

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

Fernanda Kulinski Mello

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO RECEPTOR PARA TROMBOXANOS (TP)
DURANTE A EPILEPTOGÊNESE**

Santa Maria, RS
2020

Fernanda Kulinski Mello

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO RECEPTOR PARA TROMBOXANOS (TP) DURANTE
A EPILEPTOGÊNESE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neurofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira

Santa Maria, RS
2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Mello, Fernanda Kulinski
Avaliação do papel do receptor para tromboxanos (TP)
durante a epileptogênese / Fernanda Kulinski Mello.-
2020.
43 p. ; 30 cm

Orientador: Mauro Schneider Oliveira
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2020

1. Epilepsia 2. Inflamação 3. Epileptogênese I.
Oliveira, Mauro Schneider II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica de UPM. Dados fornecidos pelo autor(s). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CNS 10/1728.

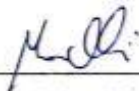
Declaro, FERNANDA KULINSKI MELLO, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Fernanda Kulinski Mello

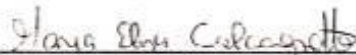
**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO RECEPTOR PARA TROMBOXANOS (TP)
DURANTE A EPILEPTOGÊNESE**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neurofarmacologia e Imunofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia.**

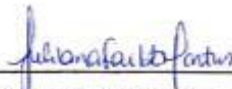
Aprovada em 05 de março de 2020:



Mauro Schneider Oliveira, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Maria Elisa Calcagnotto, Dra. (UFRGS) (Videoconferência)



Juliãna Saibt Martins, Dra. (UFN)

Santa Maria, RS
2020

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família.

Dedico aos meus pais;

Dedico aos meus irmãos;

Dedico aos meus avós;

AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas me ajudaram a chegar até aqui, algumas caminharam ao meu lado todos os dias, outras mesmo longe se mantiveram presentes. Durante todo o esse trabalho eu fui inspirada, apoiada e encorajada por essas pessoas e isso fez toda a diferença nessa caminhada, de modo que só tenho a agradecer.

Primeiramente à Deus por estar sempre ao meu lado.

À minha família, meu pai Guedes, minha mãe Janice e meus irmãos Filipe e Marcelo pelo incentivo, amor e apoio incondicional que me fizeram ser quem sou.

Ao Professor Mauro, um exemplo de profissional, agradeço a oportunidade e dedicação. Pelo incentivo ao trabalho em equipe, a busca pelo conhecimento e por toda a confiança depositada em mim.

Aos colegas que já passaram pelo LabNeuro por todo o auxílio durante os últimos 5 anos, pela amizade e os risos que tornam cada dia mais divertido. Em especial, à Mayara por todos os ensinamentos, pelos conselhos, pelas conversas filosóficas e companheirismo, esse trabalho não seria possível sem a tua ajuda, muito obrigada! À Clarissa e à Jéssica por todo o conhecimento compartilhado e por tornarem as longas tardes de comportamento mais leves. Às Alemoas e ao Samurai pela amizade, os risos e por tudo que me ensinaram.

Agradeço às gurias do LabNeuro que estiveram comigo durante esse trabalho, compartilhando risadas, comidas, angústias e o mérito, porque esse trabalho não é só meu. Agradeço à Bruna, que me acompanha desde a época de Iniciação Científica e que é a única pessoa mentalmente equilibrada desse laboratório. À Miche por estar sempre disposta a ajudar e por ser ótima nos enjambres dos equipamentos. À Kari por ser tão gentil e calma, por sempre ter uma palavra amiga e por sempre fazer mate quando chega no lab. Vocês são incríveis e eu não teria conseguido sem a ajuda e amizade de vocês! Obrigada!

Aos guris do BIOEX e às gurias do LAFARMT, em especial à Nai por toda a amizade desde a graduação. Vocês me ensinaram muito, obrigada pela amizade e parceria!

Aos funcionários do departamento, em especial à Zeli por toda a ajuda principalmente na reta final da defesa.

Aos professores do departamento por todos os ensinamentos compartilhados.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade e por oferecer ensino de qualidade e por ser minha segunda casa durante todos esses anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pela bolsa concedida.

A todos que de alguma forma contribuíram para a minha trajetória e que me fizeram acreditar que é possível!

Muito obrigada!

*Ninguém caminha sem aprender a caminhar,
sem aprender a fazer o caminho caminhando,
refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar.*

Paulo Freire

RESUMO

AVALIAÇÃO DO PAPEL DO RECEPTOR PARA TROMBOXANOS (TP) DURANTE A EPILEPTOGÊNESE

AUTOR: Fernanda Kulinski Mello
ORIENTADOR: Mauro Schneider Oliveira

O *status epilepticus* convulsivo (SE) é uma condição de emergência médica que pode levar a ao desenvolvimento de epilepsia, danos cerebrais permanentes e morte. Sabe-se que existe uma forte ligação entre epilepsia e inflamação. Por exemplo, foi demonstrado que pacientes epiléticos possuem maior conteúdo cerebral de tromboxano A₂ (TXA₂) quando comparados à indivíduos saudáveis. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o papel do receptor TP, através do uso do seu antagonista (SQ 29,548) após o SE, através de análises comportamentais, histológicas e bioquímicas. Camundongos C57BL/6 machos foram submetidos ao protocolo de indução do SE pelo método da pilocarpina. Após 90 min e 24h do fim do SE os animais receberam duas doses do antagonista SQ 29,548 ou veículo por via intracerebroventricular (2 uL ou 26 nmol/dose) e foram avaliados quanto a função neuromotora por meio do teste de neuroscore. A astrocitose e morte neuronal foram avaliadas pela marcação imunohistoquímica de GFAP e coloração de Fluoro Jade C, respectivamente. A análise estatística mostrou a presença de dois grupos distintos, responsivos e não responsivos ao antagonista TP. Os animais responsivos tiveram um desempenho melhor no teste do neuroscore, menos células positivas para Fluoro-Jade ou GFAP no hipocampo, quando comparados com animais submetidos ao SE e tratados com veículo. Os resultados mostraram que o tratamento com SQ 29,548 melhora danos neuromotores, a morte neuronal e astrocitose provocada pelo SE. Esses efeitos neuroprotetores sugerem que o receptor TP pode ser um possível novo alvo para o tratamento do SE e prevenção das suas consequências.

Palavras-chave: Epilepsia. Inflamação. SQ 29,548. Epileptogênese.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ROLE OF THROMBOXANE RECEPTOR (TP) DURING EPILEPTOGENESIS

AUTHOR: Fernanda Kulinski Mello
ADVISOR: Mauro Schneider Oliveira

Convulsive *status epilepticus* (SE) is a medical emergency that can lead to epilepsy, long lasting brain damage and death. It is known that there is a strong link between epilepsy and inflammation. For instance, it has been shown that epileptic patients have a higher cerebral levels of thromboxane A₂ (TXA₂) when compared to healthy individuals. The present study aimed to evaluate the role of the thromboxane (TP) receptor after SE, using the TP receptor antagonist SQ 29.548, through behavioral, histological and biochemical assays. C57BL/6 male mice were submitted to the SE induction protocol by the pilocarpine method. After 90 min and 24h from the end of the SE the animals received two doses of the antagonist SQ 29.548 or vehicle via intracerebroventricular (2 μ L or 26 nmol / dose) and were evaluated for neuromotor function through the neuroscore test. Astrocytosis and neuronal death were assessed by immunohistochemical staining of GFAP and Fluoro Jade C, respectively. The statistical analysis showed the presence of two distinct groups, responsive and unresponsive to the TP antagonist. Responsive animals performed better in the neuroscore test, had less positive cells for Fluoro-Jade or GFAP in the hippocampus, when compared to animals submitted to SE and treated with vehicle. The results showed that treatment with SQ 29,548 improves neuromotor damage, neuronal death and astrocytosis caused by SE. These neuroprotective effects suggest that the TP receptor may be a possible new target for the treatment of SE and prevention of its consequences.

Key words: Epilepsy. Inflammation. SQ 29,548. Epileptogenesis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHE	Barreira hematoencefálica
COX	Enzima ciclo-oxigenase
EBICT	Epilepsia benigna da infância com pontas centrotemporais
EEG	Eletroencefalograma
GAD	Glutamato descarboxilase
ILAE	Liga Internacional contra a epilepsia
PGE2	Prostaglandina E2
PGI2	Prostaglandina I2
PKC	Proteína cinase C
PTZ	Pentilenotetrazol
SE	<i>Status epilepticus</i>
SUDEP	Morte súbita relacionada a epilepsia
TLE	Epilepsia do lobo temporal
TPR	Receptor tromboxano
TXA2	Tromboxano A2
VGAT	Transportador vesicular de GABA

LISTA DE GRÁFICOS

Revisão Bibliográfica

Figura 1: Esquema diagnóstico para a classificação das epilepsias. Os tipos de crises * denotam o início das crises epiléticas. Adaptado de: Fisher et al., 2017.....	16
Figura 2 Farmacoresistência na epilepsia, hipótese dos alvos e hipótese dos transportadores. NEOEBELS et al., 2012.....	18
Figura 3: Mecanismos celulares culminam na morte celular por necrose programada após crises epiléticas. (NOEBELS et al., 2012).....	20
Figura 4: Síntese dos prostanoídes (MILATOVIĆ et al, 2011).	24
Figura 5: Biossíntese de TXA ₂ e seu receptor TP (NAKAHATA, 2008).....	27
Figura 6: Estrutura química do SQ 29,548, CAS 98672-91-4.	28

Artigo científico:

Figure 1 - Effect of intracerebroventricular injection of TP selective antagonist SQ 29,548 on neuromotor performance (Neuroscore test) 48 h after pilocarpine-induced SE.....	33
Figure 2 - Effect of intracerebroventricular injection of TP selective antagonist SQ 29,548 on neuronal degeneration in hippocampal formation 48 h after pilocarpine-induced SE	33
Figure 3 - Effect of intracerebroventricular injection of TP selective antagonist SQ 29,548 on astrogliosis in hippocampal formation 48 h after pilocarpine-induced SE	34
Figure 4 - Effect of intracerebroventricular injection of TP selective antagonist SQ 29,548 on c-FOS immunoreactivity in hippocampal formation 48 h after pilocarpine-induced SE.....	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 OBJETIVO.....	13
1.1.1 Objetivo geral	13
1.1.2 Objetivos específicos.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 EPILEPSIA	14
2.2 CLASSIFICAÇÃO.....	15
2.3 TRATAMENTO.....	17
2.4 STATUS EPILEPTICUS	19
2.4.1 Pilocarpina	22
2.4.2 Tratamento para o SE	23
2.5 INFLAMAÇÃO E EPILEPSIA	24
2.6 RECEPTOR PARA TROMBOXANOS	26
3 ARTIGO CIENTÍFICO	29
4 CONCLUSÃO	36
5 REFERÊNCIAS	37
ANEXO A	42
ANEXO B – LICENÇA DE REPRODUÇÃO DO ARTIGO	43

1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma doença neurológica crônica com incidência de 1-2 % na população em geral. A doença é caracterizada por provocar crises epiléticas espontâneas e recorrentes (OMS, 2019).

A terapia com anticonvulsivantes promove o controle das crises em 60-70% dos pacientes, porém as crises permanecem refratárias em um número significativo de indivíduos, mesmo com o uso de diferentes esquemas de tratamento. Rompimento da barreira hematoencefálica e aumento da síntese de glicoproteína-P também são comuns e dificultam o tratamento e controle da doença (VAN VLIET et al., 2007). Além disso, a qualidade de vida dos pacientes com epilepsia é afetada negativamente por diversas comorbidades neurológicas de difícil tratamento, incluindo depressão, transtornos de ansiedade e déficits cognitivos. (FISHER et al., 2014).

Existem diversas evidências de que processos inflamatórios cerebrais podem facilitar ou provocar crises epiléticas, no entanto o mecanismo exato pelo qual isso ocorre não está claro. Nesse contexto, uma das vias metabólicas mais estudadas é a das ciclo-oxigenases (COX). As ciclo-oxigenases ao metabolizarem o ácido araquidônico produzem prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXA₂). No encéfalo essa síntese é aumentada de modo notável por estimulação inespecífica, como eletrochoque, trauma ou isquemia aguda. Além disso, já foram demonstrados efeitos convulsivantes e anticonvulsivantes de prostaglandinas como PGE₂ e PGI₂ (OLIVEIRA et al., 2008; VEZZANI et al., 2011).

Em modelos animais foi visto que os níveis de TXA₂ aumentam no cérebro após crises epiléticas induzidas por ácido caínico (KIM et al., 2008). Esse aumento também é visto em pacientes com epilepsia refratária, cujos níveis de TXA₂ são aumentados em duas vezes quando comparados com indivíduos saudáveis (RUMIA et al., 2012).

