

**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 E₂**

Santa Maria, RS
2018

Viviane Nogueira de Zorzi

**EFEITO DO FLAVONOIDE GALANGINA
SOBRE A SUSCEPTIBILIDADE ÀS CONVULSÕES INDUZIDAS POR
PENTILENOTETRAZOL NA PRESENÇA DE PROSTAGLANDINA E₂**

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^a. Dr^a. 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.

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

Viviane Nogueira de Zorzi

**EFEITO DO FLAVONOIDE GALANGINA
SOBRE A SUSCEPTIBILIDADE ÀS CONVULSÕES INDUZIDAS POR
PENTILENOTETRAZOL NA PRESENÇA DE PROSTAGLANDINA E₂**

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**

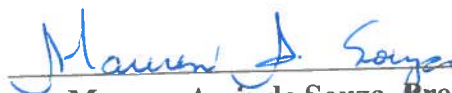
Aprovada em 24 de março de 2018:



Michele Rechia Figuera, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Clarissa Vasconcelos de Oliveira, Dra. (UFSM)



Mauren Assis de Souza, Prof. Dra. (UFPel)

Santa Maria, RS

2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, especialmente a minha melhor amiga e conselheira, minha mãe Eloci, por todo apoio e amor incondicional. Dedico também à minha tia Leci e avó Augusta, que infelizmente não estão mais entre nós, mas se faz necessário pelo carinho e incentivo recebido, que me mantém forte até hoje.

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^a. Dr^a. 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!

O conhecimento serve para encantar as pessoas,
não para humilhá-las.

(Mário Sérgio Cortella)

RESUMO

EFEITO DO FLAVONOIDE GALANGINA SOBRE A SUSCEPTIBILIDADE ÀS CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL NA PRESENÇA DE PROSTAGLANDINA E₂

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 suscetibilidade às crises epiléticas, uma vez que existe pronunciada expressão de mediadores inflamatórios, como a prostaglandina E₂ (PGE₂) durante as crises. Como demonstrado, a PGE₂ 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 PGE₂ 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 PGE₂, poderia apresentar atividade anticonvulsivante neste estudo. Para isso, no experimento 1, os camundongos foram injetados com PGE₂ (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 PGE₂, e quinze minutos após injeção de PGE₂, os camundongos foram injetados com PTZ, nas mesmas doses. Nossos resultados mostraram que o grupo tratado com PGE₂ 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 PGE₂ ou PGE₂ e PTZ em combinação aumentou o imunoconteúdo 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-PKAIIa (proteína cinase dependente de AMPc- fosforilada). No entanto, nem o tratamento com PGE₂ ou com PTZ alterou o imunoconteúdo dos receptores de PGE₂ (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 imunoconteúdo da VCAM-1 e o estado de fosforilação da enzima PKAIIa induzidos por PGE₂/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 PGE₂ e PTZ. No entanto, estudos adicionais são necessários para investigar as implicações clínicas desses achados e seus mecanismos subjacentes.

Palavras-chave: Neuroinflamação. Prostaglandina E₂. Susceptibilidade. Crises epiléticas. Galangina. Córtex cerebral.

ABSTRACT

EFFECT OF FLAVONOID GALANGIN ON SUSCEPTIBILITY TO SEIZURES PENTYLENETETRAZOLE- INDUCED IN PRESENCE PROSTAGLANDIN E₂

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 E₂ (PGE₂) during seizures. The PGE₂ has been demonstrated to stimulate the release of glutamate and to inhibit Na⁺ K⁺ -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 PGE₂ 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 PGE₂, could have anticonvulsive activity in this study. For this, in the experiment 1, the mice were injected with PGE₂ (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 PGE₂ injection, fifteen minutes later were injected with PTZ, in the same doses. Our results showed that the group treated com PGE₂ 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 PGE₂ or PGE₂ 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 α (phosphorylated cAMP-dependent protein kinase) immunocontents. However, nor PTZ or PGE₂ treatment changed the immunocontent of receptors of PGE₂ (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 α induced by PGE₂/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 PGE₂ and PTZ. However, further studies are needed to investigate the clinical implications of these findings and their underlying mechanisms.

Keywords: Neuroinflammation. Prostaglandin E₂. 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 design58

Figure 3- Effect of administration of PGE₂ (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 PGE₂ (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 PGE₂ (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 PGE₂ (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 PGE₂ (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 PGE₂ (E), PTZ (F), PGE₂ + PTZ (G) and Galangin + PGE₂ + 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) PGE₂ and/or PGE₂/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) PGE₂ or PGE₂/PTZ induced...62

Figure 10- Effect of Galangin administration (30 mg/kg, i.p.) on the increase phosphorylation at Ser96 of PKA II α subunit PGE ₂ /PTZ induced.....	63
Table 1- Effects of acute administration of PGE ₂ 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 ₂ O ₂	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 Microssomal
NMDA	N-metil D-Aspartato
OMS	Organização Mundial da Saúde
PGD ₂	Prostaglandina D2
PGE ₂	Prostaglandina E2
PGF α	Prostaglandina F2 α
PGG ₂	Prostaglandina G2
PGH ₂	Prostaglandina H2
PGI ₂	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

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	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
3	OBJETIVO	31
3.1	OBJETIVO GERAL.....	32
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	32
4	ARTIGO CIENTÍFICO	33
4.1	MANUSCRITO	35
5	CONCLUSÃO	64
	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS	67
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	87

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 E₂ (PGE₂) 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 PGE₂ 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 PGE₂ 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 PGE₂ (10ng/2 µl, intracerebroventricular). No entanto, apesar do papel importante da PGE₂ 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-trihidroxiflavona) 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 PGE₂ (RASO et al., 2001; O'LEARY et al., 2004; HONMORE et al., 2016) e mostrou efeitos protetores em modelos de nocicepção induzida por PGE₂ 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 PGE₂ 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, ἐπι (epi = em cima e lepsē = 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 micrógliia, os conhecidos “macrófagos residentes” do SNC (RANSOHOFF e PERRY, 2009). As células microgiliais 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 microgлияis 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 microgлияis 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 microgлияl, incluindo o modelo experimental por pilocarpina (SHAPIRO et al., 2008), por abrasamento (BONDE et al., 2006) bem como por injeção de ácido caínico (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).

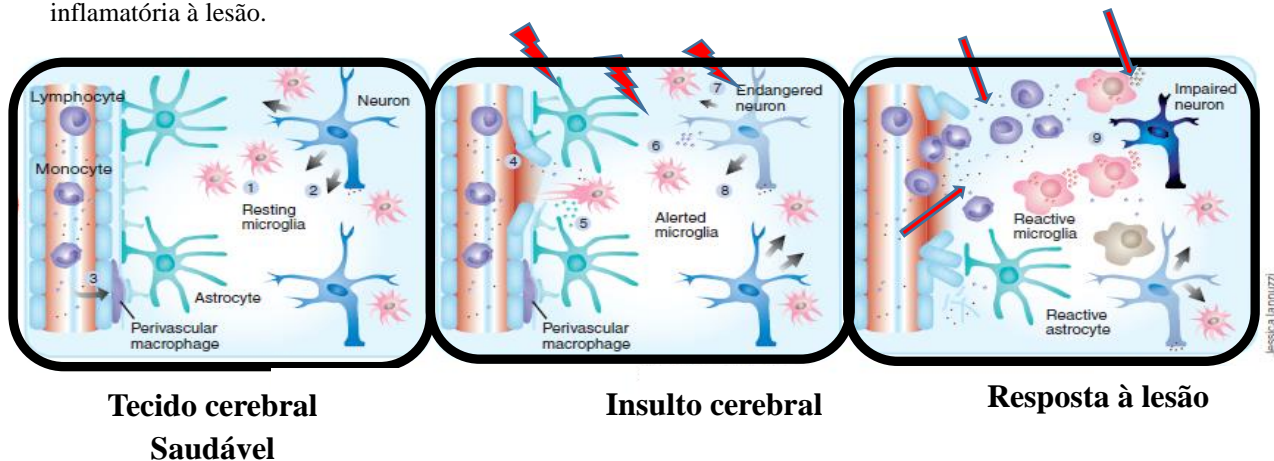
Paralelamente, o aumento do número de astrócitos também constitui um componente da neuroinflamação, sendo frequentemente uma característica da epilepsia do lobo temporal mesial e da maioria dos modelos animais de crises epilépticas (WETHERINGTON et al., 2008). Neste contexto, os astrócitos são células gлияis 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-existent (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) (Figura 1).

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

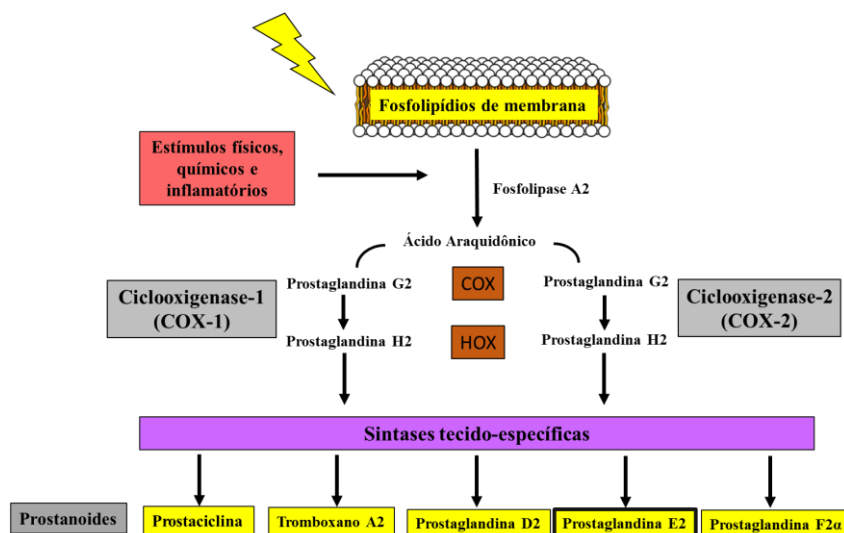
induz atividade epileptiforme (FABENE et al., 2008). De fato, os mecanismos subjacentes não são totalmente elucidados (LOSSINSKY e SHIVERS, 2004). Estes dados em conjunto, indicam uma associação estreita entre inflamação no sistema nervoso central e ocorrência de crises, e que mediadores da inflamação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



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 E₂, 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 PGE₂ 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 epilépticas e na epilepsia, tem recebido muita atenção desde a descoberta que as crises epilépticas 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 supreexpressão da enzima COX-2 tanto em pacientes epilépticos 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 epilépticas 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 Na⁺/ 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_A (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 EPILÉPTICAS

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 imunocontéudo 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 imunocontéudo 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.
-

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Os materiais e métodos, assim como resultados e a discussão que fazem parte desta dissertação estão apresentados na forma de artigo científico, este está intitulado como “*Galangin prevents the increase of susceptibility to pentylenetetrazol-induced seizures by prostaglandin E2-stimulated*”, foi submetido para revista *Molecular Neurobiology*.

Os procedimentos experimentais do presente artigo científico iniciaram-se após a obtenção da carta de aprovação do CEUA (comitê de ética na utilização de animais) da Universidade Federal de Santa Maria (ANEXO A).

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

Viviane Nogueira de Zorzi^{a,b,c}, Fernanda Hauptenthal^{a,b}, Alexandra Seide Cardoso^{a,b}, Gustavo Cassol^b, Valdir A. Facundo^d, Laudir J. Bállico^d, Daniella K.S. Lima^{d,e}, Adair Roberto Soares Santos^e, Ana Flavia Furian^f, Mauro Schneider Oliveira^f, Luiz Fernando Freire Royes^{b,c}, Michele Rechia Fighera^{a,b,c*}

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

^b Laboratório de Bioquímica do Exercício, Centro de Educação Física e Desportos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

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

^d Departamento de Química, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil

^e Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^f 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^a. 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

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 E₂ (PGE₂) during seizures. The purpose of the present study was to investigate whether PGE₂ 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 PGE₂ 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 PGE₂ 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 α (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 α induced by PGE₂/PTZ. Then, this study suggests that galangin presented anticonvulsive and anti-inflammatory activities against the behavioral and neurochemical changes induced by administration of PGE₂ and PTZ. However, further studies are needed to investigate the clinical implications of these findings and their underlying mechanisms.

Keywords: neuroinflammation, prostaglandin E₂, 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 PGE₂ 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 PGE₂ production is responsible for the regulation of neuronal excitability [19]. Once produced by COX-2, the PGE₂ interacts with G-protein coupled receptors, which exhibits differences in signal transduction [20]. However, despite the important role of PGE₂ 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 PGE₂ 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 PGE₂ [10 ng/2 µl, intracerebroventricular (i.c.v.)] [24]. These results corroborate the idea that inflammatory mediators such as PGE₂ 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 PGE₂ 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 PGE₂ 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 ± 1 °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 E₂ 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 ¹H NMR, ¹³C 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 E₂ 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 E₂ [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 PGE₂ (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 PGE₂ (100ng/2μL). 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 E₂ 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 E₂ (100 ng/2 μ 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 (≥ 1.5 x baseline); multiple sharp waves (≥ 2 x baseline) in brief spindle episodes (≥ 1 s and ≤ 5 s); multiple sharp waves (≥ 2 x baseline) in long spindle episodes (≥ 5 s); spikes (≥ 2 x baseline) plus slow waves; multispikes (≥ 2 x baseline, ≥ 3 spikes/complex) plus slow waves; and major seizure (repetitive spikes plus slow waves obliterating background rhythm, ≥ 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 °C. The protein concentration of each sample was determined by the bicinchoninic acid protein assay (Termo Fisher Scientific). Samples (20 μ 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°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 α (phosphorylated protein kinase C) (1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-PKC α (protein kinase C) (1:5000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-phospho-PKA RII α (phosphorylated cAMP-dependent protein kinase) (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), rabbit anti-total-PKA RII α (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 α , anti-phospho-PKA RII α and 1:10.000 anti-GFAP, anti-PKC α and anti-PKAII α 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.

Results

Effect of acute administration of prostaglandin E₂ on susceptibility to seizures induced by PTZ

Clinical and animal experiments studies have showed the production of PGE₂ after seizure [44]; [45]; [23]. Thus, we decide to investigate if PGE₂ administration would increase the susceptibility to seizures induced by PTZ. In this context, statistical analysis (two-way analysis of variance - ANOVA) revealed that acute treatment with PGE₂ (100ng/2μl i.c.v.) and subeffective dosage PTZ (35 mg/kg) were able to decrease the latency period for both the first myoclonic jerk [F(1,24)= 9.307; p<0.006; Fig. 3A] and first generalized tonic–clonic seizure [F(1,24)=14.36,p<0.01; Fig. 3B]. The same treatment also increased the time spent in generalized tonic–clonic seizure [F(1,24)= 9.535; p<0.006; Fig. 3C] and score on Racine's scale [F(1, 24)= 6.21; p=0.02, figure 3D] when compared with saline group.

Furthermore, quantification electroencephalographic revealed that acute administration of PGE₂ alone (100ng/2μl i.c.v.) induced increase brain wave amplitude [F(1,24)= 43.62; p<0.0001; Fig. 3E and 7E] when compared with saline group. Furthermore, statistical analysis demonstrate that the treatment with PGE₂/PTZ increased the occurrence of EEG activity when compared with PGE₂ alone [F(1,24)= 6.029 ; p<0.01; Fig. 3E and 7G]. These seizures were characterized by the occurrence of multispikes plus slow waves and major seizure activity (Fig. 7G). There was no difference on basal amplitude of the animals (data not show).

Effect of acute administration of prostaglandin E₂ on microglial and astrocytic markers

Since numerous studies have found association between neuroinflammatory processes and increased cerebral excitability. [12]; [46]; [9]; [47]; [48]. So, we investigated whether the acute administration of PGE₂ and/or PGE₂ plus PTZ would change microglial and astrocytic response. Statistical analysis revealed that both PGE₂ [F(1,25)= 40.24; p<0.0001] and PTZ [F(1, 25)= 10.33; p<0.004] increased the immunoreactivity of IBA-1 in cerebral cortex when compared with saline group. In addition, there was significant interaction [F(1, 25)= 6; p<0.03; Fig. 4A] in the group treated with PGE₂/PTZ when compared with PTZ and saline group. In this report, we also determined for Western Blot analysis the immunoreactivity of GFAP. The statistical analysis showed an increase of the GFAP in PGE₂/PTZ group [F(1, 27)= 5.096; p<0.04; Fig. 4B] when compared with saline.

