

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

Fernanda Rossatto Temp

**EFEITOS DE INIBIDORES DA ENZIMA COX-2 SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE CRISES CONVULSIVAS EM
CAMUNDONGOS**

Santa Maria, RS
2018

Fernanda Rossatto Temp

**EFEITOS DE INIBIDORES DA ENZIMA COX-2 SOBRE O DESENVOLVIMENTO
DE CRISES CONVULSIVAS EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito para obtenção do grau de **Doutora em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello
Co-orientadora: Dra. Micheli Mainardi Pillat

Santa Maria, RS
2018

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Temp, Fernanda Rossatto
EFEITOS DE INIBIDORES DA ENZIMA COX-2 SOBRE O
DESENVOLVIMENTO DE CRISES CONVULSIVAS EM CAMUNDONGOS /
Fernanda Rossatto Temp.- 2018.
155 p.; 30 cm

Orientador: Carlos Fernando de Mello
Coorientadora: Micheli Mainardi Pillat
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2018

1. Nimesulida 2. Celecoxibe 3. Etoricoxibe 4.
Neuroinflamação 5. Citocinas e prostaglandinas I. Mello,
Carlos Fernando de II. Pillat, Micheli Mainardi III.
Título.

© 2018

Todos os direitos autorais reservados a Fernanda Rossatto Temp. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: fe_temp@hotmail.com

Fernanda Rossatto Temp

**EFEITOS DE INIBIDORES DA ENZIMA COX-2 SOBRE O DESENVOLVIMENTO
DE CRISES CONVULSIVAS EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito para obtenção do grau de **Doutora em Farmacologia.**

Aprovado em 12 de janeiro de 2018:

Carlos Fernando de Mello, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Cristina Ruedell Reschke, Dra. (RCSI)

Maria José da Silva Fernandes, Dra. (UNIFESP)

Mauro Schneider Oliveira, Dr. (UFSM)

Adair Roberto Soares dos Santos, Dr. (UFSM/UFSC)

Santa Maria, RS
2018

DEDICATÓRIA

Ao meu avô materno Edeno Rossatto (in memoriam) e ao meu avô de coração Valdemar Affonso Fava (in memoriam) que almejaram e sonharam junto comigo por este momento.

Dedico esta conquista a vocês!

AGRADECIMENTOS

Foram muitos momentos vividos e conhecimentos adquiridos até conseguir chegar ao fim de mais essa etapa. Nesses agradecimentos escrevo não por ordem de significância, mas escrevo para as pessoas que fizeram diferença para que esse dia se tornasse realidade.

Agradeço a Deus por me proporcionar tudo isso, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Aos meus pais, Ernani e Jane, pelo amor infinito, por serem meus guias e inspiradores de minha formação como ser humano e profissional. Vocês são meus exemplos de força e fé, se não fosse vocês jamais teria alcançado meus objetivos. Devo-lhes tudo o que sou. Amo vocês!

Ao meu marido Rodrigo, pelo seu incansável amor por mim, incentivo, companheirismo, amizade, carinho, apoio e muita paciência. É a pessoa com quem eu sei que passarei por muitos e muitos momentos de felicidade como esta e que a vida escolheu para ser meu companheiro nas horas boas e ruins, que fica sentado comigo me olhando trabalhar, que finge ser plateia para eu ensaiar e que me tranquiliza dizendo: “no final tudo vai dar certo!”. Te amo!

Agradecer aos meus avôs aos quais dedico esta tese, porque sempre foram meus inspiradores a seguir em frente. Eles sonhavam mais do que eu por este momento. Faziam questão de estarem presentes para me ver tornar-se Doutora. Enfim, por virtude da vida não puderam estar presentes neste momento, mas creio que lá de cima a felicidade deles é imensa por este sonho estar se concretizando.

Aos meus irmãos, Fabiana e Estevan e ao meu cunhado João Marcelo, por sempre estarem por perto e torcerem pelo meu sucesso, transmitindo-me amor e carinho.

Ao meu sobrinho Lorenzo luz dos meus dias.

Ao Lord meu amado filho de quatro patas pelo companheirismo, amor e carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Carlos F. Mello, por me acolher em seu laboratório e me ensinar a amar a pesquisa. Pelos seus ensinamentos, conhecimentos, carinho, amizade, orientação e atenção imprescindíveis para a realização deste trabalho. Por sempre acreditar em mim no meu potencial mais do que um dia até eu mesma acreditei. Professor, ao senhor, minha eterna admiração e gratidão.

À minha co-orientadora Micheli, obrigada pela ajuda e tempo dedicado a mim.

Às minhas eternas amigas Josi e Paula que vou levar para a vida inteira. Obrigada por estarem presentes nos momentos mais importantes da minha vida, por toda a ajuda dedicada na realização de cada experimento, por amarem assim como eu a pesquisa, pelos vários momentos de descontração, felicidade, alegria e pelas palavras sempre sinceras. Obrigada!!!

À Ana, Laura e Amanda, amigas de todas as horas. Obrigada pela ajuda nos experimentos, pelo convívio, companheirismo. Obrigada por tudo sempre!!!

À Lu, que fomos nos conhecendo no decorrer dos experimentos (*Kindling*, SPE, evaporação de amostras), nas nossas longas e intermináveis conversas o que fez tornarmos além de colegas, amigas. Obrigada pela ajuda e pela sua amizade!

À minha querida Profe Ju. Obrigada por ser minha amiga e sempre estar pronta para me ajudar!

À minha amiga Quelen sempre pronta para me ajudar em qualquer coisa que fosse e sempre me proporcionando bons conselhos!

Aos amigos que a Irlanda/Dublin me proporcionou, Tati, Luiz e Bibi, sem palavras para expressar minha gratidão e amor por vocês. E ao Luiz por toda a paciência e inteligência dedicada a mim em cada momento no laboratório.

À minha querida e amada Cris e ao Professor David Henshall! Obrigada por me acolherem no laboratório e pela oportunidade de aprender técnicas novas e obter novos conhecimentos. A vocês, o meu muito obrigada!

À minha amiga Bruna, sempre dividindo momentos bons e ruins no lab, mas sempre com o sorriso no rosto o que me motivava a seguir em frente.

Obrigada a todos os colegas e amigos do LabNeuro por tornarem os meus dias mais felizes e pelo constante aprendizado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, que contribuíram para a minha formação científica.

Aos animais, que foram fundamentais para a realização desta pesquisa.

À Universidade Federal de Santa Maria por proporcionar o conhecimento científico através da sua pós-graduação.

À CAPES pela bolsa de estudo no Brasil e no exterior.

A todos que de alguma forma contribuíram e acreditaram no meu trabalho. Muito obrigada!

Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridades, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridades e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir!
(Augusto Cury)

RESUMO

EFEITOS DE INIBIDORES DA ENZIMA COX-2 SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE CRISES CONVULSIVAS EM CAMUNDONGOS

AUTORA: Fernanda Rossatto Temp
ORIENTADOR: Carlos Fernando de Mello

Os inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2) reduzem a síntese de prostaglandinas (PGs) e desempenham um papel importante na inflamação. Nas últimas décadas, pesquisas têm focado no uso de inibidores da COX-2 e no processo inflamatório no sistema nervoso central (SNC). No entanto, há controvérsias sobre o papel da COX-2 em crises convulsivas agudas. Alguns estudos mostram que a inibição da COX-2 diminui as crises convulsivas, enquanto outros relatam que pode facilitar os episódios convulsivos. Assim, considerando a discrepância atual quanto ao efeito pró e anticonvulsivante dos inibidores da COX-2 utilizados de forma aguda e a falta de estudos em relação ao uso subcrônico, o objetivo deste estudo foi investigar se a administração aguda ou subcrônica de inibidores da COX-2, nimesulida, celecoxibe e etoricoxibe alteram as crises convulsivas. Camundongos Swiss machos (25 – 30 gramas) foram tratados agudamente com veículo (0,1% de carboximetilcelulose em Tween 80 a 50%, p.o.) ou nimesulida, celecoxibe ou etoricoxibe (0,2, 2 ou 20 mg/kg, p.o.) 60 minutos antes da administração do agente convulsivo pentilenotetrazol (PTZ) (50 mg/kg, i.p.). Nos estudos da administração subcrônica os animais receberam veículo (0,1% de carboximetilcelulose em Tween 80 a 5%, p.o.), nimesulida, celecoxibe ou etoricoxibe (0,2, 2 ou 20 mg/kg, p.o.) diariamente durante 14 dias consecutivos. No 15º dia, os camundongos foram desafiados com PTZ (50 mg/kg, i.p.). Após administração de PTZ, os animais foram monitorados durante 20 minutos para o aparecimento de mioclônias e crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas. O número de episódios de crises convulsivas, o tempo total das crises e o escore da escala de Racine foram registrados. Após a análise comportamental, os animais foram eutanasiados e o córtex cerebral e o hipocampo foram dissecados e homogeneizados para posterior análise de mediadores pró- e anti-inflamatórias, a saber: interleucina-1 β (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6), interferon- γ (INF- γ), fator de necrose tumor- α (TNF- α) e interleucina-10 (IL-10), prostaglandinas (PGE₂, PGF_{2 α} , e PGD₂), tromboxanos (TXB₂), em picrograma por miligrama de proteína (pg/mg) e imunorreatividade dos receptores para prostaglandinas (EP1, EP2 e EP3). A administração aguda de nimesulida aumentou a latência para mioclonia, crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas induzidas por PTZ e diminuiu o número de episódios convulsivos. Entretanto, celecoxibe e etoricoxibe agudamente não alteraram os parâmetros analisados. O PTZ aumentou os níveis de citocinas no córtex cerebral e no hipocampo. Enquanto, etoricoxibe não teve efeito, celecoxibe e nimesulida atenuaram o aumento de citocinas pró-inflamatórias induzido por PTZ no córtex cerebral. Nimesulida foi o único inibidor da COX-2 que atenuou as crises convulsivas induzidas por PTZ e esse efeito coincidiu com um aumento dos níveis de IL-10 no córtex cerebral e no hipocampo. A administração subcrônica de celecoxibe diminuiu a latência para as crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas induzidas por PTZ e diminuiu o aumento das citocinas pró-inflamatórias induzido por PTZ, mas não alterou o aumento nos níveis de PGE₂ ou IL-10 induzidos por PTZ. De notória importância, a administração subcrônica de nimesulida e etoricoxibe aumentou a latência para crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas induzidas por PTZ, diminuíram o aumento de PGE₂ e potencializaram o aumento de IL-10 induzido por PTZ. Sugerimos que o efeito anticonvulsivo da nimesulida e do etoricoxibe pode estar relacionado à sua capacidade de diminuir a produção de PGE₂ e aumentar a produção de IL-10 induzidas por PTZ em camundongos, assim como observado no tratamento agudo.

Palavras-chave: Nimesulida. Celecoxibe. Etoricoxibe. Neuroinflamação. Citocinas e prostaglandinas.

ABSTRACT

EFFECTS COX-2 INHIBITORS ON THE DEVELOPMENT OF SEIZURES IN MICE

AUTHOR: FERNANDA ROSSATTO TEMP
ADVISOR: CARLOS FERNANDO DE MELLO

Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors reduce the synthesis of prostaglandins (PGs) and play an important role in inflammation. In the last decades, research has been focused on the use of COX-2 inhibitors and the inflammatory process in the central nervous system (CNS). However, there is controversy about the role of COX-2 in acute seizures. Some studies have shown that COX-2 inhibition decreases seizures, while others have reported that it may facilitate seizure episodes. Considering the current discrepancy regarding the pro and anticonvulsant acute effect of COX-2 inhibitors and the lack of studies investigating the effect of their subchronic administration, the aim of this study was to investigate whether the acute or subchronic administration of COX-2 inhibitors, nimesulide, celecoxib and etoricoxib alter seizures. Male swiss mice (25-30 grams) were treated acutely with vehicle (0.1% carboxymethylcellulose in 5% Tween 80, p.o.) nimesulide, celecoxib or etoricoxib (0.2, 2 or 20 mg/kg, p.o.) 60 minutes prior to the administration of the seizure agent pentylenetetrazol (50 mg/kg, i.p.). In subchronic administrations studies the animals received vehicle (0.1% carboxymethylcellulose in 5% Tween 80, p.o.) or nimesulide, celecoxib or etoricoxib (0.2, 2 or 20 mg/kg, p.o.) daily for 14 consecutive days. On the 15th day, mice were challenged with PTZ (50 mg/kg, i.p.). After PTZ administration the animals were monitored for 20 minutes for the appearance of myoclonic and generalized tonic-clonic seizures. The number of seizure episodes, total time spent seizing, and Racine score were recorded. After the behavioral analysis, the animals were euthanized and the cerebral cortex and hippocampus were dissected and homogenized for the analysis of pro- and anti-inflammatory mediators [interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor -alfa (TNF- α), and interleukin-10 (IL-10)], prostaglandins (PGE₂, PGF_{2 α} , and PGD₂), thromboxanes (TXB₂), in picogram per milligram of protein (pg/mg) and prostaglandin receptor (EP1, EP2 and EP3) immunoreactivity. Acute administration of nimesulide increased the latency to myoclonic, generalized tonic-clonic tonic-clonic seizures induced by PTZ and decreased the number of seizure episodes. However, celecoxib and etoricoxib acutely did not alter the parameters analyzed. PTZ increased cytokine levels in the cerebral cortex and hippocampus. While etoricoxib had no effect, celecoxib and nimesulide attenuated the PTZ-induced increase in proinflammatory cytokines in the cerebral cortex. Nimesulide was the only COX-2 inhibitor that attenuated PTZ-induced seizures, which coincided with an increase in IL-10 levels in the cerebral cortex and hippocampus. In addition, subchronic administration of celecoxib decreased the latency to PTZ-induced generalized tonic-clonic seizures and the PTZ-induced increase in proinflammatory cytokines, but did not alter the PTZ-induced increase in PGE₂ or IL-10 levels. In addition, subchronic administration of nimesulide and etoricoxib increased the latency to generalized tonic-clonic convulsive seizures induced by PTZ, decreased the PTZ-induced increase of PGE₂ and potentiated the PTZ-induced increase of IL-10. We suggest that the anticonvulsive effect of nimesulide and etoricoxib may be related to their ability to decrease PTZ-induced production of PGE₂ and to increase PTZ-induced IL-10 production in mice.

Keywords: Nimesulide. Celecoxib. Etoricoxib. Neuroinflammation. Cytokines and prostaglandins.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Classificação dos tipos de crises convulsivas de acordo com a ILAE 2017	34
Figura 2 – Processo inflamatório na periferia.....	37
Figura 3 – Apresentação de antígenos por DCs para as células T naive induz as células T a produzir interleucinas e diferenciam-se em células com o perfil Th1, Th2, Th17 e células T reguladoras (Treg)	39
Figura 4 – Inflamação no SNC independente de PAMPs e DAMPs.....	43
Figura 5 – As duas principais vias de liberação de AA a partir de fosfolipídios no cérebro	48
Figura 6 – Conversão do AA por meio de três vias chamadas COXs, LOXs e citocromo P450.....	49
Figura 7 – Ligação das prostaglandinas aos devidos receptores	57
Figura 8 – Efeitos adversos cardiovasculares	62
Figura 9 – Estrutura química da nimesulida e seus IC50 para COX-1 e COX-2	65
Figura 10 – Estrutura química do celecoxibe e seus IC50 para COX-1 e COX-2	67
Figura 11 – Estrutura química do etoricoxibe e seus IC50 para COX-1 e COX-2	68
Figura 12 – Papel das isoenzimas COX em eventos cardiovasculares.....	69
Figura 13 – Esquema referente aos estudos do nosso grupo de pesquisa.....	134

ARTIGO CIENTÍFICO I

Figure 1: Effect of nimesulide (0.2, 2 or 20 mg/kg, p.o.) on PTZ-induced seizures. Nimesulide increased the latency to PTZ (50 mg/kg, i.p.)-induced myoclonic jerks (A); latency to generalized tonic-clonic seizures (B); and decreased Racine score (C)	77
Figure 2: Lack of effect of celecoxib (0.2, 2 and 20 mg/kg, p.o.) on PTZ-induced seizures. Celecoxib did not alter PTZ (50 mg/kg, i.p.)-induced myoclonic jerks (A); latency to generalized tonic-clonic seizures (B); and Racine score (C).....	78
Figure 3: Lack of effect of etoricoxib (0.2, 2 and 20 mg/kg, p.o.) on PTZ-induced seizures. Etoricoxib did not alter the latency to PTZ (50 mg/kg, i.p.)-induced myoclonic jerks (A); latency to generalized tonic-clonic seizures (B); and Racine score (C).....	78
Figure 4: Effect of nimesulide on IL-1 β (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), TNF- α (D) and IL-10 (E) levels in the cerebral cortex and hippocampus after PTZ administration (50 mg/kg, i.p) .	79
Figure 5: Effect of celecoxib on IL-1 β (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), TNF- α (D) and IL-10 (E) levels in cerebral the cortex and hippocampus after PTZ administration (50 mg/kg, i.p)	80
Figure 6: Effect of etoricoxib on IL-1 β (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), TNF- α (D) and IL-10 (E) levels in cerebral the cortex and hippocampus after PTZ administration (50 mg/kg, i.p) .	81

ARTIGO CIENTÍFICO II EM FORMA DE MANUSCRITO

Figure 1: Effect of subchronic nimesulide (0.2, 2 or 20 mg/kg, p.o.) on PTZ-induced seizures. Nimesulide did not alter the latency to PTZ (50 mg/kg, i.p.)-induced myoclonic jerks (A); increased latency to generalized tonic-clonic seizures (B); and decreased time spent seizing (C).....	99
Figure 2: Effect of subchronic celecoxib (0.2, 2 and 20 mg/Kg, p.o.) on PTZ-induced seizures. Celecoxib did not alter the latency to PTZ (50 mg/kg, i.p.)-induced myoclonic jerks; decreased latency to generalized tonic-clonic seizures (B); and did not alter the time spent seizing (C).....	99
Figure 3: Effect of subchronic etoricoxib (0.2, 2 or 20 mg/kg, p.o.) on PTZ-induced seizures. Etoricoxib did not alter the latency to PTZ (50 mg/kg, i.p.)-induced myoclonic jerks (A); increased latency to generalized tonic-clonic seizures (B); and did not alter the time spent seizing (C)	100
Figure 4: Effect of subchronic nimesulide (20 mg/Kg, p.o.) on IL-1 β (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), TNF- α (D) and IL-10 (E) levels in the cerebral cortex and hippocampus after PTZ administration (50 mg/kg, i.p.).....	102
Figure 5: Effect of subchronic celecoxib (20 mg/Kg, p.o.) on IL-1 β (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), TNF- α (D) and IL-10 (E) levels in the cerebral cortex and hippocampus after PTZ administration (50 mg/kg, i.p.).....	104
Figure 6: Effect of subchronic etoricoxib (20 mg/Kg, p.o.) on IL-1 β (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), TNF- α (D) and IL-10 (E) levels in the cerebral cortex and hippocampus after PTZ administration (50 mg/kg, i.p.).....	106
Figure 7: Effect of subchronic nimesulide (20 mg/Kg, p.o.) on EP1 (A), EP2 (B) and EP3 (C) receptor immunoreactivity in the cerebral cortex and hippocampus after PTZ administration (50 mg/kg, i.p.).....	108
Figure 8: Effect of subchronic celecoxib (20 mg/Kg, p.o.) on EP1 (A), EP2 (B) and EP3 (C) receptor immunoreactivity in the cerebral cortex and hippocampus after PTZ administration (50 mg/kg, i.p.).....	110
Figure 9: Effect of subchronic etoricoxib (20 mg/Kg, p.o.) on EP1 (A), EP2 (B) and EP3 (C) receptor immunoreactivity in the cerebral cortex and hippocampus after PTZ administration (50 mg/kg, i.p.).....	112
Figure 10: Effect of subchronic nimesulide (20 mg/Kg, p.o.) on PGE ₂ (A), PGF _{2α} (B), TXB ₂ (C) and PGD ₂ (D) levels in the cerebral cortex after PTZ administration (50 mg/kg, i.p.).....	114
Figure 11: Effect of subchronic celecoxib (20 mg/Kg, p.o.) on PGE ₂ (A), PGF _{2α} (B), TXB ₂ (C) and PGD ₂ (D) levels in the cerebral cortex after PTZ administration (50 mg/kg, i.p.).....	115
Figure 12: Effect of subchronic etoricoxib (20 mg/Kg, p.o.) on PGE ₂ (A), PGF _{2α} (B), TXB ₂ (C) and PGD ₂ (D) levels in the cerebral cortex after PTZ administration (50 mg/kg, i.p.).....	117

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Característica das citocinas	40
Tabela 2 – Localização e peso molecular dos receptores: EP, FP, DP, TP e IP	58

ARTIGO CIENTÍFICO I

Table 1: Cytokine levels at different time-points, brain regions and seizure and seizure models.....	82
---	----

ARTIGO CIENTÍFICO II EM FORMA DE MANUSCRITO

Table 1: Effect of COX-2 inhibitors in seizure models.....	122
---	-----

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO CIENTÍFICO I

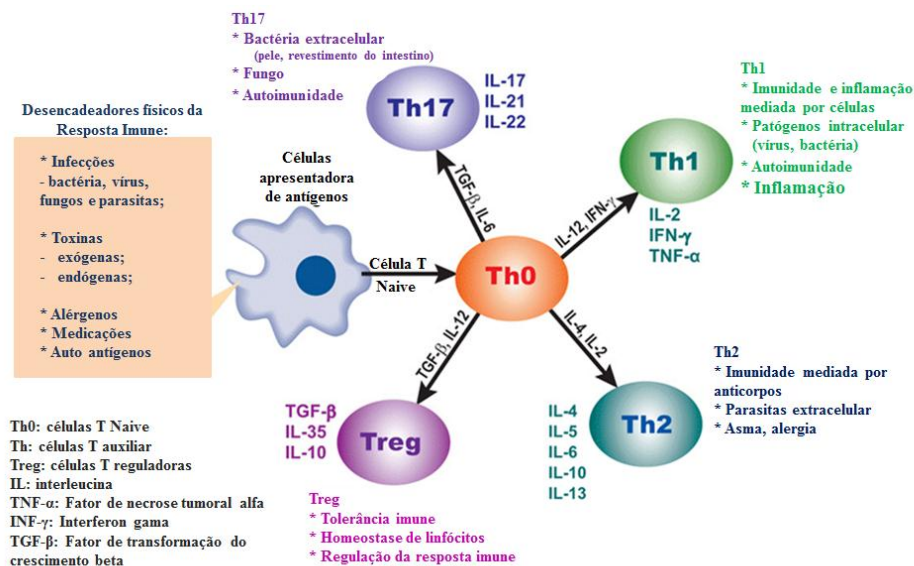
Graphical abstract..... 86

ARTIGO CIENTÍFICO II EM FORMA DE MANUSCRITO

Graphical abstract..... 90

caracterização das células T com base no perfil de secreção das citocinas tem se tornado cada vez mais importante, uma vez que diferentes doenças imunológicas do SNC envolvem determinados subtipos de células T. Células T CD4 naïve se diferenciam em subconjuntos distintos (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, e células T efectoras folicular) de acordo com o perfil de citocinas que promovem diferentes tipos de respostas inflamatórias, como mostrado na Figura 3 (HEMDAN et al., 2010; AKDIS et al., 2011).