Entretanto, enquanto as PGs tem sido extensivamente estudadas, o papel dos receptores para tromboxanos (TP) durante as crises epiléticas permanece indefinido. Sendo assim, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de investigar os efeitos de um antagonista do receptor TP sobre as consequências do *status epilepticus* (SE) a fim de determinar seu possível uso como alvo terapêutico.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o papel do receptor TP, através do uso do seu antagonista (SQ 29,548) após o *SE*, através de análises comportamentais, histológicas e bioquímicas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da injeção intracerebroventricular do antagonista do receptor TP (SQ 29,548) sobre a função neuromotora dos camundongos 48 horas após o *SE* através do teste de neuroscore.
- Avaliar o efeito do tratamento com SQ 29,548 sobre a morte celular e ativação astrocitária através da marcação imuno-histoquímica de Fluoro-Jade C e GFAP no córtex cerebral e hipocampo de camundongos.
- Avaliar o efeito do SQ 29,548 sobre a imunorreatividade de c-fos

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EPILEPSIA

A epilepsia é uma das doenças neurológicas mais comuns que chega a afetar 65 milhões de pessoas em todo o mundo e é considerada um problema de saúde pública (MOSHE et al., 2015). Estima-se que a cada ano sejam diagnosticados 2.4 milhões de novos casos de epilepsia e cerca de 80% dos pacientes vivem em países em desenvolvimento (OMS, 2019).

Países em desenvolvimento, como o Brasil, têm alta prevalência de epilepsia devido a fatores de risco como doenças endêmicas, falta de programas de saúde preventiva e dificuldade de acesso à saúde (OMS, 2019). Os pacientes sofrem com diversas comorbidades como dificuldade de aprendizado e memória, depressão, ansiedade, tem maior predisposição a doenças de espectro autista (SCHEFFER et al., 2017). A doença está relacionada com uma maior mortalidade por acidentes como quedas e traumas, suicídio, acidentes de trânsito e morte súbita relacionada a epilepsia (SUDEP), além do risco causado pelas crises epiléticas em si (DEVINSKY et al., 2016).

Aproximadamente 20% dos pacientes, mesmo com crises controladas, sofrem consequências psicossociais e emocionais negativas como menor adequação social, dificuldades emocionais, baixa autoestima, problemas no emprego e nas atividades diárias que podem ser relacionados tanto com a doença quanto com o tratamento (SEIDENBERG; PULSIPHER; HERMANN, 2009).

A doença é caracterizada pela tendência a gerar crises epiléticas recorrentes (OMS, 2019) e pode ter causas genéticas, infecciosas, estruturais, metabólicas, autoimunes e idiopáticas (SCHEFFER et al., 2017). Crises epiléticas são eventos transitórios, com alterações motoras ou não, causados pela descarga excitatória excessiva nos neurônios (FISHER et al., 2014).

A Epilepsia do Lobo Temporal (TLE) é o tipo de epilepsia mais comum em adultos representando cerca de 60% das epilepsias focais e, pelo menos, a 40% de todos os casos de epilepsia (ENGEL, 2001).

Uma característica importante da TLE é a esclerose hipocampal, que ocorre em mais da metade dos pacientes com TLE refratários ao tratamento (ANDRADE-VALENÇA et al., 2006). A esclerose hipocampal é caracterizada pela perda das células

piramidais nas regiões CA1, CA3 e no hilo do giro denteado, com dano discreto nas células granulares do giro denteado e na região CA2 do hipocampo (ZALONIS et al., 2017).

Atualmente, o diagnóstico de epilepsia é feito se o paciente teve: 1) Duas crises não provocadas, ou de reflexo, em um intervalo de 24 horas; 2) Uma crise não provocada, ou de reflexo, e tem uma condição que aumenta a probabilidade (60%) de sofrer outra crise, como por exemplo um infarto recente ou um padrão epileptiforme no eletroencefalograma (EEG); 3) Diagnóstico de uma síndrome epiléptica, como síndrome de Landau-Kleffner ou epilepsia benigna da infância com pontas centro temporais (EBICT) (FISHER et al., 2014).

2.2 CLASSIFICAÇÃO

A Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE – *International League Against Epilepsy*) definiu em 2017 um novo esquema para a classificação das epilepsias, Figura 1. A correta classificação confere compreensão do tipo de crise do paciente, ajuda no seu prognóstico e possíveis comorbidades, além disso é fundamental na escolha terapêutica. A classificação deve começar definindo o tipo de crise apresentada pelo paciente. As crises epiléticas podem ser divididas em focais, generalizadas ou desconhecidas, relativas ao seu início (SCHEFFER et al., 2017).

Na epilepsia generalizada o paciente deve apresentar padrões espícula-onda generalizados no EEG, as crises generalizadas atingem ambos os hemisférios e podem ter manifestações motoras ou não. A crise tônico-clônica generalizada causa imediata perda de consciência, com uma fase tônica caracterizada pela rigidez postural seguida de uma fase clônica onde ocorre agitação corporal intensa. Crises de ausência, ou não convulsivas, são caracterizadas por interrupção súbita de atividade e perda de consciência (FISHER et al., 2017).

Na epilepsia focal, as crises são limitadas a apenas um hemisfério cerebral e podem ser classificadas quanto ao nível de consciência. Uma crise pode ter início em um hemisfério e então atingir o outro, esta recebe o nome de crise epilética tônico-clônica focal a bilateral.

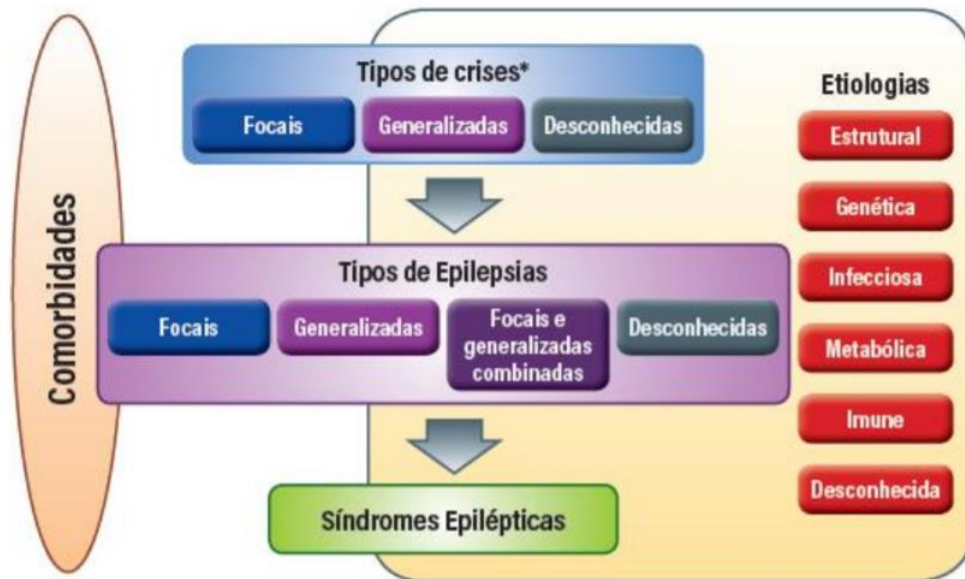


Figura 1 Esquema diagnóstico para a classificação das epilepsias. Os tipos de crises * denotam o início das crises epiléticas. Adaptado de: Fisher et al., 2017.

O terceiro tipo de epilepsia, Focais e Generalizadas Combinadas, é reservado a pacientes que apresentam tanto crises focais como generalizadas. Quando existe o diagnóstico de epilepsia mas não é possível determinar o tipo de crise, ela é classificada como Desconhecida (FISHER et al., 2017).

O terceiro nível de classificação é o diagnóstico de uma síndrome epilética, refere a um conjunto de características incluindo tipos de crises, EEG e características de imagem, que tendem a ocorrer juntas. Há várias síndromes bem reconhecidas como epilepsia de ausência da infância, síndromes de West e de Dravet. (FISHER et al., 2017).

Quanto à etiologia, as epilepsias podem ser classificadas em seis grupos, enfatizando as implicações para o tratamento, a doença pode ter mais de uma etiologia (FISHER et al., 2017).

Etiologia estrutural: uma anormalidade estrutural, visível em exames de imagem, aumenta consideravelmente os riscos de estar associada com epilepsia. Pode ser adquirida por acidente vascular cerebral, trauma, infecção ou causas genéticas como malformação (FISHER et al., 2017).

Etiologia genética: Quando a doença resulta diretamente de uma alteração genética conhecida ou presumida e as crises são o principal sintoma. Epilepsia

genéticas são um grupo diverso e em muitos casos envolvendo genes ainda não conhecidos (FISHER et al., 2017).

Etiologia infecciosa: A mais comum mundialmente. Refere-se ao desenvolvimento de epilepsia e não a crises referentes a infecção aguda. Neurocisticercose, tuberculose, HIV, malária cerebral são etiologias comuns (FISHER et al., 2017).

Etiologia metabólica: Distúrbios metabólicos com alterações bioquímicas em todo o corpo como a porfiria, a uremia, as aminoacidopatias ou as crises por dependência de piridoxina. Podem ser causados por um defeito genético ou adquiridos como no caso de deficiência cerebral de folato (FISHER et al., 2017).

Etiologia imunológica: Inflamação no sistema nervoso central mediada por doença autoimune, como por exemplo encefalite autoimune (FISHER et al., 2017).

Etiologia desconhecida: Quando não é possível classificar em nenhum grupo acima, impossibilitando o diagnóstico específico da doença. O grau de definição da doença depende dos recursos disponíveis para avaliação, instituição de saúde e país (FISHER et al., 2017).

2.3 TRATAMENTO

O tratamento da epilepsia é sintomático, os fármacos disponíveis na clínica não têm efeito antiepileptogênico, apenas diminuem a frequência das crises. Os principais mecanismos de ação dos fármacos anticonvulsivantes incluem o bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem, aumento da inibição GABAérgica, bloqueio dos canais de cálcio e ligação à proteína SV2A da vesícula sináptica (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN; 2012).

A escolha da farmacoterapia depende do tipo de crise epiléptica, fármacos como carbamazepina, fenitoína, levitiracetam e gabapentina são eficazes nas crises focais e generalizadas tônico-clônicas e não apresentam qualquer efeito sobre crises de ausência, estas só podem ser controladas com etossuximida, valproato, clonazepam e lamotrigina (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN; 2012).

Também deve-se levar em consideração as características do paciente. Pacientes idosos geralmente usam outros medicamentos, assim deve-se evitar fármacos indutores enzimáticos clássicos (carbamazepina, fenitoína, fenobarbital) a fim de diminuir os riscos de interação medicamentosa e efeitos adversos. Mulheres

em idade fértil devem evitar, sempre que for possível, o uso de ácido valpróico devido aos riscos de seu uso durante uma possível gravidez, pois o fármaco está relacionado com diversas malformações congênitas como espinha bífida, defeitos de septo atrial, fenda palatina, craniossinostose (BRASIL, 2019).

Além da intervenção medicamentosa, nos casos refratários pode-se considerar tratamentos alternativos como estimulação do nervo vagal, dieta cetogênica e ressecção cirúrgica do foco epiléptico (BRASIL, 2019).

Apesar do grande número de anticonvulsivantes existentes cerca de 30% dos pacientes são refratários a todos eles e, portanto, continuam sofrendo com crises diárias e efeitos adversos potencializados pela polimedicação. Existem dois mecanismos principais que propõem uma explicação para essa resistência aos fármacos: hipótese dos alvos e hipótese dos transportadores (fig. 2).

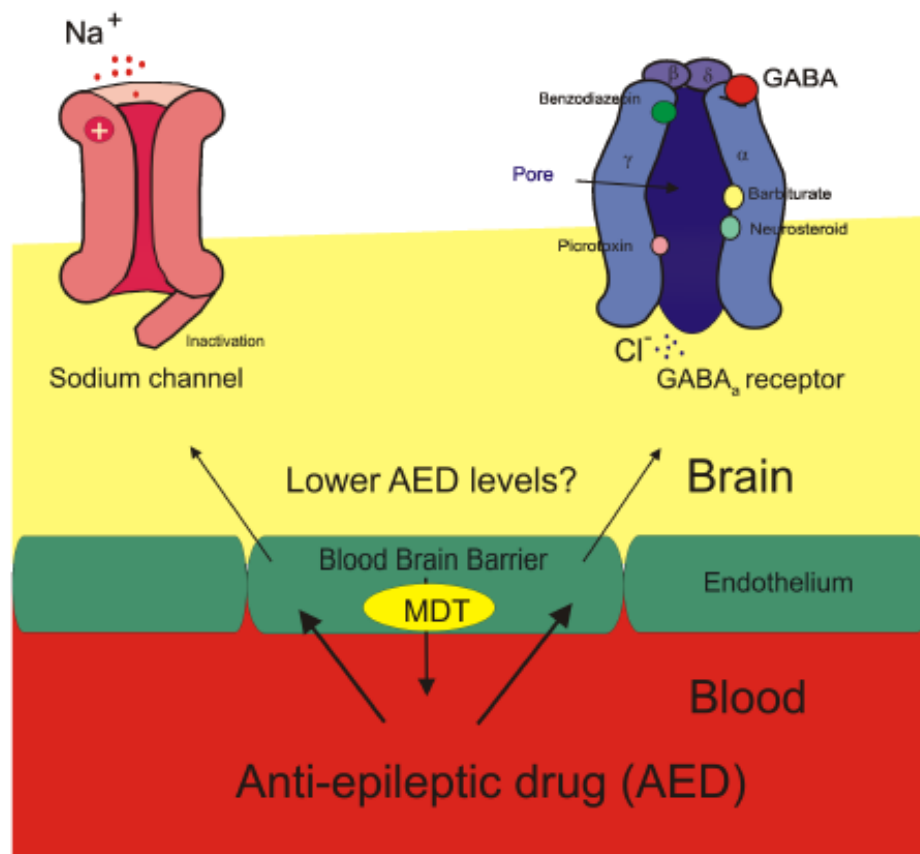


Figura 2 Farmacoresistência na epilepsia, hipótese dos alvos e hipótese dos transportadores. NEOBELS et al., 2012.