Effect of acute administration of prostaglandin E₂ on vascular adhesion and oxidative stress

Considering that oxidative stress and changed permeability of BBB facilitates the appearance and/or propagation of seizures [49]; [50]; [51]; [10], we investigated whether the acute administration of PGE₂ and PGE₂/PTZ cause lipid peroxidation (4-HNE immunoreactivity). Statistical analysis revealed significant increase in the 4-HNE immunoreactivity in the PGE₂/PTZ treated animals when compared with saline group [F(1, 23)= 20.04; p<0.0003; Fig 5A]. Similarly, statistical analysis demonstrated that PGE₂/PTZ treatments increased immunoreactivity of VCAM-1 when compared to saline group [F(1, 23) = 13.29; p<0.002; Fig. 5B].

Effect of acute administration of prostaglandin E₂ on EP receptors and PKA state phosphorylation

Since acute administration of PGE₂ potentiated the effect of a sub-effective dose of PTZ causing seizure, we decided to assess whether this effect could be due the change in immunocontent of its receptors. Statistical analysis revealed that no one treatment altered EP1 immunoreactivity [F(1,23)= 0.7524; p=0.3947; Fig. 6A], EP2 immunoreactivity [F(1, 25)= 2.077; p=0.1619; Fig. 6B] or EP3 immunoreactivity [F(1, 24)= 2.547; p=0.1236; Fig. 6C].

Activation of the protein kinase A enzyme has been related to cerebral hyperexcitability in acute seizure models [52]; [53] and is downstream of the activation cascade of EP2 and EP4 receptor [20]. Therefore, we decided to evaluate its state of phosphorylation in this model. Statistical analyzes showed a significant interaction between PGE₂/PTZ treatment [F(1, 28)= 4.604; p<0.05; Fig. 6D] on PKA immunoreactivity when compared with saline group, evidenced by an increase in phosphorylation at Ser96 of PKA II α subunit.

Effect of flavonoid galangin on the susceptibility to seizures

There are some evidences about anticonvulsant effect of some flavonoid compounds [54]; [35]; [55], we evaluated the effect of galangin (30mg/kg; i.p.) on the susceptibility to seizures induced by PGE₂/PTZ. Statistical analysis (Three-way ANOVA) revealed that pretreatment with galangin increased the latency period for both: the first myoclonic jerk [F(1,51)= 5.04; p<0.03; Fig. 7A] and the first generalized tonic-clonic seizure [F(1,51)= 4.27; p=0.05; Fig. 7B] as well as decreased time spent in generalized tonic-clonic seizure [F(1,51)= 6.96 p<0.02, Table 1] when compared to PGE₂/PTZ group. Moreover, post hoc analyzes revealed that pretreatment with galangin decreased score on Racine's scale [F(7,52)= 8.23; p<0.0002; Fig 7C] when compared to PGE₂/PTZ group.

Furthermore, quantification electroencephalographic revealed that pretreatment with galangin decreased the occurrence of EEG seizure activity induced by PGE₂ [F(1,51)= 9.46; p<0.001]. Post hoc analyzes demonstrated that the compound also protected of the increase of wave amplitude [F(7,51)= 20; p<0.002; Fig 7D and 7H] when compared to PGE₂/PTZ group. There was no difference on basal amplitude of the animals (data not show).

Effect of flavonoid galangin on microglial and astrocytic markers

Considering that *Piper Aleyreanum* demonstrated satisfactory results in nociception models induced by inflammatory components [56], we decided to verify whether the galangin pretreatment could alter inflammatory state induced by PGE₂, characterized here by IBA-1 and GFAP immunoreactivity. The results revealed that galangin was able to prevent the increase of IBA-1 immunoreactivity [F(1,40)= 4.96; p<0.04; Fig. 8A] when compared with PGE₂/PTZ group. Furthermore, the compound prevented the increase of GFAP immunoreactivity [F(1,52)= 4.38; p<0.004]. Post hoc statistical analyses showed that galangin administration decreased GFAP when compared in PGE₂ and PGE₂/PTZ groups [F(7,52)=3.94; p<0.003; Fig 8B].

Effect of flavonoid galangin on oxidative stress and vascular adhesion

Statistical analysis showed that galangin prevented the increase of 4-HNE immunoreactivity induced by PGE₂/PTZ [F(1,40)= 8.77; p<0.006]. Moreover, post hoc analyzes also showed that compound administration decreased 4-HNE immunocontent when compared with PGE₂/PTZ group [F(7,40)= 5.98; p<0.001; Fig. 9A]. Furthermore, statistical analysis revealed that galangin prevented the increase of VCAM-1 immunoreactivity [F(1,50)=13.57; p<0.002]. The post hoc analyzes showed that flavonoid galangin decreased VCAM-1 immunoreactivity when compared with PGE₂ and PGE₂/PTZ groups [F(7,50)=4.10; p<0.002] Fig.9B].

Effect of flavonoid galangin on increase PKA phosphorylation

As seen earlier in this study, administration of PGE₂ 15 minutes before PTZ caused an increase in phosphorylation state of that PKA enzyme. In this way, we evaluated the effect of galangin pretreatment on the activation state of this enzyme. In this context, post hoc analysis revealed that galangin was able to prevent the increase of PKA II α subunit immunoreactivity, evidenced by a decreased in phosphorylation at Ser96 of PKA II α subunit [F(7,53)= 4.46; p<0.002; Fig. 10] when compared with PGE₂/PTZ group.

Discussion

Evidences for an inflammatory role in human epilepsy has led to research putative triggers of brain inflammation in epilepsy and to provide mechanistic insights into the causal links between inflammation and seizures [9]. In this work, we investigated the effect of acute intracerebroventricular administration of PGE₂ on the susceptibility to seizures induced by PTZ and the neuroprotective effect of flavonoid galangin on the behavioral and biochemical parameters caused by PGE₂/PTZ in cerebral cortex of mice.

We found that PGE₂ administration increased the susceptibility to seizure PTZ-induced as evidenced by shorter latency period for both the first myoclonic seizure and first generalized tonic-clonic seizure as well as by increase in the time spent in generalized tonic-clonic seizure and score on Racine's scale. In addition, these behavioral alterations were accompanied by higher brain wave amplitude as well as higher immunoreactivity of Iba-1 and GFAP, markers of microglia and astrocytic activation respectively. Moreover, PGE₂ administration increased reactive species (RS) as well as immunocontent vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1). Interesting, PGE₂ administration did not alter the immunocontent of its receptors (EP1, EP2, EP3), but was able to increase the state of phosphorylation of PKA II α subunit. Indeed, the pretreatment with galangin improved the convulsive behavior, RS production, as well as prevent the increase of immunoreactivity in microglia, astrocytes, VCAM-1 and phosphorylation of PKA II α subunit elicited by PGE₂/PTZ.

As regards to the behavior of mice, we found that PGE₂/PTZ administration decreased the latency for the first myoclonic seizure and first generalized tonic-clonic seizure as well as increased the time spent in generalized tonic-clonic seizure and score on Racine's scale (Fig. 3A, 3B, 3C and 3D, respectively). In fact, study showed that transgenic mice that overexpress the neuronal COX-2 are more susceptible to kainate-elicited convulsions [57]. According, it has been demonstrated that the anticonvulsant action of celecoxib against seizures induced by convulsive dose of PTZ was reversed by the intracerebroventricular administration of PGE₂ [24]. However, findings of that study also showed that PGE₂ (1, 10 or 100 ng/2 μ l i.c.v) alone or in combination with a subeffective dose of PTZ (20mg/kg) was not able to cause behavioral seizures in rats [24]. Differences in these findings can be explained by different doses of PTZ and animal model used since that in our study was used a subeffective dose of PTZ of 35mg/kg and in mice. In relation to electrographic quantification, we showed that

PGE₂ alone increased brain wave amplitude, but in combination with PTZ this effect was higher than PGE₂ alone (Fig. 3E). In agreement, was demonstrated that the combination of a subeffective dose of PTZ with PGE₂ caused the appearance of multiple sharp waves in brief and long spindle episodes in the EEG recording. [24]. In this line of view, higher cyclooxygenase-2 (COX-2) activity and PGE₂ levels have been associated with harmful increases in cerebral excitability, which occurs in several situations including the epilepsy [23].

Furthermore, induction of COX-2 has been described in a wide range of neurological diseases including animal models of seizures and patients with temporal lobe epilepsy [22, 23, 58, 59, 60]. Moreover, transgenic mice that overexpress neuronal COX-2 are more susceptible to kainate-elicited convulsions [57]. Thus, it is plausible to suggest that an inflammatory event, such as increased production of PGE₂, can be closely related to recurrence of seizures since we show that administration of this prostaglandin is capable of increasing the susceptibility to seizures induced by PTZ.

Therefore, we also observed that both PTZ and PGE₂ induced an increase in reactivity of Iba-1 in cortex, however, when administered in combination, these compounds induced a higher microglia reactivity (Fig. 4A). Indeed, the microglia cells depart from the surveillance mode (one state of activity) and acquire a reactive profile to cope with altered homeostasis due the presence of any harmful agent to the CNS and these adjustments can occur in minutes to seconds [7]. In fact, microglial actions are stimulus-determined and can vary with the intensity (dose) and context [61] which could explain its higher activation after the administration of PGE₂ and PTZ in combination, as noted in our study. According, study showed that in others models of seizures, such as kainic acid administration, also were able to activate the microglial cells [62]. Moreover, there is evidence that once activated, microglial cells are neurotoxic and release several inflammatory mediators and higher levels of reactive oxygen species [63, 64]. We also can suggest that increase in lipid peroxidation induced by PGE₂ in our study (Fig 5A) may be due to microglial activation e subsequent release of oxidants agents.

Interestingly, we observed that the animals treated with PGE₂ and PTZ in combination presented seizures and increased reactivity of GFAP in cerebral cortex (Fig. 4B), suggesting that an inflammatory stimulus may lead to astrocyte reactivity and a higher neuronal excitability, facilitating the appearance of seizures. In fact, a variety of insults to the brain,

including prolonged seizures, result in reactive gliosis, which is characterized by severe morphological and biochemical changes of preexisting astrocytes [65, 66]. In this line of view, other studies have also demonstrated that, besides seizures, PGE₂ induced glutamate release and proliferation of astrocytes [24, 67, 68] and that these alterations were prevented by inhibitor of prostaglandin synthesis [24, 69, 70].

The brain has traditionally been considered an immunoprivileged site because of the presence of the Brain Blood Barrier (BBB) [71]. In line, microglia and astrocyte activation, cytokines, and reactive species may also induce the BBB leakage as well as the adhesion molecule expression such vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) [72,73,74,75], facilitating the cerebral damage and seizures [10]. In fact, studies have showed that status epilepticus provoked by pilocarpine and bicuculline are associated to vasodilatation, BBB leakage and upregulation of VCAM-1 [8, 76], which may regulate immune surveillance and inflammation on the endothelium [77]. Since we observed that the animals treated with PGE₂/PTZ presented convulsions, it is plausible to suggest that microglial/astrocytic reactivity may be associated to altered permeability BBB and lead to a higher VCAM-1 expression in cortex (Fig 5B), contributing to a lower threshold for seizures in those animals.

Although there are studies that have attributed a role for PGE₂ receptors (EPs) in the seizures induced by PTZ [78], our findings showed no changes in immuncontent of EP receptors (Fig. 6A, 6B and 6C). However, these results alone are not sufficient to say that PGE₂ is not acting on its receptors to perform the effects observed in our study.

In addition, since protein kinase A (PKA) and protein kinase C (PKC) are associated to increased excitatory post-synaptic potentials induced by PGE₂ [19], we investigated whether PGE₂ combined to PTZ could alter the phosphorylation state of these enzymes. Although PGE₂/PTZ treatment did not change phosphorylation state of PKC (data not showed), it increased the phosphorylation at Ser⁹⁶ of PKA II α subunit (Fig 6D). In agreement, a study has showed that administration of PGE₂ is involved in PKA and PKC activation as well as decreased the Na⁺, K⁺-ATPase activity, contributing to seizures [53]. In fact, these data suggest that the kinases activation may be related to appearance of seizures since the incubation with a PKA inhibitor (H-89) and a PKC inhibitor (GF-109203X) prevented PGE₂-induced decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity and convulsive behavior [52, 53]. Concerning the role of PKA in seizures, findings showed that kinase A inhibitor (H-89) administered before of PTZ was able to increase the seizure latency and threshold in PTZ-treated animals

[52] corroborating with our findings since PGE₂ administered prior to PTZ increased neuronal excitability and the state of phosphorylation of PKA.

Based on the hypothesis that inflammatory and oxidative events are involved in epilepsy, an alternative approach to the treatment of this disorder would be the use of neuroprotective therapies to prevent or slow down the progression of seizures. In this context, a number of natural products have been demonstrated to have antioxidant and anticonvulsant effects [79, 80, 81, 82, 83]. Moreover, there has been an increasing interest in the biochemical effects of medicinal plants with antioxidant and anti-inflammatory properties since as they could be candidates for the prevention of oxidative and inflammatory damage associated to epilepsy [84]. Thus, knowing that flavonoids represent one of the most important phenolic groups among products of natural origin [85] with anti-inflammatory properties and biologically active molecules in the central nervous system (CNS) [31, 86], we resolved to test if flavonoid isolated of *Piper aleyreanum* named galangin could protect against behavioral and biochemical changes induced by PGE₂ and PTZ.

Initially, we observed that pre-treatment with flavonoid galangin was effective in preventing the convulsive behavior and increasing the cerebral wave amplitude in mice treated with PGE₂ prior to PTZ (Fig 7A, 7B, 7C, 7D, 7H and table 1). In fact, there are some evidences about anticonvulsant effect of some flavonoid compounds against seizures induced by PTZ [35, 54, 55, 87, 88, 89, 90]. Moreover, studies revealed that many flavonoids may act as ligands for benzodiazepine receptors interacting with GABA receptors in brain and modulate its function [91, 92, 93], which could explain the anticonvulsive effect of this compound observed in this study. Although, we did not evaluate this way in the present study, we can not rule out the hypothesis that the anticonvulsive effect of this flavonoid compound may be related to the gabaergic system.

In addition, galangin also protected against the alterations induced by PGE₂/PTZ on Iba-1 and GFAP immunoreactivities (Fig 8A and B), as well as on the increase of production of reactive species and VCAM-1 immunocontent (Fig 9A and 9B) in cortex of mice. According, was demonstrate that galangin has antioxidant activity [31] and is able to decreased expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and COX-2 enzymes lipopolysaccharide-induced, that are importantly reported in the inflammation [29]. Moreover, galangin also decreased levels of PGE₂ and nitric oxide lipopolysaccharide-induced [29] and

the molecular docking study revealed that this compound have affinity towards COX-2 active site which can further be explored as selective COX-2 inhibitors [31].

Indeed, the first pharmacological study using *Piper aleyreanum* has showed that essential oil of this plant exerted potent antinociceptive and anti-inflammatory effects, protecting vascular leakage and leukocyte migration caused by carrageenan and against formalin-induced nociception that produces significant increase in spinal levels of inflammatory mediators as PGE₂ [28, 94], suggesting a critical role in controlling inflammatory events by compound.

This way, we speculate that the anti-inflammatory action demonstrated by flavonoid galangin may also be related to the genus *Piper* because the chloroform extract of *Piper longum* inhibited the expression of adhesion molecule as (ICAM-1), VCAM-1 and E-selectin [95]. Also, a study demonstrated that the aqueous extract of *Piper sarmentosum* significantly reduced the levels of VCAM-1, ICAM-1 and C-reactive protein (CRP) in rabbits [96]. So, we can suggest that the compound used in this study may be leaving the cerebral microenvironment more anti-inflammatory and thus protecting from the effects excitatory evidenced by the administration of PGE₂.