Figura 3 – Apresentação de antígenos por DCs para as células T naïve induz as células T a produzir interleucinas e diferenciam-se em células com o perfil Th1, Th2, Th17 e células T reguladoras (Treg)



Estes subconjuntos de células T podem promover diferentes tipos de respostas inflamatórias, com base nos respectivos perfis de citocinas, resposta para quimiocinas e interações com outras células.

Fonte: Figura adaptada, disponível em: <https://livingwellnessblog.wordpress.com/2012/10/12/am-i-th1-or-th2-or-th17/>. Acesso em: 03 nov. 2017.

Subconjuntos de células T auxiliar CD4⁺ foram descritos pela primeira vez por Mossman e Coffman (1986), que encontraram que clones de células T de camundongos separavam-se em dois subconjuntos e eles denominaram células Th1 e Th2 com base na produção de IFN- γ ou IL-4, IL-5 e IL-13, respectivamente. A relevância desta distinção foi subsequentemente demonstrada por Locksley e colaboradores (1987), que descobriram que camundongos que tinham uma resposta dominante de células Th1 resolviam a infecção ocasionada por *Leishmania*, enquanto que camundongos que apresentavam uma resposta dominante Th2 não. Trabalhos têm estabelecido a importância de células Th1 na defesa do hospedeiro contra patógenos intracelulares e de células Th2 na proteção contra infecções por

helminthos. Mais recentemente foi mostrado que células que produzem IL-17A representam uma distinta linhagem de células Th, o subconjunto de células Th17, que além da IL-17A produzem IL-17F, IL-21, IL-22 e, em seres humanos, a IL-26. Células Th17 contribuem para defesa do hospedeiro contra bactérias extracelulares e fungos, embora a extensão total da sua contribuição para defesa do hospedeiro ainda está sendo investigada. Em contraste, a essas funções de proteção das células T auxiliar, respostas células Th2 inapropriadas dão origem a doenças alérgicas, enquanto doenças autoimunes resultam de respostas inapropriadas Th1 e Th17 (OUYANG et al., 2008).

As citocinas anti-inflamatórias são uma série de moléculas imunorreguladoras que controlam as respostas das citocinas pró-inflamatórias. As citocinas agem em conjunto com inibidores específicos de citocinas e receptores de citocinas solúveis para regular a resposta imunológica humana. As principais citocinas anti-inflamatórias incluem antagonista de receptor IL-1, IL-4, IL-10, IL-11, e IL-13. TNF- α , IL-6, e fator de crescimento tumoral β (TGF- β) são conhecidos como citocinas anti-inflamatórias ou pró-inflamatórias, em diferentes circunstâncias. Receptores de citocinas específicas, como IL-1, TNF- α , e IL-18 também funcionam como inibidores de citocinas pró-inflamatórias. Entre todas as citocinas anti-inflamatórias, a IL-10 é uma citocina com potente propriedade anti-inflamatória, sendo capaz de inibir a expressão de citocinas inflamatórias, tais como TNF- α , IL-6 e IL-1 (Tabela 1) (ZHANG; AN, 2007).

Tabela 1 – Característica das citocinas

(continua)

Citocina	Receptores	Fonte celular	Alvos celulares	Associação com doenças
IL-1 α , IL-1 β	IL-1RI, IL-1RII	Macrófagos, monócitos, linfócitos, queratinócitos, micróglia, megacariócitos, neutrófilos, fibroblastos, células da linhagem sinovial, micróglia e astrócitos.	Células fibroblastos, células epiteliais e endoteliais	T, e Doenças autoimune e inflamatória, artrite reumatoide (AR), doença inflamatória intestinal, Psoríase
IL-1Ra (antagonista)	IL-1RI, IL-1RII	Monócitos, macrófagos, fibroblastos, neutrófilos, células epitelial e endotelial, queratinócitos	Células fibroblastos, células epiteliais e endoteliais.	T, e Doenças autoimune e inflamatória, artrite reumatoide (AR), doença inflamatória intestinal, Psoríase
IL-2	IL-2R	Células T ativadas CD4 ⁺ e CD8 ⁺ , células dendríticas (CD) e células Natural Killer (NK)	Células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ , células NK e B	Células T medeiam doenças autoimune e inflamatória e desenvolvimento de

IL-6	IL-6R	Células endoteliais, macrófagos/monócitos, fibroblastos e astrócitos.	Hepatócitos, leucócitos, células T, células B, células hematopoiéticas	imunodeficiência grave Doença autoimune, doença inflamatória crônica, Doença de Castleman, plasmacitoma / mieloma múltiplo
IL-10	Complexo IL-10R1/IL-10R2	Células T, células B, monócitos, macrófagos, astrócitos, CD, células epiteliais, neutrófilos e eosinófilos.	Macrófagos, monócitos, células B, células T, células NK, CD, mastócitos e granulócitos	Câncer, autoimunidade, alergia.
IL-17 ^a	IL-17AR	Células T helper 17, células T CD8 ⁺ , células NK, neutrófilos.	Células epiteliais e endoteliais, fibroblastos, osteoblastos, monócitos e macrófagos.	AR, doença inflamatória intestinal, esclerose múltipla, psoríase, asma alérgica, dermatite atópica e hipersensibilidade de contato
IFN- γ	INFR1/INFR2	Células NK, macrófagos, células T helper 1, células B, linfócito T citotóxico e micróglia.	Células epiteliais, células NK, CDs, macrófagos, células B e T	Suscetibilidade a infecção patogênica intracelular e desenvolvimento de tumor, Diabetes tipo 1, AR, encefalomielite autoimune experimental
TNF- α	TNFR1 e TNFR2	Macrófagos, mastócitos, linfócitos, micróglia e astrócitos	Macrófagos, granulócitos e células teciduais.	Doença autoimune, choque séptico e tumores.

Fonte: adaptado de Tracey e Cerami (1993); Akdis et al., (2011); Lobo-Silva et al., (2016).

2.3.1 Mecanismos inflamatórios nas crises convulsivas

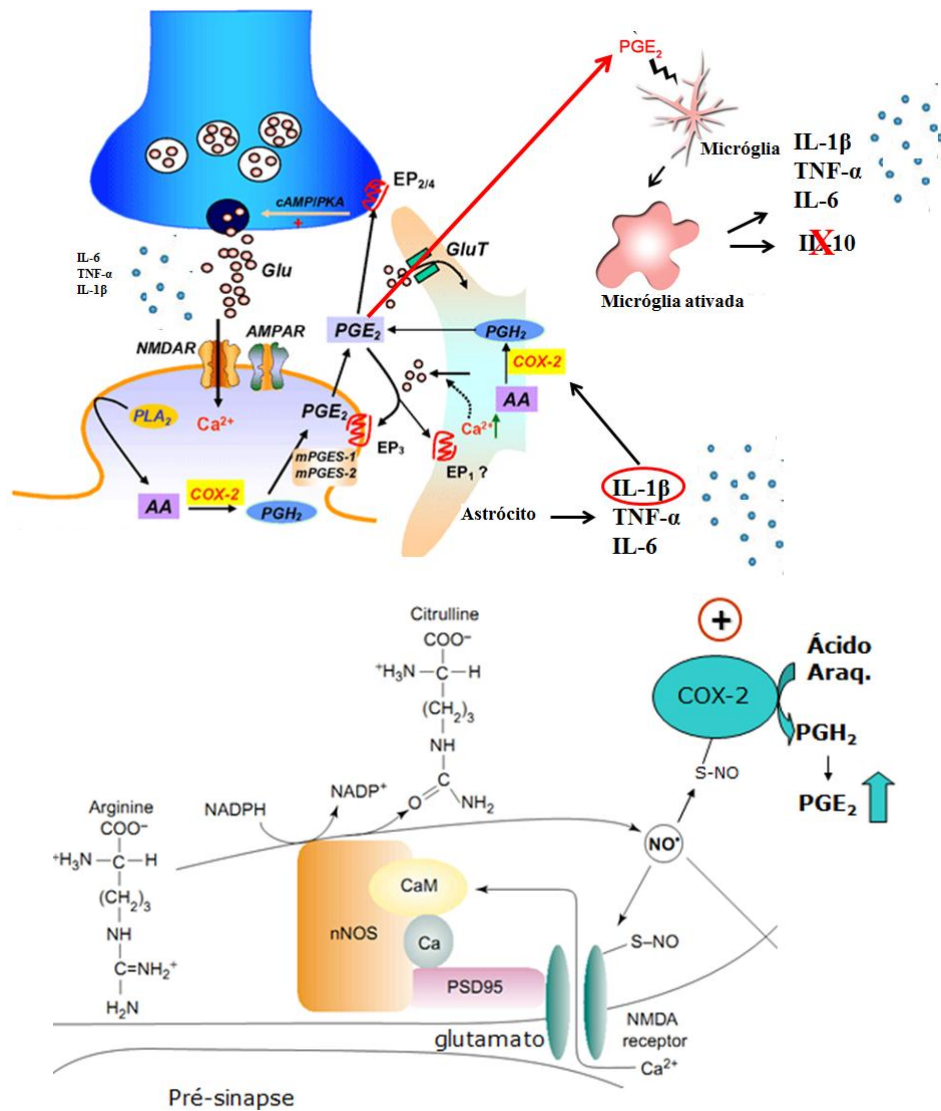
As vias inflamatórias estão implicadas na patogênese de diversas doenças do SNC, tais como epilepsia, esclerose múltipla e doença de Alzheimer e são conhecidas por serem ativadas após infecção neurológica, acidente vascular cerebral isquêmico, estado epiléptico e lesão cerebral traumática (GLASS et al., 2010). Os principais atores da resposta inflamatória no encéfalo são elementos celulares residentes, tais como, micróglia e astrócitos, que são fortemente ativados e produzem uma variedade de mediadores inflamatórios (PERRY; HOLMES, 2014).

A inflamação no SNC pode ocorrer na ausência de DAMPs e PAMPs através do aumento da atividade excitatória, por meio de um estímulo elétrico e/ou quimioconvulsivante ocorre a despolarização inicial dos neurônios com a liberação de citocinas pró-inflamatórias

(IL-1 β , TNF- α e IL-6) (BARTFAI e SCHULTZBERG, 1993; VEZANI e VIVIANI, 2015) e glutamato (FIACCO e MCCARTHY, 2018) (Figura 4). Estudos demonstraram que a superexpressão de TNF- α e IL-6 no encéfalo de camundongos estão associadas à presença de crises convulsivas espontâneas esporádicas (CAMPBELL et al., 1993; AKASSOGLU et al., 1997). Além disso, camundongos transgênicos que superexpressam IL-6 em astrócitos apresentam maior suscetibilidade ao desenvolvimento das crises convulsivas induzidas por agonistas glutamatérgicos (SAMLAND et al., 2003), mostrando assim, o papel desses mediadores inflamatórios nas crises. O neurotransmissor glutamato liberado, se liga a receptores ionotrópicos N-metil D-Aspartato (NMDA) e a ativação dos receptores de glutamato resulta na abertura de um canal iônico não-seletivo para os cátions. Isso permite o influxo de cálcio (Ca²⁺) para dentro da célula (FIACCO e MCCARTHY, 2018). O Ca²⁺ se liga a calmodulina e ativa a enzima óxido nítrico sintase neuronal a produzir óxido nítrico que, por sua vez, vai ativar a enzima COX-2 a produzir PGE₂ (Figura 4) (BARAÑANO et al., 2001; TIAN et al., 2008). Estudos já verificaram que o aumento de PGE₂ facilita as crises epiléticas. Oliveira e colaboradores (2008a) mostraram que PGE₂ possui um papel importante em crises convulsivas e que a administração de anticorpos monoclonais anti-PGE₂ atenua as crises convulsivas induzidas por PTZ. Além disso, a injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de PGE₂ facilita o aparecimento das crises convulsivas induzidas por este agente convulsivante, bem como por ácido metilmalônico (SALVADORI et al., 2012), e diminui a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase no hipocampo de ratos (OLIVEIRA et al., 2009).

Ainda, citocinas pró-inflamatórias incluindo interleucina IL-1 β , TNF- α , IL-6 são rapidamente liberadas por células gliais (VEZZANI et al., 2013, 2011) e a expressão de seus receptores são induzidas ou supra reguladas nos neurônios, bem como em microglias e astrócitos (BALOSSO et al., 2005; LEHTIMÄKI et al., 2003; RAVIZZA; VEZZANI, 2006; VEZZANI; GRANATA, 2005), seguindo de crises epiléticas. Em seus estudos, Chiu e colaboradores (2015) mostraram que a PGE₂ inibiu a produção de IL-10 induzida por lipopolissacarídeo (LPS) em micróglia através da ativação de receptor para prostaglandina E2 (EP2). Ademais, O'Bannion e colaboradores (1996) verificaram que IL-1 β aumenta a produção de PGE₂ em astrócitos de camundongos.

Figura 4 – Inflamação no SNC independente de PAMPs e DAMPs



Fonte: adaptado de (Barañano et al., 2001; Tian et al., 2008).

Por outro lado, sabe-se também que a inflamação pode facilitar e/ou exacerbar as crises convulsivas, embora o mecanismo exato pelo qual isso aconteça ainda não está totalmente esclarecido. Outra hipótese proposta, é que a inflamação desencadeie respostas imunológicas pelo reconhecimento de DAMPs e PAMPs, como por exemplo, a HMGB1 (proteínas do grupo box-1 de alta mobilidade) e LPS (MATSUO et al., 2006; CREMER et al., 2009; RODGERS et al., 2009; MAROSO et al., 2010; DEDEURWAERDERE et al., 2012). Estudos têm demonstrado que o LPS pode facilitar crises convulsivas induzidas por pilocarpina, por ligar-se a PRRs, como os receptores *toll-like* (TLR-4) e receptores de produtos finais de glicação avançada (*advanced glycation end products receptors* - RAGE). Esse efeito facilitatório das crises convulsivas é revertido por ifenprodil, o qual exerce sua

ação por bloqueio dos receptores NMDA (N-metil D-aspartato), sugerindo, assim, o envolvimento desses receptores nas crises convulsivas induzidas por LPS (MATSUO et al., 2006; RODGERS et al., 2009; MAROSO et al., 2010). Essa associação entre DAMPS ou PAMPS e PRRs, desencadeia um aumento na produção de citocinas e ativação de receptores, como por exemplo, o receptor para IL-1 (IL-1R), cujo antagonismo diminui as crises convulsivas induzidas por LPS (AUVIN et al., 2010). Já se sabe também, que a atividade convulsiva provocada por bicuculina está relacionada com a superexpressão da IL-1 β (LIBRIZZI et al., 2012). E que a injeção intrahipocampal de ácido caínico induz aumento na imunoreatividade da IL-1 β em astrócitos (BALOSSO et al., 2008) e micróglia (VEZZANI et al., 1999).

Cabe ainda ressaltar que, além das citocinas inflamatórias, outros fatores inflamatórios, como as PGE₂ e outros elementos e receptores da via dos eicosanóides tem sido diferencialmente implicados na gênese e/ou propagação de crises epiléticas conforme será abordado com detalhes nas próximas subseções.

2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIAS

Nos últimos 80 anos, os modelos animais foram fundamentais para o surgimento de novas terapias para o tratamento da epilepsia. Uma variedade de modelos animais tem sido desenvolvida, entre eles, destacam-se modelos genéticos (que desenvolvem crises espontâneas ou por estímulo sensorial), modelos elétricos (como o abrasamento e eletrochoque) e modelos farmacológicos, como ácido caínico, pilocarpina, penicilina, 4-aminopiridina, toxina colérica, bicuculina, picrotoxina, PTZ (BIDMON et al., 2008). Em nosso estudo optamos pelo PTZ, substância química que induz crise aguda e crônica, sendo analisada a latência para o primeiro episódio mioclônico e para a crise generalizada tônico-clônica. As crises induzidas por PTZ são associadas a um grau variável de ruptura da barreira hematoencefálica (LORENZO et al., 1975), podendo ser inibidas por agentes anti-inflamatórios (OLIVEIRA et al., 2008a). Como podemos observar diversos estudos com diferentes fármacos anti-inflamatórios mostraram que quando o PTZ é administrado antes ou após os fármacos as crises são atenuadas ou não tem efeito (Tabela 1 do manuscrito).

2.4.1 O modelo do pentilenotetrazol (PTZ)

No final da década de 1880 as propriedades convulsivas de vários produtos químicos foram explorados (KRALL et al., 1978), como por exemplo do PTZ, também denominado Metrazol®, Cardiazol® ou pentetrazol. O PTZ foi sintetizado em 1924 e logo após o primeiro relato de sua ação convulsiva foi utilizado para pesquisa em vários laboratórios com o objetivo de identificar fármacos com atividade anticonvulsivante (HILDEBRANDT, 1926). O PTZ é um estimulante do SNC, e tem sido utilizado como um agente indutor de crises, sendo utilizado tanto em modelos experimentais de epilepsia agudos quanto crônicos (LOSCHER, 2009). O PTZ é um antagonista do receptor GABA_A (ácido gamaaminobutírico), um receptor acoplado a um canal permeável a cloreto, cuja ativação provoca hiperpolarização neuronal, o que torna o neurônio refratário a estímulos despolarizantes (CREMER et al., 2009).