A hipótese dos alvos diz que modificações nos alvos dos fármacos, intrínsecas (genéticas) ou adquiridas (alteração nas subunidades, fosforilação, etc.) diminuem a sensibilidade ao fármaco. A hipótese dos transportadores diz que a resistência é

causada pela superexpressão de transportadores de efluxo, que impedem a chegada dos anticonvulsivantes ao sítio de ação em concentrações eficazes. A superexpressão de glicoproteína-P pós SE já foi comprovada em 48h pós SE (NOEBELS et al., 2012; BANKSTAHL et al., 2011).

Embora a epilepsia ainda não tenha cura, pode ser considerada “resolvida” quando o paciente não tem crises há 10 anos e está sem tratamento farmacológico há pelo menos 5 anos (FISCHER et al., 2014).

2.4 STATUS EPILEPTICUS

O *status epilepticus* (SE) é a forma mais grave de crise epiléptica. Trata-se de uma emergência médica e é um fator de alto risco para o desenvolvimento da epilepsia. Afeta cerca de 61 em cada 100.000 pessoas por ano e tem altas taxas de mortalidade, chegando a 40% para indivíduos idosos (TRINKA et al., 2015)

A Liga Internacional Contra Epilepsia (ILAE) em força-tarefa no ano de 2015 definiu o SE como “*Uma condição que resulta da falha de mecanismos responsáveis pela terminação de crises ou do início de mecanismos que levam a crises anormalmente prolongadas (após tempo 1). É uma condição que pode ter consequências a longo prazo (após tempo 2), incluindo morte neuronal, dano neuronal, alteração nas redes neurais, dependendo do tipo e duração das crises*”. Para SE tônico-clônico t_1 e t_2 foram definidos como 5 e 30 minutos, respectivamente. As informações sobre t_1 e t_2 para SE focal ainda são inconclusivas, mas estimadas entre 10 min e <60 min, ainda não há informações sobre para t_1 e t_2 SE de ausência (TRINKA et al., 2015).

Já foi demonstrado que uma crise que dure mais que 7 min tem alta probabilidade de se tornar duradoura e que cerca de 10% das primeiras crises não provocadas duram mais que 30 min, assim o tempo t_1 (ideal para início de tratamento) foi determinado em 5 min, numa tentativa de evitar as consequências a longo prazo. O SE causa uma lesão generalizada no hipocampo, desde que foi demonstrado que pacientes que já passaram pelo SE tem uma densidade hipocampal menor quando comparados a pacientes epilépticos que nunca entraram em SE (SHINNAR, et al., 2001). Também, pacientes com SE tem maiores níveis sanguíneos de enolase neurônios-específica, usada como marcador de lesão neuronal, mesmo quando o SE é não convulsivo (NOEBELS et al., 2012).

Experimentalmente, foi demonstrado que o principal tipo de morte celular no SE é necrose, entretanto, em diversos modelos é possível identificar neurônios morfologicamente necróticos com marcação positiva para TUNEL, bax, expressão de caspase e morte programada independente de caspase, sugerindo que a apoptose também está envolvida na morte neuronal pós SE (NOEBELS et al., 2012).

A morte neuronal por apoptose é uma forma de morte ativa que resulta da execução de programas celulares, as vias melhores caracterizadas são a intrínseca e extrínseca (Fig. 3). O primeiro passo da via extrínseca é a ativação da superfamília TNF que recruta outras proteínas para formar um complexo e ativar caspase-8 e assim ativar caspase-3, que mata a célula por efeitos proteolíticos disseminados, rompendo DNA, inativando o reparo do DNA, atacando o citoesqueleto entre outros. A via intrínseca é iniciada quando a mitocôndria libera o citocromo c do espaço intermembrana para o citosol, onde em associação com fator ativador de protease 1 e deoxiadenosina trifosfato (dATP) forma um complexo apoptosoma que ativa caspase-9 e assim caspase-3 (NOEBELS et al., 2012).

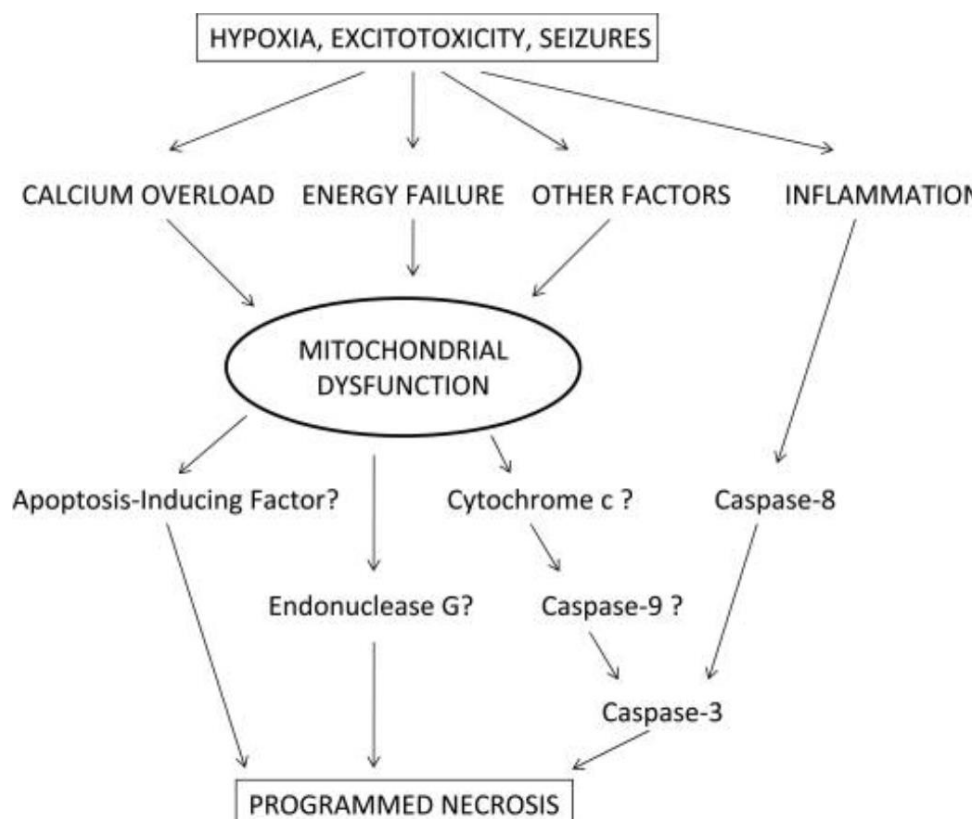


Figura 3: Mecanismos celulares culminam na morte celular por necrose programada após crises epiléticas. (NOEBELS et al., 2012).

Em modelo de SE induzido por ácido caínico (KA) foi visto que o SE causa dois tipos de morte nas células piramidais da CA1, necrose precoce (1 dia após SE) e morte programada positiva para TUNEL e caspase-3 (3-7 dias pós SE), apesar da marcação de caspase não foi visto morfologia de apoptose, sugerindo que a principal forma de morte é por necrose (NOEBELS et al., 2012).

Outra grande alteração que ocorre durante o SE é na neurotransmissão GABAérgica. O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, é produzido pela glutamato descarboxilase (GAD) a partir do glutamato, o GABA é metabolizado pela GABA transaminase à semialdeído succínico e então em succinato no ciclo de Krebs, também ocorre recaptação ativa através do transportador vesicular de GABA (VGAT) (RANG et al., 2007; TREIMAN, 2001).

Durante o SE ocorre a internalização de receptores GABA_A, devido ao aumento da atividade de calcineurina (ou proteína fosfatase II) que desfosforila a subunidade β_3 do receptor GABA_A e diminui a fosforilação dependente de PKC, facilitando a endocitose dos receptores e diminuindo a neurotransmissão inibitória (NOEBELS, 2012; MELE; COSTA; DUARTE, 2019). Entretanto a função da PKC na regulação GABA_AR é complexa, pois já em outros estudos já foi demonstrado aumento da excitabilidade neuronal após ativação da PKC, essa dualidade pode ser devida às suas diversas isoformas (FUORTES; FARIA; MERLIN, 2008; DAIGEN et al 1991).

Além disso, a astrocitose reativa pós SE induz diminuição da atividade da glutamina sintetase, o que diminui a síntese e conteúdo de GABA nas sinapses. A inflamação, astrocitose e menor atividade de glutamina sintase ocorrem logo após a lesão inicial e são mantidos durante a epileptogênese (NOEBELS et al, 2012; EID et al, 2013; COULTER; EID; 2012).

Além de perda neuronal, o SE também causa alterações nas sinapses e essa reorganização ocorre logo após o SE durante o período latente, antes das crises espontâneas, em conjunto com a diminuição do tônus inibitório de GABA, que também aparece logo após o SE é preditivo de epileptogênese (NOEBELS et al, 2012).

O SE causa hipertensão, diminuição do pH, hipóxia e vasoconstrição no cérebro que leva ao rompimento da barreira hematoencefálica (BHE) que leva ao extravasamento de proteínas do soro, ativação da via inflamatória e entrada de leucócitos no cérebro (VAN VLIET et al, 2015). Foi demonstrado que a permeabilidade da BHE atinge seu pico em 5h e 24h pós SE a BHE já está restaurada (MENDES et

al, 2019). A recomposição da BHE coincide com a superexpressão de transportadores de efluxo como glicoproteína P, proteína de resistência a múltiplas drogas 1 e 2 (MRP1 e MRP2) e proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP) (VAN VLIET et al, 2015).

Deve-se considerar que apesar do rompimento da BHE no SE ser prejudicial, também representa uma oportunidade única de tratamento, visto que facilita a chegada dos fármacos ao cérebro, o que pode prevenir ou atenuar as comorbidades da epilepsia (MENDES et al, 2019).

Além disso, o SE é uma condição dinâmica e que evolui rapidamente, modifica a atividade neuronal e sináptica. Essa plasticidade neuronal demonstrada é manifestada como mudanças no padrão de crises, padrão de EEG, sensibilidade à fármacos, dano neuronal e morte (NOEBELS et al, 2012).

2.4.1 Pilocarpina

Experimentalmente, existem várias maneiras de induzir o SE, e um dos métodos mais estabelecidos é o que faz uso de pilocarpina. O modelo da pilocarpina pode ser usado para gerar crises agudas e também para gerar o SE que posteriormente culmina em epilepsia. A pilocarpina é um agonista de receptores muscarínicos do subtipo M1. Ao ativar este receptor causa influxo de cálcio, despolarização e, de forma dose-dependente, crises epiléticas que podem evoluir até o SE. A administração sistêmica de pilocarpina causa alterações que podem ser divididas em 3 fases: 1) Período agudo de crises motoras límbicas que progridem até o SE; 2) Período silencioso, latente, com progressiva normalização do EEG e comportamento; 3) Período crônico, aparecimento de crises espontâneas; (TURSKI et al, 1983; CAVALHEIRO, 1995; CAVALHEIRO et al, 2006).

Esse modelo é altamente isomórfico com a epilepsia humana e mimetiza características comportamentais, eletroencefalográficas e histológicas desta. (TURSKI et al, 1983; CURIA et al, 2008). Por exemplo, induz perda neuronal, principalmente nas camadas CA1, CA3 e hilo do giro denteado, brotamento de fibras musgosas e dispersão da camada granular, além, é claro, do aparecimento de crises recorrentes e espontâneas (CAVALHEIRO, 1995; CAVALHEIRO et al, 2006).

2.4.2 Tratamento para o SE

O tratamento ideal para o SE ainda não está definido, e as taxas de refratariedade são elevadas. Para fins de controle das crises, foram definidas 4 fases e o tratamento depende da fase do SE:

Fase I: Fase inicial, SE iminente, caracterizado pelo aumento da frequência e gravidade das crises, crises contínuas por mais de 5 min.

Fase II: SE estabelecido, 10-30 min, fármacos benzodiazepínicos perdem eficácia.

Fase III: SE refratário (falha de 2 ou mais drogas), aumento do tempo de crise, diminuição da atividade motora (dissociação eletromecânica), coma.

Fase IV: SE super refratário/ SE maligno, crises continuam apesar do tratamento na maior dose com anestésicos iv por mais de 24h.