Furthermore, pretreatment with galangin was able to decrease the phosphorylation state of PKAII α in cerebral cortex of mice induced by administration of PGE₂ previously to PTZ (Fig. 10), suggesting an important role of PKA on the neuronal excitability and seizures. In fact, study demonstrated that the reduction of PGE₂ levels and state of PKA phosphorylation by celecoxib inhibited the glutamate release in synaptosomes of cerebral cortex [97]. Confirming these results, the activation of PKA prevented the inhibitory effect of glutamate release mediated by celecoxib in the cerebral cortex of rats [97]. Taken together these findings, we propose that the flavonoid galangin may also be decreasing the seizure by modulating inflammatory pathways and PKA activation.

In summary, considering all data found in this work, we can suggest that the increase on the susceptibility to seizures induced-PGE₂/PTZ may be resulted of higher neuronal excitability and activated microglia and astrocytes, culminating in a major production of reactive species and VCAM-1 reactivity. These events could compromise the integrity of BBB, altering its permeability and making the animals more susceptible the seizures. The flavonoid galangin has therapeutic potential to be used as an anticonvulsant, since that it was able to prevent the behavioral and neurochemical alterations induced by PGE₂/PTZ. However,

further studies are required to clarify the molecular mechanisms that contribute to increase of seizure susceptibility during inflammatory conditions.

Conflict of interest

All authors declare that there is no conflict of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the CNPq (grants: Pronem: 11/2082-4). M.R. Figuera, L.F.F. Royes; Furian A.F.; Schneider-Oliveira M.; Santos, A.R.S. are recipients of CNPq fellowships. All authors confirm that there is no competing financial conflict of interest.

References:

1. Preux PM, Ratsimbazafy V, Jost J (2015) Epidemiology of febrile seizures and epilepsy: a call for action. *J Pediatr (Rio J)* 91 (6):512-514. doi:10.1016/j.jpmed.2015.08.003
2. Fisher RS (2015) Redefining epilepsy. *Curr Opin Neurol* 28 (2):130-135. doi:10.1097/WCO.0000000000000174
3. Sharma AK, Reams RY, Jordan WH, Miller MA, Thacker HL, Snyder PW (2007) Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicol Pathol* 35 (7):984-999. doi:10.1080/01926230701748305
4. Wetherington J, Serrano G, Dingleline R (2008) Astrocytes in the epileptic brain. *Neuron* 58 (2):168-178. doi:10.1016/j.neuron.2008.04.002
5. Yagami T, Koma H, Yamamoto Y (2016) Pathophysiological Roles of Cyclooxygenases and Prostaglandins in the Central Nervous System. *Mol Neurobiol* 53 (7):4754-4771. doi:10.1007/s12035-015-9355-3
6. Marchi N, Angelov L, Masaryk T, Fazio V, Granata T, Hernandez N, Hallene K, Diglaw T, Franic L, Najm I, Janigro D (2007) Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. *Epilepsia* 48 (4):732-742. doi:10.1111/j.1528-1167.2007.00988.x
7. Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10 (11):1387-1394. doi:10.1038/nn1997
8. Fabene PF, Navarro Mora G, Martinello M, Rossi B, Merigo F, Ottoboni L, Bach S, Angiari S, Benati D, Chakir A, Zanetti L, Schio F, Osculati A, Marzola P, Nicolato E, Homeister JW, Xia L, Lowe JB, McEver RP, Osculati F, Sbarbati A, Butcher EC, Constantin G (2008) A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. *Nat Med* 14 (12):1377-1383. doi:10.1038/nm.1878
9. Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ (2011) The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol* 7 (1):31-40. doi:10.1038/nrneuro.2010.178
10. Fabene PF, Laudanna C, Constantin G (2013) Leukocyte trafficking mechanisms in epilepsy. *Mol Immunol* 55 (1):100-104. doi:10.1016/j.molimm.2012.12.009
11. Luo J, Wang W, Xi Z, Dan C, Wang L, Xiao Z, Wang X (2014) Concentration of soluble adhesion molecules in cerebrospinal fluid and serum of epilepsy patients. *J Mol Neurosci* 54 (4):767-773. doi:10.1007/s12031-014-0366-8
12. Vezzani A, Granata T (2005) Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 46 (11):1724-1743. doi:10.1111/j.1528-1167.2005.00298.x

13. Sewal RK, Modi M, Saikia UN, Chakrabarti A, Medhi B (2017) Increase in seizure susceptibility in sepsis like condition explained by spiking cytokines and altered adhesion molecules level with impaired blood brain barrier integrity in experimental model of rats treated with lipopolysaccharides. *Epilepsy Res* 135:176-186. doi:10.1016/j.eplesyres.2017.05.012
14. Dube CM, Brewster AL, Richichi C, Zha Q, Baram TZ (2007) Fever, febrile seizures and epilepsy. *Trends Neurosci* 30 (10):490-496. doi:10.1016/j.tins.2007.07.006
15. Ravizza T, Balosso S, Vezzani A (2011) Inflammation and prevention of epileptogenesis. *Neurosci Lett* 497 (3):223-230. doi:10.1016/j.neulet.2011.02.040
16. Takemiya T, Matsumura K, Yamagata K (2007) Roles of prostaglandin synthesis in excitotoxic brain diseases. *Neurochem Int* 51 (2-4):112-120. doi:10.1016/j.neuint.2007.05.009
17. Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J, Bremer M, Isakson P (1996) COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93 (6):2317-2321
18. Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF (1993) Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 11 (2):371-386
19. Chen C, Bazan NG (2005) Endogenous PGE2 regulates membrane excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 93 (2):929-941. doi:10.1152/jn.00696.2004
20. Sugimoto Y, Narumiya S (2007) Prostaglandin E receptors. *J Biol Chem* 282 (16):11613-11617. doi:10.1074/jbc.R600038200
21. Okada K, Yuhi T, Tsuji S, Yamashita U (2001) Cyclooxygenase-2 expression in the hippocampus of genetically epilepsy susceptible El mice was increased after seizure. *Brain Res* 894 (2):332-335
22. Desjardins P, Sauvageau A, Bouthillier A, Navarro D, Hazell AS, Rose C, Butterworth RF (2003) Induction of astrocytic cyclooxygenase-2 in epileptic patients with hippocampal sclerosis. *Neurochem Int* 42 (4):299-303
23. Takemiya T, Suzuki K, Sugiura H, Yasuda S, Yamagata K, Kawakami Y, Maru E (2003) Inducible brain COX-2 facilitates the recurrence of hippocampal seizures in mouse rapid kindling. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 71 (3-4):205-216
24. Oliveira MS, Furian AF, Royes LF, Figuera MR, Fiorenza NG, Castelli M, Machado P, Bohrer D, Veiga M, Ferreira J, Cavalheiro EA, Mello CF (2008) Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylentetrazol-induced seizures. *Epilepsy Res* 79 (1):14-21. doi:10.1016/j.eplesyres.2007.12.008
25. Perucca E, French J, Bialer M (2007) Development of new antiepileptic drugs: challenges, incentives, and recent advances. *Lancet Neurol* 6 (9):793-804. doi:10.1016/S1474-4422(07)70215-6
26. Saklani A, Kutty SK (2008) Plant-derived compounds in clinical trials. *Drug Discov Today* 13 (3-4):161-171. doi:10.1016/j.drudis.2007.10.010
27. Facundo V, Morais S (2003) Constituents of *Piper aleyreanum* (Piperaceae). *Biochemical systematics and ecology* 31 (1):111-113
28. Lima DK, Ballico LJ, Rocha Lapa F, Goncalves HP, de Souza LM, Iacomini M, Werner MF, Baggio CH, Pereira IT, da Silva LM, Facundo VA, Santos AR (2012) Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC in rodents. *J Ethnopharmacol* 142 (1):274-282. doi:10.1016/j.jep.2012.05.016
29. Raso GM, Meli R, Di Carlo G, Pacilio M, Di Carlo R (2001) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A. 1. *Life sciences* 68 (8):921-931

30. O'Leary KA, de Pascual-Teresa S, Needs PW, Bao YP, O'Brien NM, Williamson G (2004) Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. *Mutat Res* 551 (1-2):245-254. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.01.015
31. Honmore VS, Kandhare AD, Kadam PP, Khedkar VM, Sarkar D, Bodhankar SL, Zanwar AA, Rojatkar SR, Natu AD (2016) Isolates of *Alpinia officinarum* Hance as COX-2 inhibitors: Evidence from anti-inflammatory, antioxidant and molecular docking studies. *International immunopharmacology* 33:8-17
32. Lima DK (2012) Thesis, Estudo fitoquímico e análise antinociceptiva, anti-inflamatória e antiulcerogênica da parte aérea de *Piper aleyreanum* C.DC (Piperaceae), Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil, p. 115.
33. Mendlik MT, Uritsky TJ (2015) Treatment of neuropathic pain. *Curr Treat Options Neurol* 17 (12):50
34. Taiwe GS, Tchoya TB, Menanga JR, Dabole B, De Waard M (2016) Anticonvulsant activity of an active fraction extracted from *Crinum jagus* L.(Amaryllidaceae), and its possible effects on fully kindled seizures, depression-like behaviour and oxidative stress in experimental rodent models. *Journal of ethnopharmacology* 194:421-433
35. Citraro R, Navarra M, Leo A, Donato Di Paola E, Santangelo E, Lippiello P, Aiello R, Russo E, De Sarro G (2016) The anticonvulsant activity of a flavonoid-rich extract from orange juice involves both NMDA and GABA-benzodiazepine receptor complexes. *Molecules* 21 (9):1261
36. Adeoluwa O, Aderibigbe A, Agu G (2016) Pharmacological evaluation of central nervous system effects of ethanol leaf extract of *Olax Subscorpioidea* in experimental animals. *Drug research* 66 (04):203-210
37. Napolini AP, Cocco AR, Villa Martignoni F, Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Rubin MA, Barron S, Mello CF (2012) Traxoprodil decreases pentylentetrazol-induced seizures. *Epilepsy Res* 100 (1-2):12-19. doi:10.1016/j.epilepsyres.2012.01.002
38. Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, St Jean P, Schork NJ, Mulholland N, Ballas C, Schill J, Buono RJ, Berrettini WH (1999) Mapping loci for pentylentetrazol-induced seizure susceptibility in mice. *J Neurosci* 19 (16):6733-6739
39. Cavalheiro EA, Fernandes MJ, Turski L, Mazzacoratti MG (1992) Neurochemical changes in the hippocampus of rats with spontaneous recurrent seizures. *Epilepsy Res Suppl* 9:239-247; discussion 247-238
40. McColl CD, Horne MK, Finkelstein DI, Wong JY, Berkovic SF, Drago J (2003) Electroencephalographic characterisation of pentylentetrazole-induced seizures in mice lacking the alpha 4 subunit of the neuronal nicotinic receptor. *Neuropharmacology* 44 (2):234-243
41. Racine RJ (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 32 (3):281-294
42. Kharatishvili I, Immonen R, Gröhn O, Pitkänen A (2007) Quantitative diffusion MRI of hippocampus as a surrogate marker for post-traumatic epileptogenesis. *Brain* 130 (12):3155-3168
43. Funck VR, Ribeiro LR, Pereira LM, de Oliveira CV, Grigoletto J, Figuera MR, Royes LFF, Furian AF, Oliveira MS (2014) Long-term decrease in Na⁺, K⁺-ATPase activity after pilocarpine-induced status epilepticus is associated with nitration of its alpha subunit. *Epilepsy research* 108 (10):1705-1710
44. Förstermann U, Heldt R, Hertting G (1983) Increase in brain prostaglandins during convulsions is due to increased neuronal activity and not to hypoxia. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie* 263 (2):180-188
45. Baran H, Heldt R, Hertting G (1987) Increased prostaglandin formation in rat brain following systemic application of kainic acid. *Brain research* 404 (1-2):107-112

46. Choi J, Koh S (2008) Role of brain inflammation in epileptogenesis. *Yonsei Med J* 49 (1):1-18. doi:10.3349/ymj.2008.49.1.1
47. Rojas A, Jiang J, Ganesh T, Yang MS, Lelutiu N, Gueorguieva P, Dingledine R (2014) Cyclooxygenase-2 in epilepsy. *Epilepsia* 55 (1):17-25. doi:10.1111/epi.12461
48. Dambach H, Hinkerohe D, Prochnow N, Stienen MN, Moinfar Z, Haase CG, Hufnagel A, Faustmann PM (2014) Glia and epilepsy: experimental investigation of antiepileptic drugs in an astroglia/microglia co-culture model of inflammation. *Epilepsia* 55 (1):184-192. doi:10.1111/epi.12473
49. Van Vliet E, da Costa Araujo S, Redeker S, Van Schaik R, Aronica E, Gorter J (2006) Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain* 130 (2):521-534
50. Rambo LM, Ribeiro LR, Oliveira MS, Furian AF, Lima FD, Souza MA, Silva LF, Retamoso LT, Corte CL, Puntel GO, de Avila DS, Soares FA, Figuera MR, Mello CF, Royes LF (2009) Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylenetetrazol-induced seizures. *Neurochem Int* 55 (5):333-340. doi:10.1016/j.neuint.2009.04.007
51. Souza MA, Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Lima FD, Dalla Corte LC, Silva LF, Retamoso LT, Dalla Corte CL, Puntel GO, de Avila DS, Soares FA, Figuera MR, de Mello CF, Royes LF (2009) Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia* 50 (4):811-823. doi:10.1111/j.1528-1167.2008.01908.x
52. Hosseini-Zare MS, Salehi F, Seyedi SY, Azami K, Ghadiri T, Mobasser M, Gholizadeh S, Beyer C, Sharifzadeh M (2011) Effects of pentoxifylline and H-89 on epileptogenic activity of bucladesine in pentylenetetrazol-treated mice. *Eur J Pharmacol* 670 (2-3):464-470. doi:10.1016/j.ejphar.2011.09.026
53. Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, Calixto JB, Otalora LF, Garrido-Sanabria ER, Mello CF (2009) Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. *J Neurochem* 109 (2):416-426. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05961.x
54. Taiwe GS, Tchoya TB, Menanga JR, Dabole B, De Waard M (2016) Anticonvulsant activity of an active fraction extracted from *Crinum jagus* L. (Amaryllidaceae), and its possible effects on fully kindled seizures, depression-like behaviour and oxidative stress in experimental rodent models. *J Ethnopharmacol* 194:421-433. doi:10.1016/j.jep.2016.10.023
55. Adeoluwa OA, Aderibigbe AO, Agu GO (2016) Pharmacological Evaluation of Central Nervous System Effects of Ethanol Leaf Extract of *Olox Subscorpioidea* in Experimental Animals. *Drug Res (Stuttg)* 66 (4):203-210. doi:10.1055/s-0035-1564137
56. Lima DK, Ballico LJ, Lapa FR, Gonçalves HP, de Souza LM, Iacomini M, de Paula Werner MF, Baggio CH, Pereira IT, da Silva LM (2012) Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C. DC in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 142 (1):274-282
57. Kelley KA, Ho L, Winger D, Freire-Moar J, Borelli CB, Aisen PS, Pasinetti GM (1999) Potentiation of excitotoxicity in transgenic mice overexpressing neuronal cyclooxygenase-2. *Am J Pathol* 155 (3):995-1004. doi:10.1016/S0002-9440(10)65199-1
58. Chen J, Marsh T, Zhang JS, Graham SH (1995) Expression of cyclo-oxygenase 2 in rat brain following kainate treatment. *Neuroreport* 6 (2):245-248
59. Okada K, Yuhi T, Tsuji S, Yamashita U (2001) Cyclooxygenase-2 expression in the hippocampus of genetically epilepsy susceptible El mice was increased after seizure. *Brain research* 894 (2):332-335