O PTZ é o modelo de crise aguda que têm sido mais utilizado experimentalmente tanto em pesquisas com foco na fisiopatologia das crises convulsivas, quanto na identificação de novos fármacos que possam inibir e/ou diminuir a suscetibilidade para crises. Algumas das principais vantagens do modelo do PTZ são o curto período de latência para crise generalizada tônico-clônica, a mínima degeneração neuronal e sua utilidade para triagem de fármacos anticonvulsivantes (CREMER et al., 2009; ENGEL; PEDLEY, 2008). As doses de PTZ administradas nos modelos animais de crises convulsivas variam entre os autores, entre 40 a 100 mg/kg. Baixas doses de PTZ (40 mg/kg) exibem curtos episódios de imobilidade, característicos de crises de ausência, e gravações no eletroencefalograma (EEG) apresentaram atividades rítmicas típicas. Altas doses de PTZ (60-100 mg/kg) exibem crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas. Quando o objetivo é induzir uma única crise convulsiva, o PTZ é aplicado uma só vez, enquanto que, para a indução de crises convulsivas repetidas como no modelo do *abrasamento químico*, são administradas doses repetidas, em concentrações subconvulsivantes, em diferentes intervalos de tempo como de 24 em 24 ou de 48 em 48 horas. O tratamento varia de 2 a 8 semanas (ENGEL; PEDLEY, 2008).

2.5 EICOSANÓIDES

Os eicosanóides são um importante grupo de autacóides de ácidos graxos endógenos que são sintetizados a partir de ácido araquidônico, um ácido graxo insaturado de 20 carbonos contendo quatro duplas ligações nas membranas celulares. A produção de eicosanóides se inicia a partir da liberação dos fosfolipídios de membrana pela ação da enzima fosfolipase A₂,

que pode ser ativada por estímulos mecânicos, físicos e/ou produzidos por diversos mediadores (AKIBA; SATO, 2004). Assim, o ácido araquidônico é liberado, servindo de substrato para a produção de mediadores inflamatórios por meio de duas vias: 1) Via da COX, que produzem PGs, prostaciclina e tromboxanos; 2) via da lipooxigenase (LOX), a qual produz leucotrienos e lipoxina e 3) via das oxigenases microsômicas do citocromo P450 (CAPRA et al., 2013).

2.5.1 História

Em 1930, Kurzrok e Lieb, dois ginecologistas americanos, observaram que tiras de miométrio uterino relaxavam ou contraíam quando expostas a sêmen. Subseqüentemente, Goldblatt na Inglaterra e von Euler na Suécia descreveram que o líquido seminal e as glândulas reprodutivas acessórias tinham atividades vasopressoras e capacidade de contrair o músculo liso (GOLDBLATT, 1935; VON EULER, 1936). Von Euler (1936) identificou o material ativo como sendo um ácido lipossolúvel, o qual denominou “prostaglandina”, inferindo que sua origem seria da glândula prostática. Mais tarde, em 1962, Samuelsson, Bergström e colaboradores elucidaram as estruturas da PGE₁ e da PGF_{1α} (BERGSTROM; SAMUELSSON, 1962). Em 1964, Bergström e colaboradores e van Dorp e colaboradores obtiveram independentemente a biossíntese de PGE₂ a partir do ácido araquidônico (AA), usando homogêneos de vesícula seminal de carneiros. Vane, Smith e Willis descreveram que o ácido acetilsalicílico e os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) atuavam pela inibição da biossíntese das prostaglandinas (VANE, 1971). As descobertas do tromboxano A₂ (TxA₂), da prostaciclina (PGI₂) e dos LTs seguiram-se em rápida sucessão (SHINOHARA et al., 1999).

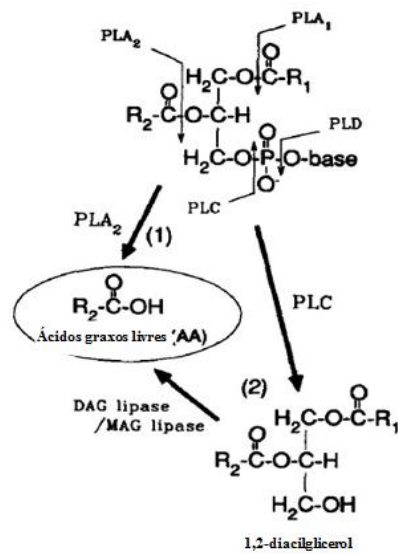
O AA, o mais abundante e importante dos precursores dos eicosanóides, é um ácido graxo essencial que contém 20 carbonos e quatro ligações duplas a partir da posição ômega 6, produzindo um ácido 5,8,11,14- eicosatetraenóico (BREYER et al., 2001). A síntese do AA ocorre no fígado, apesar do cérebro também ser capaz de sintetizar AA e ácido docosahexaenóico a partir de seus ácidos graxos precursores independente do fígado (DHOPEHWARKAR; SUBRAMANIAN, 1976). A síntese intracerebral de AA é importante no período neonatal, quando a atividade do fígado é relativamente baixa (COOK, 1978), sendo os astrócitos o principal sítio no cérebro para o processamento de ácidos graxos essenciais de cadeia longa (HEWETT et al., 2000).

Sabe-se que o AA não está rigidamente ligado às membranas celulares, eles são liberados em resposta a diversos estímulos, particularmente influxo de cálcio, e exercem várias ações biológicas (KATSUKI; OKUDA, 1995). O AA pode agir como segundo mensageiro intracelular, promovendo assim, a ativação da proteína G responsável pela liberação de ânion superóxido por leucócitos inflamatórios. E também pode dar origem a eicosanóides através de três vias enzimáticas: via das COXs, vias das LOXs e via das oxigenases microsômicas do citocromo P450 (GOODMAN; GILMAN, 2012).

2.5.2 Biossíntese do AA

A liberação de AA a partir de fosfolipídios de membrana ocorre por duas principais vias: 1) clivagem da ligação éster *sn*-2 nos fosfolipídios de membrana pela fosfolipase A₂ (PLA₂); 2) clivagem da ligação éster de fosfato pela fosfolipase C (PLC). A biossíntese dos eicosanóides é limitada pela disponibilidade de substrato e depende primariamente da liberação, por acil-hidrolases (mais notavelmente a PLA₂), do aporte de AA esterificado no domínio *sn*-2 dos fosfolipídios ou de outros lipídios complexos da membrana, para que esse AA possa sofrer a ação das enzimas sintetizadoras de eicosanóides. Estímulos químicos e físicos ativam a translocação dependente de cálcio da PLA₂ citosólica (cPLA₂) do grupo IV, que tem alta afinidade por AA, para a membrana, onde ela hidrolisa a ligação éster *sn*-2 nos fosfolipídios de membrana (particularmente fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina), liberando o araquidonato (KISHIMOTO et al., 2010). Alternativamente, a formação de AA livre pode ser iniciada pela ativação de PLC, que cliva o fosfolipídio (principalmente fosfatidilinositol) na ligação éster de fosfato, produzindo 1,2-diacilglicerol. Esse intermediário é clivado por diacilglicerol (DAG) lipase para produzir ácidos graxos livres e monoacilglicerol (MAG). Além disso, hidrólise de MAG por MAG-lipase dá origem a ácidos graxos e glicerol (PIOMELLI, 1993). Além disso, a geração do 1,2-diacilglicerol pode ocorrer por outra via, através da hidrólise da fosfatidilcolina pela fosfolipase D (PLD) originando o ácido fosfátídico, o qual é desfosforilado pela fosfatase em diacilglicerol (Figura 5) (DIVECHA; IRVINE, 1995). Entretanto, o envolvimento dessa via na geração de AA no SNC não tem sido confirmado.

Figura 5 – As duas principais vias de liberação de AA a partir de fosfolipídios no cérebro

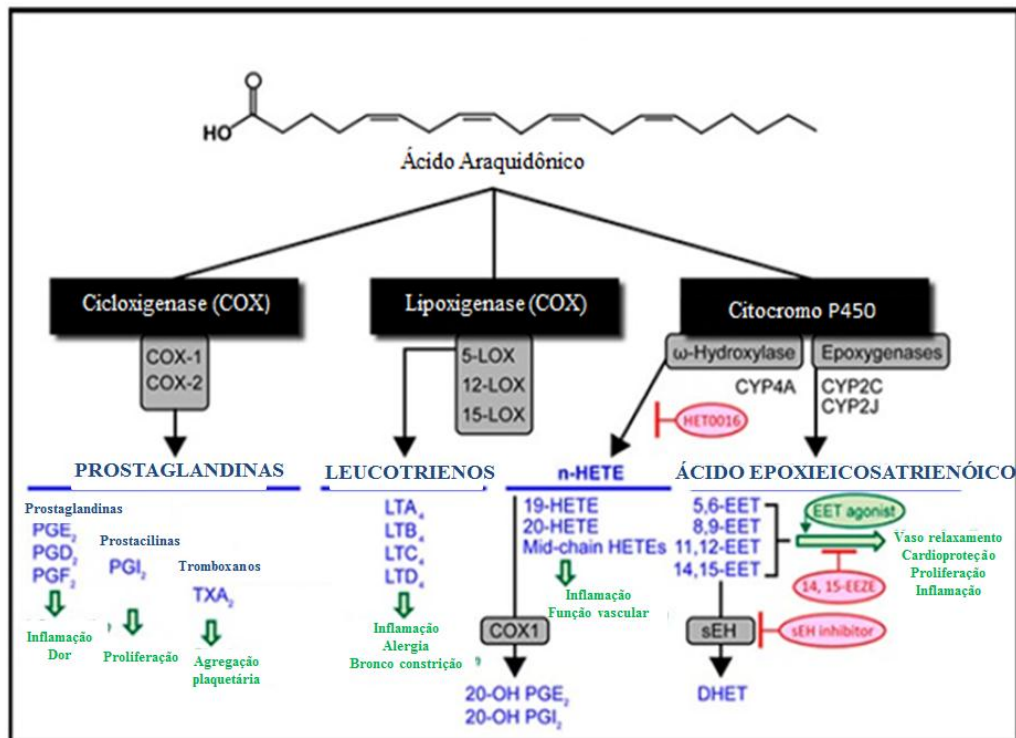


Fonte: adaptado de Katsuki e Okuda (1995).

Múltiplas isoformas adicionais de PLA_2 foram caracterizadas (secretória do grupo IIA ($sPLA_2$), do grupo V ($sPLA_2$), independente de cálcio do grupo IV ($iPLA_2$) e do grupo X ($sPLA_2$). Na ausência de estímulos, o AA liberado pela $iPLA_2$ é reincorporado às membranas celulares, impedindo a biossíntese dos eicosanóides. Embora a $cPLA_2$ predomine na liberação aguda de AA, a $sPLA_2$ indutível contribui para a produção de AA em condições de estimulação prolongada ou intensa (GOODMAN; GILMAN, 2012).

A maior parte dos efeitos do ácido araquidônico nos tecidos e no cérebro é atribuível a sua conversão por meio de três vias citadas acima formando diferentes eicosanóides. A via das COXs catalisam a formação PGs, prostaciclina e TXBs. LTs e lipoxinas são formados pela via da LOX, e via das oxigenases microsômicas do citocromo P450 produzem ácidos epoxieicosatrienóicos (Figura 6) (KATSUKI; OKUDA, 1995).

Figura 6 – Conversão do AA por meio de três vias chamadas COXs, LOXs e citocromo P450



Fonte: adaptado de Panigrahy et al. (2011).

2.5.3 Ciclooxygenases (COXs)

A COX, também chamada prostaglandina-endoperoxídeo sintase H (PGHS), é uma glicoproteína dimérica integral da membrana, purificada em 1976 e clonada em 1988 (OTTERNESS et al., 1995). Esta enzima catalisa os dois primeiros passos da biossíntese de PGs: oxidação do AA (incorporação de duas moléculas de oxigênio em cada molécula de araquidonato) ao endoperoxídeo PGG₂ e sua subsequente redução a PGH₂, ambos compostos intermediários (VANE et al., 1998). O endoperoxídeo (PGH₂) é metabolizado por uma ou mais enzimas do tipo isomerase ou sintase, formando os chamados prostanóides clássicos. As PGs das séries D, E e F α provêm a partir da PGH₂, originando PGE₂, PGF₂ α , PGD₂. PGH₂ origina outros dois compostos, com estruturas diferentes das prostaglandinas, o primeiro é o TXA₂, formado pela tromboxano sintase, e o segundo é PGI₂, a partir da prostaciclina sintase (BOTTING, 2006).

Duas isoformas de COXs, denominadas COX-1 e COX-2 têm sido identificadas em células eucariotas. Essas enzimas são consideradas 60% homólogas, ambas apresentam peso

molecular de aproximadamente 70kD, e possuem mecanismos similares de metabolização do ácido araquidônico (SCHONBECK et al., 1999). Entretanto, algumas diferenças podem ser observadas, como: diferente sequência genética para cada isoforma (DUBOIS et al., 1998); sítio de ligação do agente inibidor na isoforma 2 é estruturalmente cerca de 25% maior que o da COX-1 (BROOKS et al., 1999); a COX-2, além de agir no metabolismo do ácido araquidônico é capaz de atuar no metabolismo do ácido linolênico e ácido linoleico; e diferenças na expressão das isoformas diante de processos inflamatórios, visto que a COX-1 parece não ser alterada (ou apresenta discreto aumento - 2 a 4 vezes), enquanto a COX-2 encontra-se expressivamente aumentada (cerca de 20 vezes ou mais) (SCHONBECK et al., 1999; FITZGERALD; PATRONO, 2001).

A COX-1 é encontrada constitutivamente em quase todos os tecidos (como citoprotetora gástrica e mantenedora da homeostase renal e plaquetária), e participa ativamente no processo neuroinflamatório. No SNC a COX-1 é expressa constitutivamente em astrócitos (fonte principal de produtos da COX no cérebro), neurônios (HEWETT et al., 2000) e micróglia, sendo considerada a principal mediadora da resposta inflamatória na micróglia (CHOI et al., 2009). Já a COX-2 é constitutivamente expressa em poucos tecidos, como ossos e certas áreas renais, e no SNC em neurônios glutamatérgicos do córtex cerebral e hipocampo, áreas que evidenciam proeminente papel no início das crises convulsivas (Figura 4) (YAMAGATA et al., 1993; NIWA et al., 2000; YANG; CHEN, 2008; CHOI et al., 2009). Entretanto, sua expressão é predominantemente induzida por estados inflamatórios, como atividade convulsiva, dano cerebral, fatores de crescimento que levam a ativação de receptores NMDA (SIMMONS et al., 2004), LPS e citocinas como IL-1 β , IL-2 e TNF- α . As citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10, e IL-13, diminuem a indução de COX-2, assim como corticosteróides (OTTO; SMITH, 1995). Ao contrário da COX-1, a COX-2 está expressa em neurônios cerebrais, mesmo em condições basais, e pode ser rápida e transitoriamente induzida por crises convulsivas em neurônios hipocampais e corticais (TAKEMIYA et al., 2003).

O efeito da deleção das enzimas COX-1 e COX-2 sobre a infiltração de leucócitos no cérebro e alterações na permeabilidade da barreira hemato-encefálica (BHE), após injeção i.c.v. de LPS foi estudado por Choi e colaboradores (2010). Seus resultados mostram que COX-1 e COX-2 têm papéis distintos na iniciação da resposta imunológica inata e modulam de forma diferente a ativação microglial e o recrutamento de leucócitos, particularmente de neutrófilos. O influxo de neutrófilos no local da lesão (cérebro inflamado) é atenuado em camundongos nocaute para COX-1 e aumentado em animais nocaute para a COX-2. Esses

resultados indicam que a inibição da atividade da COX-1 é anti-inflamatória, enquanto a supressão da atividade da COX-2 acentua a resposta neuroinflamatória. O mesmo foi visto no estudo de Choi e colaboradores (2008), que observaram que 24 horas após a injeção de LPS, camundongos com deleção genética da COX-1 apresentaram ativação atenuada da microglia e de astrócitos, redução da expressão de citocinas pró-inflamatórias, atenuação dos níveis de proteína carbonila e nitrotirosina, bem como ativação da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (NADPH oxidase), expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (ONSi) e mieloperoxidase (MPO), e ainda preveniu a perda de células neuronais no hipocampo. Além disso, a inibição farmacológica da enzima COX-1 com SC-560 (inibidor seletivo da COX-1) administrado por 7 dias (uma vez ao dia, intraperitonealmente), significativamente reduz a produção de PG induzida por LPS, assim como a síntese de RNAm das citocinas pró-inflamatórias. Estes dados sugerem que a COX-1 facilita a ativação de células gliais e sustenta processos inflamatórios que envolvem danos neuronais.

A expressão da isoenzima COX-2 em cérebro de camundongos após um *kindling* elétrico hipocampal foi observada no estudo de Takemiya e colaboradores (2003). Os autores constataram que a expressão da COX-2 encontra-se altamente elevada nas células granulares e levemente elevada nas células piramidais do hipocampo contralateral quando comparado aos animais do grupo controle. Além disso, observaram que as concentrações da PGE₂ aumentam imediatamente após o *kindling* em animais que expressam a COX-2 e em animais controle, ao contrário do que foi observado em camundongos nocaute para a enzima COX-2, mostrando assim o envolvimento da COX-2 em crises convulsivas.

2.5.4 Lipoxigenase (LOX)

O AA liberado além de servir de substrato para a via da COX, serve também como substrato para a via das LOXs. Os leucotrienos (*leuco* porque são produzidos pelos leucócitos e *trienos* porque contém um sistema trieno conjugado de duplas ligações) são sintetizados a partir do ácido araquidônico em vias catalisadas pela lipoxigenase. Estas enzimas citosólicas solúveis são encontradas principalmente nos pulmões, nas plaquetas, nos mastócitos e nos leucócitos. A principal enzima deste grupo é a 5-lipoxigenase. Os LTs são lipídeos derivados de ácidos graxos essenciais de 20 carbonos, possuindo três, quatro ou cinco duplas ligações, são eles: o ácido 8,11,14 – eicosatrienóico, (ácido linolênico); o ácido 5, 8, 11, 14 – eicosatetraenóico (ácido araquidônico – AA) e o ácido 5, 8, 11, 14, 17 – eicosapentaenóico (EPA) (BRINK et al., 2003).

As LOXs constituem uma família de enzimas que contêm ferro não ligado ao heme e catalisam a oxigenação dos ácidos graxos poliênicos em hidroperóxidos lipídicos correspondentes. Essas enzimas requerem como substrato um ácido graxo com ligações duplas *cis* separadas por um grupo metileno. O AA que contém várias ligações duplas com essa configuração é metabolizado em ácidos hidroxiperoxi-eicosatetraenoicos (HPETEs), que variam quanto ao local de inserção do hidroperóxido. Os HPETEs são convertidos em seus hidroxi-ácidos graxos (HETEs) correspondentes por reação enzimáticas ou por uma peroxidase (GOODMAN; GILMAN, 2012; RANG; DALE, 2011).

Os leucotrienos são predominantemente produzidos por células inflamatórias, incluindo leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e mastócitos. Existem três diferentes lipoxigenases que são específicas de células: 5-lipoxigenase (5-LOX) em células mielóides; 12-LOX em plaquetas; e 15-LOX em células epiteliais / endoteliais. Essas três isoformas de LOX são também encontradas basicamente em neurônios, astrócitos e oligodendrócitos (MANEV et al., 1998; FREIRE; VAN DYKE, 2000).

2.5.5 Enzimas do citocromo P450

O AA liberado além de servir de substrato para a via da COX e da LOX, serve também como substrato para a via do citocromo P450 (CYP). As enzimas CYP envolvidas no metabolismo do AA podem ser geralmente classificadas em CYP epoxigenases e CYP hidroxilases, as quais metabolizam o AA para ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs) e ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETEs), respectivamente (ROMAN, 2002).

Várias enzimas CYP podem ser consideradas como CYP epoxigenase e metabolizar o AA. Os ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs) são sintetizados principalmente pelas CYP2C e CYP2J epoxigenases. Quando a PLA2 citósolica encontra-se ativada, o AA é hidrolisado e convertido para EETs. O CYP tem um importante papel no subsequente metabolismo da PGH₂ para compostos biologicamente ativos, como PGI₂ por CYP8A1, e TXA₂ por CYP5A1 (ZORDOKY; EL-KADI, 2010). Sabe-se que a PGI₂ é conhecido por inibir a agregação de plaquetas e a vasoconstrição e, que TxA₂ estimula a agregação de plaquetas. Estudos recentes têm ligado o polimorfismo no gene CYP8A1 e CYP5A1 na patogênese de diversas doenças cardiovasculares (NAKAYAMA, 2005; KIMOULI et al., 2009).

Os EETs são metabolizados pela ação de uma epóxido hidrolases solúvel para o correspondente ácido dihidroxieicosatrienóico (DHETs), que são biologicamente menos ativos (KATSUKI; OKUDA, 1995).