Atualmente no Brasil o protocolo de tratamento do SE deve seguir uma sequência de 3 linhas que leva em consideração as fases do SE. A primeira linha de tratamento compreende fármacos benzodiazepínicos, que aumentam a frequência de abertura do receptor GABA_A e leva a hiperpolarização neuronal – lorazepam (iv ou in), diazepam (iv ou retal), clonazepam (iv), midazolam (iv, im, in e bucal). A segunda linha compreende a fase do SE estabelecido, são usados fármacos com mecanismos que não envolvem diretamente o sistema GABAérgico, como o bloqueio de canais de sódio, cálcio – fenitoína (iv), levetiracetam (iv), valproato de sódio (iv), fenobarbital (iv, im). A terceira linha de tratamento é utilizada quando as duas primeiras falham, cerca de 30-40% dos casos chegam ao SE refratário, nesses casos é usada anestesia geral – tiopental, pentobarbital, midazolam, propofol - com intubação e ventilação, além disso é recomendado EEG pelo menos a cada 24 horas para garantir o fim das descargas ictais. No caso de SE super refratário, são recomendados cetamina, corticosteroides, magnésio, IV imunoglobulina, dieta cetogênica e neuroestimulação (BRASIL, 2019; JONES et al, 2014; TRINKA et al, 2015).

Fármacos benzodiazepínicos são muito eficazes em terminar o SE quando utilizados logo no início da crise, mas inefetivos no controle do SE prolongado, essa resistência tempo-dependente pode ser explicada pela internalização de receptores GABA_A que ocorrem logo após o SE (BURMAN et al, 2019;).

O processo pelo qual o cérebro previamente normal sofre alterações funcionais e passa a gerar uma atividade elétrica anormal que facilita a geração de crises é

chamado de epileptogênese. A epileptogênese pode ser dividida em três fases: um evento precipitador (SE, trauma cerebral, infecção, por exemplo), um período latente onde ocorrem os chamados “mecanismos de epilepsia” e a epilepsia estabelecida. Desvendar os mecanismos de epilepsia é a chave para a compreensão da doença e desenvolvimento de drogas mais eficazes e seguras (GOLDBERG e COULTER, 2013). Dentre as milhares de alterações que acontecem após o SE e durante a epileptogênese, uma das mais estudadas é a neuroinflamação.

2.5 INFLAMAÇÃO E EPILEPSIA

A inflamação é um mecanismo fisiológico induzido por infecção ou dano tecidual que tem o objetivo de remover o patógeno e reparar o tecido lesado. Porém a inflamação, em certas circunstâncias, também pode levar à disfunção e morte celular. Sabe-se que a neuroinflamação pode exacerbar a excitabilidade neuronal e gerar crises epiléticas, bem como induzir a epileptogênese por diferentes vias, entre elas a das ciclo-oxigenases (COX- 1 e 2) (VEZZANI; FRIEDMAN; DINGLEDINE, 2013).

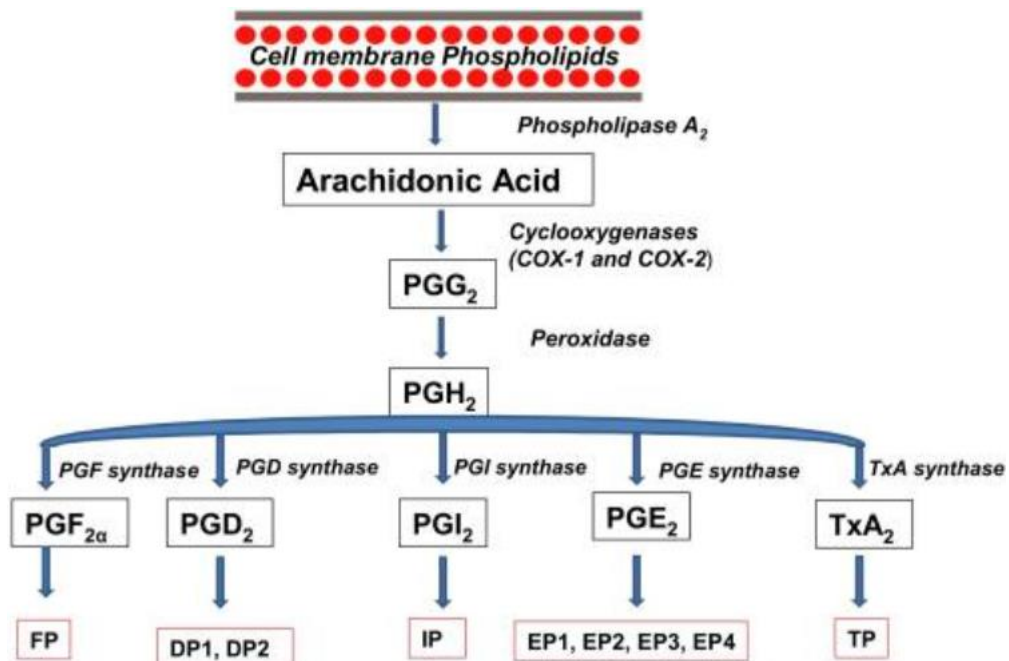


Figura 4: Síntese dos prostanóides (MILATOVIC et al, 2011).

As ciclo-oxigenases fazem a conversão do ácido araquidônico, liberado da membrana fosfolipídica por ação da fosfolipase A2 (PLA2), à prostaglandina H2 (PGH2), através de uma reação de duas etapas, a ciclização do ácido araquidônico à prostaglandina G2 (PGG2) e sua redução para formar a prostaglandina H2 (PGH2). A PGH2 é rapidamente convertida por sintases específicas a um dos cinco principais prostanóides bioativos: prostaglandina F2 (PGF2), prostaglandina D2 (PGD2), prostaglandina I2 (PGI2), prostaglandina E2 (PGE2) e tromboxano A2 (TXA2). Figura 4.

A COX-2 é abundantemente expressa no córtex e hipocampo, e é induzida rapidamente em modelos experimentais com ácido cáfnico e pentilenotetrazol, assim como por liberação de ácido araquidônico durante crises epiléticas. A neuroinflamação pode ser tanto uma causa quanto consequência das crises epiléticas (VEZZANI et al., 2011).

Muitos estudos demonstram efeitos positivos da inibição da via e confirmam o papel pró epilético das prostaglandinas. Foi demonstrado que celecoxibe, inibidor seletivo COX 2, tem efeito anticonvulsivante contra crises induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) e essa proteção é revertida com a administração intracerebroventricular de PGE2 (OLIVEIRA et al., 2008).

Também com uso de celecoxibe foi demonstrado que a produção de glicoproteína-p é dependente de COX-2, visto que a síntese foi diminuída com o uso do fármaco e de outros inibidores da enzima (BAUER et al, 2008).

Em um estudo com amostras de neocórtex de pacientes com epilepsia refratária, foram medidos os metabólitos da COX, PGE2, TXA2 e PGI2, todos estavam em níveis aumentados em relação ao controle, entretanto o nível de TXA2 mostrou-se 2 vezes mais alto que o nível de PGI2, enquanto no controle seu nível de TXA2 era ligeiramente mais baixo que PGI2 (RUMIA et al., 2012).

Sabendo que o TXA2 tem efeito vasoconstritor e agregante plaquetário é possível sugerir que este prostanóide possa contribuir para o dano neuronal gerado na epilepsia. Os efeitos da ativação de receptores para TXA2 no cérebro podem ser diversos, foi demonstrado por HSU e KAN em 2014 que a ativação pré-sináptica do receptor TP leva ao aumento da liberação de glutamato, enquanto a ativação pós-sináptica está associada com a inibição da transmissão (HSU e KAN, 1996); Porém a influência dos receptores TP nas crises epiléticas e epilepsia ainda não havia sido testada.

Em um trabalho do grupo foi demonstrado que a administração subcutânea de U-46619, agonista do receptor TP, aumenta a latência para crises induzidas por PTZ em camundongos, possivelmente via TP com participação de outras vias, visto que o tratamento levou também ao aumento da expressão proteica de proteína cinase C fosforilada (PKC) e a relação PKC fosforilada/total, embora a administração intraperitoneal de SQ 29,548, antagonista do receptor TP, não tenha sido capaz de alterar o efeito do agonista (FREITAS et al., 2018).

2.6 RECEPTOR PARA TROMBOXANOS

O tromboxano A₂ (TXA₂) é sintetizado a partir da PGH₂ por uma enzima chamada tromboxano A sintase (TXS), essa via também gera o ácido 5,8,10-heptadecatrienoico (HHT) e malondialdeído (MDA). O TXA₂ é transformado rapidamente à forma inativa tromboxano B₂ (TXB₂) por reação não enzimática, a meia vida do TXA₂ é de cerca de 30 min (NAKAHATA, 2008). Figura 5.

O tromboxano A₂ exerce sua ação através do receptor TP, um receptor metabotrópico que pode acoplar-se à proteínas G_q, G₁₁, G₁₂, G₁₃, G₁₅, G₁₆, G_i, G_s e G_h, que regulam vários efetores, como fosfolipase C (PLC), fator de troca de nucleotídeo de guanina Rho (RhoGEF) e adenilato ciclase, que resultam em respostas fisiológicas como regulação do citoesqueleto, proliferação e apoptose (NAKAHATA, 2008).

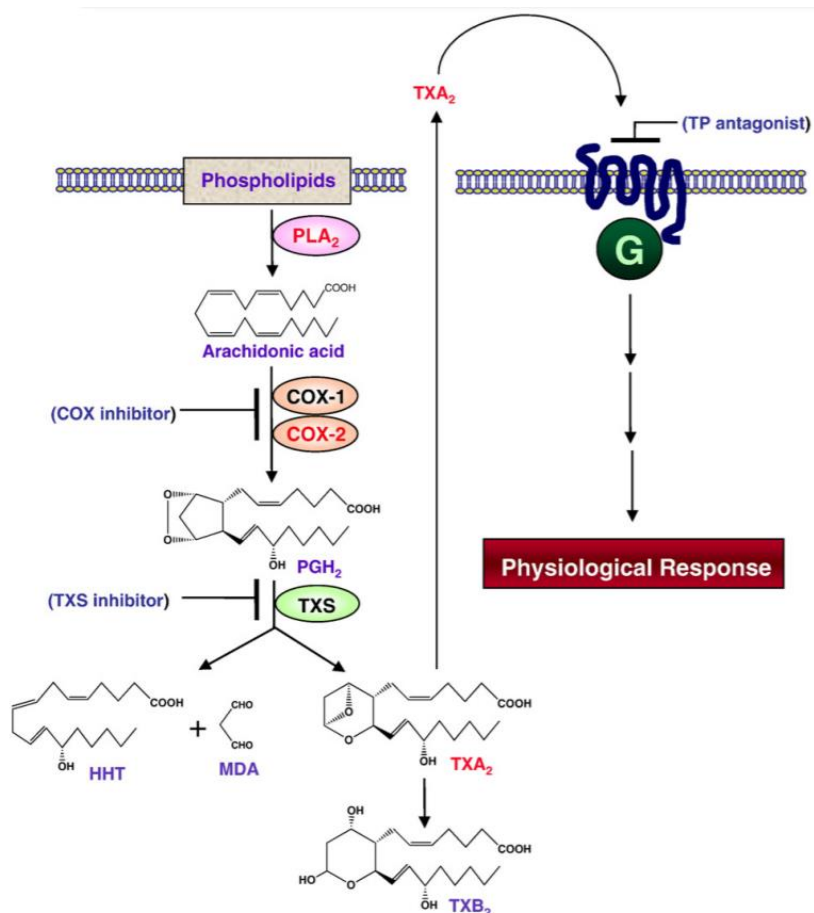


Figura 5: Biossíntese de TXA₂ e seu receptor TP (NAKAHATA, 2008).

Várias das funções mediadas pelo receptor TP, como vasoconstrição e ativação plaquetária, dependem do acoplamento com a proteína Gq. A sinalização via Gq ativa a PLC que cliva o fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP₂) e gera dois segundos mensageiros inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG). O principal efeito do DAG é ativar a PKC. O IP₃ é liberado no citosol e age no receptor IP₃ que controla a liberação de Ca²⁺ das reservas intracelulares (RANG et al, 2007).

A regulação da excitabilidade celular depende em grande parte da regulação da concentração de cálcio. O aumento da corrente de cálcio pode gerar hiperexcitabilidade principalmente via receptor NMDA que pode levar a crises epiléticas e SE, excitotoxicidade e morte celular. Bloqueadores de canais de cálcio são úteis no tratamento da epilepsia, principalmente para crises de ausência (RANG et al, 2007; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN; 2012).

Foi demonstrado também que a expressão do receptor TP pode ser regulado para cima com espécies reativas de oxigênio (EROs) e provocar aumento nas respostas de TXA₂. Além disso, em um experimento de Yan et al 2016, foi comprovado

que o TXA2 está aumentado em regiões após isquemia cerebral em camundongos, colocalizado com macrófagos e micróglia ativada, também os animais foram tratados com SQ 29,548 e seus efeitos anti-inflamatórios e anti estresse oxidativo foram suficientes para diminuir o volume de infarto e impedir o rompimento da BHE e lesão neuronal subsequente.