60. Turrin NP, Rivest S (2004) Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy. *Neurobiol Dis* 16 (2):321-334. doi:10.1016/j.nbd.2004.03.010
61. Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, Schwartz M (2005) Activation of microglia by aggregated β -amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN- γ and IL-4 render them protective. *Molecular and Cellular Neuroscience* 29 (3):381-393
62. Vezzani A, Conti M, De Luigi A, Ravizza T, Moneta D, Marchesi F, De Simoni MG (1999) Interleukin-1 β immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *Journal of Neuroscience* 19 (12):5054-5065
63. Kim SU, de Vellis J (2005) Microglia in health and disease. *J Neurosci Res* 81 (3):302-313. doi:10.1002/jnr.20562
64. Block ML, Zecca L, Hong JS (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* 8 (1):57-69. doi:10.1038/nrn2038
65. Binder DK, Steinhauser C (2006) Functional changes in astroglial cells in epilepsy. *Glia* 54 (5):358-368. doi:10.1002/glia.20394
66. Ravizza T, Gagliardi B, Noe F, Boer K, Aronica E, Vezzani A (2008) Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis* 29 (1):142-160. doi:10.1016/j.nbd.2007.08.012
67. Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzi BL, Pozzan T, Volterra A (1998) Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 391 (6664):281-285. doi:10.1038/34651
68. Zhang D, Hu X, Qian L, Wilson B, Lee C, Flood P, Langenbach R, Hong JS (2009) Prostaglandin E2 released from activated microglia enhances astrocyte proliferation in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 238 (1):64-70. doi:10.1016/j.taap.2009.04.015
69. Cali C, Lopatar J, Petrelli F, Pucci L, Bezzi P (2014) G-protein coupled receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: role of prostaglandins. *Neural Plast* 2014:254574. doi:10.1155/2014/254574
70. Dey A, Kang X, Qiu J, Du Y, Jiang J (2016) Anti-Inflammatory Small Molecules To Treat Seizures and Epilepsy: From Bench to Bedside. *Trends Pharmacol Sci* 37 (6):463-484. doi:10.1016/j.tips.2016.03.001
71. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 16 (1):1-13. doi:10.1016/j.nbd.2003.12.016
72. Neish AS, Williams AJ, Palmer HJ, Whitley MZ, Collins T (1992) Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *J Exp Med* 176 (6):1583-1593
73. Lee YW, Kuhn H, Hennig B, Neish AS, Toborek M (2001) IL-4-induced oxidative stress upregulates VCAM-1 gene expression in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol* 33 (1):83-94. doi:10.1006/jmcc.2000.1278
74. Lee S, Chung J, Ha IS, Yi K, Lee JE, Kang HG, Choi I, Oh K-H, Kim JY, Surh CD (2007) Hydrogen peroxide increases human leukocyte adhesion to porcine aortic endothelial cells via NF κ B-dependent up-regulation of VCAM-1. *International immunology* 19 (12):1349-1359
75. Kim S-R, Bae Y-H, Bae S-K, Choi K-S, Yoon K-H, Koo TH, Jang H-O, Yun I, Kim K-W, Kwon Y-G (2008) Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF- κ B activation in endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1783 (5):886-895

76. Librizzi L, Regondi MC, Pastori C, Frigerio S, Frassoni C, de Curtis M (2007) Expression of adhesion factors induced by epileptiform activity in the endothelium of the isolated guinea pig brain in vitro. *Epilepsia* 48 (4):743-751. doi:10.1111/j.1528-1167.2007.01047.x
77. Cook-Mills JM, Marchese ME, Abdala-Valencia H (2011) Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. *Antioxid Redox Signal* 15 (6):1607-1638. doi:10.1089/ars.2010.3522
78. Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, Calixto JB, Mello CF (2008) Modulation of pentylenetetrazol-induced seizures by prostaglandin E2 receptors. *Neuroscience* 152 (4):1110-1118. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.01.005
79. Jiang Y, Chen L, Sun CW, Zhong GG, Qi H, Ma XY, Xu JD (1993) [Influence of 11 ginsenoside monomers on action potentials of myocardiocytes]. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 14 Suppl:S8-12
80. Nguelefack TB, Nana P, Atsamo AD, Dimo T, Watcho P, Dongmo AB, Tapondjou LA, Njamen D, Wansi SL, Kamanyi A (2006) Analgesic and anticonvulsant effects of extracts from the leaves of *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth (Crassulaceae). *J Ethnopharmacol* 106 (1):70-75. doi:10.1016/j.jep.2005.12.003
81. Pal DK (2009) Determination of brain biogenic amines in *Cynodon dactylon* Pers. and *Cyperus rotundus* L. treated mice. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* 1 (1):190-197
82. Gahlot K, Lal VK, Jha S (2013) Anticonvulsant potential of ethanol extracts and their solvent partitioned fractions from *Flemingia strobilifera* root. *Pharmacognosy research* 5 (4):265
83. Pace IDD (2013) Efeito do Triterpeno 3 β , 6 β , 16 β , trihidroxilup-20 (29)-eno nas convulsões induzidas por pentilenotretazol: papel da Na⁺, K⁺ ATPase.
84. Noda Y, Yamada K, Nabeshima T (1997) Role of nitric oxide in the effect of aging on spatial memory in rats. *Behav Brain Res* 83 (1-2):153-158
85. Zuanazzi JdS, Montanha JA (2004) Flavonóides. *Farmacognosia: da planta ao medicamento* 5:577-614
86. Hou Y, Aboukhatwa MA, Lei DL, Manaye K, Khan I, Luo Y (2010) Anti-depressant natural flavonols modulate BDNF and beta amyloid in neurons and hippocampus of double TgAD mice. *Neuropharmacology* 58 (6):911-920. doi:10.1016/j.neuropharm.2009.11.002
87. Griebel G, Perrault G, Tan S, Schoemaker H, Sanger DJ (1999) Pharmacological studies on synthetic flavonoids: comparison with diazepam. *Neuropharmacology* 38 (7):965-977
88. Du XM, Sun NY, Takizawa N, Guo YT, Shoyama Y (2002) Sedative and anticonvulsant activities of goodyerin, a flavonol glycoside from *Goodyera schlechtendalana*. *Phytother Res* 16 (3):261-263. doi:10.1002/ptr.862
89. Nwafor PA, Okwuasaba FK (2003) Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of methanolic extract of *Asparagus pubescens* root in rodents. *J Ethnopharmacol* 84 (2-3):125-129
90. Adebisin IF, Akindede AJ, Adeyemi OO (2015) Evaluation of neuropharmacological effects of aqueous leaf extract of *Albizia glaberrima* (Leguminosae) in mice. *J Ethnopharmacol* 160:101-108. doi:10.1016/j.jep.2014.11.040
91. Hanrahan JR, Chebib M, Johnston GA (2011) Flavonoid modulation of GABA(A) receptors. *Br J Pharmacol* 163 (2):234-245. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01228.x
92. Aslan M, Orhan DD, Orhan N (2011) Effect of *Gentiana olivieri* on experimental epilepsy models. *Pharmacogn Mag* 7 (28):344-349. doi:10.4103/0973-1296.90419
93. Thirupathy KP, Tulshkar A, Vijaya C (2011) Neuropharmacological activity of *Lippia nodiflora* Linn. *Pharmacognosy Res* 3 (3):194-200. doi:10.4103/0974-8490.85007

94. Malmberg AB, Yaksh TL (1995) Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. *J Neurosci* 15 (4):2768-2776
95. Singh N, Kumar S, Singh P, Raj HG, Prasad AK, Parmar VS, Ghosh B (2008) Piper longum Linn. Extract inhibits TNF-alpha-induced expression of cell adhesion molecules by inhibiting NF-kappaB activation and microsomal lipid peroxidation. *Phytomedicine* 15 (4):284-291. doi:10.1016/j.phymed.2007.06.007
96. Amran AA, Zakaria Z, Othman F, Das S, Al-Mekhlafi HM, Nordin NA (2011) Changes in the vascular cell adhesion molecule-1, intercellular adhesion molecule-1 and c-reactive protein following administration of aqueous extract of piper sarmentosum on experimental rabbits fed with cholesterol diet. *Lipids Health Dis* 10:2. doi:10.1186/1476-511X-10-2
97. Lin TY, Lu CW, Wang CC, Huang SK, Wang SJ (2014) Cyclooxygenase 2 inhibitor celecoxib inhibits glutamate release by attenuating the PGE2/EP2 pathway in rat cerebral cortex endings. *J Pharmacol Exp Ther* 351 (1):134-145. doi:10.1124/jpet.114.217372

Figure Legends:

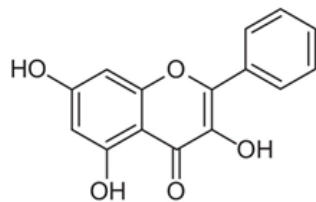


Figure 1. Flavonoid galangin (3,5,7-trihydroxyflavone).

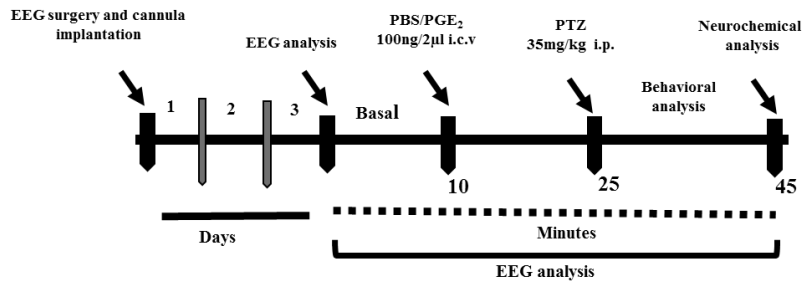
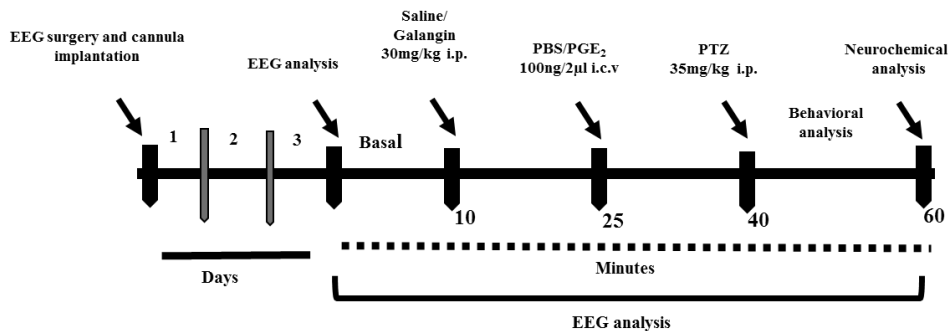
a**b**

Figure 2. Representation of experimental design. (A) The animals were submitted to surgery for electrodes and/or cannula introduction. Three days after they were connected to EEG and a 10-min baseline recording was obtained to establish an adequate control period. After this baseline recording, the animals were injected with PGE₂ (100ng/2μl i.c.v.) or its vehicle (PBS), then 15 minutes later, they were injected with PTZ (35 mg/kg, i.p) or vehicle (0.9 % NaCl) and were observed for the appearance of convulsive behavior during 20 minutes. (B) Animals were submitted to surgery for electrodes and cannula implantments. And three days after, they were connected to EEG and a 10-min baseline recording was obtained to establish an adequate control period. After this baseline recording, the animals were injected with the flavonoid galangin (30mg/kg) or saline, 15 minutes after, the animals were injected with PGE₂ (100ng/2μl i.c.v.) or its vehicle (PBS). Fifteen minutes later, they were injected with PTZ (35 mg/kg, i.p) or vehicle (0.9 % NaCl) and were observed for the appearance of convulsive behavior during 20 minutes to seizure evaluation. Soon after this period, the animals were sacrificed and cerebral cortex removed for neurochemical analyses.

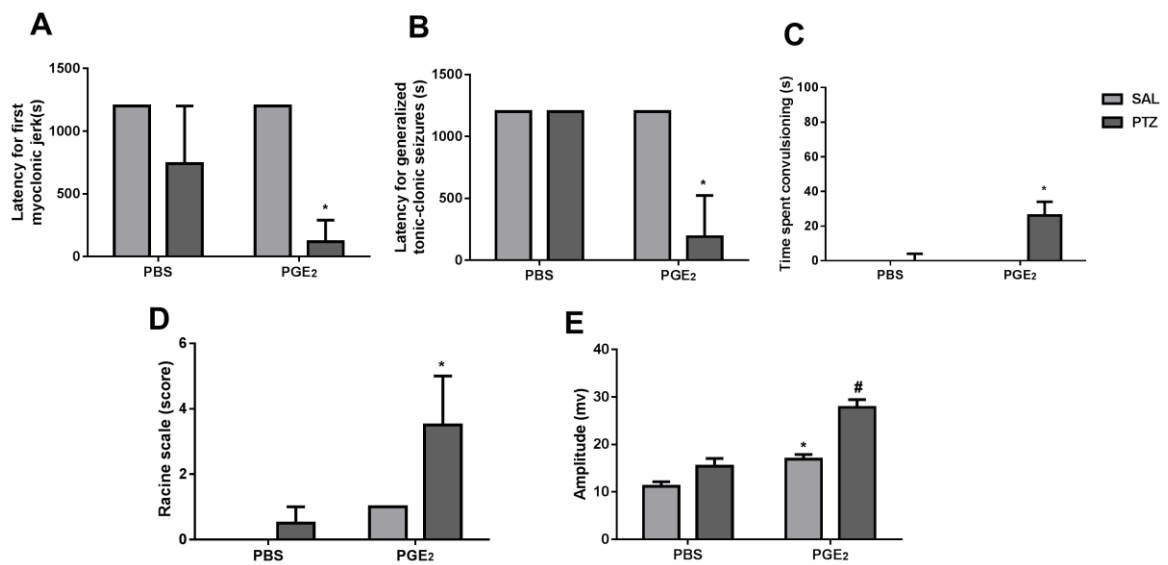


Figure 3. Effect of administration of PGE₂ (100ng/2μl i.c.v.) on seizure susceptibility with PTZ (35 mg/kg, i.p). Data from latency to the first myoclonic seizure (A), first tonic-clonic seizure (B), time spent in generalized tonic-clonic seizure (C), and Racine scale (D) are median – interquartile range. Data from wave amplitude analysis (E) are mean ± standard error of the mean; All for n= 7-9 animals per group. *p < 0.05 compared to SAL group. #p < 0.05 compared to PGE₂ and PTZ groups. (Two-way ANOVA).

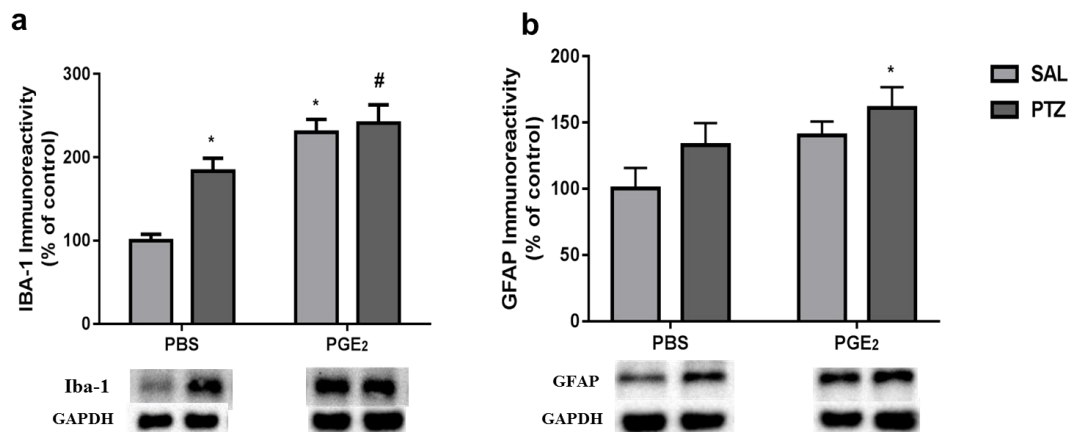


Figure 4. Effect of acute administration of PGE₂ (100ng/2μl i.c.v.) prior to subconvulsive dosage of PTZ (35 mg/kg, i.p) on immunoreactivity of IBA-1 (A) and GFAP (B). Data expressed in mean ± standard error of the mean; All for n= 6-8 animals per group. *p < 0.05 compared to SAL group. #p < 0.05 compared to PTZ group. (Two-way ANOVA).