O AA pode também ser metabolizado pelas enzimas CYP4A, 4B e 4F hidroxilases ao 20-ácido hidroxieicosatetraenóico (20-HETE), o principal metabólito da CYP hidroxilases, é um mediador pró-inflamatório que estimula acentuadamente a produção de citocinas inflamatórias, quimiocinas nas células endoteliais, incluindo IL-8, IL-13, IL-4, e PGE₂. 20-HETE, estimula a ativação das vias NF-κB e MAPK/ERK, o que sugere que o efeito pró-inflamatório do HETE pode ser mediado pela via inflamatória central do NF-κB (ISHIZUKA et al., 2008). A degradação de 20-HETE ocorre, por exemplo, em células endoteliais, podendo ainda ser metabolizado pelas COXs para 20-hidróxi prostaglandina G₂ e H₂ (SCHWARTZMAN et al., 1989). O 20-HETE pode também ser oxidado por ω-oxidação ou β-oxidação (KADUCE et al., 2004).

2.6 PROSTAGLANDINAS (PG_S), PROSTACICLINA E TROMBOXANO (TXB)

Os prostanóides são mediadores celulares que modulam uma variedade de processos fisiológicos e patológicos através de receptores de membrana localizados na superfície das células alvo (FITZGERALD; PATRONO, 2001). Estas substâncias têm importante função homeostática na proteção da mucosa gástrica, fisiologia renal, gestação e agregação plaquetária, além de terem sua produção induzida em condições como inflamação e câncer (FITZGERALD, 2002).

As PGs estão envolvidas em diversas situações onde o processo inflamatório se faz presente, como, resposta imunológica, hematopoese, dano, reparação tecidual e reabsorção óssea. Considerada uma molécula chave na sinalização neuronal, a PGE₂ tem importante papel na regulação da excitabilidade da membrana e na plasticidade sináptica (BAZAN et al., 2002).

Os níveis cerebrais basais das PGs, in vivo, são relativamente baixos, e sua síntese pode ser estimulada pelo aumento da atividade neuronal, que ocorre, por exemplo, durante as crises convulsivas induzidas quimicamente ou eletricamente (HERTTING et al., 1985; BAZAN et al., 1986). Durante as crises convulsivas, a COX-2 é rapidamente induzida e prostanóides incluindo PGE₂, PGD₂ e PGF_{2α} são produzidas no encéfalo (YOSHIKAWA et al., 2006). Entre os prostanóides avaliados, a PGE₂ é um dos principais produtos da COX-2 no encéfalo, e sinaliza via receptores EPs efeitos pró-inflamatórios no cérebro que são revertidos pela inibição farmacológica destes receptores (JIANG; DINGLELINE, 2013).

PGF_{2α}, tem significativo papel na iniciação da parturição, função renal, controle do fluxo sanguíneo cerebral e pressão intraocular (SUGIMOTO et al., 1997; MOHAN et al., 2012). Contudo, o papel da PGF_{2α} e seu receptor FP na patogênese do dano cerebral

isquêmico não é claro. Um estudo realizado por Kim e colaboradores (2012) mostrou que tanto o tratamento com antagonistas para o receptor FP quanto a sua deleção melhora as funções neurológicas após isquemia bem como diminui o volume de infarto da lesão quando comparado aos animais veículo. Esses resultados sugerem que os receptores FP estão envolvidos no dano induzido por isquemia cerebral. Entretanto, Chung e colaboradores (2013) observaram que a expressão reduzida da COX-2, assim como o resultante déficit de $\text{PGF}_{2\alpha}$, podem ser fatores essenciais para o aumento da suscetibilidade às crises em encéfalo imaturo de camundongos. Além disso, a suscetibilidade às crises e a mortalidade induzida por ácido caínico (AK) é reduzida pela administração i.c.v. de $\text{PGF}_{2\alpha}$, sugerindo assim, uma divergência na literatura quanto ao papel da $\text{PGF}_{2\alpha}$ em crises convulsivas.

A PGD_2 tem sido sugerida por exercer efeitos anti- e pró-inflamatórios, e, de fato, é o melhor candidato prostanóide a possuir efeito anticonvulsivo, pois é a PG mais abundante liberada durante as crises (NAFFAH-MAZZACORATTI et al., 1995). Entretanto, como já mencionado se tem dados atuais de que a $\text{PGF}_{2\alpha}$ é a PG mais abundante liberada durante as crises (YOSHIKAWA et al., 2006). Assim, Akarsu e colaboradores (1998) verificaram o efeito benéfico da PGD_2 no encéfalo de ratos após crises convulsivas induzidas por PTZ. Os autores administraram pela via i.c.v. PGD_2 e observou-se um aumento da latência para a ocorrência de crises tônico-clônica generalizada, resultando na potencialização da atividade da PGD_2 endógena, e obteve-se um efeito anticonvulsivo. Sendo que, quando foi administrado pela via i.c.v. um análogo estável da PGD_2 , a incidência e intensidade das crises foi inibida. Entretanto, a administração de um antagonista para o receptor da PGD ou inibidor da PGD sintase, resultou em um efeito pro-convulsivante, aumentando a intensidade e incidência das crises. Estes resultados indicam que a atividade endógena da PGD_2 no cérebro pode desempenhar um papel inibitório específico para a iniciação e propagação de crises convulsivas induzidas por PTZ em ratos.

Ajuebor e colaboradores (2000) também investigaram se a PGD_2 derivada da COX-2 regula a inflamação do cólon em ratos. Neste estudo os autores induziram colite pela administração intracolônica de ácido trinitrobenzeno sulfônico em ratos, resultando no aumento da síntese de PGD_2 e na expressão do RNAm da COX-2 em relação aos ratos controle. Para determinar qual isoforma da COX foi responsável pela síntese de PGD_2 , os animais foram tratados por via oral com celecoxibe ou indometacina imediatamente após a indução da colite, e foi observado que tanto celecoxibe como indometacina foram capazes de reduzir a síntese de PGD_2 . No entanto, estes fármacos não alteraram a síntese de PGE_2 em ratos com colite. Dessa forma, foi sugerido que os inibidores da COX-2 exacerbaram a colite, em parte, por reduzir a síntese de PGD_2 . Ademais, Kaushik e colaboradores (2014)

observaram em seu estudo que crises induzidas por PTZ aumentavam o conteúdo de PGD_2 no encéfalo de camundongos selvagem. E que esse aumento era atenuado no encéfalo de animais nocaute para PGD sintase hematopoiética (H-PGDS) ou PGD sintase lipocalina (L-PGDS) e suprimido em animais L/H PGDS nocaute.

Prostaciclina apresenta potente atividade antiplaquetária e vasodilatadora e é comumente considerada como um antagonista fisiológico do TXA_2 , um prostanóide também sintetizado através da via da COX e com efeito vasoconstritor e antiagregante plaquetário (DOGNE et al., 2000). Sendo que, o tromboxano é sintetizado em plaquetas através da via da COX-1, enquanto prostaciclina é principalmente sintetizada pelas células endoteliais e células do músculo liso vascular mediante a via da COX-2. Já se sabe, que o balanço entre síntese de PGI_2 e TXA_2 pode ser considerado como principal sistema regulatório de interação das paredes dos vasos e plaquetas (ULLRICH et al., 2001). Porém, um desequilíbrio destes prostanóides tem sido verificado em doenças cardiovasculares tanto em animais como em humanos. Estudos recentes tem mostrado que o uso de inibidores seletivos para a COX-2 são capazes de criar um desequilíbrio entre $\text{PGI}_2/\text{TXA}_2$. Esses fármacos reduzem a síntese de PGI_2 na parede dos vasos, e não afetam a produção de tromboxano das plaquetas (via da COX-1) (MINUZ, 2008; WARNER; MITCHELL, 2008).

No estudo de Gamaniel e colaboradores (1989) verificou-se que as prostaciclina aumentam o limiar para crise convulsiva. Esse efeito benéfico do iloprost (um análogo estável da PGI_2), PGE_1 e PGI_2 sobre as crises convulsivas induzidas pelos modelos do PTZ, estriquina e eletrochoque máximo. Nesse sentido, verificou-se que o pré-tratamento com PGE_1 , PGI_2 e iloprost atenuou as crises convulsivas induzidas nos três modelos. Uma vez que o iloprost se mostrou um anticonvulsivante mais potente que a PGE_1 e PGI_2 , sugeriu-se que os prostanóides apresentam atividade anticonvulsiva, e que a relativa estabilidade química do iloprost pode contribuir para os melhores efeitos observados nos modelos testados.

O efeito do TXB_2 endógeno sobre as crises convulsivas induzidas por pentilenotetrazol foi investigado utilizando os inibidores da tromboxano sintase OKY-1581 e UK 38,485 no estudo de McGinley e colaboradores (1985). Naquele estudo ambos compostos diminuíram a produção de TXB_2 no cérebro medido 2 minutos após a crise convulsiva, porém não alteraram os níveis de PGE_2 , $\text{PGF}_{2\alpha}$, ou 6-ceto- $\text{PGF}_{1\alpha}$ no encéfalo. Também, não foram observados efeitos desses agentes sobre o limiar de crise tônico clônica, enquanto que a indometacina (10 mg/kg, i.p.), fármaco que inibe tanto a produção de TXB_2 como de PGs, reduziu o limiar da crise tônico clônica. Assim, este estudo conclui que o TXB_2 no encefalo é improvável estar relacionado com atividade convulsiva, como foi observado com indometacina.

2.6.1 Vias de sinalização ativadas por receptores EP, DP, IP, TP e FP

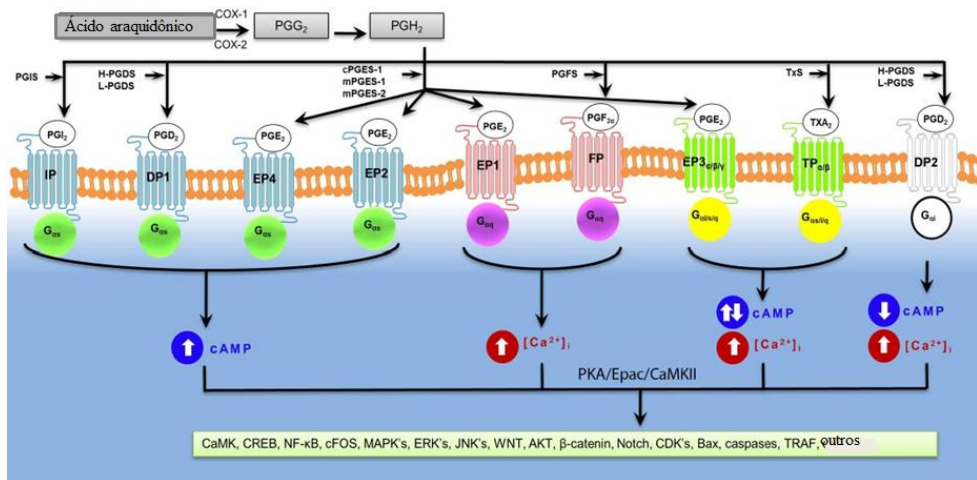
As PGs podem ser encontradas em diversos tecidos e órgãos, e a diversidade de efeitos que elas podem provocar depende, diretamente, do tipo de receptor específico presente nos diferentes tipos celulares (MEDEIROS et al., 2012). As PGs PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, PGI₂, e TxA₂ interagem com os seguintes receptores EP1, EP2, EP3 e EP4, DP1 e DP2, FP, IP e TP, os quais encontram-se acoplados a proteínas G: Gαq, Gαi, e Gαs (MOHAN et al., 2012).

O receptor EP1 está acoplado à proteína heterodimérica Gαq, desencadeando aumento dos níveis de Ca²⁺. Esta ação deve-se à ativação da PLC, a qual, por sua vez leva à produção de IP₃ e DAG, e consequente mobilização de Ca²⁺ no citosol, ativando a proteína quinase C (PKC) (HEBERT et al., 1990; NARUMIYA, 2009; KAWABATA, 2011). EP2, EP4, DP1 e IP exercem suas funções através da ligação a Gαs (estimulatória), desencadeando aumento nos níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) (MOHAN et al., 2012).

Os receptores acoplados a proteína Gαs desencadeiam a cascata de sinalização através da ativação direta da enzima adenilil ciclase, a qual leva a um aumento dos níveis de AMPc. Esse aumento, por sua vez, é suficiente para ativar a proteína quinase A (PKA) ou mesmo, uma via independente desta, denominada Epac. A enzima Epac possui um domínio com alta afinidade para o AMPc, homólogo a subunidade R (regulatória) da PKA. O que difere entre uma via e outra, é que, na via Epac o aumento do AMPc ativa a Rap 1 e 2, que são consideradas pequenas GTPases, processo que é independente da ativação da PKA (GLOERICH e BOS, 2010).

Estudos de clonagem revelaram a presença de três variantes para o receptor EP3 (EP_{3α,β,γ}) em camundongos. EP_{3α,β,γ} agem principalmente através de Gαi (inibitória), o que desencadeia diminuição nos níveis de AMPc, mas também ativa proteína quinase C (PKC) (BREYER et al., 2001), sendo que a isoforma EP3γ pode exercer suas funções através da ligação a Gαs (Figura 7) (SUGIMOTO; NARUMIYA, 2007).

Figura 7 – Ligação das prostaglandinas aos devidos receptores



Fonte: adaptado de Mohan et al. (2012).

O receptor TP se acopla com as seguintes proteínas G: $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha q}$, $G_{\alpha i}$ e $G_{\alpha_{12/13/15/16}}$ (SHENKER et al., 1991; LAUGWITZ et al., 1996; MUCK et al., 1998). Essas proteínas G por sua vez regulam vários efetores, incluindo a PLC, adenilil ciclase, AMPc e cálcio intracelular (MOHAN et al., 2012). O receptor DP2 é acoplado a proteína $G_{\alpha i}$, levando a inibição da produção do AMPc e aumento do cálcio intracelular em vários tipos de células (SAWYER et al., 2002).

Por fim, a ativação do receptor FP ocasiona a liberação de inositol 1,4,5-trifosfato e DAG que por sua vez, ativa a via da proteína cinase II dependente de cálcio-calmodulina (NARUMIYA et al., 1999; SALEEM et al., 2009).

2.6.2 Estrutura molecular dos receptores EPs

Em camundongos, os receptores EP1, EP2, EP3, EP4, FP, IP, TP, DP1 e DP2 possuem 405, 362, 361-365, 513, 366, 417, 341, 357 e 382 aminoácidos, respectivamente (IRIE et al., 1993; SUGIMOTO et al., 1993; MOHAN et al., 2012). Suas localizações nos cromossomos e pesos moleculares diferem de acordo com os subtipos.

Tabela 2 – Localização e peso molecular dos receptores: EP, FP, DP, TP e IP

Receptores	Localização Cromossomo		Peso molecular
	Camundongo	Humano	
EP1	8 (40.22 cM)	19p13.1	42 kDa
EP2	14 (22.68 cM)	14q22	53 kDa
EP3	3 (81.32 cM)	1p31.2	43 kDa
EP4	15 (1.99 cM)	5p13.1	53.4 kDa
FP	3 (76.96 cM)	1p31.1	40.06 KDa
DP1	14 (22.59 cM)	14q22.1	40.006 KDa
DP2	19 A	11q12-q13.3	45.88 KDa
TP	10 (39.72 cM)	19p13.3	37.66 KDa
IP	7 (9.15 cM)	19q13.3	45.02 KDa

Fonte: disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. Acesso em: 10 set. 2017.

A PGE₂ é capaz de ativar os quatro subtipos de receptores EP, embora a afinidade entre eles seja limitada. A PGE₂ liga-se com maior afinidade aos receptores EP3 e EP4 (Kd <1 nM), enquanto aos receptores EP1 e EP2 se ligam com menor afinidade (Kd > 10 nM) (DAVIS et al., 2004). A homologia encontrada entre o receptor EP1 para EP2, EP3 e EP4 é de 30, 33 e 28%, respectivamente.

2.6.3 Distribuição e localização celular dos receptores EP, IP, DP e TP nos tecidos e no encéfalo

Os níveis de expressão dos subtipos de receptores EP variam entre os tecidos de camundongos. Os quatro subtipos de receptores EP têm sido detectados em neurônios do hipocampo, neocórtex e astrócitos (ZHU et al., 2005). Zhu e colaboradores (2005) observaram que os receptores EP2 e EP3 encontram-se mais abundantemente expressos no hipocampo e córtex, enquanto que apenas pequena quantidade dos receptores EP1 e EP4 são detectados nessas regiões. EP1, EP2 e EP4 foram co-localizados com sinaptofisina, sugerindo a presença desses receptores em terminais pré-sinápticos.

Quanto à expressão gênica dos receptores EP, estudos mostram que o RNAm do receptor EP1 é expresso restritamente à micróglia, rins, pulmões e estômago (SUGIMOTO; NARUMIYA, 2007). O RNAm do receptor EP2 está expresso no sistema nervoso periférico e no sistema nervoso central, principalmente em astrócitos e neurônios do córtex cerebral, estriado, hipocampo (neurônios piramidais corno de Amon setor 1 (CA1)), no tálamo e hipotálamo, e ainda na micróglia sob diferentes condições patológicas (BATSHAKE et al.,

1995; ZHANG; RIVEST, 1999; HUTCHINSON et al., 2009). A expressão do RNAm do receptor EP3 é mais abundante no sistema olfatório, hipocampo, regiões hipotalâmicas subcortical do encéfalo devido ao seu papel na termorregulação, sendo também expresso em cultura de astrócitos (NAKAMURA et al., 2000; KITANAKA et al., 1996; VASILACHE et al., 2007). O RNAm do receptor EP4 está expresso no hipotálamo, regiões anterior e posterior do encéfalo, e em baixos níveis em células endoteliais (ZHANG; RIVEST, 1999).

O RNAm do receptor IP está expresso em muitos tipos de tecidos incluindo baço, timo, aorta coronária e pulmonar, artéria cerebral, rim e em corpos celulares de neurônios (OIDA et al., 1995). O RNAm do receptor DP1 está expresso no córtex cerebral, camada de células piramidais do hipocampo, giro denteado, tálamo, plexo coróide e leptomeninges (OIDA et al., 1997). A expressão do RNAm do receptor FP têm sido previamente demonstrada em cérebro de camundongos, e em cultura de astrócitos e neurônios. O RNAm do receptor TP encontra-se expresso no cérebro em astrócitos, oligodendrócitos e estriado (HONMA et al., 2006).

2.6.4 Receptores EP e Crises

Durante as crises convulsivas, a COX-2 é rapidamente induzida e prostanóides incluindo PGE₂, PGD₂ e PGF_{2α} são produzidas (YOSHIKAWA et al., 2006) no encéfalo, particularmente a PGE₂. Neste sentido, evidências de que a PGE₂ é uma efetora chave para os efeitos da COX-2 em crises convulsivas vêm de estudos que utilizam agonistas e antagonistas dos receptores EPs. Trabalhos do nosso grupo já evidenciaram que receptores EPs estão envolvidos e possuem efeitos distintos nas crises convulsivas. Oliveira e colaboradores (2008) mostraram que antagonistas seletivos para receptores EP1, EP3 e EP4, e o agonista seletivo para receptor EP2 butaprosté aumentam a latência para crises convulsivas tônico-clônicas generalizadas induzidas por PTZ. Ainda, Santos e colaboradores (2017) verificaram que a administração sistêmica do ONO-AE1-259-01, um agonista altamente seletivo de receptores EP2, aumenta a latência para as crises convulsivas, diminuiu o número e duração das crises e a amplitude média das crises eletrográficas induzidas por PTZ e por pilocarpina, em camundongos. De fato, Jiang e colaboradores (2013) em seu estudo observaram que camundongos epiléticos que recebiam administração sistêmica de TG6-10-1, antagonista do receptor EP2, apresentavam redução na mortalidade e neurodegeneração no hipocampo após o SE, acelerada recuperação do peso e prevenção da abertura da barreira hematoencefálica sem modificação nas crises agudas.

De modo controverso, evidências em modelos de inflamação crônica e neurodegeneração demonstram uma associação entre a ativação do receptor EP2 e neurotoxicidade secundária (JIANG AND DINGLELINE, 2013; QUAN et al., 2013; FU et al., 2015; ANDREASSON, 2010). Quan e colaboradores (2013) mostraram que a ativação do receptor EP2 pela PGE₂ ou butaprostete promove inflamação no cérebro por exacerbar a indução de COX-2 pró-inflamatória, óxido nítrico sintase induzível, IL-1 β , e IL-6, mas bloqueia a indução de TNF- α , CCL3 e CCL4, sendo que a ativação de outros receptores para PGE₂ tais como, EP1, EP3 e EP4, tem pouco ou nenhum efeito na expressão desses mediadores inflamatórios. Estes resultados indicam que a ativação do receptor EP2 desempenha uma função regulatória complexa durante a ativação clássica da micróglia.