Assim, fica claro que o bloqueio farmacológico do receptor TP pode ser útil ao tratamento de epilepsia ou SE. O [1S-[1 α ,2 α (Z),3 α ,4 α]-7-[3-[[2-[(phenylamino)carbonyl] hydrazino]methyl]-7-oxabicyclo[2.2.1]hept-2-yl]-5-heptenoic acid (SQ 29,548) é um antagonista do receptor TP altamente seletivo.

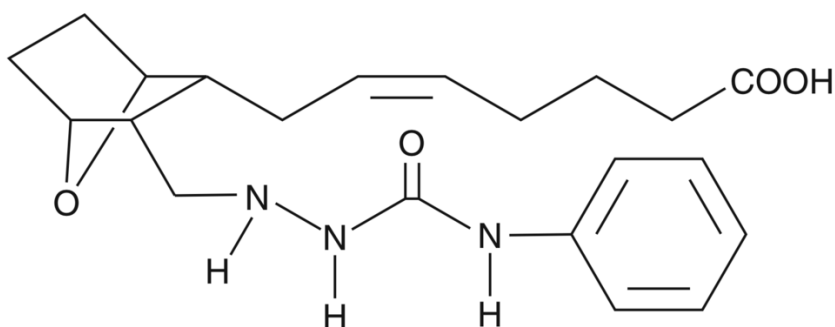


Figura 6: Estrutura química do SQ 29,548, CAS 98672-91-4.

O SQ 29,548 tem baixa permeabilidade através da barreira hematoencefálica, mesmo em doses de 5 mg/Kg i.p. chega ao em níveis abaixo do limite de detecção por isso a via mais adequada para administração da substância seria intracerebroventricular (SOPER et al., 2012; REBEL et al., 2015).

3 ARTIGO CIENTÍFICO

Os procedimentos experimentais iniciaram-se após a obtenção da carta de aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria (ANEXO A).

Os materiais e métodos, assim como os resultados e discussão que fazem parte desta dissertação estão apresentados na forma de artigo científico, intitulado “*Neuroprotective effects of thromboxane receptor antagonist SQ 29,548 after pilocarpine-induced status epilepticus in mice*” publicado na revista *Epilepsy Research* e reproduzido aqui integralmente.



Contents lists available at ScienceDirect

Epilepsy Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/epilepsyres

Neuroprotective effects of thromboxane receptor antagonist SQ 29,548 after pilocarpine-induced status epilepticus in mice

Fernanda Kulinski Mello^a, Mayara Lütchemeyer Freitas^a, Naieli Schiefelbein Souto^b,
 Viviane Nogueira Zorzi^c, Michele Pereira Moreira^a, Bruna Neuberger^a, Karine Gabriela Costa^a,
 Michele Rechia Fighera^{a,c}, Luiz Fernando Royes^{a,c}, Ana Flávia Furian^{a,b},
 Mauro Schneider Oliveira^{a,*}

^a Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

^b Graduate Program in Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

^c Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Eicosanoid
 Thromboxane
 TXA₂R
 Status epilepticus
 Neuroprotection

ABSTRACT

Thromboxane A₂ (TXA₂) is an important eicosanoid in the cardiovascular system, and increasing evidence suggests that TXA₂ receptors (TPs) and their ligands may constitute valuable tools for the development of neuroprotective drugs. However, the role of TPs on seizure-induced damage has not been investigated. Therefore, we evaluated the effects of SQ 29,548, a potent and selective TP antagonist—on neuromotor performance, neurodegeneration, reactive astrogliosis, and c-Fos protein immunoreactivity after pilocarpine-induced status epilepticus (SE) in mice. Adult C57BL/6 mice received intracerebroventricular SQ 29,548 injections 90 min and 24 h after pilocarpine-induced SE. We found that SQ 29,548 prevented the impairment of neuromotor performance (Neuroscore test) 48 h after pilocarpine-induced SE. Data analysis suggested the existence of two subgroups of SQ 29,548-treated post-SE animals. Eight out of 12 SQ 29,548-treated animals displayed Neuroscore values identical to those of vehicle-treated controls, and were considered SQ 29,548 responders. However, 4 out of 12 SQ 29,548-treated animals did not show any improvement in Neuroscore values, and were considered SQ 29,548 non-responders. Treatment with SQ 29,548 attenuated SE-induced increase in the number of FJC- or GFAP-positive cells in the hippocampus of SQ 29,548 responders. In addition, SQ 29,548 prevented the SE-elicited increase of c-Fos immunoreactivity in the hippocampus. In summary, our results suggest that the TP antagonist (SQ 29,548) improves neurological outcome after pilocarpine-induced SE in mice. The existence of SQ 29,548 responders and non-responders was suggested by results from the Neuroscore test. Additional studies are needed to understand the mechanisms underlying these findings, as well as the potential uses of TP antagonists in the treatment of seizure-induced damage.

1. Introduction

Status epilepticus (SE), a life-threatening medical emergency defined by the occurrence of continuous seizure activity (Trinka et al., 2015a), is often associated with long-term morbidity and mortality (Betjemann and Lowenstein, 2015). SE occurs in up to 61 per 100,000 individuals per year with a mortality rate of up to 40 %, and requires prompt diagnosis and treatment (Trinka et al., 2015b). Compelling evidence indicates that SE affects multiple organs—including the brain, heart, lungs, and kidneys—either because of enduring seizure activity or due to aggressive pharmacotherapy (Al-Mufti and Claassen, 2014).

Moreover, SE is a well-established risk factor for the subsequent development of epilepsy (Meierkord, 2007). Therefore, it is important to develop therapeutic strategies to mitigate the pathological processes that follow SE, so as to limit the subsequent neurological, cognitive, psychological, and social consequences of SE.

A myriad of molecular and cellular events—including excitotoxicity, neurodegeneration, ischemic injury, and neuroinflammation—occur in the brain after SE (Borges et al., 2003; Fabene et al., 2007). Among several promising targets for neuroprotection after SE are the prostanoïd receptors (Jiang et al., 2012, 2013; Pekcec et al., 2009; Rojas et al., 2014). For instance, ablation of EP1 (a prostaglandin E2 receptor)

* Corresponding author at: Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Av. Roraima, nº 1000, Prédio 21, sala 5207, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

E-mail address: ms.oliveira@ufsm.br (M.S. Oliveira).

<https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2020.106277>

Received 2 October 2019; Received in revised form 7 December 2019; Accepted 14 January 2020

Available online 16 January 2020

0920-1211/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

reduces the likelihood of kainate-induced SE, and reduces both hippocampal cell death and the mRNA levels of inflammatory mediators (Jiang et al., 2012). Moreover, post-SE administration of an EP2 (another prostaglandin E2 receptor) antagonist in the mouse pilocarpine model also decreases mortality, brain inflammation, blood-brain barrier disruption, and hippocampal neurodegeneration (Jiang et al., 2013); this further suggests the potential for neuroprotective strategies involving prostanoid receptors. However, it remains unclear whether other prostanoid receptors, such as the thromboxane A2 receptor (TP) (Yan et al., 2016), are associated with SE-elicited damage.

The TP receptor is a G protein-coupled receptor found in many tissues and cell types (Nakahata, 2008). It is particularly important in mediating platelet activation/aggregation and endothelial vasoconstriction (Nakahata, 2008). Accordingly, TP receptor antagonism constitutes an established strategy for antithrombotic therapies (Nakahata, 2008). In addition, recent evidence indicates that TP receptors expressed in brain parenchymal cells play a role in neuroprotection (Yan et al., 2016). In fact, intracerebroventricular administration of SQ 29,548 (a potent and selective TP receptor antagonist) after transient middle cerebral artery occlusion reduces the volume of cerebral infarction, the release of inflammatory cytokines, and microglia/macrophage activation (Yan et al., 2016). In this context, we hypothesized that TP participates in the deleterious consequences of SE and investigated the effects of its antagonist (SQ 29,548) on neuromotor performance, neurodegeneration, reactive astrogliosis, and protein expression in mice with pilocarpine-induced SE.

2. Material and methods

2.1. Study animals

Adult female C57BL/6 mice (30–35 g) were maintained under controlled conditions (12 h light/dark cycle, 24 ± 1 °C, and 55 % relative humidity), with free access to food (Puro Trato, Santa Maria, Brazil) and filtered water. Animal use was in accordance with the guidelines from national (the Brazilian Council of Animal Experimentation, CONCEA) and international (Humane Care and Use of Laboratory Animals, the U.S. Public Health Service) legislation and was approved by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria (protocol number 5250180515). All efforts were made to minimize both the number of animals used, and their suffering.

2.2. Surgical procedures

Each animal was anesthetized with an intraperitoneal (i.p.) injection of ketamine and xylazine (80 and 10 mg/kg, respectively), and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under stereotaxic guidance, a 7-mm stainless steel cannula (28 gauge) was inserted immediately above the right ventricle (coordinates relative to bregma: AP, -0.5 mm; L, 1.1 mm; DV, 2.2 mm from the dura) (Paxinos and George, 2007). For postoperative pain control, meloxicam and dipyrone (2 and 100 mg/kg respectively; i.p.) were administered before and after the surgical procedure. Experiments were performed 3 days after the surgery.

2.3. SE and SQ 29,548 treatment

Pilocarpine hydrochloride (P0472, Sigma-Aldrich) was administered in repeated low doses (100 mg/kg, i.p.), as this approach is known to increase the probability of SE and reduce acute mortality (Grottick et al., 2007). To minimize the peripheral cholinergic effects, the mice also received methylscopolamine (58502, Sigma-Aldrich; 1 mg/kg, i.p.) 30 min before pilocarpine dosage. In brief, pilocarpine was dissolved to 10 mg/mL in 0.9 % NaCl, and administered every 20 min. Injections were limited to 6 injections per animal, and were continued until the onset of SE—defined by the occurrence of continuous limbic seizures

following generalized seizures. After 30 min in SE, diazepam (Santisa, Bauru, SP, Brazil; 10 mg/kg, i.p.) was injected to quell the severity of SE (Gualtieri et al., 2012). Age-matched controls also received methylscopolamine and diazepam, but were administered only 0.9 % NaCl instead of pilocarpine. Either SQ 29,548 (19025, Cayman Chemical) or its vehicle, 0.1 % DMSO (34869, Sigma-Aldrich), were administered by intracerebroventricular (i.c.v.) injection 90 min and 24 h after SE (26 nmol/2 μ l) (Yan et al., 2016). All animals submitted to the pilocarpine dosage protocol developed SE. Four animals died during SE before receiving diazepam or other treatments, and one vehicle-treated animal was found dead around 24 h after SE.

2.4. Neuroscore

Neuromotor function was assessed through the Neuroscore test 48 h after pilocarpine-induced SE, as described by Ferreira et al. (Ferreira et al., 2013). Briefly, the animals were subjected to a grid-walk test for 1 min in order to assess the number of foot-faults. Subsequently, forelimb and hindlimb functions were evaluated by suspending the animals by the tail and observing how they grasped the top of the cage when they were lowered (to test the forelimbs). The same procedure was used to evaluate hindlimb spreading and extension during suspension. Finally, the animals were tested for both right and left resistance to lateral pulsion. Animals were scored from 0 (severely impaired) to 4 (normal) for each of the following indices: walking failures, fore- and hindlimb function, and resistance to lateral pulsion. The maximum score for each animal was 12. Neurological motor functions were evaluated by an experienced investigator who was blinded to experimental groups. Based on the severity of neuromotor impairment, we divided the SQ 29,548-treated SE animals into two sub-groups (Peng et al., 2016): those with Neuroscore values greater than or equal to the average plus one standard deviation of vehicle-treated SE animals were considered SQ 29,548 responders, and the remaining animals were regarded as SQ 29,548 non-responders.

2.5. Tissue preparation for histology

Forty-eight hours after SE, the mice were deeply anesthetized with thiopental (180 mg/kg, i.p.), and perfused with 50 mL heparinized saline (5 IU/mL) and 4 % paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4). The brain was post fixed in 4 % PFA for 24 h, and thereafter, in 30 % sucrose for 3 days. The ipsilateral hemisphere was frozen and cut in a cryostat (HM525NX UV Cryostat; 956651, Thermo Fisher Scientific), and the 20 μ m slices were stored in a cryoprotectant at -20 °C until further use.

2.6. Fluoro-Jade C (FJC) staining

FJC staining was performed according to Wang et al. (Wang et al., 2008). Free-floating sections were placed on gelatinized slides and sequentially immersed in a solution of 0.05 % NaOH in 80 % ethanol for 5 min, 70 % ethanol for 2 min, distilled water for 2 min, and 0.06 % potassium permanganate for 10 min. The slides were rinsed for 2 min in distilled water and then transferred to the FJC staining solution (0.001 %; 2578699, MilliporeSigma) and DAPI (0.01 %; sc-3598, Santa Cruz Biotechnology) in 0.1 % acetic acid for 30 min. After staining, the sections were rinsed with distilled water (3 times for 2 min each) and dried. The slides were immersed in xylene for 1 min, covered with DPX and a coverslip, and photographed under a fluorescent microscope (L5 filter to FJC and A4 filter to DAPI; DMI4000B, Leica). Slide evaluation was conducted under 20X magnification using ImageJ (Schneider et al., 2012).