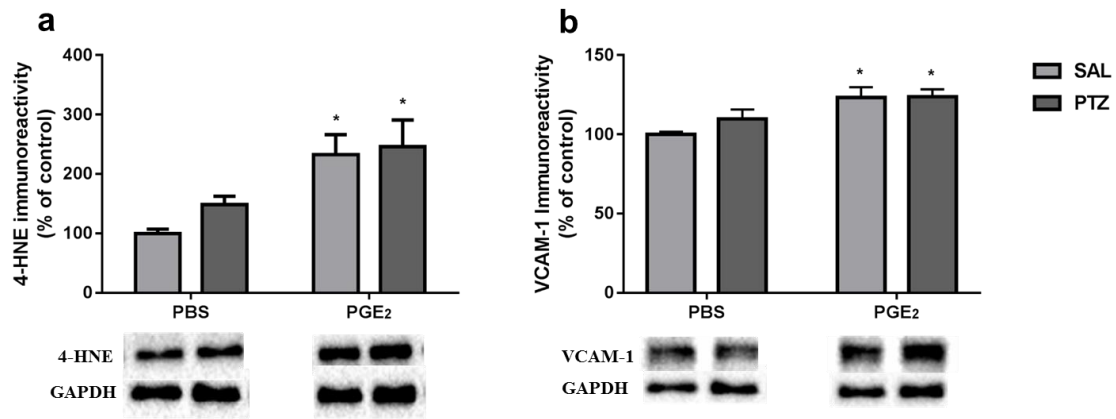


Figure 5. Effect of acute administration of PGE₂ (100ng/2 μ l i.c.v.) prior to subconvulsive dosage of PTZ (35 mg/kg, i.p) on immunoreactivity of 4-HNE(A) and VCAM-1 (B). Data expressed in mean \pm standard error of the mean; All for n= 6-8 animals per group. *p < 0.05 compared to SAL group. (Two-way ANOVA).

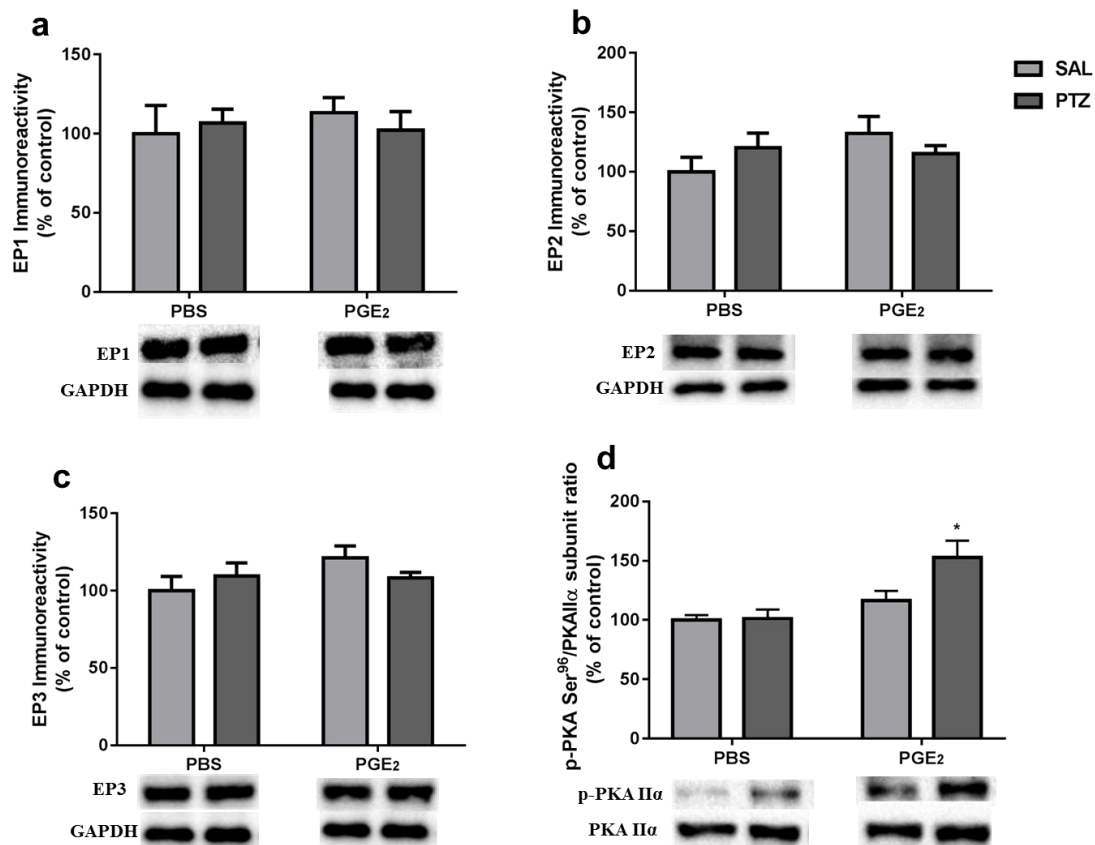


Figure 6. Effect of acute administration of PGE₂ (100ng/2 μ l i.c.v.) prior to subconvulsive dosage of PTZ (35 mg/kg, i.p) on immunoreactivity EP1(A), EP2 (B), EP3(C) and the ratio p-

PKA/PKA (D). Data expressed in mean \pm standard error of the mean; All for n= 6-8 animals per group. *p < 0.05 compared to SAL group. (Two-way ANOVA).

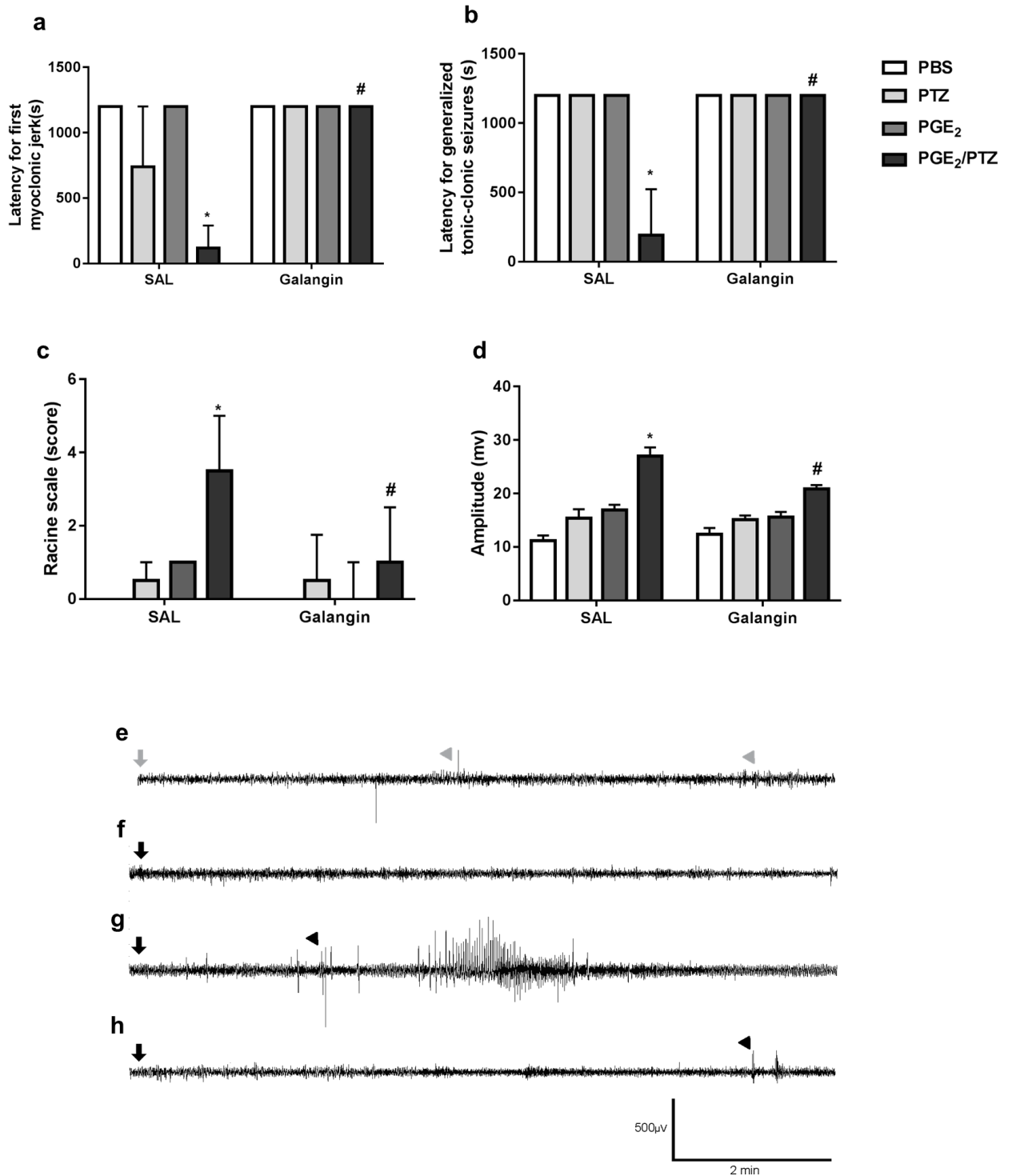


Figure 7. Effect of galangin administration (30 mg/kg, i.p.) on the increase seizure susceptibility elicited by PGE₂ (100ng/2 μ l i.c.v.) prior to PTZ injection (35 mg/kg, i.p.). Data from latency to the first myoclonic seizure (A), first tonic-clonic seizure (B), and Racine scale (C), are median – interquartile range. Data from wave amplitude analysis (D) are mean \pm standard error of the mean. Representative electroencephalographic recordings of animals

treated with PGE₂ (E), PTZ (F), PGE₂ + PTZ (G) and galangin + PGE₂ + PTZ (H). Gray arrow indicate PGE₂ injection; gray arrowheads indicate small electroencephalographic changes; black arrows indicate PTZ injection and black arrowheads indicate the first clonic seizure. All for n= 7-9 animals per group. *p < 0.05 compared to SAL group. #p < 0.05 compared to PGE₂PTZ group. (Three-way ANOVA).

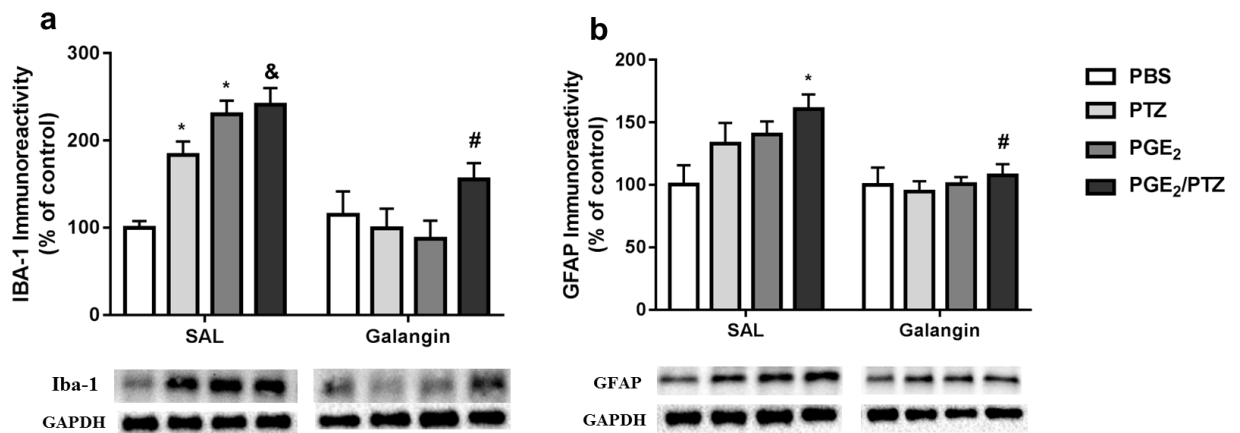


Figure 8. Effect of galangin administration (30 mg/kg, i.p.) on the increase of immunoreactivity of IBA-1 (A) and GFAP (B) PGE₂ and/or PGE₂/PTZ-induced. Data expressed in mean ± standard error of the mean; All for n= 6-8 animals per group. *p < 0.05 compared to SAL group. &p < 0.05 compared to PTZ group #p < 0.05 compared to PGE₂/PTZ group. (Three-way ANOVA).

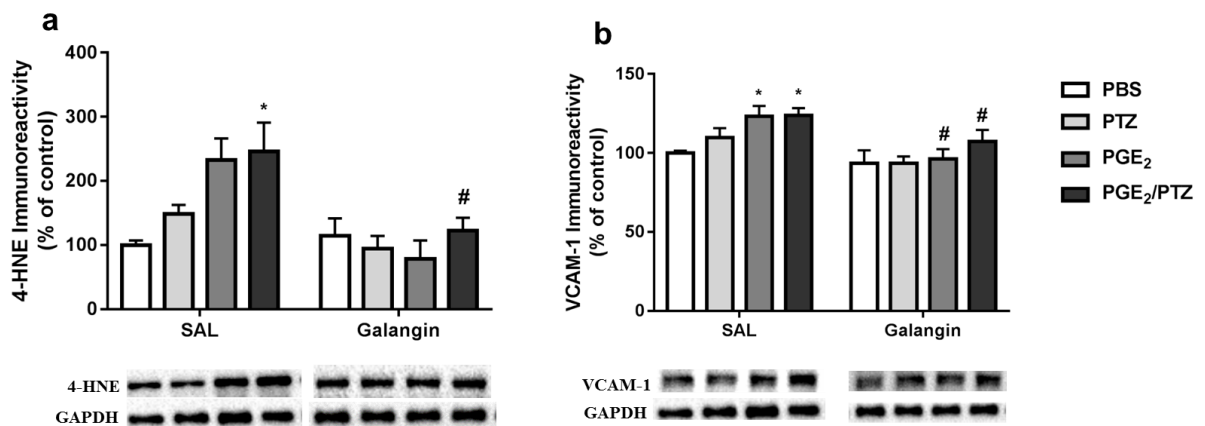


Figure 9. Effect of galangin administration (30 mg/kg, i.p.) on the increase of immunoreactivity 4-HNE (A) and VCAM-1 (B) PGE₂ or PGE₂/PTZ-induced. Data expressed

in mean \pm standard error of the mean; All for n= 6-8 animals per group. *p < 0.05 compared to SAL group. #p < 0.05 compared to PGE₂/PTZ group. (Three-way ANOVA).

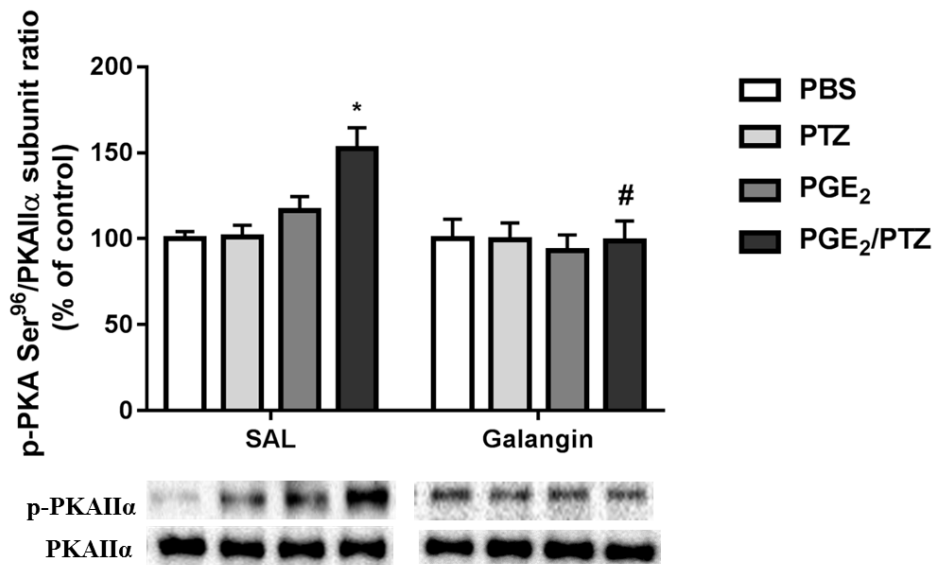


Figure 10. Effect of galangin administration (30 mg/kg, i.p.) on the increase phosphorylation at Ser96 of PKA II α subunit PGE₂/PTZ-induced. Data expressed in mean \pm standard error of the mean; All for n= 6-8 animals per group. *p < 0.05 compared to SAL group. #p < 0.05 compared to PGE₂/PTZ group. (Three-way ANOVA).