Ao longo dos últimos anos, estudos tem demonstrado que a deleção genética ou inibição farmacológica do receptor EP1 é neuroprotetora. Fischborn e colaboradores (2010) verificaram que o pré-tratamento sistêmico com o antagonista EP1, SC-51089, diminui a gravidade das crises, mas não afetou o limiar para as crises em camundongos abradados na amígdala. Outrossim, Rojas e colaboradores (2014) revelaram que a deleção do receptor EP1 não tem efeito sobre o limiar de crises convulsivas, mas reduz danos neuronais, a probabilidade de entrar em *status epilepticus* e as respostas pró-inflamatórias no hipocampo de camundongos após a injeção de cainato (ROJAS et al., 2014).

2.7 ANTI-INFLAMATÓRIOS

2.7.1 História

Os AINES têm suas origens no uso de extratos de plantas contendo salicilato, especialmente a casca do salgueiro (*Salix alba* e outros membros da espécie *Salix*), no tratamento de febre, dor e inflamações (RAINSFORD, 2004). Esses tratamentos datam do início da era indiana, africanas e americanas e foram descritas inicialmente em detalhes por Roman e autoridades médicas gregas. Durante os séculos XVII, XVIII e XIX, a popularidade desses extratos de plantas cresceu muito, principalmente em virtude da publicação do reverendo Edward Stone no século 17, onde provavelmente constavam os primeiros ensaios clínicos de extrato de casca de salgueiro para o tratamento de má-laria ou febre. O isolamento dos principais componentes ativos de salicilato deu-se no início do século XIX. Com avanços em química na Europa e desenvolvimentos na indústria química alemã em meados do final do século 19, seguiram a síntese de ácidos salicílicos e acetilsalicílicos, sendo este último

comercializado com sucesso pela Bayer AG como Aspirin TM há mais de 100 anos (RAINSFORD, 2004a).

O desenvolvimento da primeira categoria dos quais são agora conhecidos como os antiinflamatórios não esteróides (AINEs), das quais a aspirina tornou-se reconhecida como precursor, foi fenilbutazona em 1946 (por JR Geigy, Basileia, Suíça) e mais tarde indometacina na década de 1960 (por Merck & Co, Rahway, NJ, EUA) (OTTERNESS, 1995). Fenilbutazona foi inicialmente empregada como uma combinação com antipirina na crença de que aumentaria as ações mais tarde. Entretanto, apareceu uma maior atividade antiinflamatória / analgésica da fenilbutazona em relação à antipirina. A fenilbutazona foi utilizada por mais de 30 anos com sucesso para o tratamento de artrite e outras condições inflamatórias dolorosas até sua popularidade diminuir progressivamente após associações com agranulocitose e supressão da medula óssea (ainda essencialmente não comprovado hoje), úlceras gastrointestinais superiores e sangramento e subsequente popularidade de AINEs mais avançados (RAINSFORD, 2007).

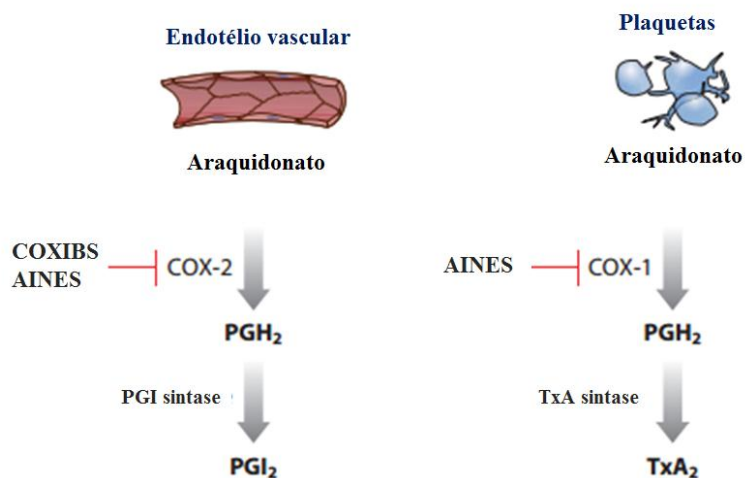
O uso de substâncias medicinais como folhas de mirtilo secas ou extratos amargos da casca de árvores de álamo foram utilizados para tratar dor nas costas e abdominal. O primeiro relatório publicado que documenta os efeitos antipiréticos e analgésicos da casca de salgueiro apareceu na Inglaterra em 1973 em uma apresentação à Sociedade Real pelo Reverendo Edward Stone. O componente ativo da casca de salgueiro foi mais tarde identificado como salicilina, que é metabolizada em salicilato (RAINSFORD, 2007).

Em 1828, Johann Andreas Buchner isolou a salicilina a partir da casca de salgueiro (*Salix alba*), sendo que em 1838, Raffaele Piria tratou este composto de modo a produzir ácido salicílico, que também podia ser encontrado em várias espécies de *Spiraea*, nomeadamente *Spiraea ulmaria*. Posteriormente, Hammond Kolbe sintetizou o ácido salicílico, que começou a ser produzido industrialmente em 1874 (VONKKEMAN; VAN de LAAR, 2010). Em 1897, o químico alemão Felix Hoffman sintetiza ácido acetilsalicílico, chamado aspirina (derivado de Acetil Spirea) e onze dias depois Hoffman sintetiza outro novo composto também por acetilação o qual foi chamado de di acetil morfina. Em 1899 a aspirina é registrada como um nome comercial, e logo em seguida, em 1900 é patenteado nos Estados Unidos e na Inglaterra e tornou-se disponível para venda no ano seguinte. Contudo, apesar do amplo uso desses agentes, o seu mecanismo de ação foi esclarecido somente em 1982, quando John Vane ganhou o Prêmio Nobel pela sua descoberta, que propôs que os antiinflamatórios semelhantes à aspirina suprimem o processo inflamatório pela inibição da COX, inibindo assim, a síntese de prostaglandinas (CARVALHO et al., 2004; HAWKEY, 2005). Este acontecimento marca uma nova era na pesquisa e investigação dos AINEs, estabelecendo a

COX como um importante alvo molecular no desenvolvimento de novos fármacos, com efeitos significativos na redução da inflamação, dor e febre (RAINSORD, 2007). Assim, em 1989 Phillip Needleman identificou a segunda isoforma da COX, a COX-2. Esta descoberta levou à hipótese de que as prostaglandinas anti-inflamatórias (PGs) eram produzidas através da expressão constitutiva da COX-1, enquanto as PGs proinflamatórias eram produzidos por meio da indução da isoforma COX-2 (MEADE et al., 1993; VANE et al., 1998). Os AINEs tradicionais eram conhecidos por inibir ambas as isoformas da COX e seus efeitos adversos gastrointestinais eram atribuídos à inibição de PG gastroprotetoras produzidas através da via COX-1 (RAO; KNAUS, 2008). Dessa forma, uma nova perspectiva terapêutica emergiu para o desenvolvimento de fármacos mais seletivos e com menores efeitos adversos (FITZGERALD; PATRONO, 2001).

Assim, em 1995 os inibidores seletivos da COX-2 de primeira geração entram em ensaios clínicos, como celecoxibe e rofecoxibe (HAWKEY, 2005), e quatro anos depois (1998) celecoxibe é aprovado para venda. Apesar desse sucesso inicial após o lançamento de inibidores seletivos da COX-2, preocupações foram criadas em relação aos efeitos cardiovasculares adversos (MUKHERJEE et al., 2001). Estudos adicionais, conclusivamente demonstraram que os inibidores seletivos da COX-2 podem modificar o equilíbrio natural entre tromboxano A_2 (TxA_2) protrombótico e prostaciclina (PGI_2) antitrombótico, potencialmente aumentando a possibilidade de um evento cardiovascular trombótico (Figura 8) (SOLOMON et al., 2004; SOLOMON, 2005).

Figura 8 – Efeitos adversos cardiovasculares



Fonte: adaptado de Marnett (2009).

A evidência atual indica que inibidores seletivos de COX-2 têm efeitos cardiovasculares adversos importantes que incluem aumento do risco de infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, insuficiência cardíaca e hipertensão. O risco desses efeitos adversos é provavelmente maior em pacientes com histórico prévio ou com alto risco de doença cardiovascular. Nestes pacientes, o uso de inibidores da COX-2 para o alívio da dor deve ser limitado e somente usado se não houver alternativas apropriadas, e então, apenas na menor dose e pelo menor tempo necessário (ANTMAN et al., 2007).

2.7.2 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são fármacos amplamente utilizados no tratamento da dor, inflamação e febre, sendo uma das classes de medicamentos mais prescritas em todo o mundo. Atualmente existe mais de 50 AINEs diferentes no mercado mundial. São considerados medicamentos para tratamentos sintomáticos inespecíficos, não interferindo na história natural das doenças inflamatórias. Seu uso é muito difundido em todo o mundo e continua a crescer. Em 1995, sua comercialização alcançava a cifra de 2,2 bilhões de dólares, com 73 milhões de prescrições anuais em todo o mundo (KUMMER; COELHO, 2002).

De uma maneira geral, o mecanismo dos AINEs envolve a inibição da oxidação do ácido araquidônico pelas enzimas COXs de ácidos graxos, considerada a enzima chave para a síntese dos prostanoídes e TXBs. Os AINEs reduzem especialmente componentes da resposta inflamatória e imunológica em que as PGs, principalmente as derivadas da COX-2, desempenham papel significativo (BOMBARDIER et al., 2000).

Efeitos colaterais como irritação da mucosa gástrica, toxicidade hepática e renal (KONTOGIORGIS; HADJIPAVLOU-LITINA, 2002), eventos cardiovasculares e trombóticos podem ser causados pela administração oral de todos os tipos de AINEs (KONSTAM et al., 2001; MUKHERJEE et al., 2001).

A absorção dos diversos tipos de AINEs é semelhante quando administrados através das vias oral, muscular ou renal. Para a maioria dos AINEs a ligação à proteínas plasmáticas é maior que 90%, e, se a concentração plasmática for maior que a capacidade de fixação, haverá aumento desproporcional de fármaco livre e conseqüentemente um aumento dos efeitos colaterais (KATZUNG, 2004).

A maioria dos AINEs são metabolizados rapidamente pelo fígado, e sua duração de ação varia bastante, cerca de 4 a 24 horas. Normalmente o intervalo para uso dos AINEs de

meia-vida curta é de 6 a 8 horas, para os de meia-vida média é de 12 horas, e para os de meia-vida longa, de 24 horas. A administração parenteral desses fármacos diminui o efeito de primeira passagem e aumenta significativamente a biodisponibilidade. A metabolização hepática ocorre por reações de conjugação, oxidação, glucoronidação e acetilação, sendo pequena parte do fármaco excretada de forma inalterada na urina (SAKATA; ISSY, 2008).

A meia-vida de um fármaco é definida como o tempo durante o qual a concentração do fármaco no plasma diminui para a metade de seu valor original. O conhecimento da meia-vida do fármaco é necessário para se obter a concentração máxima plasmática constante, após doses repetidas em intervalos que representem a meia-vida, com o objetivo de orientar a posologia. Dessa forma, quanto mais longa a meia-vida, mais longa a permanência do fármaco no organismo após interrupção da administração do mesmo. Assim, durante a administração crônica do fármaco, quanto mais longa a meia-vida, mais tempo será necessário para que o mesmo atinja o valor de estado de equilíbrio: uma meia-vida para alcançar 50% do valor de estado de equilíbrio, duas para alcançar 75%, três para alcançar 87,5%, e assim por diante. Se o fármaco possuir uma meia vida de aproximadamente 24 horas, por exemplo, serão necessários de 3 a 5 dias para se aproximar da concentração de estado de equilíbrio durante uma infusão a uma velocidade constante (GOODMAN; RANG; DALE, 2012).

As propriedades físico-químicas determinam a distribuição dos AINEs nos tecidos e são responsáveis pelas diferenças nas características que podem influenciar na eficácia terapêutica. Os fatores mais importantes são a lipossolubilidade e a constante de ionização (pKa). Muitos dos AINEs são ácidos fracos, com pKa em torno de 2 a 5. A proporção de fármaco não ionizado (em estado lipossolúvel) que existe em pH fisiológico pode influenciar na distribuição do fármaco nos tecidos (RAINSFORD, 2006).

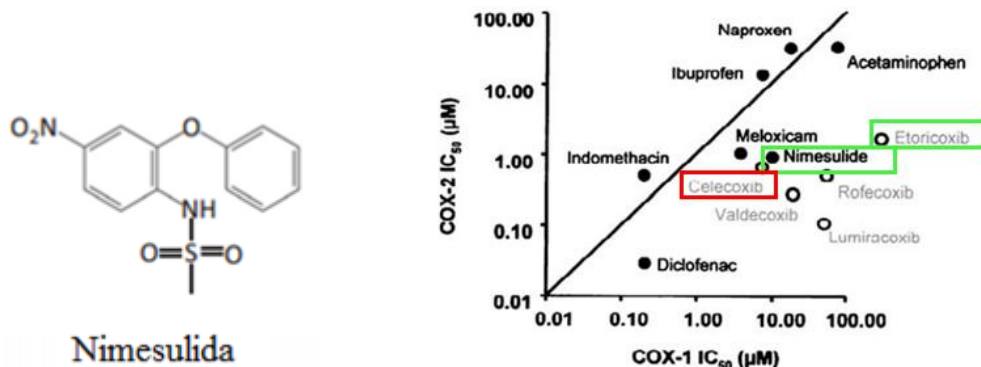
Os AINEs são captados preferencialmente pelos tecidos inflamados, porém, podem, ainda, se concentrar na mucosa gástrica e nos rins, os quais constituem os principais locais de efeitos adversos (RAINSFORD, 1999).

O efeito dos AINEs na produção de PGs é a principal causa de toxicidade, refletindo em disfunções plaquetárias, broncoespasmo, alteração da função renal, hipertensão arterial e úlcera péptica comumente associados ao seu uso. Além da inibição da biossíntese de PGs, os AINEs também são responsáveis por múltiplos efeitos no processo inflamatório, como: redução dos ácidos graxos livres dos leucócitos, inibição da formação de lipídeos de membrana, inibição da migração de leucócitos, desacoplamento da fosforilação oxidativa, inibição da síntese de mucopolissacarídeo, ação antioxidante, estabilização das membranas lipossômicas, inibição da agregação de neutrófilos (SAKATA; ISSY, 2008).

Os AINES inibem, de forma variável, ambas as isoformas COX em suas dosagens terapêuticas. Dessa maneira, passaram a ser caracterizados de acordo com a capacidade de inibir COX-1 e 2. Tal característica é expressa em termos de IC₅₀, concentração necessária para inibir 50% da atividade COX, usando sistemas de teste *in vitro*. As razões de IC₅₀ para COX-1 e 2 têm sido calculadas para avaliar a capacidade de inibição de cada isoforma, assim, uma baixa relação COX-2/COX-1 sugere ser o agente relativamente seletivo para COX-2 (KUMMER; COELHO, 2002).

A nimesulida (4'-nitro-2'-fenoximetanosulfonânida) é um AINE, que difere dos outros compostos desta categoria por apresentar um radical sulfonânida em lugar de um radical carboxílico (Figura 9). A nimesulida apresenta efeitos anti-inflamatórios, analgésicos ou antipiréticos e inibe preferencialmente a enzima COX-2, reduzindo a síntese de PGs relacionadas à inflamação. É prontamente absorvida pelo trato gastrointestinal, alcançando o pico de concentração plasmática em 1-2 horas. O nível de ligação às proteínas plasmáticas é cerca de 99%, e a meia vida é de 2 a 5 horas em humanos (SAKATA; ISSY, 2008). Sua excreção é predominantemente renal, mais de 80%, não dando origem a fenômenos de acúmulo mesmo após administrações repetidas, e, além disso, apresenta uma boa tolerabilidade sistêmica e gastrointestinal (VANE et al., 1998). O volume de distribuição da nimesulida nos ratos é baixo, apesar das boas propriedades de permeabilidade deste fármaco. A excreção sistêmica avaliada em ratos após administração intravenosa é 16.1 mL/h/Kg. Portanto, a taxa de eliminação da nimesulida em ratos parece ser a partir de 2-7 vezes mais baixos do que nos seres humanos, provavelmente devido a uma taxa e extensão diferente do metabolismo do fármaco. A meia vida é de 6.1 horas quando administrada oralmente em ratos (RAINSFORD, 2006).

Figura 9 – Estrutura química da nimesulida e seus IC₅₀ para COX-1 e COX-2



Fonte: adaptado de Dey et al. (2016); Shi e Klotz (2008).

2.7.3 Coxibes

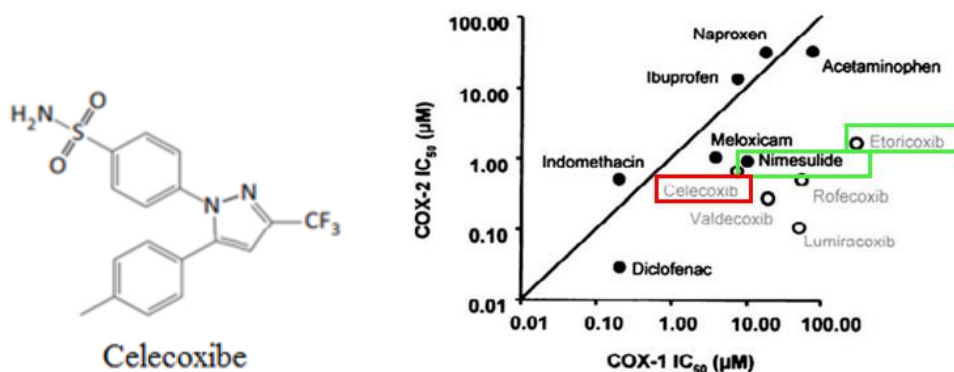
Denominados inibidores seletivos da COX-2, os coxibes são AINEs, desenvolvidos com o objetivo de manter a eficácia dos representantes não seletivos, sem sua capacidade de lesar sítios gástricos e renais. Essa vantagem seria farmacodinamicamente explicada pela capacidade de inativar seletivamente a COX-2, preservando a ciclooxigenase constitutiva (COX-1), responsável pela proteção fisiológica exercida por PGs naqueles sítios (GOODMAN; GILMAN, 2012).

Os coxibes mostraram-se anti-inflamatórios relativamente tão eficazes quanto alguns dos AINEs não-seletivos, com definido benefício em artrite reumatóide, dismenorréia e dor pós-operatória e benefício provável em osteoartrose. Estes protegeram, na ordem de 50%, contra ulcerações e queixas gastrintestinais por curto prazo (até 6 meses), mas induziram gastropatia e hemorragias petequiais. Entretanto, estudos têm revelado persistência de dispepsia, dor abdominal, diarreia e lesões renais mesmo com o uso de inibidores seletivos da COX-2. Tem sido sugerido ainda, que estes medicamentos estão associados a eventos cardiovasculares (infarto do miocárdio, trombose, hipertensão arterial, hipertensão sistólica isolada), edema, hepatotoxicidade e distúrbio visual agudo temporário. Seu custo é considerado mais elevado do que os AINEs convencionais. Assim, recomenda-se que a prescrição desses fármacos seja reservada a pacientes de alto risco (idosos, com comorbidade ou história prévia de evento gastrintestinal) (KATZUNG, 2004).