2.7. Glial fibrillary acidic protein immunohistochemistry

Astrocyte activation was investigated through immunohistochemical

detection of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in free-floating sections. The sections were blocked with 1.5 % normal goat serum in 10 mM PBS containing 0.5 % Triton X for 1 h at room temperature, incubated at 4 °C for 72 h with primary antibodies raised against GFAP (1:1000; Z0334, Dako, Agilent), and washed 3 times in PBS. Following this, the sections were exposed to biotinylated goat anti-rabbit secondary antibodies (1:250, Vector Laboratories) for 1 h at room temperature. Sections were washed 3 more times and incubated with avidin-biotin horseradish peroxidase (HRP) complexes for 30 min at room temperature (1:125; PK-4001, Vector Elite ABC kit; Vector Laboratories) followed by 3 more washes. Immunoreactivity was detected using diaminobenzidine (Vector Laboratories). Sections were transferred to gelatinized glass slides, air dried, mounted with Cytoseal™ (8310-16, Thermo Fisher Scientific), and cover slipped. Slide evaluation was conducted under 20X magnification using a light microscope (DMI4000 B, Leica) and quantified in the ImageJ program.

2.8. Western blot

Western blot analyses were performed in 20 µm hippocampal sections after heat-induced antigen retrieval (Kawashima et al., 2014). In brief, 10 sections were homogenized in 10 volumes of a solution containing 300 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 2 % sodium dodecyl sulfate (SDS). Samples were incubated at 90 °C for 120 min and then centrifuged for 20 min at 16,000g at 4 °C. Protein concentration was measured using a standard BCA kit (Thermo Fisher Scientific). A 20 µg aliquot of protein was subjected to 10 % SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to 0.2 µm nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5 % (w/v) non-fat dry milk and incubated overnight with primary antibodies raised against c-FOS (1:1000; 4384, Cell Signaling Technology). After washing, the membranes were further incubated for 1 h with HRP-linked secondary antibodies (1:10000; A0545, Sigma-Aldrich) and developed for chemiluminescence (Clarity ECL, Bio-Rad) in a ChemiDoc imaging system (Bio-Rad). Protein bands corresponding to c-FOS were quantified with ImageJ (RIID: nif-0000-30467) and normalized using the Ponceau S red total protein stain (Romero-Calvo et al., 2010).

2.9. Statistical analyses

Data were analyzed by one- or two-way ANOVA, followed by post hoc analyses with a Newman-Keuls multiple comparison test. All analyses were done in GraphPad Prism version 6.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). A probability of $P < 0.05$ was considered significant. Statistical values are shown only when significant, and all data are expressed as mean \pm SEM.

3. Results

In the first experiment, we administered the Neuroscore test 48 h after pilocarpine-induced SE to evaluate the effect of SQ 29,548 injections (i.c.v.) on neuromotor performance. Pilocarpine-induced SE decreased Neuroscore [F (1,26) = 21.91; $P < 0.0001$; Fig. 1A], and post hoc analyses suggested a protective effect of SQ 29,548 (Fig. 1A). Further analyses suggested the existence of two subgroups of SQ 29,548-treated post-SE animals. In fact, 8 out of 12 SQ 29,548-receiving animals—termed SQ 29,548 responders—displayed Neuroscore values identical to those of vehicle-treated controls, indicating a high level of protection afforded by SQ 29,548 [F (2,13) = 51.46; $P < 0.0001$; Fig. 1B]. However, 4 of out of 12 SQ 29,548-treated animals did not show any improvement in Neuroscore values, and were considered SQ 29,548 non-responders. Samples from non-responders were excluded from subsequent neurochemical analyses. Notably, we detected no differences in the doses needed to induce SE [F (2,13) = 0.2846; $P = 0.7569$; Fig. 1C], suggesting that the differences in response to SQ 29,548 may be unrelated to individual sensitivity to pilocarpine.

To further investigate the neuroprotective potential of SQ 29,548

after SE-induced damage, we assessed FJC-stained neurons and GFAP immunoreactivity 48 h after pilocarpine-induced SE. The number of FJC-positive cells in the CA1 subfield [F (1,11) = 8244; $P = 0.0152$; Fig. 2A] and in the hilus of the dentate gyrus (DG) [F (1,11) = 14.46; $P = 0.0029$; Fig. 2C] were higher in post-SE animals. No changes were detected in the CA3 subfield (Fig. 2B). Post hoc analyses revealed that SQ 29,548 responders had fewer FJC-positive cells in both the CA1 subfield and the hilus of the DG than vehicle-treated post-SE animals, indicating a neuroprotective effect of SQ 29,548. SE also increased the number of GFAP-positive cells in the CA1 subfield [F (1,11) = 12.67; $P = 0.0045$; Fig. 3A], indicating astrogliosis in hippocampal formation 48 h after pilocarpine-induced SE. However, SQ 29,548 responders had GFAP-positive cell counts comparable to those of vehicle-treated controls, suggesting a neuroprotective effect of SQ 29,548 in this subset of animals. Pilocarpine-induced SE did not modify the number of GFAP-positive cells in the CA3 subfield (Fig. 3B) or the hilus of the DG (Fig. 3C). Nevertheless, SQ 29,548-treated animals had fewer GFAP-positive cells in the hilus of the DG than vehicle-treated animals [F (1,11) = 4.916; $P = 0.0486$; Fig. 3C], indicating that TP receptor antagonism reduces astrocyte activation.

Since the expression of c-Fos—an immediate expression gene involved in neuronal plasticity, cell growth, mitosis, and many neurochemical processes—is increased under robust neuronal activation, we investigated the expression pattern of c-Fos after SE and SQ 29,548 treatment. We found that pilocarpine-induced SE increased c-Fos immunoreactivity in the mice hippocampus 48 h after SE, and that this effect was blunted by the i.c.v. injection of SQ 29,548 [F (1,14) = 4.794; $P = 0.046$; Fig. 4].

4. Discussion

In the present study, we showed that a TP receptor antagonist improves neurological outcome after pilocarpine-induced SE in mice. Specifically, an i.c.v. injection of SQ 29,548 affords protection against neuromotor impairment (Neuroscore), neurodegeneration (FJC), reactive astrogliosis (GFAP), and c-Fos overexpression. Interestingly, the protective effect of SQ 29,548 on neuromotor performance appeared to be all-or-none, since 8 out of 12 animals had Neuroscore values identical to those of vehicle-treated controls (SQ 29,548 responders), while the remaining subjects did not show any improvement after SQ 29,548 treatment (non-responders). This finding is particularly interesting considering that a similar pattern of responders and non-responders to a TP receptor antagonist has been reported in previous studies. For instance, clinical data demonstrates significant variability in individual responses to Seratrodast—an orally active TP receptor antagonist that is currently prescribed for asthma therapy in Japan (Tanaka et al., 1999). In fact, during a 4-week multicenter trial, adult asthmatic patients received Seratrodast once a day and were evaluated for typical signs and symptoms of asthma. Based on the improvements of asthma symptom scores and peak expiratory flow rate, 18 out of 45 patients were classified as Seratrodast responders, while the other 27 were classified as non-responders (Tanaka et al., 1999). While the mechanisms underlying the differences between TP antagonist responders and non-responders are not clear, it is interesting that the same phenomenon was detected in completely different circumstances in two different study systems. Another point to consider is that 2 animals in the non-responder group performed worse on the Neuroscore test (score = 0) than any vehicle-treated SE animal. One mouse needed 2 pilocarpine injections to establish SE, whereas the other one needed 3 pilocarpine injections. In our view, this indicates that these two animals were not overly sensitive to the effects of pilocarpine. One possible explanation is the existence of a subgroup of SE animals that could be harmed by post-SE SQ 29,548 treatments. However, since only 2 animals (out of 12) exhibited this behavior, it is difficult to definitively confirm or refute this assumption at present.

Compelling evidence suggests that bioactive prostanoids play a role

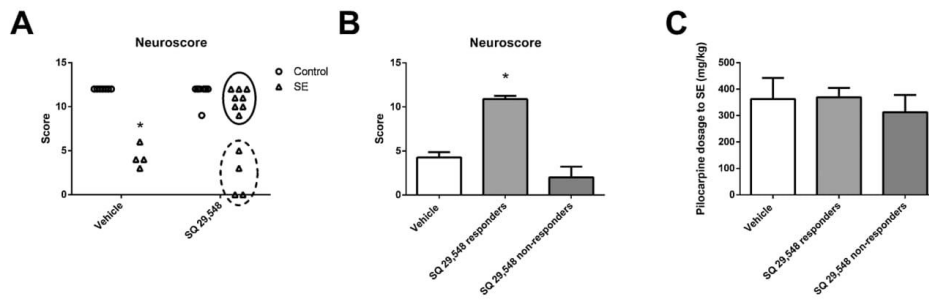


Fig. 1. Effect of intracerebroventricular injection of TP selective antagonist SQ 29,548 on neuromotor performance (Neuroscore test) 48 h after pilocarpine-induced SE. Data are shown as mean + SEM, and individual values appear as open triangles. In panel A all SQ 29,548-receiving animals were pooled together. Circled symbols depict treatment responders (solid line) and non-responders (dashed line). The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) compared to the respective control group. In panel B SQ 29,548-receiving animals were divided into responders and non-responders according to the criteria described in Material and Methods section. The amount of pilocarpine needed to induce SE in individual mice is presented in panel C. The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) from all other groups.

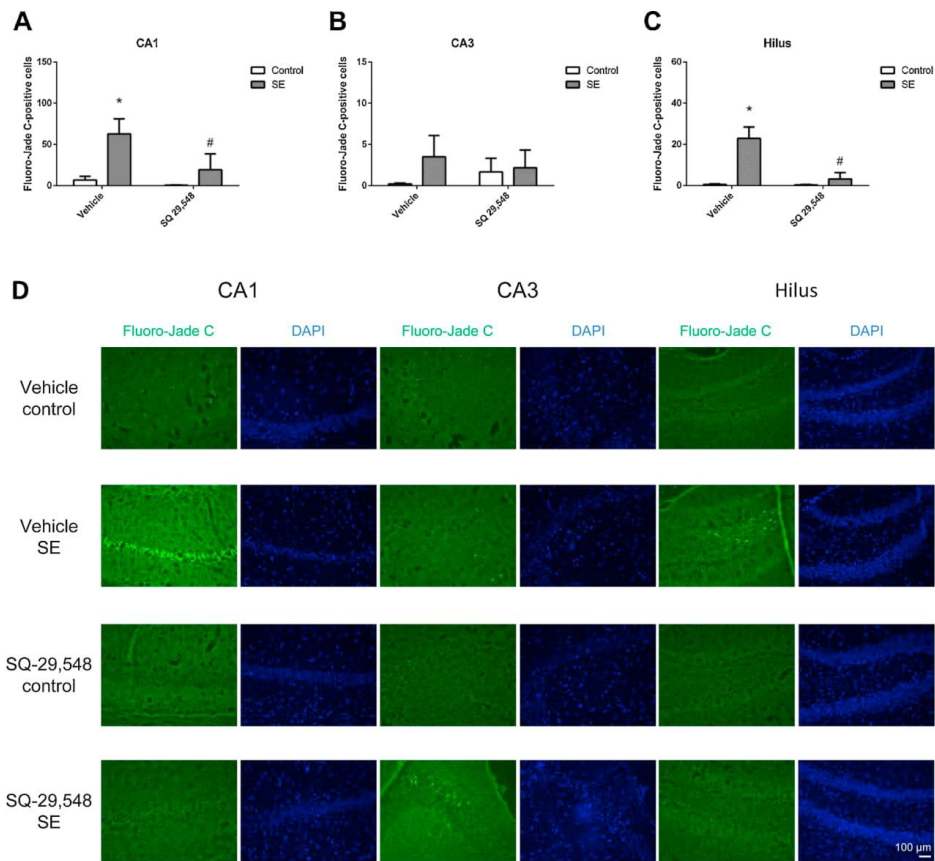


Fig. 2. Effect of intracerebroventricular injection of TP selective antagonist SQ 29,548 on neuronal degeneration in hippocampal formation 48 h after pilocarpine-induced SE. Data are shown as mean + SEM, and individual values appear as open triangles. Number of Fluoro-Jade C-positive cells in (A) CA1, (B) CA3 and (C) hilus of SQ 29,548 responders. Representative images are shown in (D). The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) from the respective control group, whereas the hashtag (#) indicates a significant difference from vehicle-treated SE animals.