Table 1. Effects of acute administration of PGE₂ prior to PTZ and treatment with Galangin on duration of tonic-clonic seizures:

Mean time spent in tonic-clonic seizures (s)	
Group:	Time (s):
SAL	0
PTZ	1.43 \pm 0.95
PGE ₂	0
PGE ₂ + PTZ	31 \pm 9.48 *
Galangin	0
Galangin + PTZ	3 \pm 1.70
Galangin + PGE ₂	0
Galangin + PGE ₂ +PTZ	4.1 \pm 2.71 #

Data represent means \pm S.E.M. for n = 7-9 in each group. *p < 0.05 compared to SAL group. #p < 0.05 compared to PGE₂/PTZ group. (Three-way ANOVA).

5 CONCLUSÃO

- a) A administração aguda de prostaglandina E_2 anteriormente ao pentilenotetrazol alterou a latência para crise mioclônica e tônico-clônica generalizada, bem como, a duração das crises e a amplitude de ondas eletroencefalográficas;
- b) A administração aguda de prostaglandina E_2 previamente ao pentilenotetrazol foi capaz de causar ativação das células microgliais, bem como, dos astrócitos;
- c) A administração aguda de prostaglandina E_2 anteriormente ao pentilenotetrazol aumentou os níveis de 4-HNE (marcador de lipoperoxidação) e o imunocontéudo da molécula de adesão celular vascular (VCAM-1);
- d) A prostaglandina E_2 , administrada previamente ao pentilenotetrazol, não alterou o imunocontéudo dos receptores de prostaglandina E_2 , entretanto, aumentou a fosforilação da PKAII α (proteína cinase A);
- e) O flavonoide, galangina, protegeu das crises convulsivas, observadas através da análise das latências para crise mioclônica e tônico-clônica generalizadas, duração das crises generalizadas e análises eletroencefalográficas;
- f) O composto galangina protegeu das alterações neuroquímicas (ativação das células microgliais e astrocitária, assim como, do aumento de 4-HNE, do imunocontéudo da VCAM-1 e fosforilação da PKAII α) induzidas por prostaglandina E_2 administrada previamente ao pentilenotetrazol.

Em resumo, considerando todos os dados encontrados neste trabalho, podemos sugerir que o aumento da susceptibilidade às convulsões induzidas pela administração de PGE_2 / PTZ pode ser resultado de uma maior excitabilidade neuronal e glial, culminando em uma maior produção de espécies reativas e reatividade vascular. Esses eventos podem comprometer a integridade da barreira hemato-encefálica, alterando sua permeabilidade e tornando os animais mais suscetíveis às convulsões. O flavonoide, galangina, tem potencial terapêutico para ser usado como anticonvulsivante, pois conseguiu prevenir as alterações comportamentais e neuroquímicas induzidas por PGE_2 / PTZ.

Frente ao fato que o flavonoide galangina mostrou atividade anticonvulsivante no modelo utilizado neste trabalho, estudos futuros para testar o efeito deste composto natural em modelos crônicos de crises epiléticas podem ser pensados. Dessa forma, estudos adicionais se fazem necessários para obtenção de informações sobre os mecanismos moleculares que

contribuem para o aumento da susceptibilidade às crises durante condições inflamatórias e os mecanismos subjacentes que contribuem para esse aumento.

REFERÊNCIAS

ABBASI, E. et al. Neuroprotective effects of vitexin, a flavonoid, on pentylenetetrazole-induced seizure in rats. **Chem Biol Drug Des**, v. 80, n. 2, p. 274-8, Aug 2012. ISSN 1747-0285 (Electronic)

1747-0277 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22554436> >.

ABBOTT, N. J. Inflammatory mediators and modulation of blood–brain barrier permeability. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 20, n. 2, p. 131-147, 2000. ISSN 0272-4340.

ADEBESIN, I. F.; AKINDELE, A. J.; ADEYEMI, O. O. Evaluation of neuropharmacological effects of aqueous leaf extract of *Albizia glaberrima* (Leguminosae) in mice. **J Ethnopharmacol**, v. 160, p. 101-8, Feb 3 2015. ISSN 1872-7573 (Electronic)

0378-8741 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25479157> >.

ADEOLUWA, O.; ADERIBIGBE, A.; AGU, G. Pharmacological evaluation of central nervous system effects of ethanol leaf extract of *Olax Subscorpioidea* in experimental animals. **Drug research**, v. 66, n. 04, p. 203-10, 2016.

AMATEAU, S. K.; MCCARTHY, M. M. Induction of PGE 2 by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. **Nature neuroscience**, v. 7, n. 6, p. 643, 2004. ISSN 1546-1726.

AMRAN, A. A. et al. Changes in the vascular cell adhesion molecule-1, intercellular adhesion molecule-1 and c-reactive protein following administration of aqueous extract of *piper sarmentosum* on experimental rabbits fed with cholesterol diet. **Lipids Health Dis**, v. 10, p. 2, Jan 9 2011. ISSN 1476-511X (Electronic)

1476-511X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21214952> >.

AMUDHAN, S.; GURURAJ, G.; SATISHCHANDRA, P. Epilepsy in India I: Epidemiology and public health. **Ann Indian Acad Neurol**, v. 18, n. 3, p. 263-77, Jul-Sep 2015. ISSN 0972-2327 (Print)

0972-2327 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26425001> >.

ASLAN, M.; ORHAN, D. D.; ORHAN, N. Effect of *Gentiana olivieri* on experimental epilepsy models. **Pharmacogn Mag**, v. 7, n. 28, p. 344-9, Oct 2011. ISSN 0976-4062 (Electronic)

0973-1296 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22262939> >.

AVALLONE, R. et al. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. **Biochem Pharmacol**, v. 59, n. 11, p. 1387-94, Jun 1 2000. ISSN 0006-2952 (Print)

0006-2952 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10751547> >.

AVIGNONE, E. et al. Status epilepticus induces a particular microglial activation state characterized by enhanced purinergic signaling. **J Neurosci**, v. 28, n. 37, p. 9133-44, Sep 10 2008. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18784294> >.

BAIK, E. J. et al. Cyclooxygenase-2 selective inhibitors aggravate kainic acid induced seizure and neuronal cell death in the hippocampus. **Brain Res**, v. 843, n. 1-2, p. 118-29, Oct 2 1999. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10528118> >.

BALLABH, P.; BRAUN, A.; NEDERGAARD, M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. **Neurobiol Dis**, v. 16, n. 1, p. 1-13, Jun 2004. ISSN 0969-9961 (Print)

0969-9961 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15207256> >.

BARAN, H.; HELDT, R.; HERTTING, G. Increased prostaglandin formation in rat brain following systemic application of kainic acid. **Brain research**, v. 404, n. 1-2, p. 107-112, 1987. ISSN 0006-8993.

BERG, A. T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676-85, Apr 2010. ISSN 1528-1167 (Electronic)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20196795> >.

BERG, A. T.; SCHEFFER, I. E. New concepts in classification of the epilepsies: entering the 21st century. **Epilepsia**, v. 52, n. 6, p. 1058-62, Jun 2011. ISSN 1528-1167 (Electronic)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21635233> >.

BEZZI, P. et al. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. **Nature**, v. 391, n. 6664, p. 281-5, Jan 15 1998. ISSN 0028-0836 (Print)

0028-0836 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9440691> >.

BIALER, M.; WHITE, H. S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, n. 1, p. 68-82, Jan 2010. ISSN 1474-1784 (Electronic)

1474-1776 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20043029> >.

BINDER, D. K.; STEINHAUSER, C. Functional changes in astroglial cells in epilepsy. **Glia**, v. 54, n. 5, p. 358-68, Oct 2006. ISSN 0894-1491 (Print)

0894-1491 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16886201> >.

BLOCK, M. L.; ZECCA, L.; HONG, J. S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nat Rev Neurosci**, v. 8, n. 1, p. 57-69, Jan 2007. ISSN 1471-003X (Print)

1471-003X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17180163> >.

BONDE, S.; EKDAHL, C. T.; LINDVALL, O. Long-term neuronal replacement in adult rat hippocampus after status epilepticus despite chronic inflammation. **Eur J Neurosci**, v. 23, n. 4, p. 965-74, Feb 2006. ISSN 0953-816X (Print)

0953-816X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16519661> >.

BOSETTI, F.; LANGENBACH, R.; WEERASINGHE, G. R. Prostaglandin E2 and microsomal prostaglandin E synthase-2 expression are decreased in the cyclooxygenase-2-deficient mouse brain despite compensatory induction of cyclooxygenase-1 and Ca²⁺-dependent phospholipase A2. **J Neurochem**, v. 91, n. 6, p. 1389-97, Dec 2004. ISSN 0022-3042 (Print)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15584915> >.

BREYER, R. M. et al. Prostanoid receptors: subtypes and signaling. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 41, p. 661-90, 2001. ISSN 0362-1642 (Print)

0362-1642 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264472> >.

BUTOVSKY, O. et al. Activation of microglia by aggregated β -amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN- γ and IL-4 render them protective. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 29, n. 3, p. 381-393, 2005. ISSN 1044-7431.

CALI, C. et al. G-protein coupled receptor-evoked glutamate exocytosis from astrocytes: role of prostaglandins. **Neural Plast**, v. 2014, p. 254574, 2014. ISSN 1687-5443 (Electronic)

1687-5443 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24551459> >.

CARVALHO, A. C. et al. Situation of herbal medicines register in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008. ISSN 0102-695X.

CAVALHEIRO, E. A. et al. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**, v. 32, n. 6, p. 778-82, Nov-Dec 1991. ISSN 0013-9580 (Print)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1743148> >.

CAVALHEIRO, E. A. et al. Neurochemical changes in the hippocampus of rats with spontaneous recurrent seizures. **Epilepsy Res Suppl**, v. 9, p. 239-47; discussion 247-8, 1992. ISSN 0922-9833 (Print)

0922-9833 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1363042> >.

CHEN, C.; BAZAN, N. G. Endogenous PGE2 regulates membrane excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons. **J Neurophysiol**, v. 93, n. 2, p. 929-41, Feb 2005. ISSN 0022-3077 (Print)

0022-3077 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15653788> >.

CHEN, C.; MAGEE, J. C.; BAZAN, N. G. Cyclooxygenase-2 regulates prostaglandin E2 signaling in hippocampal long-term synaptic plasticity. **J Neurophysiol**, v. 87, n. 6, p. 2851-7, Jun 2002. ISSN 0022-3077 (Print)

0022-3077 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12037188> >.

CHEN, J. et al. Expression of cyclo-oxygenase 2 in rat brain following kainate treatment. **Neuroreport**, v. 6, n. 2, p. 245-248, 1995. ISSN 0959-4965.

CHOI, J. et al. Cellular injury and neuroinflammation in children with chronic intractable epilepsy. **J Neuroinflammation**, v. 6, p. 38, Dec 19 2009. ISSN 1742-2094 (Electronic)

1742-2094 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20021679> >.

CHOI, J.; KOH, S. Role of brain inflammation in epileptogenesis. **Yonsei Med J**, v. 49, n. 1, p. 1-18, Feb 29 2008. ISSN 0513-5796 (Print)

0513-5796 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18306464> >.

CITRARO, R. et al. The anticonvulsant activity of a flavonoid-rich extract from orange juice involves both NMDA and GABA-benzodiazepine receptor complexes. **Molecules**, v. 21, n. 9, p. 1261, 2016.

COOK-MILLS, J. M.; MARCHESE, M. E.; ABDALA-VALENCIA, H. Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 6, p. 1607-38, Sep 15 2011. ISSN 1557-7716 (Electronic)

1523-0864 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21050132> >.

DAMBACH, H. et al. Glia and epilepsy: experimental investigation of antiepileptic drugs in an astroglia/microglia co-culture model of inflammation. **Epilepsia**, v. 55, n. 1, p. 184-92, Jan 2014. ISSN 1528-1167 (Electronic)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24299259> >.

DEININGER, M. H.; SCHLUESENER, H. J. Cyclooxygenases-1 and -2 are differentially localized to microglia and endothelium in rat EAE and glioma. **J Neuroimmunol**, v. 95, n. 1-2, p. 202-8, Mar 1 1999. ISSN 0165-5728 (Print)

0165-5728 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10229132> >.

DESJARDINS, P. et al. Induction of astrocytic cyclooxygenase-2 in epileptic patients with hippocampal sclerosis. **Neurochem Int**, v. 42, n. 4, p. 299-303, Mar 2003. ISSN 0197-0186 (Print)

0197-0186 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12470703> >.

DEY, A. et al. Anti-Inflammatory Small Molecules To Treat Seizures and Epilepsy: From Bench to Bedside. **Trends Pharmacol Sci**, v. 37, n. 6, p. 463-484, Jun 2016. ISSN 1873-3735 (Electronic)

0165-6147 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27062228> >.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacol Res**, v. 112, p. 4-29, Oct 2016. ISSN 1096-1186 (Electronic)

1043-6618 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26812486> >.

DU, X. M. et al. Sedative and anticonvulsant activities of goodyerin, a flavonol glycoside from *Goodyera schlechtendaliana*. **Phyther Res**, v. 16, n. 3, p. 261-3, May 2002. ISSN 0951-418X (Print)

0951-418X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12164273> >.

DUBE, C. M. et al. Fever, febrile seizures and epilepsy. **Trends Neurosci**, v. 30, n. 10, p. 490-6, Oct 2007. ISSN 0166-2236 (Print)

0166-2236 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17897728> >.

EKDAHL, C. T. et al. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 23, p. 13632-13637, 2003. ISSN 0027-8424.

FABENE, P. F.; LAUDANNA, C.; CONSTANTIN, G. Leukocyte trafficking mechanisms in epilepsy. **Mol Immunol**, v. 55, n. 1, p. 100-4, Aug 2013. ISSN 1872-9142 (Electronic)

0161-5890 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23351392> >.

FABENE, P. F. et al. A role for leukocyte-endothelial adhesion mechanisms in epilepsy. **Nat Med**, v. 14, n. 12, p. 1377-83, Dec 2008. ISSN 1546-170X (Electronic)

1078-8956 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19029985> >.

FACUNDO, V. A. et al. Non-substituted B-ring flavonoids and an indole alkaloid from *Piper aleyreanum* (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 45, p. 206-208, 2012. ISSN 0305-1978.

FACUNDO, V.; MORAIS, S. Constituents of *Piper aleyreanum* (Piperaceae). **Biochemical systematics and ecology**, v. 31, n. 1, p. 111-113, 2003. ISSN 0305-1978.

FERRARO, T. N. et al. Mapping loci for pentylenetetrazol-induced seizure susceptibility in mice. **J Neurosci**, v. 19, n. 16, p. 6733-9, Aug 15 1999. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10436030> >.

FERREIRA IDE, L.; TABOSA E SILVA, T. P. [Mortality from epilepsy in Brazil, 1980-2003]. **Cien Saude Colet**, v. 14, n. 1, p. 89-94, Jan-Feb 2009. ISSN 1678-4561 (Electronic)

1413-8123 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19142312> >.

FIACCO, T. A. et al. Selective stimulation of astrocyte calcium in situ does not affect neuronal excitatory synaptic activity. **Neuron**, v. 54, n. 4, p. 611-626, 2007. ISSN 0896-6273.

FITZGERALD, G. A. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 11, p. 879-90, Nov 2003. ISSN 1474-1776 (Print)

1474-1776 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14668809> >.

FISHER, R. S. Redefining epilepsy. **Curr Opin Neurol**, v. 28, n. 2, p. 130-5, Apr 2015. ISSN 1473-6551 (Electronic)

1350-7540 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25734953> >.

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 1528-1167 (Electronic)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24730690> >.

FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470-2, Apr 2005. ISSN 0013-9580 (Print)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15816939> >.

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 1528-1167 (Electronic)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28276060> >.

FÖRSTERMANN, U.; HELDT, R.; HERTTING, G. Increase in brain prostaglandins during convulsions is due to increased neuronal activity and not to hypoxia. **Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie**, v. 263, n. 2, p. 180-188, 1983. ISSN 0003-9780.