O celecoxibe, (4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il] benzenesulfonamida), é um fármaco derivado da classe das sulfonamidas que possui características apolares sendo, portanto, um fármaco lipofílico e de alta permeabilidade (Figura 10). Apresenta características de um ácido fraco com valores de pK_a 11,1, e encontra-se na forma não ionizada em pH fisiológico (PAULSON et al., 2001). O celecoxibe, um coxibe de primeira geração disponível na clínica médica apresenta meia-vida diferente para ratos e humanos. Em ratos, a meia vida plasmática difere entre machos (3,73 horas) e fêmeas (14 horas) (PAULSON et al., 2000), e em humanos aproximadamente 12 horas (SHI; KLOTZ, 2008). Apresenta biodisponibilidade oral lenta em torno de 20-60% (PAULSON et al., 2001; WERNER et al., 2002; Hinz et al., 2007), e o volume médio de distribuição é de aproximadamente 500 litros por 70 kg em indivíduos jovens adultos saudáveis, indicando extensa distribuição em todos os tecidos (SHI e KLOTZ, 2008). Em ratos, o volume médio de distribuição difere entre machos (2,51 litros/Kg) e fêmeas (2,42 litros/Kg). O celecoxibe apresenta depuração plasmática em humanos em torno de 450 mL/min, e em ratos machos

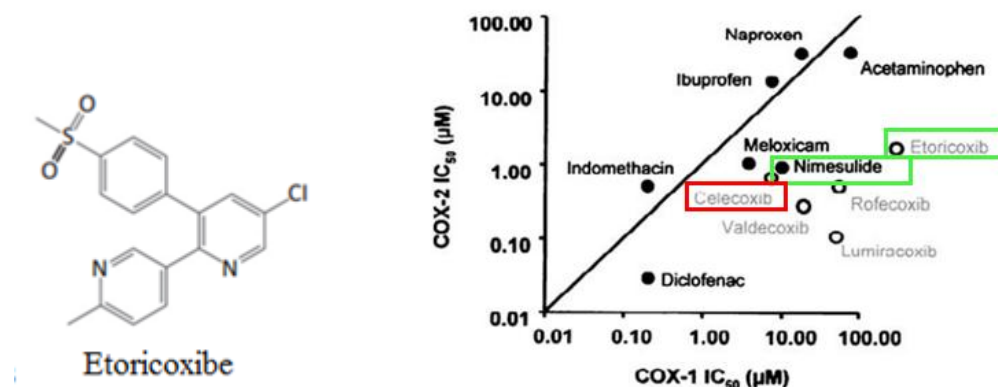
(7,76 mL/min/Kg) e fêmeas (1,99 mL/min/Kg) (PAULSON et al., 2001). Pouco fármaco é excretado inalterado, a maior parte é excretada como ácidos carboxílicos e metabólitos glicuronídeos na urina e nas fezes (58%), ocorrendo à eliminação total da droga no organismo após 120 horas da administração. A taxa de ligação às proteínas plasmáticas, que é independente da concentração, é de cerca de 97% em concentrações plasmáticas terapêuticas e o celecoxibe não se liga preferencialmente aos eritrócitos no sangue (PAULSON et al., 2000; GOODMAN; GILMAN, 2012).

Figura 10 – Estrutura química do celecoxibe e seus IC₅₀ para COX-1 e COX-2



Fonte: adaptado de Dey et al. (2016); Shi e Klotz (2008).

Já o etoricoxibe, 5-cloro-3-(4-metanosulfonilfenil)-6'-metil-[2,3']-bipiridinil], inibidor seletivo da COX-2 de segunda geração disponível na clínica médica, é um fármaco derivado da classe das metilsulfonas (Figura 11). Este fármaco apresenta uma alta biodisponibilidade oral de aproximadamente 100%, e volume de distribuição no estado de equilíbrio de 120 litros em seres humanos (AGRAWAL et al., 2003; Hinz et al., 2007). A taxa de ligação às proteínas plasmáticas humanas é de aproximadamente 92% na faixa de concentração de 0,05 a 5 microgramas/mL. O etoricoxibe atravessa a placenta de ratas e coelhas e a barreira hematoencefálica de ratos. Sua excreção ocorre em maior parte pela urina (70%), e sua depuração plasmática é aproximadamente 57 mL/min em humanos (RODRIGUES et al., 2003).

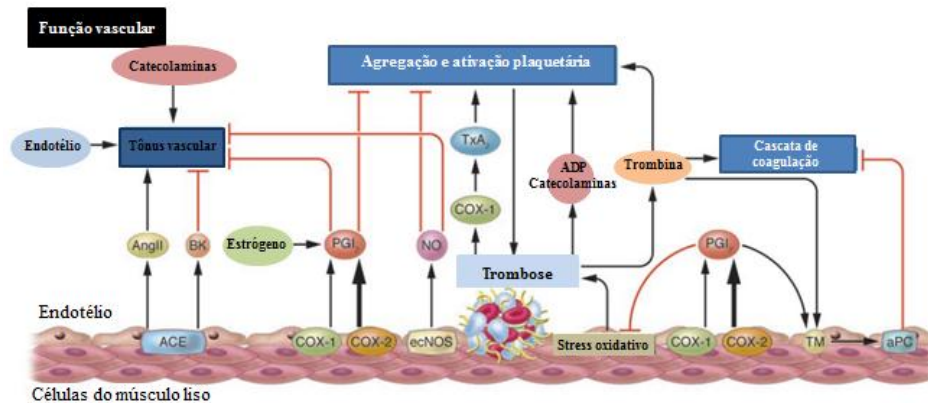
Figura 11 – Estrutura química do etoricoxibe e seus IC₅₀ para COX-1 e COX-2

Fonte: adaptado de Dey et al. (2016); Shi e Klotz (2008).

Verificou-se claramente que os inibidores da COX-2 (celecoxibe, rofecoxibe e valdecoxibe) atravessam a barreira hematoencefálica e atingem o SNC de humanos em concentrações suficientes para inibir a atividade da enzima COX-2. O tempo de absorção e disposição sistêmica dos três coxibes foi semelhante, e houve diferenças significativas quanto à passagem dos coxibes no SNC (1.7 ± 0.8 , 0.9 ± 0.3 , e 1.3 ± 0.8 horas, respectivamente), sendo que rofecoxibe e valdecoxibe tiveram uma maior entrada no SNC. Acredita-se que essas diferenças estejam relacionadas principalmente a ligação dos fármacos as proteínas plasmáticas. Estes resultados são importantes para utilização terapêutica desses fármacos (DEMBO *et al.*, 2005). O mesmo foi visto no estudo de Renner e colaboradores (2010), onde o etoricoxibe administrado de forma oral em humanos alcançou o líquido cefalorraquidiano em concentrações efetivas e com um tempo de latência de aproximadamente uma hora.

Tem sido verificado em estudos que inibidores seletivos da COX-2 ocasionam efeitos cardiovasculares (infarto no miocárdio e acidente vascular encefálico). Em um estudo realizado para prevenção de adenoma envolveu 2045 pacientes que receberam placebo ou celecoxibe, nas doses de 200 e 400 mg, duas vezes ao dia durante três anos. Após três anos, ocorreu uma diminuição dose-dependente na recorrência de pólipos e um aumento em eventos cardiovasculares e trombóticos, devido a administração prolongada dos inibidores da COX-2 (BERTAGNOLLI *et al.*, 2006). Os efeitos observados podem ser ocasionados pela redução na biossíntese de PGI₂ (considerada um inibidor da agregação plaquetária), e por um aumento na síntese de tromboxanos (agregador plaquetário) (GROSSER *et al.*, 2006). Estes resultados indicam que o celecoxibe é um agente eficaz para a prevenção de adenomas coloretais, mas, devido a potenciais eventos cardiovasculares, não pode ser rotineiramente recomendado para esta indicação quando usado por longo período de tempo (Figura 12).

Figura 12 – Papel das isoenzimas COX em eventos cardiovasculares



Fonte: adaptado de Grosser et al. (2006).

Os inibidores da COX-2 têm sido desenvolvidos com o objetivo de fornecer similar eficácia e maior segurança comparado com os AINEs tradicionais (FITZGERALD, 2002; JAYARAMAN et al., 2010; JAYARAMAN et al., 2010; JAYARAMAN et al., 2010).

Nas últimas décadas diversas pesquisas têm sido focadas no uso dos coxibes como estratégia na terapia antiepiléptica, estreitando cada vez mais as relações entre as PGs e o desenvolvimento das crises. Embora exista uma ampla gama de estudos na literatura, diversos autores divergem com relação ao envolvimento da COX-2 nas crises convulsivas. Bauer e colaboradores (2008) usando capilares cerebrais isolados de ratos demonstraram que a incubação destes com grandes concentrações de glutamato induzem uma expressão aumentada da glicoproteína P e que o uso de celecoxibe, bem como o tratamento com antagonista do receptor NMDA (MK-801) foi capaz de inibir esse aumento. Corroborando com esse resultado, em camundongos nocaute para COX-2, a incubação com altas concentrações de glutamato e o uso de celecoxibe não apresentaram efeito sobre a atividade ou a expressão da glicoproteína P. Tomados em conjunto, esses dados fornecem evidências do envolvimento da COX-2 na sinalização do receptor NMDA quando ativado pelo glutamato, assim como na expressão e atividade da glicoproteína P.

Sob o mesmo ponto de vista, Schlichtiger e colaboradores (2010), por exemplo, avaliaram o efeito do bloqueio da expressão da glicoproteína P pelo uso do celecoxibe na penetração de fenobarbital no cérebro. O celecoxibe atenuou, significativamente, a frequência das crises convulsivas. Os autores sugerem que a regulação da expressão da glicoproteína P pode ser mediada pela via das COX-2, uma vez que o bloqueio dessa via foi capaz de

restaurar a sensibilidade ao fenobarbital em ratos que, antes do teste, demonstraram pouca ou nenhuma resposta ao fármaco.

O envolvimento da COX-2 na sinalização do receptor NMDA também foi verificado por Hewett e colaboradores (2006). Camundongos que receberam injeção intrahipocampal de NMDA apresentaram aumento na expressão da COX-2 entre 3 e 6 horas após a administração de NMDA, alcançando o pico em 12 horas. O tratamento com rofecoxibe por via sistêmica, 4 dias antes e 3 dias após a injeção de NMDA, atenuou a excitotoxicidade no hipocampo de maneira dose dependente. Além disso, o tratamento com rofecoxibe foi capaz de atenuar o edema cerebral após a injeção intrahipocampal de NMDA.

Além dos estudos acima citados, Jung e colaboradores (2006) defendem que a inibição da COX-2 possa prevenir a epileptogênese. Os autores observaram que o tratamento com celecoxibe promoveu uma redução na frequência e na duração das crises convulsivas recorrentes espontâneas em ratos após o *status epilepticus* (SE). Além disso, o tratamento com celecoxibe preveniu a perda neuronal nas regiões CA1, CA3 e hilo hipocampais. Esses dados mostram que a inibição da COX-2 pode prevenir a epileptogênese, sugerindo um papel terapêutico para inibidores da COX-2 na epilepsia. Oliveira e colaboradores (2008) demonstraram que o tratamento com celecoxibe pela via oral preveniu o desenvolvimento das crises convulsivas induzidas por PTZ em ratos. Além disso, os autores mostraram que o pré-tratamento com PGE₂, via i.c.v., seguida da administração de PTZ em dose subconvulsivante, promove o desenvolvimento de crises convulsivas. O mesmo ocorreu no estudo de Salvadori e colaboradores (2012), onde o tratamento com celecoxibe pela via oral preveniu o desenvolvimento das crises convulsivas induzidas por ácido metil-malônico (AMM) em ratos. Além disso, a administração i.c.v. da PGE₂ foi capaz de reverter os efeitos protetores do celecoxibe.

Baik e colaboradores (1999) em seu estudo observaram que inibidores seletivos para COX-2 e inibidores não seletivos como a indometacina, agravaram as crises induzidas por ácido cáinico assim como a morte neuronal de células piramidais nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo. Sugerindo assim, que PGs endógenas possuem propriedades anticonvulsivantes. Por outro lado, Ciceri e colaboradores (2002), observaram que o celecoxibe, inibidor seletivo da COX-2, reduziu os níveis elevados de PGE₂ no cérebro de ratos tratados com ácido cáinico. Reforçando esse estudo, Toscano e colaboradores (2008) verificaram que uma dose subconvulsivante de ácido cáinico em camundongos nocaute para COX-2, é capaz de levar a um aumento das crises, associado com dano neuronal. Os autores ainda mostraram que o pré-tratamento com celecoxibe, por 6 semanas, em camundongos selvagens, aumentou a

susceptibilidade para as crises induzidas por ácido caínico, com intensidade nas crises similar aos nocautes COX-2. Ainda, Okada e colaboradores (2001) observaram que camundongos EL, geneticamente susceptíveis a crises, apresentaram aumento na expressão da COX-2 no hipocampo após crise epilética. Os animais foram tratados com indometacina pela via oral por 4 semanas, entretanto o tratamento não apresentou nenhum efeito tanto no limiar quanto na duração das crises. Isso sugere, que COX-2 e PGs podem não ter significante função na epileptogênese e podem ser induzidas como um subproduto das crises em camundongos EL.

Por outro lado, Dhir e colaboradores (2005, 2006, 2007), observaram que o tratamento por 15 dias tanto com inibidor preferenciais para COX-1 (naproxeno), quanto com inibidor preferencial para COX-2 (nimesulida) e rofecoxibe (inibidor da COX-2) foram capazes de atenuar o score de *kindling* induzido por PTZ em camundongos, bem como reverteu diversas alterações bioquímicas induzidas por PTZ. Sugerindo assim, que inibidores da COX tem importante papel na patofisiologia do *kindling* induzido por PTZ em camundongos.

Além disso, Claycomb e colaboradores (2011) mostraram aumento na imunoreatividade da COX-2 hipocampal após crises agudas e desenvolvimento de abrasamento induzidos por PTZ em camundongos CD-1, embora nenhuma evidência de morte neuronal tenha sido observada em ambos os modelos. O rofecoxibe, administrado por 5 dias antes do PTZ, e 5 dias após o desenvolvimento do Kindling em camundongos, não foi capaz de atenuar as crises.

Existem diversas pesquisas atribuindo atividade antiepilética a fármacos anti-inflamatórios, como o parecoxibe, fármaco inibidor da COX-2 de segunda geração. Quando administrado duas vezes ao dia por 18 dias, na dose de 10 mg/kg, i.p., após o *status epiléticos* (SE) induzido por pilocarpina exerceu significante efeito neuroprotetor em neurônios hipocampais. Embora, o tratamento não tenha sido capaz de alterar a frequência, incidência ou duração das crises recorrentes espontâneas, o parecoxibe foi capaz de atenuar a gravidade das crises (POLASCHECK et al., 2010). Assim, os autores concluem que o tratamento com parecoxibe resultou em efeito neuroprotetor, porém, todos os animais desenvolveram epilepsia ao final do experimento. Isto poderia indicar que o SE induzido por processos inflamatórios não são críticos para o desenvolvimento da epileptogênese ou que a inibição da COX-2 não é uma estratégia ideal para bloquear processos inflamatórios que são cruciais para a epileptogênese.

3 PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

3.1 ARTIGO CIENTÍFICO I – CYCLOOXYGENASE-2 INHIBITORS DIFFERENTIALLY ATTENUATE PENTYLENETETRAZOLINDUCED SEIZURES AND INCREASE OF PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINE LEVELS IN THE CEREBRAL CORTEX AND HIPPOCAMPUS OF MICE



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Pharmacology

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

Full length article

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



Fernanda Rossatto Temp^a, Joseane Righes Marafija^a, Laura Hautrive Milanese^a, Thiago Duarte^{a,c}, Leonardo Magno Rambo^d, Micheli Mainardi Pillat^{b,e}, Carlos Fernando Mello^{a,b,*}

^a Graduation Program in Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^b Department of Physiology and Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

^c Center of Health Sciences, Lutheran University of Brazil, Santa Maria, RS 97020-001, Brazil

^d Department of Physical Education, Federal University of Pampa – UNIPAMPA, Uruguaiana, RS 97508-000, Brazil

^e Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Chemical compounds studied in this article:

Pentylenetetrazol (PubChem CID: 5917)
 Nimesulide (PubChem CID: 4495)
 Celecoxib (PubChem CID: 2662)
 Etoricoxib (PubChem CID: 123619)
 Carboxymethylcellulose (PubChem CID: 23706213)
 Tween 80 (PubChem CID: 443315)
 Sodium Chloride (PubChem CID: 5234)
 Phosphate-buffered saline (PBS) (PubChem CID: 24978514)
 Ethylenediaminetetraacetic acid (PubChem CID: 6049)
 Phenylmethylsulfonyl fluoride (PubChem CID: 4784)

Keywords:

Nimesulide
 Celecoxib
 Etoricoxib
 Neuroinflammation
 Cytokines
 Epilepsy

ABSTRACT

Seizures increase prostaglandin and cytokine levels in the brain. However, it remains to be determined whether cyclooxygenase-2 (COX-2) derived metabolites play a role in seizure-induced cytokine increase in the brain and whether anticonvulsant activity is shared by all COX-2 inhibitors. In this study we investigated whether three different COX-2 inhibitors alter pentylenetetrazol (PTZ)-induced seizures and increase of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interferon- γ (INF- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) levels in the hippocampus and cerebral cortex of mice. Adult male albino Swiss mice received nimesulide, celecoxib or etoricoxib (0.2, 2 or 20 mg/kg in 0.1% carboxymethylcellulose (CMC) in 5% Tween 80, p.o.). Sixty minutes thereafter the animals were injected with PTZ (50 mg/kg, i.p.) and the latency to myoclonic jerks and to generalized tonic-clonic seizures were recorded. Twenty minutes after PTZ injection animals were killed and cytokine levels were measured. PTZ increased cytokine levels in the cerebral cortex and hippocampus. While celecoxib and nimesulide attenuated PTZ-induced increase of proinflammatory cytokines in the cerebral cortex, etoricoxib did not. Nimesulide was the only COX-2 inhibitors that attenuated PTZ-induced seizures. This effect coincided with an increase of IL-10 levels in the cerebral cortex and hippocampus, constituting circumstantial evidence that IL-10 increase may be involved in the anticonvulsant effect of nimesulide.

1. Introduction

Accumulating clinical and experimental evidence has been gathered over the past few years associating neuroinflammation with epilepsy and/or increased seizure susceptibility. In line with this view, while acute and chronic seizures increase key inflammatory mediators in the brain (Vezzani and Granata, 2005), inflammatory mediators synthesized and released in response to pathogen and

tissue damage facilitate seizures (Gomez et al., 2014; Ho et al., 2015).

Inflammation, as part of the innate immune response, is commonly described as sequential events triggered by the activation of pattern-recognition receptors by pathogen- and damage-associated molecular patterns, such as the Toll-like receptors (TLRs) (Maroso et al., 2010). The activation of TLRs leads to the induction of numerous genes that function in inflammatory responses. These include cytokines

* Corresponding author.

E-mail address: cf.mello@smail.ufsm.br (C.F. Mello).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.013>

Received 7 November 2016; Received in revised form 24 April 2017; Accepted 8 May 2017

Available online 03 June 2017

0014-2999/ © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

(e.g., tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-6 (IL-6)), inflammatory chemokines, such as CCL2 (Cazareth et al., 2014) and, sequentially, key enzymes involved in the synthesis of proinflammatory lipid mediators and nitric oxide (Hsiao et al., 2007). Accordingly, TNF- α induces prostaglandin G/H synthase-2 in microvascular vessels and infiltrating neutrophils (Tsao et al., 1999) and IL-1 β stimulates prostaglandin E₂ (PGE₂) production in murine astrocytes (O'Banion et al., 1996). Cyclooxygenases (COXs) 1 and 2 convert arachidonic acid to PGH₂, and specific thromboxane or PG synthases convert PGH₂ to thromboxane A₂ (TXA₂), PGF_{2 α} , PGE₂, PGI₂ or PGD₂ (Medeiros et al., 2012).

While this sequential view of the inflammatory process (TLR activation, cytokine synthesis, lipid mediator production) has been relatively well established for the peripheral production of prostanoids (Kawai and Akira, 2008) and lipopolysaccharide (LPS)-induced neuroinflammation (Chu et al., 2015; Ho et al., 2015), there is evidence that the prostaglandins produced in response to seizures are initially synthesized by cytokine-independent mechanisms, which involve constitutive COX-2 (involved in PGF_{2 α} , PGE₂, 6-keto-PGF_{1 α} , TXA₂ and PGD₂ production) and COX-1 (involved in PGD₂ and TXA₂ production) (Choi et al., 2009). Therefore, the sequential production of cytokines and prostaglandins that has consolidated in the literature as a logical sequence for the peripheral inflammatory response, may not occur exactly in the same way in the central nervous system (CNS). As a consequence, it is possible that constitutive COX-2-derived prostaglandins modulate seizure-induced cytokine production and release in the CNS. This would be particularly relevant considering the well-known proconvulsant action of TNF- α (Zare-Shahabadi et al., 2015), IL-1 β (Arisi et al., 2015; Balosso et al., 2008) and IL-6 (Campbell et al., 1993). If prostaglandins increased proconvulsant (or decreased anticonvulsant) cytokine production and release, this could constitute an additional mechanism by which proconvulsant prostaglandins, such as PGE₂ (Oliveira et al., 2008a, 2008b), facilitate seizures. This putative feedforward proinflammatory and proconvulsant mechanism would sum to the already described PGE₂-induced increase of astrocytic glutamate release (Takemiya et al., 2003), Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition (Oliveira et al., 2009) and inhibition of potassium currents (Chen and Bazan, 2005) in the CNS. Therefore, in this study we investigated whether different COX-2 inhibitors alter pentylenetetrazol (PTZ)-induced seizures and increase of IL-1 β , IL-6, interferon- γ (INF- γ), TNF- α , and IL-10 levels in mice.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult male Swiss mice (28 \pm 3 g; n = 168), housed ten to a cage, and maintained under controlled light and environment (12-h light/dark cycle, lights on at 7:00, 22 \pm 1 °C, 55% relative humidity) with free access to food (Guabi, Santa Maria, Brazil) and water were used. All animals were obtained from the Animal House of the Federal University of Santa Maria. Behavioral tests were conducted during the light phase of the cycle (between 10:00 a.m. and 14:00 p.m.). All experiments reported in this study were conducted in accordance with the policies of the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications no. 80-23), revised in 1996, and with the Institutional and National regulations for animal research (#024/2014). All efforts were made to reduce the number of animals used to a minimum, as well as to minimize their suffering.