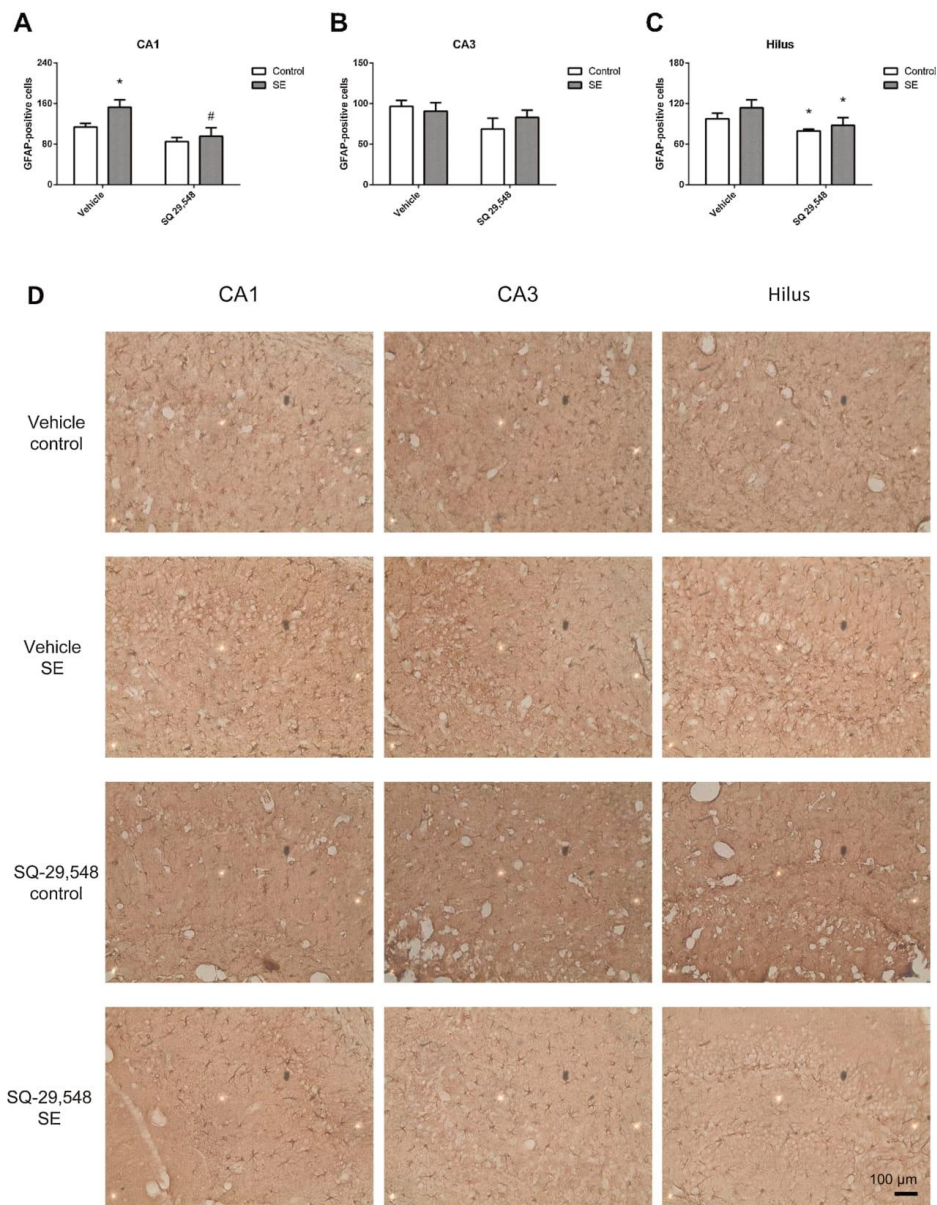


Fig. 3. Effect of intracerebroventricular injection of TP selective antagonist SQ 29,548 on astrogliosis in hippocampal formation 48 h after pilocarpine-induced SE. Data are shown as mean + SEM, and individual values appear as open triangles. Number of GFAP-positive cells in (A) CA1, (B) CA3 and (C) hilus of SQ 29,548 responders. Representative images are shown in (D). The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) from the respective control group, whereas the hashtag (#) indicates a significant difference from vehicle-treated SE animals.

in seizures and seizure-associated damage (Mello and Oliveira, 2014). However, it is unclear whether increased production and release of these inflammatory mediators cause seizures or are a consequence of seizures. Moreover, depending on the receptor and secondary

messenger pathways involved, prostanoids may facilitate, protect, or even not alter seizure-associated damage. For instance, EP1 knockout mice show reduced hippocampal neurodegeneration (as measured by Fluoro-Jade B staining) in spite of displaying similar kainate-induced SE

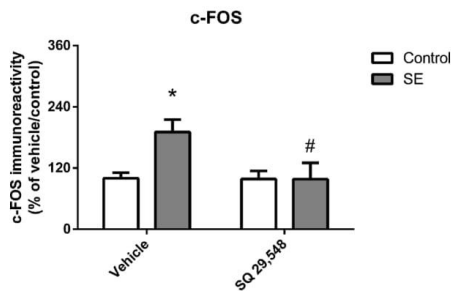


Fig. 4. Effect of intracerebroventricular injection of TP selective antagonist SQ 29,548 on c-FOS immunoreactivity in hippocampal formation 48 h after pilocarpine-induced SE. In this analysis only SQ 29,548 responders were included. Data are shown as mean \pm SEM, and individual values appear as open triangles. The asterisk indicates a significant difference ($P < 0.05$) from the respective control group, whereas the hashtag (#) indicates a significant difference from vehicle-treated SE animals.

behavioral phenotypes as wild-type mice (Rojas et al., 2014). Moreover, repeated pretreatment with SC-51089 after pilocarpine-induced SE in female Wistar Unilever rats blunted glycoprotein-P overexpression, but did not affect the loss of polymorphic neurons in the hippocampal hilus (Pekcec et al., 2009). Furthermore, studies by Jiang et al. (Jiang et al., 2012, 2013) revealed that the pharmacological blockade of EP2 receptors using small molecule antagonists of EP2 receptors decreased neurodegeneration in the hippocampal subregions CA1, CA3, and dentate hilus in animals subjected to pilocarpine-induced SE. Altogether, these results support the idea that the role of prostanoids on seizure-induced damage is complex, and may vary depending on experimental conditions such as the convulsant agent used. To the best of our knowledge, this study is the first to evaluate the role of TPs on seizure-induced damage. SQ 29,548 (i.c.v.) treatments prevented the SE-induced increase in FJC-positive cells in the CA1 subfield and hilus of the DG in SQ 29,548 responders, indicating a neuroprotective effect of the TP receptor antagonist (as detected through FJC-staining and GFAP immunohistochemistry). Moreover, the TP antagonist blunted also the SE-induced increase in the number of GFAP-positive cells in the CA1 subfield of SQ 29,548 responders, indicating the prevention of astrogliosis in the dorsal hippocampal formation. In addition, SQ 29,548 prevented the SE-elicited increase of c-Fos immunoreactivity in the hippocampus, indicating prevention of the persistent over-activation of limbic regions after SE. To some extent, our present data agree with those by Yan et al. (Yan et al., 2016), who showed that SQ 29,548 injection (i.c.v.) reduced the cerebral infarct volume, microglial/macrophage activation, and inflammatory cytokine production (IL-1 β , IL-6 and TNF- α), and alleviated the oxidative stress response after transient middle cerebral artery occlusion in mice. Of course, the mechanisms underlying brain damage after ischemia and prolonged seizure may differ, but it is remarkable that the positive effects of the TP antagonist after brain insults were detected in different experimental paradigms.

5. Conclusions

Our study revealed that SQ 29,548, a potent and selective TP antagonist, improved neurological outcome after pilocarpine-induced SE in mice. Positive effects on neuromotor function of mice revealed the existence of SQ 29,548 responders and non-responders. Further studies are needed to understand the mechanisms underlying these findings as well as the potential of TP antagonists in the treatment of seizure-induced damage.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grants #304708/2015-1 and #471666/2013-0) and from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Fapergs) (grant #2349-2551/14-5). The authors gratefully acknowledge the student fellowships from CAPES (to M.L.F., N.S.S. and V.N.Z.), CNPq/Pibic (F.K.M.) and FAPERGS/PROBIC (B.N.). A.F.F. and M.S.O. are grantees of CNPq research productivity fellowships. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001".

References

- Al-Mufri, F., Claassen, J., 2014. Neurocritical care: status epilepticus review. *Crit. Care Clin.* 30, 751–764.
- Bejtjemann, J.P., Lowenstein, D.H., 2015. Status epilepticus in adults. *Lancet Neurol.* 14, 615–624.
- Borges, K., Gearing, M., McDermott, D.L., Smith, A.B., Almonte, A.G., Wainer, B.H., Dingleline, R., 2003. Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. *Exp. Neurol.* 182, 21–34.
- Fabene, P.F., Merigo, F., Galie, M., Benati, D., Bernardi, P., Farace, P., Nicolato, E., Marzola, P., Sbarbati, A., 2007. Pilocarpine-induced status epilepticus in rats involves ischemic and excitotoxic mechanisms. *PLoS One* 2, e1105.
- Ferreira, A.P., Rodrigues, F.S., Della-Pace, L.D., Mota, B.C., Oliveira, S.M., Gewehr, V., Cde, C., Bobinski, F., de Oliveira, C.V., Brum, J.S., Oliveira, M.S., Furian, A.F., de Barros, C.S., Ferreira, J., Santos, A.R., Figuera, M.R., Royes, L.F., 2013. The effect of NADPH-oxidase inhibitor apocynin on cognitive impairment induced by moderate lateral fluid percussion injury: role of inflammatory and oxidative brain damage. *Neurochem. Int.* 63, 583–593.
- Grotticke, L., Hoffmann, K., Löscher, W., 2007. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Exp. Neurol.* 207, 329–349.
- Gualtieri, F., Curia, G., Marinelli, C., Biagini, G., 2012. Increased perivascular laminin predicts damage to astrocytes in CA3 and piriform cortex following chemoconvulsive treatments. *Neuroscience* 218, 278–294.
- Jiang, J., Ganesh, T., Du, Y., Quan, Y., Serrano, G., Qui, M., Speigel, I., Rojas, A., Lelutiu, N., Dingleline, R., 2012. Small molecule antagonist reveals seizure-induced mediation of neuronal injury by prostaglandin E2 receptor subtype EP2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 3149–3154.
- Jiang, J., Quan, Y., Ganesh, T., Pouliot, W.A., Dudek, F.E., Dingleline, R., 2013. Inhibition of the prostaglandin receptor EP2 following status epilepticus reduces delayed mortality and brain inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 3591–3596.
- Kawashima, Y., Koda, Y., Singh, A., Matsumoto, M., Matsumoto, H., 2014. Efficient extraction of proteins from formalin-fixed paraffin-embedded tissues requires higher concentration of tris(hydroxymethyl)aminomethane. *Clin. Proteomics* 11, 4.
- Meierkord, H., 2007. The risk of epilepsy after status epilepticus in children and adults. *Epilepsia* 48 (Suppl. 8), 94–95.
- Mello, C.F., Oliveira, M.S., 2014. Commentary on Kaushik et al.: prostaglandin D2 is crucial for seizure suppression and postictal sleep. Novel evidence supporting a role for prostanoid receptors in seizure control. *Exp. Neurol.* 257, 157–161.
- Nakahata, N., 2008. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. *Pharmacol. Ther.* 118, 18–35.
- Paxinos, K.B.F., George, 2007. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*, third edition ed. .
- Pekcec, A., Unkrue, B., Schlichtiger, J., Soerensen, J., Hartz, A.M., Bauer, B., van Vliet, E.A., Gorter, J.A., Potschka, H., 2009. Targeting prostaglandin E2 EP1 receptors prevents seizure-associated P-glycoprotein up-regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 330, 939–947.
- Peng, W.F., Ding, J., Li, X., Fan, F., Zhang, Q.Q., Wang, X., 2016. N-methyl-D-aspartate receptor NR2B subunit involved in depression-like behaviours in lithium chloride-pilocarpine chronic rat epilepsy model. *Epilepsy Res.* 119, 77–85.
- Rojas, A., Gueorgueva, P., Lelutiu, N., Quan, Y., Shaw, R., Dingleline, R., 2014. The prostaglandin EP1 receptor potentiates kainate receptor activation via a protein kinase C pathway and exacerbates status epilepticus. *Neurobiol. Dis.* 70, 74–89.
- Romero-Calvo, I., Ocaín, B., Martínez-Moya, P., Suárez, M.D., Zarzuelo, A., Martínez-Angustín, O., de Medina, F.S., 2010. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal. Biochem.* 401, 318–320.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* 9, 671–675.
- Tanaka, H., Igarashi, T., Saitoh, T., Teramoto, S., Miyazaki, N., Kaneko, S., Ohmichi, M., Abe, S., 1999. Can urinary eicosanoids be a potential predictive marker of clinical response to thromboxane A2 receptor antagonist in asthmatic patients? *Respir. Med.* 93, 891–897.
- Trinka, E., Cock, H., Hesdorffer, D., Rossetti, A.O., Scheffer, L.E., Shinnar, S., Shorvon, S., Lowenstein, D.H., 2015a. A definition and classification of status epilepticus—report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia* 56, 1515–1523.
- Trinka, E., Hofler, J., Leitinger, M., Brigo, F., 2015b. Pharmacotherapy for status epilepticus. *Drugs* 75, 1499–1521.
- Wang, L., Liu, Y.H., Huang, Y.G., Chen, L.W., 2008. Time-course of neuronal death in the mouse pilocarpine model of chronic epilepsy using Fluoro-Jade C staining. *Brain Res.* 1241, 157–167.
- Yan, A., Zhang, T., Yang, X., Shao, J., Fu, N., Shen, F., Fu, Y., Xia, W., 2016. Thromboxane A2 receptor antagonist SQ29548 reduces ischemic stroke-induced microglia/macrophages activation and enrichment, and ameliorates brain injury. *Sci. Rep.* 6, 35885.