FUNCK, V. R. et al. Long-term decrease in Na⁺, K⁺-ATPase activity after pilocarpine-induced status epilepticus is associated with nitration of its alpha subunit. **Epilepsy research**, v. 108, n. 10, p. 1705-1710, 2014. ISSN 0920-1211.

GAHLOT, K.; LAL, V. K.; JHA, S. Anticonvulsant potential of ethanol extracts and their solvent partitioned fractions from *Flemingia strobilifera* root. **Pharmacognosy research**, v. 5, n. 4, p. 265, 2013.

GAITATZIS, A.; SANDER, J. W. The mortality of epilepsy revisited. **Epileptic Disord**, v. 6, n. 1, p. 3-13, Mar 2004. ISSN 1294-9361 (Print)

1294-9361 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15075062> >.

GLASS, M.; DRAGUNOW, M. Neurochemical and morphological changes associated with human epilepsy. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 21, n. 1, p. 29-41, Jul 1995. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8547953> >.

GOMES-LEAL, W. et al. Astrocytosis, microglia activation, oligodendrocyte degeneration, and pyknosis following acute spinal cord injury. **Exp Neurol**, v. 190, n. 2, p. 456-67, Dec 2004. ISSN 0014-4886 (Print)

0014-4886 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530884> >.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nat Rev Immunol**, v. 3, n. 1, p. 23-35, Jan 2003. ISSN 1474-1733 (Print)

1474-1733 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12511873> >.

GRIEBEL, G. et al. Pharmacological studies on synthetic flavonoids: comparison with diazepam. **Neuropharmacology**, v. 38, n. 7, p. 965-977, 1999. ISSN 0028-3908.

HANISCH, U. K.; KETTENMANN, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. **Nat Neurosci**, v. 10, n. 11, p. 1387-94, Nov 2007. ISSN 1097-6256 (Print)

1097-6256 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17965659> >.

HANRAHAN, J. R.; CHEBIB, M.; JOHNSTON, G. A. Flavonoid modulation of GABA(A) receptors. **Br J Pharmacol**, v. 163, n. 2, p. 234-45, May 2011. ISSN 1476-5381 (Electronic)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21244373> >.

HAYAISHI, O.; HUANG, Z.-L. Role of orexin and prostaglandin E (2) in activating histaminergic neurotransmission. **Drug News Perspect**, v. 17, n. 2, p. 105, 2004.

HONMORE, V. S. et al. Isolates of *Alpinia officinarum* Hance as COX-2 inhibitors: Evidence from anti-inflammatory, antioxidant and molecular docking studies. **International immunopharmacology**, v. 33, p. 8-17, 2016. ISSN 1567-5769.

HOSSEINI-ZARE, M. S. et al. Effects of pentoxifylline and H-89 on epileptogenic activity of bucladesine in pentylenetetrazol-treated mice. **Eur J Pharmacol**, v. 670, n. 2-3, p. 464-70, Nov 30 2011. ISSN 1879-0712 (Electronic)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21946102> >.

HOU, Y. et al. Anti-depressant natural flavonols modulate BDNF and beta amyloid in neurons and hippocampus of double TgAD mice. **Neuropharmacology**, v. 58, n. 6, p. 911-20, May 2010. ISSN 1873-7064 (Electronic)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19917299> >.

JAKOBSSON, P. J. et al. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 13, p. 7220-5, Jun 22 1999. ISSN 0027-8424 (Print)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10377395> >.

JANIA, L. A. et al. Microsomal prostaglandin E synthase-2 is not essential for in vivo prostaglandin E2 biosynthesis. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 88, n. 3-4, p. 73-81, 2009. ISSN 1098-8823.

JIANG, Y. et al. [Influence of 11 ginsenoside monomers on action potentials of myocardiocytes]. **Zhongguo Yao Li Xue Bao**, v. 14 Suppl, p. S8-12, Nov 1993. ISSN 0253-9756 (Print)

0253-9756 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8010077> >.

JUNG, K. H. et al. Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. **Neurobiol Dis**, v. 23, n. 2, p. 237-46, Aug 2006. ISSN 0969-9961 (Print)

0969-9961 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16806953> >.

KANG, N. et al. Astrocytic glutamate release-induced transient depolarization and epileptiform discharges in hippocampal CA1 pyramidal neurons. **Journal of neurophysiology**, v. 94, n. 6, p. 4121-4130, 2005. ISSN 0022-3077.

KAUFMANN, W. E. et al. COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 6, p. 2317-2321, 1996. ISSN 0027-8424.

KELLEY, K. A. et al. Potentiation of excitotoxicity in transgenic mice overexpressing neuronal cyclooxygenase-2. **Am J Pathol**, v. 155, n. 3, p. 995-1004, Sep 1999. ISSN 0002-9440 (Print)

0002-9440 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10487857> >.

KHARATISHVILI, I. et al. Quantitative diffusion MRI of hippocampus as a surrogate marker for post-traumatic epileptogenesis. **Brain**, v. 130, n. 12, p. 3155-3168, 2007. ISSN 1460-2156.

KIM, D. K.; JANG, T. J. Cyclooxygenase-2 expression and effect of celecoxib in flurothyl-induced neonatal seizure. **Int J Exp Pathol**, v. 87, n. 1, p. 73-8, Feb 2006. ISSN 0959-9673 (Print)

0959-9673 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16436115> >.

KIM, S.-R. et al. Visfatin enhances ICAM-1 and VCAM-1 expression through ROS-dependent NF- κ B activation in endothelial cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 5, p. 886-895, 2008. ISSN 0167-4889.

KIM, S. U.; DE VELLIS, J. Microglia in health and disease. **J Neurosci Res**, v. 81, n. 3, p. 302-13, Aug 1 2005. ISSN 0360-4012 (Print)

0360-4012 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15954124> >.

LAXER, K. D. et al. The consequences of refractory epilepsy and its treatment. **Epilepsy Behav**, v. 37, p. 59-70, Aug 2014. ISSN 1525-5069 (Electronic)

1525-5069 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24980390> >.

LEE, S. et al. Hydrogen peroxide increases human leukocyte adhesion to porcine aortic endothelial cells via NF κ B-dependent up-regulation of VCAM-1. **International immunology**, v. 19, n. 12, p. 1349-1359, 2007. ISSN 1460-2377.

LEE, Y. W. et al. IL-4-induced oxidative stress upregulates VCAM-1 gene expression in human endothelial cells. **J Mol Cell Cardiol**, v. 33, n. 1, p. 83-94, Jan 2001. ISSN 0022-2828 (Print)

0022-2828 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11133225> >.

LIBRIZZI, L. et al. Expression of adhesion factors induced by epileptiform activity in the endothelium of the isolated guinea pig brain in vitro. **Epilepsia**, v. 48, n. 4, p. 743-51, Apr 2007. ISSN 0013-9580 (Print)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17386052> >.

LIMA, D. K. et al. Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from Piper aleyreanum C.DC in rodents. **J Ethnopharmacol**, v. 142, n. 1, p. 274-82, Jun 26 2012. ISSN 1872-7573 (Electronic)

0378-8741 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22588049> >.

LIMA, D. K. Thesis, Estudo fitoquímico e análise antinociceptiva, anti-inflamatória e antiulcerogênica da parte aérea de Piper aleyreanum C.DC (Piperaceae), Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil, 2012, p. 115.

LIN, T. Y. et al. Cyclooxygenase 2 inhibitor celecoxib inhibits glutamate release by attenuating the PGE₂/EP₂ pathway in rat cerebral cortex endings. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 351, n. 1, p. 134-45, Oct 2014. ISSN 1521-0103 (Electronic)

0022-3565 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25047516> >.

LIU, Y. F. et al. The anticonvulsant and neuroprotective effects of baicalin on pilocarpine-induced epileptic model in rats. **Neurochem Res**, v. 37, n. 8, p. 1670-80, Aug 2012. ISSN 1573-6903 (Electronic)

0364-3190 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22528832> >.

LOSCHER, W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. **Eur J Pharmacol**, v. 342, n. 1, p. 1-13, Jan 19 1998. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9544786> >.

LOSCHER, W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res**, v. 50, n. 1-2, p. 105-23, Jun 2002. ISSN 0920-1211 (Print)

0920-1211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12151122> >.

LOSCHER, W. Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans. **Eur J Pharmacol**, v. 610, n. 1-3, p. 1-11, May 21 2009. ISSN 1879-0712 (Electronic)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19292981> >.

LOSCHER, W.; SCHMIDT, D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Res**, v. 2, n. 3, p. 145-81, May-Jun 1988. ISSN 0920-1211 (Print)

0920-1211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3058469> >.

LÖSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure-European Journal of Epilepsy**, v. 20, n. 5, p. 359-368, 2011. ISSN 1059-1311.

LOSSINSKY, A. S.; SHIVERS, R. R. Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review. **Histol Histopathol**, v. 19, n. 2, p. 535-64, Apr 2004. ISSN 0213-3911 (Print)

0213-3911 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15024715> >.

LUO, J. et al. Concentration of soluble adhesion molecules in cerebrospinal fluid and serum of epilepsy patients. **J Mol Neurosci**, v. 54, n. 4, p. 767-73, Dec 2014. ISSN 1559-1166 (Electronic)

0895-8696 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25001004> >.

MAGIORKINIS, E.; SIDIROPOULOU, K.; DIAMANTIS, A. Hallmarks in the history of epilepsy: epilepsy in antiquity. **Epilepsy Behav**, v. 17, n. 1, p. 103-8, Jan 2010. ISSN 1525-5069 (Electronic)

1525-5050 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19963440> >.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats. **J Neurosci**, v. 15, n. 4, p. 2768-76, Apr 1995. ISSN 0270-6474 (Print)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7722627> >.

MARCHESELLI, V. L.; BAZAN, N. G. Sustained induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by seizures in hippocampus. Inhibition by a platelet-activating factor antagonist. **J Biol Chem**, v. 271, n. 40, p. 24794-9, Oct 4 1996. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8798751> >.

MARCHI, N. et al. Seizure-promoting effect of blood-brain barrier disruption. **Epilepsia**, v. 48, n. 4, p. 732-42, Apr 2007. ISSN 0013-9580 (Print)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17319915> >.

MEDINA, J. H. et al. Chrysin (5, 7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsant properties. **Biochemical pharmacology**, v. 40, n. 10, p. 2227-2231, 1990. ISSN 0006-2952.

MEGIDDO, I. et al. Health and economic benefits of public financing of epilepsy treatment in India: An agent-based simulation model. **Epilepsia**, v. 57, n. 3, p. 464-74, Mar 2016. ISSN 1528-1167 (Electronic)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26765291> >.

MENDLIK, M. T.; URITSKY, T. J. Treatment of neuropathic pain. **Curr Treat Options Neurol**, v. 17, n. 12, p. 50, 2015.

MENEGAZZI, M. et al. Glycyrrhizin attenuates the development of carrageenan-induced lung injury in mice. **Pharmacol Res**, v. 58, n. 1, p. 22-31, Jul 2008. ISSN 1043-6618 (Print)

1043-6618 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18590825> >.

MIOTO, R. País deixa de gerar US \$5 bi por ano com fitoterápicos. **Folha UOL. Disponível na internet no endereço:** < <http://www.blackwell-synergy.com/links> >. Acesso em, v. 1, n. 06, 2010.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E 2-biosynthetic pathway. **Progress in lipid research**, v. 43, n. 1, p. 3-35, 2004. ISSN 0163-7827.

MURAKAMI, M. et al. Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 42, p. 32783-32792, 2000. ISSN 0021-9258.

NASPOLINI, A. P. et al. Traxoprodil decreases pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsy Res**, v. 100, n. 1-2, p. 12-9, Jun 2012. ISSN 1872-6844 (Electronic)

0920-1211 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22281061> >.

NASSIRI-ASL, M.; SHARIATI-RAD, S.; ZAMANSOLTANI, F. Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 32, n. 4, p. 989-93, May 15 2008. ISSN 0278-5846 (Print)

0278-5846 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18262708> >.

NEISH, A. S. et al. Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. **J Exp Med**, v. 176, n. 6, p. 1583-93, Dec 1 1992. ISSN 0022-1007 (Print)

0022-1007 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1281211> >.

NGUELEFACK, T. B. et al. Analgesic and anticonvulsant effects of extracts from the leaves of *Kalanchoe crenata* (Andrews) Haworth (Crassulaceae). **J Ethnopharmacol**, v. 106, n. 1, p. 70-5, Jun 15 2006. ISSN 0378-8741 (Print)

0378-8741 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16423479> >.

NIMMERJAHN, A.; KIRCHHOFF, F.; HELMCHEN, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. **Science**, v. 308, n. 5726, p. 1314-8, May 27 2005. ISSN 1095-9203 (Electronic)

0036-8075 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831717> >.

NODA, Y.; YAMADA, K.; NABESHIMA, T. Role of nitric oxide in the effect of aging on spatial memory in rats. **Behav Brain Res**, v. 83, n. 1-2, p. 153-8, Feb 1997. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9062675> >.

NUGROHO, A. et al. Identification and quantification of the sedative and anticonvulsant flavone glycoside from *Chrysanthemum boreale*. **Arch Pharm Res**, v. 36, n. 1, p. 51-60, Jan 2013. ISSN 0253-6269 (Print)

0253-6269 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23325489> >.

NWAFOR, P. A.; OKWUASABA, F. K. Anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of methanolic extract of *Asparagus pubescens* root in rodents. **J Ethnopharmacol**, v. 84, n. 2-3, p. 125-9, Feb 2003. ISSN 0378-8741 (Print)

0378-8741 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648804> >.

O. C SNEAD, M. C. [gamma]-aminobutyric acid-A receptor antagonist-induced absence seizures in rats: A dose-specific response. **Annals of Neurology**, 1998. 545.

OKADA, K. et al. Cyclooxygenase-2 expression in the hippocampus of genetically epilepsy susceptible El mice was increased after seizure. **Brain Res**, v. 894, n. 2, p. 332-5, Mar 16 2001. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11251211> >.

O'LEARY, K. A. et al. Effect of flavonoids and vitamin E on cyclooxygenase-2 (COX-2) transcription. **Mutat Res**, v. 551, n. 1-2, p. 245-54, Jul 13 2004. ISSN 0027-5107 (Print)

0027-5107 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15225597> >.

OLIVEIRA F. A. et al. Anticonvulsant properties of N-salicylotryptamine in mice. **Pharmacology Biochemistry & Behavior** 68:199-202, 2001.

OLIVEIRA, G. R. D. **Importância da análise da frequência cardíaca na diferenciação de eventos epiléticos e não epiléticos**. DISSERTAÇÃO. Fortaleza-Ceará 2006.

OLIVEIRA, M. S. et al. Modulation of pentylenetetrazol-induced seizures by prostaglandin E2 receptors. **Neuroscience**, v. 152, n. 4, p. 1110-8, Apr 9 2008. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18329178> >.

OLIVEIRA, M. S. et al. Prostaglandin E2 modulates Na⁺,K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. **J Neurochem**, v. 109, n. 2, p. 416-26, Apr 2009. ISSN 1471-4159 (Electronic)

0022-3042 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19200345> >.

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

PACE, I. D. D. Efeito do Triterpeno 3 β , 6 β , 16 β , trihidroxilup-20 (29)-eno nas convul-sões induzidas por pentilenotretazol: papel da Na⁺, K⁺ ATPase. 2013.

PACHTER, J. S.; DE VRIES, H. E.; FABRY, Z. The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. **J Neuropathol Exp Neurol**, v. 62, n. 6, p. 593-604, Jun 2003. ISSN 0022-3069 (Print)

0022-3069 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12834104> >.

PAL, D. K. Determination of brain biogenic amines in Cynodon dactylon Pers. and Cyperus rotundus L. treated mice. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 1, p. 190-197, 2009.

PARK, H. G. et al. Anticonvulsant effect of wogonin isolated from Scutellaria baicalensis. **Eur J Pharmacol**, v. 574, n. 2-3, p. 112-9, Nov 28 2007. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17692312> >.

PAVLOVA, T.; STEPANICHEV, M.; GULYAEVA, N. Pentylentetrazole kindling induces neuronal cyclin B1 expression in rat hippocampus. **Neuroscience letters**, v. 392, n. 1, p. 154-158, 2006. ISSN 0304-3940.

