% relative humidity) and received food and water *ad libitum*. The “Principles of Laboratory Animal Care” (NIH

publication no. 80-23, revised 1996) were followed in all experiments and the experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil and are registered under number 5042310115. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Prostaglandin E<sub>2</sub> and pentylenetetrazol were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) and was dissolved in PBS (pH 7.4) and 0.9 % NaCl, respectively. The flavonoid galangin (3,5,7-trihydroxyflavone, Figure 1) was isolated from the leaves of the ethanolic extract of *Piper alyreanum* by the Department of Organic Chemistry (Universidade Federal de Rondônia, Brazil) and structurally characterized by analysis of <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR (1D and 2D) and mass spectral data as previously described (Facundo et al., 2012). Galangin was dissolved in 0.9 % NaCl plus Tween 80, and the final concentration of Tween 80 did not exceed 5% and did not cause any effect *per se*.

### **Study Design**

Experiment 1: in order to determine the role of prostaglandin E<sub>2</sub> on behavioral, electrographic, and neurochemical alterations in cerebral cortex of mice prior to sub convulsive dose of PTZ (35 mg/kg, i.p). Three days after the surgical procedure to implant the cannula and electrodes for electroencephalographic analysis, the mice were injected with prostaglandin E<sub>2</sub> [100 ng/2µl, intracerebroventricular (i.c.v.) [24] or their vehicle (PBS), 15 minutes after, they were injected with a subconvulsive dose of PTZ (35 mg/kg, i.p) or vehicle (0.9 % NaCl) [37] and behavioral analyzes were taken during 20 minutes in this model of seizure [38].

Experiment 2: To evaluate whether the flavonoid compound could demonstrate neuroprotective effect against the protocol described in Experiment 1. Three days after the surgical procedure, the mice were injected with the flavonoid galangin (30 mg/kg, i.p.) or vehicle (0.9 % NaCl) and 15 minutes after, they were injected with PGE<sub>2</sub> (100 ng/2µl i.c.v.) or vehicle (PBS). Fifteen minutes after, the animals were injected with PTZ (35 mg/kg, i.p) or vehicle (0.9 % NaCl) and behavioral analyzes were taken during 20 minutes. As soon, the animals were euthanized and cerebral cortex removed for neurochemical analyses. The dose of the flavonoid galangin used was selected based on previous results from our laboratory [32].

### **Placement of cannula**

Mice were anesthetized with ketamine (100 mg/kg, i.p.) and xylazine (30 mg/kg, i.p.) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under stereotaxic guidance, a cannula was inserted into the right lateral ventricle (coordinates relative to bregma: AP 0 mm, ML 0.9 mm, V 1.8 mm from the dura). After a recovery period of three days, animals received intracerebroventricular injection of PBS or PGE<sub>2</sub> (100ng/2 $\mu$ L). All intracerebroventricular injections were performed by using a needle (30 gauge) protruding 1 mm below a guide cannula. All drugs were injected over 1-min period by using a Hamilton syringe, and an additional minute was allowed to elapse before removal of needle to avoid backflow of drug through the cannula.

### **Placement of electrodes and EEG recordings**

To determine whether the treatments used alter the amplitude of brain waves, the animals was anesthetized with ketamine (100 mg/kg; i.p.) and xylazine (30 mg/kg; i.p.) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under stereotaxic guidance, a cannula and a set of electrodes were implanted for the purpose of EEG recording. The guide cannula was glued to a multipin socket and inserted into the right ventricle through a previously opened skull orifice. Two screw electrodes were placed over the right (ipsilateral) and left (contralateral) parietal cortices (coordinates in mm: AP 4.5, L 2.5) along with a ground lead positioned over the nasal sinus. The electrodes were connected to a multipin socket and fixed to the skull with dental acrylic cement.

The procedures for EEG recording were carried out as previously described [39]. Briefly, the animals were allowed to habituate to a Plexiglas cage (25cm x 25cm x 60cm) for at least 30 min before the EEG recordings. Animals were subsequently connected to the lead socket that resides inside a Faraday's cage. The mice was then connected to a 100x headstage pre-amplifier (model #8202-DSE3) in a low-torque swivel (Pinnacle Technology Inc, Lawrence, KS, USA) and the EEG was recorded using a PowerLab 16/30 data acquisition system (AD Instruments, Castle Hill, Australia). EEG signals were amplified, filtered (0.1 to 50.0 Hz, bandpass), digitalized (sampling rate 1024 Hz) and stored in a PC for off-line analysis. EEG recordings were analyzed off-line using LabChart 7.2 software (AD Instruments). Wave amplitude were automatically calculated using the native LabChart function (Average cyclic height).