4 CONCLUSÃO

O tratamento com SQ 29,548 apesar de não evitar completamente os danos causados pelo SE, demonstrou proteger contra danos neuromotores, morte celular e astrogliose causadas pelo SE, embora não seja possível identificar um efeito modificador da doença a longo prazo devido ao uso de um protocolo agudo. O antagonista do receptor TP demonstra ser benéfico no período inicial após o SE, contudo mais estudos em modelos crônicos devem ser feitos para avaliar o seu potencial uso na clínica.

5 REFERÊNCIAS

ANDRADE-VALENÇA, L. P. A. et al. Epilepsia do lobo temporal mesial associada à esclerose hipocampal. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, v. 12, p. 31-36. Dec 2006. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/jecrn/v12n1/a07v12n1>>

BANKSTAHL, J. P. et al. A novel positron emission tomography imaging protocol identifies seizure-induced regional overactivity of p-glycoprotein at the blood-brain barrier. **J Neurosci**, v. 31, p. 8803-8811. Jun 2011. Disponível em: < <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6616-10.2011>>

BAUER, B. et al. Seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier through glutamate and cyclooxygenase-2 signaling. **Mol Pharmacol**, v. 73, n. 5, p. 1444-53, May 2008. ISSN 0026-895x. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18094072>>

BRASIL. Ministério da saúde. **Relatório de recomendação: Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para epilepsia**. Mar 2019. Disponível em: < http://conitec.gov.br/images/Consultas/Relatorios/2019/Relatorio_PCDT_Epilepsia_C_P13_2019.pdf>

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman e Gilman**. 12^a ed. Porto Alegre. AMGH, 2012.

BURMAN, R. J. et al. Excitatory GABAergic signalling is associated with acquired benzodiazepine resistance in status epilepticus. **Brain**, v. 11, p. 3482-3501. Nov 2019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31553050>>

CAVALHEIRO E. A. The pilocarpine model of epilepsy. **Ital. J. Neurol. Sci.**, v. 16, n 1-2, p. 33-7, Feb-Mar 1995. ISSN 0392-0461 (Print) 0392-0461 Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7642349>

CAVALHEIRO E. A. et al. **Models of Seizures and Epilepsy**, Cap. 35: The Pilocarpine Model of Seizures. Elsevier, 2006.

COULTER, D. A; EID, T. Astrocyt regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. **Glia**, v. 60, p. 1215-1226. May 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3375386/>>

CURIA, G. et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **J Neurosci Methods**, v. 172, p. 143-57. Jul 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2518220/>>

DAIGEN, A. et al. Long-lasting enhancement of the membrane-associated protein kinase C activity in the hippocampal kindled rat. **Jpn J Psychiatry Neurol.**, v.45, p. 297-301. Jun 1991. Disponível em: <doi: 10.1111/j.1440-1819.1991.tb02475.x>.

DEVINSKY, O. et al. Reconizing and preventing epilepsy-related mortality: A call for action. **Neurology**, v 86, p. 779-86, Feb 23 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26674330>>

EID, T. et al. Regulation of Astrocyte Glutamine Synthetase in Epilepsy. *Neurochem. Int.*, v.7, p. 670-81. Dec 2013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23791709>>

ENGEL, J. Mesial temporal lobe epilepsy: what have we learned? **The Neuroscientist: a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry**, v. 7, n. 4, p. 340–52, ago. 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11488399>>

FISHER, R. S. et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475-82, Apr 2014. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24730690>>

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**, v. 58, n. 4, p. 522-530, Apr 2017. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28276060>>

FREITAS, M. L. et al. Anticonvulsant-like effect of thromboxane receptor agonist U-46619 against pentylentetrazol-induced seizures. **Epilepsy Res**, v. 146, p. 137-143, Oct 2018. ISSN 0920-1211. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30153647>>

FUORTES, M. G., FARIA, L. C., MERLIN L., R. Impact of protein kinase C activation on epileptiform activity in the hippocampal slice. **Epilepsy Res**. V. 82, p. 38-45. Ago 2008. Disponível em: <10.1016/j.epilepsyres.2008.07.002>

GOLDBERG, E. M.; COULTER, D. A. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 5, p. 337-49, May 2013. ISSN 1471-003X (Print) 1471-003x. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23595016>>

HSU, K. S.; KAN, W. M. Thromboxane A2 agonist modulation of excitatory synaptic transmission in the rat hippocampal slice. **Br J Pharmacol**, v. 118, n. 8, p. 2220-7, Aug 1996. ISSN 0007-1188 (Print) 0007-1188. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8864565>>

JONES, S. et al. A protocol for the in-hospital emergency drug management of convulsive status epilepticus in adults. *Pract Neurol.*, v. 3, p. 194-7. Jun 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24810377>>

KIM, H. J. et al. Involvement of endogenous prostaglandin F2 α on kainic acid-induced seizure activity through FP receptor: the mechanism of proconvulsant effects of COX-2 inhibitors. **Brain Res**, v. 1193, p. 153-61, Feb 8 2008. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18178179>>

MELE, M.; COSTA, R. O.; DUARTE, C. B. Alterations in GABAA-receptor trafficking and synaptic dysfunction in brain disorders. **Front. Cell. Neurosc.**, v. 13, p. 13-77. Mar

2019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6416223/>>

MENDES, N. F. et al. The Blood-Brain Barrier Breakdown During Acute Phase of the Pilocarpine Model of Epilepsy Is Dynamic and Time-Dependent. **Front. Neurol.**, v. 10 Apr 2019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31040818>>

MILATOVIC, D. et al. Prostanoid signaling: dual role for prostaglandin E2 in neurotoxicity. **Neurotoxicology.**, v. 3, p. 312-9. Jun 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376752>

MOSHE, S. L. et al. Epilepsy: new advances. **Lancet**, v. 385, n. 9971, p. 884-98, Mar 7 2015. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25260236>>

NAKAHATA, N. Thromboxane A2: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. **Pharmacol Ther**, v. 118, n. 1, p. 18-35, Apr 2008. ISSN 0163-7258 (Print) 0163-7258. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18374420>>

NOEBELS, J. L. **Jasper's basic mechanisms of epilepsies [internet]**. 4.ed. Bethesda (MD): National center for biotechnology information (US)

OLIVEIRA, M. S. et al. Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylentetrazol-induced seizures. **Epilepsy Res**, v. 79, n. 1, p. 14-21, Mar 2008. ISSN 0920-1211 (Print) 0920-1211. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18255268>>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Epilepsy: Key facts**. 20 de junho de 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>> Acesso em 10 de outubro de 2019.

RANG, H. P. et al. **Rang e Dale Farmacologia**. 6 ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2007.
REBEL, A. A. et al. Brain changes associated with thromboxane receptor antagonist SQ 29,548 treatment in a mouse model. **J Neurosci Res**, v. 93, n. 8, p. 1279-92, Aug 2015. ISSN 0360-4012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25703023>>

RUMIA, J. et al. Eicosanoid levels in the neocortex of drug-resistant epileptic patients submitted to epilepsy surgery. **Epilepsy Res**, v. 99, n. 1-2, p. 127-31, Mar 2012. ISSN 0920-1211. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22104086>>

SCHEFFER, I. E. et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 512-521, Apr 2017. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28276062>>

SEIDENBERG, M.; PULSIPHER, D. T.; HERMANN, B. Association of epilepsy and comorbid conditions. **Future Neurol**, v. 4, n. 5, p. 663-668, Sep 1 2009. ISSN 1479-6708 (Print 1479-6708. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2802344/>>

SHINNAR, S. et al. How long do new-onset seizures in children last? *Ann Neurol*, v.49, p.659-64. Mai 2001. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11357957/>

SOPER, J. H. et al. Brain-penetrant tetrahydronaphthalene thromboxane A2-prostanoid (TP) receptor antagonists as prototype therapeutics for Alzheimer's disease. *ACS Chem Neurosci*, v. 3, n. 11, p. 928-40, Nov 21 2012. ISSN 1948-7193. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23173073>>

STALEY, K. Molecular mechanisms of epilepsy. *Nat Neurosci*, v.3, p. 367-73. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4409128/>>

TREIMAN, D. M. GABAergic Mechanisms in Epilepsy. *Epilepsia*, v.42, p. 8-12. Dez 2001. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1528-1157.2001.042suppl.3008.x>>

TRINKA, E. et al. A definition and classification of status epilepticus--Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*, v. 56, n. 10, p. 1515-23, Oct 2015. ISSN 0013-9580. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26336950>>

TRINKA, E. et al. Pharmacotherapy for Status Epilepticus. *Drugs*, v.13, p. 1499-521. Sep 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26310189>>

TURSKI, W. A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res*, v.9, n. 3, p. 315-35. Sep 1983. ISSN 0166-4328. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6639740>>

VAN VLIET, E. A. et al. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain*, v. 130, n. Pt 2, p. 521-34, Feb 2007. ISSN 0006-8950. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17124188>>

VAN VLIET, E. A. et al. Blood-brain barrier dysfunction, seizures and epilepsy. *Semin Cell Dev Biol.*, v.38, p. 26-34. Feb 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25444846>>

VEZZANI, A. et al. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol*, v. 7, n. 1, p. 31-40, Jan 2011. ISSN 1759-4758. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21135885>>

VEZZANI, A.; FRIEDMAN, A.; DINGLEDINE, R. J. The role of inflammation in epileptogenesis. *Neuropharmacology*, v. 69, p. 16-24, Jun 2013. ISSN 0028-3908. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22521336>>

ZALONIS, I. et al. Verbal and Figural Fluency in Temporal Lobe Epilepsy: Does Hippocampal Sclerosis Affect Performance? *Cogn Behav Neurol*, v. 30, n. 2, p. 48-56, Jun 2017. ISSN 1543-3633. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28632521>>

YAN, A. et al. Thromboxane A2 receptor antagonist SQ 29,548 reduces ischemic stroke-induced microglia/macrophages activation and enrichment, and ameliorates

brain injury. **Nat. Sci. Rep.** Oct 2016. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27775054>>

ANEXO A



Comissão de Ética no Uso de Animais

da
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O papel dos receptores de tromboxanos (TP) em crises epiléticas e em diferentes modelos de epilepsia", protocolada sob o CEUA nº 5250180515 (ID 000389), sob a responsabilidade de **Mauro Schneider Oliveira e equipe; Mayara Lutchemeyer de Freitas; Ana Cláudia Beck Grauncke; Thaíze Lopes de Souza** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 09/07/2015.

We certify that the proposal "The role of thromboxane receptors (TP) in seizures in different models of epilepsy", utilizing 400 Isogenics mice (400 females), protocol number CEUA 5250180515 (ID 000389), under the responsibility of **Mauro Schneider Oliveira and team; Mayara Lutchemeyer de Freitas; Ana Cláudia Beck Grauncke; Thaíze Lopes de Souza** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 07/09/2015.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [06/2015](#) a [06/2019](#)

Área: [Fisiologia E Farmacologia](#)

Origem: [Biotério Central UFSM](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [60 a 60 dias](#)

N: [400](#)

Linagem: [C57BL/6](#)

Peso: [20 a 25 g](#)

Local do experimento: Os experimentos propostos serão realizados em dois laboratórios no prédio 21 do Campus sede da Universidade Federal de Santa Maria: Sala 5219 (prédio 21) e Sala 5214 (prédio 21) Além disso, a equipe executora possui acesso à estrutura multiusuária, bem como o biotério de experimentação animal do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFSM.

Santa Maria, 10 de fevereiro de 2020

Profa. Dra. Patrícia Severo do Nascimento
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

ANEXO B – LICENÇA DE REPRODUÇÃO DO ARTIGO



RightsLink®



Home



Help



Email Support



Sign in



Create Account



Neuroprotective effects of thromboxane receptor antagonist SQ 29,548 after pilocarpine-induced status epilepticus in mice

Author:

Fernanda Kulinski Mello, Mayara Lütchemeyer Freitas, Naieli Schiefelbein Souto, Viviane Nogueira Zorzi, Michele Pereira Moreira, Bruna Neuberger, Karine Gabriela Costa, Michele Rechia Figuera, Luiz Fernando Royes, Ana Flávia Furian, Mauro Schneider Oliveira

Publication: Epilepsy Research

Publisher: Elsevier

Date: February 2020

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

Please note that, as the author of this Elsevier article, you retain the right to include it in a thesis or dissertation, provided it is not published commercially. Permission is not required, but please ensure that you reference the journal as the original source. For more information on this and on your other retained rights, please visit: <https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright#Author-rights>

BACK

CLOSE WINDOW