PEDLEY, J. E. T. A. **Epilepsy: A Comprehensive Textbook**. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

PERUCCA, E.; FRENCH, J.; BIALER, M. Development of new antiepileptic drugs: challenges, incentives, and recent advances. **Lancet Neurol**, v. 6, n. 9, p. 793-804, Sep 2007. ISSN 1474-4422 (Print)

1474-4422 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17706563> >.

PREUX, P. M.; RATSIMBAZAFY, V.; JOST, J. Epidemiology of febrile seizures and epilepsy: a call for action. **J Pediatr (Rio J)**, v. 91, n. 6, p. 512-4, Nov-Dec 2015. ISSN 1678-4782 (Electronic)

0021-7557 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26354867> >.

PROPERZI, F.; ASHER, R. A.; FAWCETT, J. W. Chondroitin sulphate proteoglycans in the central nervous system: changes and synthesis after injury. **Biochem Soc Trans**, v. 31, n. 2, p. 335-6, Apr 2003. ISSN 0300-5127 (Print)

0300-5127 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12653631> >.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalogr Clin Neurophysiol**, v. 32, n. 3, p. 281-94, Mar 1972. ISSN 0013-4694 (Print)

0013-4694 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4110397> >.

RAIVICH, G. et al. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. **Brain Res Brain Res Rev**, v. 30, n. 1, p. 77-105, Jul 1999. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10407127> >.

RAMBO, L. M. et al. Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylentetrazol-induced seizures. **Neurochem Int**, v. 55, n. 5, p. 333-40, Sep 2009. ISSN 1872-9754 (Electronic)

0197-0186 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393274> >.

RANSOHOFF, R. M.; PERRY, V. H. Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 119-45, 2009. ISSN 0732-0582 (Print)

0732-0582 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19302036> >.

RASKIN, I.; RIPOLL, C. Can an apple a day keep the doctor away? **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 27, p. 3419-3429, 2004. ISSN 1381-6128.

RASO, G. M. et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Sci**, v. 68, n. 8, p. 921-31, Jan 12 2001. ISSN 0024-3205 (Print)

0024-3205 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11213362> >.

RAVIZZA, T.; BALOSSO, S.; VEZZANI, A. Inflammation and prevention of epileptogenesis. **Neurosci Lett**, v. 497, n. 3, p. 223-30, Jun 27 2011. ISSN 1872-7972 (Electronic)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21362451> >.

RAVIZZA, T. et al. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. **Neurobiol Dis**, v. 29, n. 1, p. 142-60, Jan 2008. ISSN 0969-9961 (Print)

0969-9961 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17931873> >.

RAYGUDE, K. S. et al. Anticonvulsant effect of fisetin by modulation of endogenous biomarkers. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, n. 3, p. 215-222, 2012. ISSN 2210-5239.

ROBERTS, S. M.; BEZINOVER, D. S.; JANICKI, P. K. Reappraisal of the role of dolasetron in prevention and treatment of nausea and vomiting associated with surgery or chemotherapy. **Cancer Manag Res**, v. 4, p. 67-73, 2012. ISSN 1179-1322 (Print)

1179-1322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22427733> >.

ROJAS, A. et al. Cyclooxygenase-2 in epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 1, p. 17-25, Jan 2014. ISSN 1528-1167 (Electronic)

- 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24446952> >.
- SAKLANI, A.; KUTTY, S. K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discov Today**, v. 13, n. 3-4, p. 161-71, Feb 2008. ISSN 1359-6446 (Print)
- 1359-6446 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18275914> >.
- SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. **Eur J Pharmacol**, v. 331, n. 1, p. 43-52, Jul 16 1997. ISSN 0014-2999 (Print)
- 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9274929> >.
- SANDER, J. W. The epidemiology of epilepsy revisited. **Curr Opin Neurol**, v. 16, n. 2, p. 165-70, Apr 2003. ISSN 1350-7540 (Print)
- 1350-7540 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12644744> >.
- SANG, N. et al. Postsynaptically synthesized prostaglandin E2 (PGE2) modulates hippocampal synaptic transmission via a presynaptic PGE2 EP2 receptor. **J Neurosci**, v. 25, n. 43, p. 9858-70, Oct 26 2005. ISSN 1529-2401 (Electronic)
- 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16251433> >.
- SCHWARTZ, M. et al. Microglial phenotype: is the commitment reversible? **Trends in neurosciences**, v. 29, n. 2, p. 68-74, 2006. ISSN 0166-2236.
- 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 1528-1167 (Electronic)
- 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28276062> >.
- SERRANO, G. et al. Ablation of cyclooxygenase-2 in forebrain neurons is neuroprotective and dampens brain inflammation after status epilepticus. **Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 42, p. 14850-14860, 2011. ISSN 0270-6474.
- SEWAL, R. K. et al. Increase in seizure susceptibility in sepsis like condition explained by spiking cytokines and altered adhesion molecules level with impaired blood brain barrier integrity in experimental model of rats treated with lipopolysaccharides. **Epilepsy Res**, v. 135, p. 176-186, Sep 2017. ISSN 1872-6844 (Electronic)
- 0920-1211 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28797776> >.
- SHAPIRO, L. A.; WANG, L.; RIBAK, C. E. Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats. **Epilepsia**, v. 49 Suppl 2, p. 33-41, 2008. ISSN 0013-9580 (Print)
- 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18226170> >.

SHARMA, A. K. et al. Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 7, p. 984-99, Dec 2007. ISSN 0192-6233 (Print)

0192-6233 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18098044> >.

SHLOSBERG, D. et al. Blood–brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. **Nature Reviews Neurology**, v. 6, n. 7, p. 393, 2010. ISSN 1759-4766.

SIMMONS, D. L.; BOTTING, R. M.; HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacol Rev**, v. 56, n. 3, p. 387-437, Sep 2004. ISSN 0031-6997 (Print)

0031-6997 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15317910> >.

SINGH, N. et al. Piper longum Linn. Extract inhibits TNF-alpha-induced expression of cell adhesion molecules by inhibiting NF-kappaB activation and microsomal lipid peroxidation. **Phytomedicine**, v. 15, n. 4, p. 284-91, Apr 2008. ISSN 1618-095X (Electronic)

0944-7113 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17689945> >.

SOMERA-MOLINA, K. C. et al. Glial Activation Links Early-Life Seizures and Long-Term Neurologic Dysfunction: Evidence Using a Small Molecule Inhibitor of Proinflammatory Cytokine Upregulation. **Epilepsia**, v. 48, n. 9, p. 1785-1800, 2007. ISSN 1528-1167.

SOUZA, M. A. et al. Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. **Epilepsia**, v. 50, n. 4, p. 811-23, Apr 2009. ISSN 1528-1167 (Electronic)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19055495> >.

SUGAYA, A. et al. Inhibitory effect of peony root extract on pentylentetrazol-induced EEG power spectrum changes and extracellular calcium concentration changes in rat cerebral cortex. **J Ethnopharmacol**, v. 33, n. 1-2, p. 159-67, May-Jun 1991. ISSN 0378-8741 (Print)

0378-8741 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1943164> >.

SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E receptors. **J Biol Chem**, v. 282, n. 16, p. 11613-7, Apr 20 2007. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17329241> >.

TAIWE, G. S. et al. Anticonvulsant activity of an active fraction extracted from *Crinum jagus* L. (Amaryllidaceae), and its possible effects on fully kindled seizures, depression-like behaviour and oxidative stress in experimental rodent models. **J Ethnopharmacol**, v. 194, p. 421-433, Dec 24 2016. ISSN 1872-7573 (Electronic)

0378-8741 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27725241> >.

TAKEMIYA, T.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K. Roles of prostaglandin synthesis in excitotoxic brain diseases. **Neurochem Int**, v. 51, n. 2-4, p. 112-20, Jul-Sep 2007. ISSN 0197-0186 (Print)

0197-0186 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17629358> >.

TAKEMIYA, T. et al. Inducible brain COX-2 facilitates the recurrence of hippocampal seizures in mouse rapid kindling. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 71, n. 3-4, p. 205-16, Jul 2003. ISSN 1098-8823 (Print)

1098-8823 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14518562> >.

TEMP, F. R. et al. Cyclooxygenase-2 inhibitors differentially attenuate pentylenetetrazol-induced seizures and increase of pro- and anti-inflammatory cytokine levels in the cerebral cortex and hippocampus of mice. **Eur J Pharmacol**, v. 810, p. 15-25, Sep 5 2017. ISSN 1879-0712 (Electronic)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28583427> >.

THIRUPATHY, K. P.; TULSHKAR, A.; VIJAYA, C. Neuropharmacological activity of *Lippia nodiflora* Linn. **Pharmacognosy Res**, v. 3, n. 3, p. 194-200, Jul 2011. ISSN 0974-8490 (Electronic)

0974-8490 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22022169> >.

TIAN, G.-F. et al. An astrocytic basis of epilepsy. **Nature medicine**, v. 11, n. 9, p. 973, 2005. ISSN 1546-170X.

TOMLINSON, A. et al. Cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase isoforms in rat carrageenin-induced pleurisy. **Br J Pharmacol**, v. 113, n. 3, p. 693-8, Nov 1994. ISSN 0007-1188 (Print)

0007-1188 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7532080> >.

TURRIN, N. P.; RIVEST, S. Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy. **Neurobiol Dis**, v. 16, n. 2, p. 321-34, Jul 2004. ISSN 0969-9961 (Print)

0969-9961 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15193289> >.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 38, p. 97-120, 1998. ISSN 0362-1642 (Print)

0362-1642 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9597150> >.

VAN VLIET, E. et al. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. **Brain**, v. 130, n. 2, p. 521-534, 2006. ISSN 1460-2156.

VEZZANI, A. et al. Interleukin-1 β immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. **Journal of Neuroscience**, v. 19, n. 12, p. 5054-5065, 1999. ISSN 0270-6474.

VEZZANI, A. et al. The role of inflammation in epilepsy. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 1, p. 31-40, Jan 2011. ISSN 1759-4766 (Electronic)

- 1759-4758 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21135885> >.
- VEZZANI, A.; GRANATA, T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. **Epilepsia**, v. 46, n. 11, p. 1724-43, Nov 2005. ISSN 0013-9580 (Print)
- 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16302852> >.
- WALZ, R. B., M. M.; LINHARES, M. N.; LEITE, J. P.; SAKAMOTO, A.C. KAPCZINSKI F, QUEVEDO J E IZQUIERDO I. Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos. **Epilepsias**, p. Epilepsias, 2004.
- WETHERINGTON, J.; SERRANO, G.; DINGLELINE, R. Astrocytes in the epileptic brain. **Neuron**, v. 58, n. 2, p. 168-78, Apr 24 2008. ISSN 1097-4199 (Electronic)
- 0896-6273 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18439402> >.
- WHO. World Health Organization. **Mental health and primary health care**, 1997.
- WHO: World Health Organization 2018. Disponível em: < http://www.who.int/mental_health/neurology/epilepsy/en/ >. Acesso em: 01/03/2018.
- YAGAMI, T.; KOMA, H.; YAMAMOTO, Y. Pathophysiological Roles of Cyclooxygenases and Prostaglandins in the Central Nervous System. **Mol Neurobiol**, v. 53, n. 7, p. 4754-71, Sep 2016. ISSN 1559-1182 (Electronic)
- 0893-7648 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26328537> >.
- YAMAGATA, K. et al. Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. **Neuron**, v. 11, n. 2, p. 371-86, Aug 1993. ISSN 0896-6273 (Print)
- 0896-6273 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8352945> >.
- YAMAGATA, K. et al. Coexpression of microsomal-type prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells of rats during endotoxin-induced fever. **J Neurosci**, v. 21, n. 8, p. 2669-77, Apr 15 2001. ISSN 1529-2401 (Electronic)
- 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11306620> >.
- YANG, F. et al. Roles of astrocytes and microglia in seizure-induced aberrant neurogenesis in the hippocampus of adult rats. **J Neurosci Res**, v. 88, n. 3, p. 519-29, Feb 15 2010. ISSN 1097-4547 (Electronic)
- 0360-4012 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19774666> >.
- ZHANG, D. et al. Prostaglandin E2 released from activated microglia enhances astrocyte proliferation in vitro. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 238, n. 1, p. 64-70, Jul 1 2009. ISSN 1096-0333 (Electronic)
- 0041-008X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19397918> >.

ZHANG, W. et al. Inflammatory activation of human brain endothelial cells by hypoxic astrocytes in vitro is mediated by IL-1 β . **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 20, n. 6, p. 967-978, 2000. ISSN 0271-678X.

ZUANAZZI, J. D. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v. 5, p. 577-614, 2004.

ZUCKER, D. K.; WOOTEN, G. F.; LOTHMAN, E. W. Blood-brain barrier changes with kainic acid-induced limbic seizures. **Exp Neurol**, v. 79, n. 2, p. 422-33, Feb 1983. ISSN 0014-4886 (Print)

0014-4886 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6822273> >.

ZUNIC, L.; SKRBO, A.; DOBRACA, A. Historical Contribution of Pharmaceutics to Botany and Pharmacognosy Development. **Mater Sociomed**, v. 29, n. 4, p. 291-300, Dec 2017. ISSN 1512-7680 (Print)

1512-7680 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29285002> >.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Comissão de Ética no Uso de Animais

da

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do 3,5-dihidroxi-7-metoxiflavona (PAPAH-1) e 3,5,6-trihidroxi-7-metoxiflavona (PAPA-Act-3) sobre a susceptibilidade às convulsões induzidas por pentilenetetrazol (PTZ): o papel da prostaglandina-E2", protocolada sob o CEUA nº 5042310115, sob a responsabilidade de **Michele Rechia Figuera** e equipe; **Alexandra Seide Cardoso**; **Fernanda Hauptenthal**; **Guilherme Busanello**; **Maria Parizzi Funghetto**; **Viviane Nogueira de Zorzi**; **Luiz Fernando Freire Royes** - 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 19/05/2015.

We certify that the proposal "Effect of 3,5-dihydroxy-7-methoxyflavone (PAPAH-1) and 3,5,6-trihydroxy-7-methoxyflavone (PAPA-Act-3) on the susceptibility to seizures induced by pentylenetetrazole (PTZ): the role prostaglandin E2", utilizing 256 Heterogenics mice (256 males), protocol number CEUA 5042310115, under the responsibility of **Michele Rechia Figuera** and team; **Alexandra Seide Cardoso**; **Fernanda Hauptenthal**; **Guilherme Busanello**; **Maria Parizzi Funghetto**; **Viviane Nogueira de Zorzi**; **Luiz Fernando Freire Royes** - 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 05/19/2015.

Finalidade da Proposta: *Pesquisa (Acadêmica)*

Vigência da Proposta: de 06/2015 a 03/2018

Área: *Neuropsiquiatria/neurologia*

Origem: *Biotério Central UFSM*

Espécie: *Camundongos heterogênicos*

sexo: *Machos*

Idade: *2 a 2 meses*

N: *256*

Linhagem: *Swiss*

Peso: *30 a 30 g*

Resumo: A inflamação tem um importante papel em doenças do Sistema Nervoso Central, incluindo a epilepsia. Essa é uma doença com componentes comportamentais e eletroencefalográficos, que comprometem a qualidade de vida dos pacientes acometidos por ela. O tratamento farmacológico existente para esta condição é eficaz em 60-70% dos pacientes, sendo os demais refratários a eles. Por isso, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas é de fundamental importância. Alguns membros da família Piperaceae, como a Piper aleyreanum já têm mostrado ação anti-inflamatória, assim como algumas substâncias extraídas dela, sendo por isso relevante a pesquisa de sua atividade anticonvulsivante. Sabendo disso, o presente estudo visa pesquisar o efeito dos extratos da Piper aleyreanum na susceptibilidade às convulsões induzidas por pentilenetetrazol (PTZ) em camundongos, bem como seus efeitos sobre os marcadores inflamatórios e de dano oxidativo a fim de verificar uma possível ação anticonvulsivante dos extratos.

Local do experimento: *Laboratório de Bioquímica do Exercício*

Santa Maria, 14 de fevereiro de 2018

Prof. Dr. Denis Brock Rosemberg
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

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