2.2. Reagents

The following drugs were used in the present study. PTZ (Sigma, USA), nimesulide (Nisulid©, Aché), celecoxib (Celebra©, Pfizer) or etoricoxib (Arcoxia©, MSD). Commercial ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) kits for cytokines assays were purchased from

eBIOSCIENCE (San Diego, USA). PTZ was dissolved in 0.9% NaCl and administered intraperitoneally (i.p.). Nimesulide, celecoxib and etoricoxib were suspended in 0.1% carboxymethylcellulose (CMC) plus 5% Tween 80 and administered by oral gavage (volume: 10 ml/kg).

2.3. Experimental protocol: effect of nimesulide, celecoxib or etoricoxib on PTZ-induced seizures

Since the three COX-2 inhibitors permeate the blood-brain barrier (Dembo et al., 2005; Ferrario and Bianchi, 2003; Renner et al., 2010) and their IC₅₀s are similar (around 1 μ M) (Shi and Klotz, 2008), the effect of nimesulide, celecoxib or etoricoxib on PTZ-induced seizures was investigated by oral administering each drug (0.2, 2 or 20 mg/kg in 0.1% CMC in 5% Tween 80), or vehicle (0.1% CMC in 5% Tween 80, 10 ml/kg) 60 min before PTZ (50 mg/kg, i.p.). After PTZ injection animals were observed for the appearance of behavioral seizures, as described below. PTZ has been widely used as a model of acute seizure and drug doses were chosen based on previous studies (Dhir et al., 2006; Jayaraman et al., 2010; Oliveira et al., 2008b; Salvadori et al., 2012).

2.4. Seizure evaluation

After PTZ injection the animals were followed up (and video monitored) for 20 min and the latency to myoclonic jerks and generalized tonic-clonic seizures were recorded, according to Ferraro et al. (1999). The severity of PTZ-induced seizures was scored by a modified Racine scale (Luttjohann et al., 2009), as follows: (1) sudden behavioral arrest and/or motionless staring; (2) facial jerking with muzzle and eye; (3) neck jerks; (4) clonic seizure in a sitting position; (5) convulsion including clonic and/or tonic-clonic seizure while lying on the belly and/or pure tonic seizure; (6) convulsion including clonic and/or tonic-clonic seizure while lying on the side and/or wild jumping. We have considered the current experimental model as a model of acute individual seizure (but not a model of *status epilepticus*) because the Commission on Classification and Terminology and the Commission on Epidemiology of the International League Against Epilepsy (ILAE) defined *status epilepticus* (SE) as "... a condition resulting either from the failure of the mechanisms responsible for seizure termination or from the initiation of mechanisms, which lead to abnormally, prolonged seizures (after time point t1). It is a condition, which can have long-term consequences (after time point t2), including neuronal death, neuronal injury, and alteration of neuronal networks, depending on the type and duration of seizures. This definition is conceptual, with two operational dimensions: the first is the length of the seizure and the time point (t1) beyond which the seizure should be regarded as "continuous seizure activity." The second time point (t2) is the time of ongoing seizure activity after which there is a risk of long-term consequences. In the case of convulsive (tonic-clonic) SE, both time points (t1 at 5 min and t2 at 30 min) are based on animal experiments and clinical research" (Trinka et al., 2015). Since our animals did not achieve 5 min of continuous seizure activity, it is not possible to classify their seizures as "*status epilepticus*".

2.5. Cytokine assay

Animals were treated with vehicle (0.1% CMC in 5% Tween 80, p.o., 10 ml/kg) or nimesulide (20 mg/kg) or celecoxib (20 mg/kg) or etoricoxib (20 mg/kg) by oral gavage and, 60 min thereafter were injected with PTZ (50 mg/kg, i.p.) or 0.9% NaCl (10 ml/kg, i.p.). Animals were killed by decapitation 20 min after PTZ (or 0.9% NaCl) injection and the hippocampi and cerebral cortex were dissected and homogenized in 10 mM PBS containing 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 0.5% bovine serum albumin, pH 7.4. Samples were centrifuged at 25,000g for 10 min and the supernatant was used to measure IL-1 β , IL-6, TNF- α ,

INF- γ and IL-10 levels. Cytokine quantification was carried out using a commercial ELISA kit (eBIOSCIENCE, San Diego, USA, IL-1 β cat. BMS6002INST; IL-6 cat. BMS603HS; TNF- α cat. BMS6072INST; INF- γ cat. BMS606INST; IL-10 cat. BMS614INST), according to manufacturer's instructions. The results were expressed as picogram of cytokine per milligram of protein. Protein content was measured by the bicinchoninic acid method (Pierce, Rockford, IL).

2.6. Statistical analyses

Behavioral data were analyzed by Kruskal–Wallis test followed by nonparametric Dunn's multiple comparison test. These data are presented as median (n = 8–12) and interquartile range. Cytokine levels were analyzed by three-way ANOVA: pretreatment (vehicle or COX-2 inhibitor) by treatment (saline or PTZ) by cerebral structure (hippocampus or cerebral cortex, considered as within-subject factor) followed by Bonferroni *post hoc* test and are expressed as mean (n = 3–5) + S.E.M. A probability of $P < 0.05$ was considered significant. The number of animals in each group is small because of the restrictions imposed by the ethics and animal care committee and animal use guidelines, which includes the use of factorial designs (Festing and Altman, 2002) and other measures aiming rational use of animals. We have used the strategy of sequential sampling, in which an experiment may be interrupted if a significant effect is found in a planned statistical analysis of partial data (before the estimated n by power analysis is achieved) because we did not have information about the variability of the dependent variables (Chamove, 1996). We have estimated a n=8 per group using the G Power software for these experiments. As far as we found statistically significant effects using the first batch of animals (3–5 per group – the experiment was planned to occur using two batches of animals), the experiment was interrupted.

3. Results

3.1. Effect of nimesulide, celecoxib or etoricoxib on PTZ-induced seizures

Statistical analysis revealed that nimesulide significantly increased the latency to PTZ-induced myoclonic jerks [H(3) = 11.63, $P < 0.05$, Fig. 1A], latency to generalized tonic-clonic seizures [H(3) = 9.44, $P < 0.05$, Fig. 1B] and decreased Racine scale scores [H(3) = 10.66, $P = 0.014$, Fig. 1C]. Representative videos showing a control (S1) and a nimesulide-treated (S2) animal are shown in the supplementary data. On the other hand, celecoxib and etoricoxib did not alter PTZ-induced seizures and Racine scale scores (Figs. 2 and 3, respectively). Two

animals died in vehicle-PTZ groups (2/30), one animal in 0.2 mg/Kg celecoxib-PTZ group (1/12) and one animal in 2 mg/Kg etoricoxib-PTZ group (1/10) due to PTZ-induced seizures. These animals were not used for cytokine assays.

Supplementary material related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.013>.

3.2. Effect of nimesulide on cytokine (IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α and IL-10) levels

Statistical analysis of IL-1 β levels [three-way ANOVA: pretreatment (vehicle or nimesulide) by treatment (saline or PTZ) by cerebral structure (hippocampus or cerebral cortex)] revealed a significant treatment (saline or PTZ) by cerebral structure interaction [F(1,11) = 20.63, $P < 0.001$]. *Post hoc* analysis (Bonferroni's test) showed that PTZ consistently increased IL-1 β levels in both cerebral structures (Fig. 4A). Statistical analysis of IL-6 levels revealed significant pretreatment (vehicle or nimesulide) by structure (hippocampus or cerebral cortex) and treatment (saline or PTZ) by structure (hippocampus or cerebral cortex) interactions: [F(1,11) = 15.82, $P < 0.002$ and F(1,11) = 23.58, $P < 0.001$, respectively]. *Post hoc* analysis revealed that PTZ consistently increased IL-6 levels in both cerebral structures. *Post hoc* analysis (individual Bonferroni tests within each cerebral structure) also showed that nimesulide decreased IL-6 levels in the cerebral cortex of animals that received PTZ (Fig. 4B). Statistical analysis of IFN- γ levels revealed significant pretreatment (vehicle or nimesulide) by structure (hippocampus or cerebral cortex) and treatment (saline or PTZ) by structure (hippocampus or cerebral cortex) interactions: [F(1,11) = 12.61, $P < 0.005$ and F(1,11) = 7.68, $P < 0.018$, respectively]. The *post-hoc* analysis revealed PTZ consistently increased IFN- γ levels in both cerebral structures. *Post hoc* analysis (individual Bonferroni tests within each cerebral structure) also revealed that nimesulide decreased IFN- γ levels in the cerebral cortex, regardless the animals received saline or PTZ (Fig. 4C). The statistical analysis of TNF- α levels revealed significant pretreatment (vehicle or nimesulide) by structure (hippocampus or cerebral cortex) and treatment (saline or PTZ) by structure (hippocampus or cerebral cortex) interactions: [F(1,11) = 6.50, $P < 0.027$ and F(1,11) = 14.15, $P < 0.003$, respectively]. The *post-hoc* analysis revealed PTZ consistently increased TNF- α levels in both cerebral structures (Fig. 4D) and that nimesulide decreased TNF- α levels in the cerebral cortex, regardless the animals received saline or PTZ. Statistical analysis of IL-10 levels revealed a significant pretreatment (vehicle or nimesulide) by treatment (saline or PTZ) interaction [F(1,11) = 18.31, $P < 0.001$]. *Post hoc* analysis (Bonferroni's test) showed that PTZ consistently increased IL-

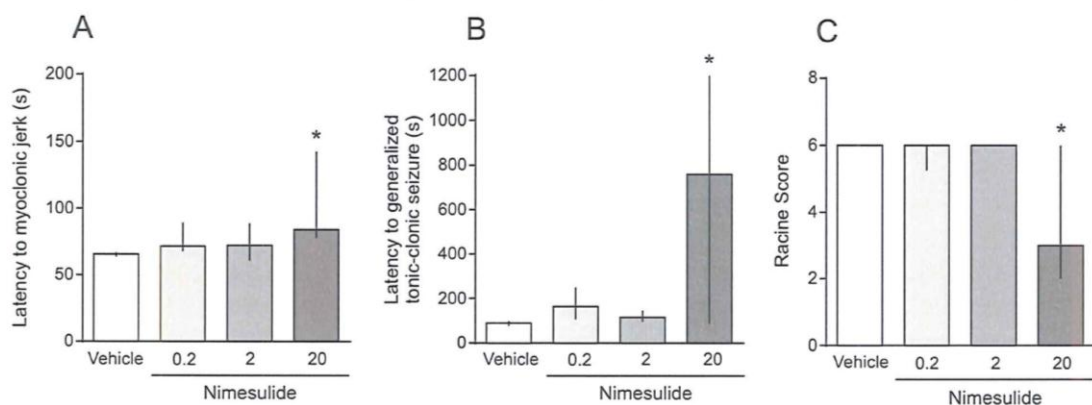


Fig. 1. Effect of nimesulide (0.2, 2 or 20 mg/kg, p.o.) on PTZ-induced seizures. Nimesulide increased the latency to PTZ (50 mg/kg, i.p.)-induced myoclonic jerks (A); latency to generalized tonic-clonic seizures (B); and decreased Racine score (C). * $P < 0.05$ compared with vehicle-PTZ group (Kruskal–Wallis followed by Dunn's test). Data are presented as median \pm interquartile range for n = 8 in each group.

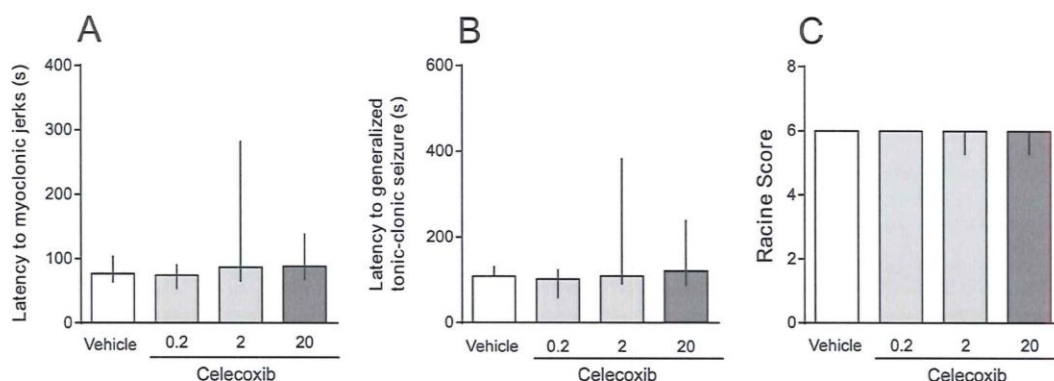


Fig. 2. Lack of effect of celecoxib (0.2, 2 and 20 mg/kg, p.o.) on PTZ-induced seizures. Celecoxib did not alter PTZ (50 mg/kg, i.p.)-induced myoclonic jerks (A); latency to generalized tonic-clonic seizures (B); and Racine score (C). Data are presented as median \pm interquartile range for $n = 12$ in each group.

10 levels in the cerebral cortex and hippocampus, and that nimesulide significantly potentiated such an increase in both structures (hippocampus or cerebral cortex) (Fig. 4E).

3.3. Effect of celecoxib on cytokine (IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α and IL-10) levels

Statistical analysis [three-way ANOVA: pretreatment (vehicle or celecoxib) by treatment (saline or PTZ) by cerebral structure (hippocampus or cerebral cortex)] of IL-1 β levels revealed significant effects of pretreatment [$F(1,10) = 27.94$, $P < 0.001$], treatment [$F(1,10) = 222.98$, $P < 0.001$] and cerebral structure [$F(1,10) = 47.88$, $P < 0.001$]. *Post hoc* analysis (Bonferroni's test) showed that while celecoxib decreased in cerebral cortex, PTZ increased IL-1 β levels, regardless of the cerebral structure analyzed. Moreover, IL-1 β levels were higher in the cerebral cortex than in the hippocampus (Fig. 5A). The same profile was found for IL-6 [significant effects of pretreatment: $F(1,10) = 33.98$, $P < 0.001$; treatment: $F(1,10) = 355.44$, $P < 0.001$; and cerebral structure $F(1,10) = 35.00$, $P < 0.001$] (Fig. 5B) and for INF- γ [significant effects of pretreatment: $F(1,10) = 30.47$, $P < 0.001$; treatment: $F(1,10) = 347.15$, $P < 0.001$; and cerebral structure $F(1,10) = 82.47$, $P < 0.001$] (Fig. 5C). Interestingly, statistical analysis of TNF- α levels revealed significant pretreatment (vehicle or celecoxib) by structure (hippocampus or cerebral cortex) and treatment (saline or PTZ) by structure (hippocampus or cerebral cortex) interactions: [$F(1,10) = 8.74$, $P < 0.05$ and $F(1,10) = 42.16$, $P < 0.001$, respectively]. *Post hoc* analysis (individual Bonferroni tests within

each cerebral structure) revealed that celecoxib decreased TNF- α levels in the cerebral cortex, regardless the animals received saline or PTZ, and that celecoxib reduced hippocampal TNF- α levels only in those animals injected with PTZ. The *post-hoc* analysis also revealed that PTZ-induced increase of TNF- α levels was more prominent in the cerebral cortex than in the hippocampus (Fig. 5D). Statistical analysis of IL-10 also revealed significant pretreatment (vehicle or celecoxib) by structure (hippocampus or cerebral cortex) and treatment (saline or PTZ) by structure (hippocampus or cerebral cortex) interactions: [$F(1,10) = 12.99$, $P < 0.05$ and $F(1,10) = 49.85$, $P < 0.05$, respectively]. *Post hoc* analysis (individual Bonferroni tests within each cerebral structure) revealed that celecoxib increased IL-10 levels only in the cerebral cortex of animals injected with PTZ (Fig. 5E).

3.4. Effect of etoricoxib on cytokine (IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α and IL-10) levels

Statistical analysis of IL-1 β levels [three-way ANOVA: pretreatment (vehicle or etoricoxib) by treatment (saline or PTZ) by cerebral structure (hippocampus or cerebral cortex)] revealed a significant pretreatment (vehicle or etoricoxib) by treatment (saline or PTZ) interaction [$F(1,10) = 5.32$, $P < 0.05$]. *Post hoc* analysis (Bonferroni's test) showed that etoricoxib decreased IL-1 β levels in the cerebral cortex of the animals injected with saline (but not in those injected with PTZ). A similar tendency towards an effect of etoricoxib on the levels IL-1 β in the hippocampus of the animals injected with saline was also found, but did not achieve statistical

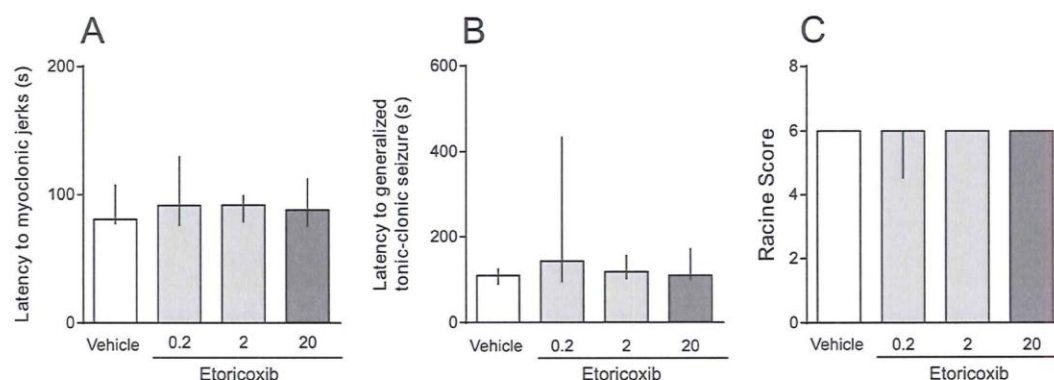


Fig. 3. Lack of effect of etoricoxib (0.2, 2 and 20 mg/kg, p.o.) on PTZ-induced seizures. Etoricoxib did not alter the latency to PTZ (50 mg/kg, i.p.)-induced myoclonic jerks (A); latency to generalized tonic-clonic seizures (B); and Racine score (C). Data are presented as median \pm interquartile range for $n = 10$ in each group.