### **Drug administration protocol and seizure evaluation**

To assess whether prostaglandin E<sub>2</sub> would facilitate convulsive behavior prior to PTZ and whether the flavonoid galangin would be able to exert neuroprotection, the animals were treated with galangin (30 mg/kg, i.p.) or its vehicle (0.9 % NaCl, i.p.). Then, 15 minutes after the mice were injected with prostaglandin E<sub>2</sub> (100 ng/2  $\mu$ l, i.c.v.) or PBS and 15 minutes later with PTZ (35 mg/kg, i.p.). The presence of seizures was monitored in all animals by electroencephalographic recordings. A 10-min baseline recording was obtained to establish an adequate control period. After this baseline recording, the animals were observed for the appearance of convulsive behavior, defined by the occurrence of myoclonic jerks and clonic movements involving hindlimbs and forelimbs contralateral to the injected site. In addition the animals were observed for appearance of generalized tonic–clonic convulsive episodes [38] characterized by whole-body clonus involving all four limbs and tail followed by sudden loss of upright posture and autonomic signs, such hyper-salivation and defecation respectively. The onset time for the first convulsive episode (characterized by appearance of myoclonic jerks and clonic movements) and the sum of the duration of all convulsions presented by mice during the behavioral evaluation period (total time spent convulsing) was recorded using a stopwatch. The EEG recordings were visually examined for seizure activity, as defined by the occurrence of the following alterations in the recording leads [40]: isolated sharp waves ( $\geq 1.5$  x baseline); multiple sharp waves ( $\geq 2$  x baseline) in brief spindle episodes ( $\geq 1$  s and  $\leq 5$  s); multiple sharp waves ( $\geq 2$  x baseline) in long spindle episodes ( $\geq 5$  s); spikes ( $\geq 2$ x baseline) plus slow waves; multispikes ( $\geq 2$ x baseline,  $\geq 3$  spikes/complex) plus slow waves; and major seizure (repetitive spikes plus slow waves obliterating background rhythm,  $\geq 5$  s). The modified Racine behavioral scale was used to classify the epileptic behavioral response (1 = twitching, freezing, 2 = myoclonic jerks of one forelimb; 3 = bilateral forelimb clonus; 4 = forelimb clonus with rearing; 5 = tonic–clonic convulsion) [41, 42].

### **Western Blot**

Western blot analysis was performed according to [43] with some modifications. Samples of cerebral cortex were lysed on ice in RIPA (radio-immunoprecipitation assay) and centrifuged for 20 min at  $12.700 \times g$  and  $4^\circ C$ . The protein concentration of each sample was determined by the bicinchoninic acid protein assay (Termo Fisher Scientific). Samples (20  $\mu$ g protein) were then subjected to an 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to a nitrocellulose membrane using Trans-Blot® Turbo™ Transfer System and equal protein loading was confirmed by Ponceau S staining. After specific blocking, the blots were incubated overnight at  $4^\circ C$  with rabbit anti-Iba-1 (ionized calcium binding adapter

molecule 1) (1:400; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-GFAP (glial fibrillary acidic protein) (1:1000; Dako), rabbit anti-EP1 (E-prostanoid 1)(1:100 ;Abcam), rabbit anti EP2 (E-prostanoid 2) (1:5000 ;Abcam), rabbit anti-EP3 (E-prostanoid 3) (1:3000 ;Abcam), goat anti-phospho-PKC $\alpha$  (phosphorylated protein kinase C) (1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-PKC $\alpha$  (protein kinase C) (1:5000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-phospho-PKA RII $\alpha$  (phosphorylated cAMP-dependent protein kinase) (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-total-PKA RII $\alpha$  (cAMP-dependent protein kinase) (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA ), mouse anti-4-HNE (4-hydroxynonenal) (1:1000; Abcam), rabbit VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). Rabbit anti-GAPDH (1:5000, Cell-Signaling) was stained as additional control of the protein loading. After primary antibody incubation, membranes were washed with TBS-T (TBS plus 0.1% Tween 20) three time at room temperature for 15 min and incubated with anti-rabbit (Sigma Aldrich – A6154) or anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology – sc2005) secondary antibodies conjugated with horseradish peroxidase (1:5000 for anti-Iba-1, anti-4-HNE, anti-VCAM-1, anti-phospho-PKC $\alpha$ , anti-phospho-PKA RII $\alpha$  and 1:10.000 anti-GFAP, anti-PKC $\alpha$  and anti-PKAII $\alpha$  reg for 2h at room temperature. Bands were visualized by enhanced chemiluminescence using ECL Western Blotting Substrate (Pierce ECL, BioRad) and the signals were captured with fotodocumentador ChemiDoc XRS+ (BioRad). Then the bands were quantified by using Image Lab software (Bio-Rad). Values are expressed as a percentage of the control and the phosphorylation ratio was calculated as the relative amount of phosphorylated and non-phosphorylated forms of PKC and PKA.

### **Statistical analysis**

Statistical analysis was carried out by three-way and two-way analysis of variance (ANOVA) and only F-values of  $P < 0.05$  are presented. Post hoc analysis was carried out by the Duncan test for three-way and Tukey test for two-way, when appropriate. Behavioral results are expressed in median and inter-quartile interval and the others results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical analyses were performed utilizing the SPSS 20 software in a PC-compatible computer.