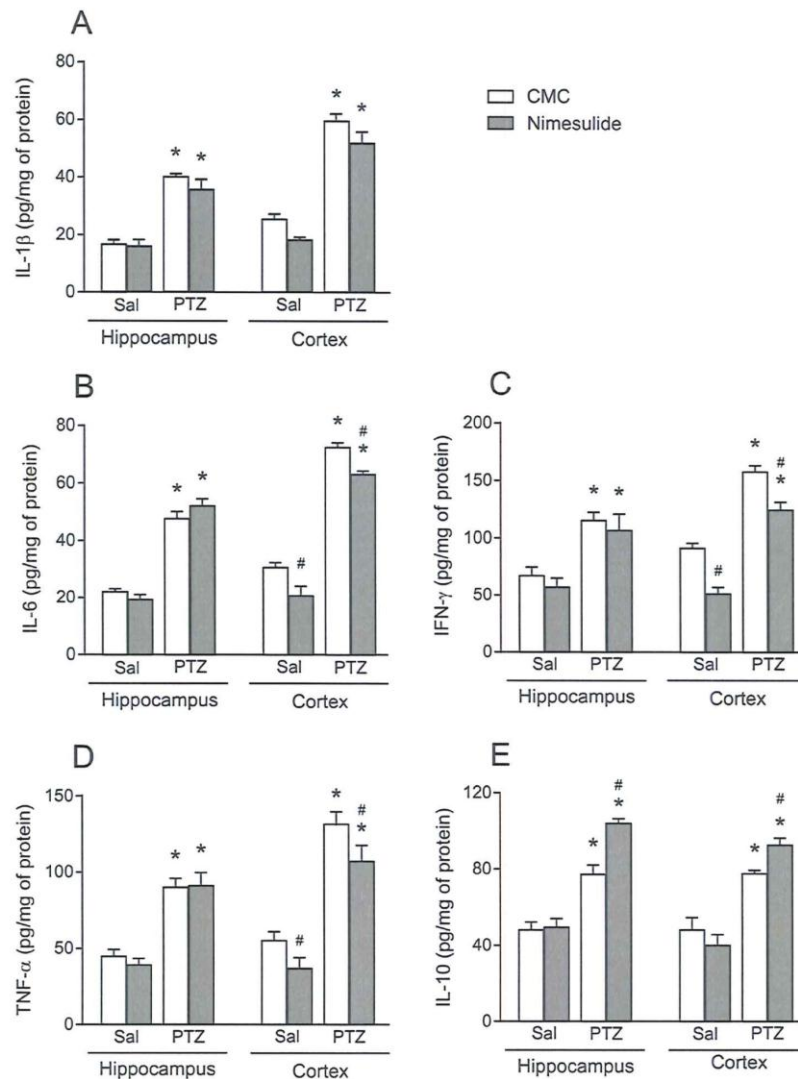


Fig. 4. Effect of nimesulide (20 mg/kg, p.o.) on IL-1 β (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), TNF- α (D) and IL-10 (E) levels in the cerebral cortex and hippocampus after PTZ administration (50 mg/kg, i.p.). Data are presented as mean \pm S.E.M. for $n = 3-5$ in each group. * $P < 0.05$ compared with respective saline group (Bonferroni's test). # $P < 0.05$ compared with respective CMC control group (Bonferroni's test).

significance. In addition, significant effects of treatment (saline or PTZ) [$F(1,10) = 81.18$, $P < 0.001$] and cerebral structure [$F(1,10) = 5.23$, $P < 0.05$] were revealed in the analysis because PTZ consistently increased IL-1 β levels regardless the pretreatment and because IL-1 β levels were higher in the cerebral cortex than in the hippocampus (Fig. 6A). Statistical analysis of IL-6 data revealed significant effects of treatment: [$F(1,10) = 120.56$, $P < 0.001$]. *Post hoc* analysis (Bonferroni's test) showed that PTZ consistently increased IL-6 levels regardless of the cerebral structure analyzed. In addition, analogously to the results with IL-1 β , etoricoxib decreased IL-6 levels in the cerebral cortex of animals injected with saline (Fig. 6B). Statistical analysis of INF- γ levels revealed significant effects of pretreatment: [$F(1,10) = 12.08$, $P < 0.006$] and treatment: [$F(1,10) = 192.79$, $P < 0.001$]. *Post hoc* analysis (Bonferroni's test) showed that PTZ consistently increased INF- γ

levels in both cerebral structures and that etoricoxib decreased INF- γ levels in the cerebral cortex per se (Fig. 6C). Statistical analysis of TNF- α levels revealed significant effects of pretreatment: [$F(1,10) = 10.50$, $P < 0.009$] and treatment: [$F(1,10) = 158.28$, $P < 0.001$]. *Post hoc* analysis (Bonferroni's test) showed that PTZ consistently increased TNF- α levels in both cerebral structures and that etoricoxib decreased TNF- α levels in the cerebral cortex of animals that received saline (Fig. 6D). Statistical analysis of IL-10 levels revealed significant pretreatment (vehicle or etoricoxib) and treatment (saline or PTZ): [$F(1,10) = 10.82$, $P < 0.008$ and $F(1,10) = 262.13$, $P < 0.001$, respectively]. *Post hoc* analysis (individual Bonferroni tests within each cerebral structure) revealed that PTZ consistently increased IL-10 levels in both cerebral structures. Only a tendency towards a significant effect on etoricoxib on IL-10 levels in the cerebral cortex of saline-

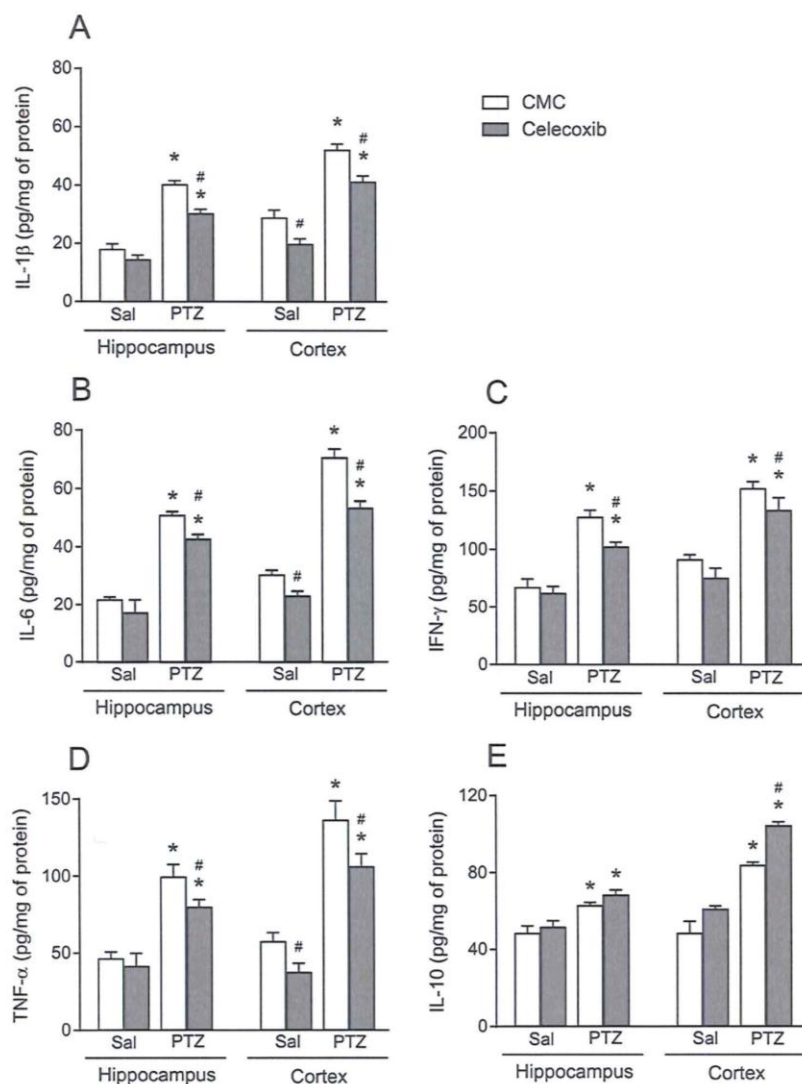


Fig. 5. Effect of celecoxib (20 mg/kg, p.o.) on IL-1 β (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), TNF- α (D) and IL-10 (E) levels in the cerebral cortex and hippocampus after PTZ administration (50 mg/kg, i.p.). Data are presented as mean \pm S.E.M. for $n = 3-4$ in each group. * $P < 0.05$ compared with respective saline group (Bonferroni's test). # $P < 0.05$ compared with respective CMC control group (Bonferroni's test).

injected animals was found ($P = 0.07$, Bonferroni's test) (Fig. 6E).

4. Discussion

The current study showed that while nimesulide attenuated, celecoxib and etoricoxib did not alter PTZ-induced seizures in mice. Other remarkable finding of this study is the prominent PTZ-induced increase of IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α and IL-10 levels in both cerebral cortex and hippocampus. While celecoxib and nimesulide attenuated PTZ-induced increase of proinflammatory cytokines, etoricoxib did not. Nimesulide was the only COX-2 inhibitor that increased IL-10 levels in the cerebral cortex and in the hippocampus, and such an increase depended on PTZ administration.

Over the past few years an increasing body of clinical and experimental evidence has strongly supported the hypothesis that

inflammation may constitute a common and key mechanism in the pathophysiology of seizures (Vezzani and Granata, 2005). In fact, it has been shown that several convulsant agents or procedures, regardless of their nature, increase cytokine levels. Accordingly, kainic acid, pilocarpine, PTZ, bicuculline, 4-aminopyridine and electric and auditory stimulation increase the levels of cytokines, measured as mRNA or protein, in different cerebral structures (Abdallah, 2010; Al-Shorbagy et al., 2013; Arisi et al., 2015; Balosso et al., 2008; Chiu et al., 2015; De Simoni et al., 2000; de Souza Bernardino et al., 2015; Gomez et al., 2014; Lima et al., 2015; Minami et al., 1991, 1990; Rodriguez et al., 2015; Vezzani et al., 1999), although a decrease in IL-1 β and IL-10 levels was observed 4 h after scorpion venom-induced seizures. Table 1 summarizes the main findings of these studies. A comprehensive analysis of the data contained in Table 1 suggests that cytokine levels increase depends on the method used to induce seizures (including

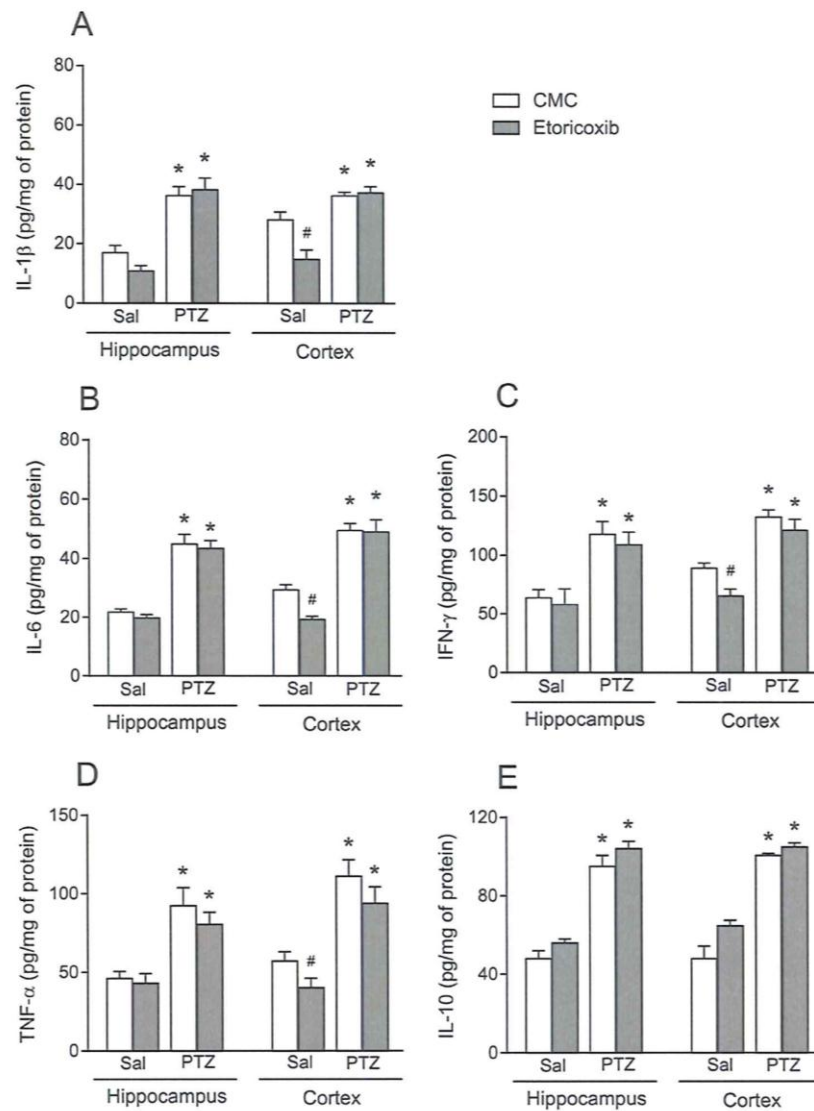


Fig. 6. Effect of etoricoxib (20 mg/kg, p.o.) on IL-1 β (A), IL-6 (B), IFN- γ (C), TNF- α (D) and IL-10 (E) levels in the cerebral cortex and hippocampus after PTZ administration (50 mg/kg, i.p.). Data are presented as mean \pm S.E.M. for n = 3–4 in each group. * P < 0.05 compared with respective saline group (Bonferroni's test). # P < 0.05 compared with respective CMC control group (Bonferroni's test).

nature of the convulsant agent and route of administration). A second interesting finding is that the more recent studies have shown an early increase in cerebral tissue levels of cytokines after seizures, as early as 20–30 min after seizure induction (Al-Shorbagy et al., 2013; Gomez et al., 2014). This is in line with the view that post-transcriptional events, such as mRNA processing and translation, may regulate cytokine levels in the early steps of inflammation (Mino and Takeuchi, 2013). Therefore, our findings are in full agreement with the studies which have reported an early increase of brain cytokine levels after PTZ-induced seizures (Al-Shorbagy et al., 2013; Gomez et al., 2014) and with the studies that have indicated a role for cytokines in seizure induction in animals that genetically under- or overexpress cytokines (Campbell et al., 1993; Claycomb et al., 2012; Vezzani et al., 1999).

Etoricoxib did not alter PTZ-induced seizures or cytokine levels in both cerebral cortex and hippocampus of mice in our study. There are only a few studies on the effect of etoricoxib on experimental models of seizures (Citraro et al., 2015; Jayaraman et al., 2010; Katyal et al., 2015), and both anticonvulsant and proconvulsant effects have been reported, depending on the dose used. Moreover, etoricoxib potentiates the anticonvulsant effect of diazepam but decreases the anticonvulsant effect of phenytoin (Jayaraman et al., 2010). Since these studies have used different administration protocols, animal species and convulsant agents, it is possible that these methodological differences may have accounted for the these discrepant outcomes, including the currently lack of effect of etoricoxib on PTZ-induced seizures in our assay.

Celecoxib decreased the levels of all proinflammatory cytokines: IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α . Although a proconvulsant role has been

Table 1
Cytokine levels at different time-points, brain regions and seizure models.

Convulsant agent	Cytokine	Structure	Cell	Time	Fold increase compared to control	Animal	Ref.
Kainic acid (0.19 mmol, i.h.)	IL1 β	Hippocampus	microglia	3, 24 h	qualitative histology, 16-fold	Male Sprague Dawley rats	[1]
	IL1 β mRNA	Cortex, thalamus, hypothalamus, hippocampus	–	2.5 h	1.1 fold, 0.8 fold, 0.9 fold, 0.2 fold	Male Sprague Dawley rats	[2]
Kainic acid (10 mg/kg, i.p.)	IL1 β mRNA	Hippocampus	–	1 h	0.1 fold		
	IL1 β mRNA	Cortex, thalamus, hypothalamus	–	1.5 h	1.1 fold, 0.2 fold, 0.2 fold		
Kainic acid (7 ng/0.5 μ L, i.c.v.)	IL1 β mRNA	Hypothalamus	–	3.5 h	1.4 fold	Male C57BL/6 mice	[3]
	IL1 β	Hippocampus	astrocytes	3 h	increased (qualitative histology);		
Kainic acid (15 mg/Kg, i.p.)	IL-1 β mRNA,	Hippocampus	–	3 h	15 fold, 2.5 fold, 2.8 fold	Adult male Sprague Dawley rats	[4]
	IL-6 mRNA,	Hippocampus	–	24 h	12.5 fold, 7.5 fold, 3 fold	Dawley rats	
Kainic acid (12 mg/Kg, i.p.)	TNF- α mRNA	Cerebral cortex, thalamus, hypothalamus	–	72 h	4 fold, 2 fold, 2 fold	Adult male Sprague Dawley rats	[5]
	IL-1 β mRNA	Cerebral cortex, thalamus, hypothalamus, midbrain and pons-medulla	–	2 h	increased (semi-quantitative RT-PCR analyses); levels already tended to decrease 4 h after the injection (semi-quantitative RT-PCR analyses);		
Pilocarpine (320 mg/Kg, i.p.)	TNF- α mRNA	Hippocampus, cerebral cortex, striatum, thalamus and hypothalamus	–	2 h, 4 h	increased (semi-quantitative RT-PCR analyses);	Male Sprague Dawley rats	[6]
	IL-1 β	Neocortex, piriform cortex, hippocampus	–	2 h	2 fold, 2 fold, 2 fold		
Pilocarpine (340 mg/kg, i.p.)	IL-1 β	Neocortex, hippocampus	–	6 h	2 fold, 2 fold		
	IL-1 β	Piriform cortex and neocortex.	–	24 h	2-fold, -2.5-fold		
Pilocarpine (150 mg/Kg, i.p.)	IL-1 β	Piriform cortex, hippocampus, neocortex, cerebellum	–	5 days	–		
	TNF- α	Piriform cortex, hippocampus	–	24 h	0.5 fold, 0.5 fold		
Pilocarpine (25, 50, 100 and 200 μ g/ μ L, i.h.)	TNF- α	Hippocampus	–	5 days	2 fold	Male Wistar rats	[7]
	IL-1 β mRNA, TNF- α mRNA, PGE $_2$, TNF- α , IL-10	Hippocampus	–	30 min	\pm 1.6 fold, \pm 3.4 fold	Adult male Wistar rats	[8]
Pilocarpine (25, 50, 100 and 200 μ g/ μ L, i.h.)	IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, INF- γ , TNF- α	Hippocampus	–	30 min	2.4 fold, 1.5 fold, 0.2 fold, ELISA	Male C57BL/6 mice	[9]
	IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, INF- γ , TNF- α	Prefrontal cortex tissues	–	24 h post-SE	IL-2, IL-17A, INF- γ , TNF- α not altered, and IL-6 increased \pm 5 fold, IL-10 increased (\pm 2.1) fold		
Limbic SE was induced in rats by unilateral 60 min electrical stimulation	IL-1 β mRNA, IL-6 mRNA, TNF- α mRNA	CA3 region hippocampus after the induction SE	–	24 h post-SE	not altered in prefrontal cortex	Male Sprague Dawley rats	[10]
				2 h	3.0 fold, 2.6 fold, \pm 1.3 fold		
				6 h	4.5 fold, 4.1 fold, 2.6 fold		
				18 h	\pm 4.5 fold, \pm 5.5 fold, \pm 1.7 fold		
				24 h	\pm 4.8 fold, \pm 4.5 fold, \pm 1.7 fold		

(continued on next page)

Table 1 (continued)

Convulsant agent	Cytokine	Structure	Cell	Time	Fold increase compared to control	Animal	Ref.
Auditory stimulus (120 dB)	IL-1 β IL-6 TNF- α	Cortex Striatum, cortex Cortex, inferior colliculus, striatum	—	4 h 4 h 4 h	0.671 fold 0.2 fold, 0.46 fold 1.6 fold, 0.3 fold, 0.3 fold	Male audiogenic Wistar rats	[11]
TsTX-1 (0.125 mg/ml/ animal)	INF- γ IL-1 β , IL-10 IL-1 β mRNA	Hippocampus, brain Brain	—	4 h 4 h	\pm 2.4 fold, \pm 2 fold \pm 15.5 fold, \pm 2.3 fold	Male Wistar rats	[12]
4-aminopyridine (2.5 mg/ kg, i.p.)	IL-1 β mRNA TNF- α mRNA	Hippocampus	—	30 min	\pm 1.4 fold, \pm 2.3 fold	Male Wistar rats	[7]
Bicuculline (0.77 mmol, i.h.)	IL-1 β	Hippocampus	microglia	24 h	1.6 N.S.	Male Sprague Dawley rats	[1]
Pentylenetetrazol (50 mg/ kg, i.p.)	IL-1 β mRNA IL-1 β	Cerebral cortex, hypothalamus and hippocampus	—	3 h 30 min, 3 h	qualitative histology N.A.	Male Sprague Dawley rats	[2]
Pentylenetetrazol (50 mg/ kg, i.p.)	IL-1 β mRNA, TNF- α mRNA	Hippocampus	—	30 min	\pm 1.2 fold, \pm 2.3 fold	Male Wistar rats	[7]
Pentylenetetrazol (40 mg/ kg, i.p.) kindling	TNF- α , IL-10, PGE ₂	Cerebral cortex	—	24 h	0.7 fold, 5.7 fold, 1.2 fold	Male Swiss mice	[13]
Pentylenetetrazol (60 mg/ kg, i.p.)	TNF- α , IL-10, PGE ₂	Cerebral cortex	—	24 h	0.9 fold, 3.1 fold, 1.1 fold	Male Swiss mice	[13]

N.A.: data not available; N.S.: not significant; SE: status epilepticus. 1. Vezzani et al. (1999); 2. Minami et al. (1990); 3. Balosso et al. (2008); 4. Chin et al. (2015); 5. Minami et al. (1991); 6. Aristi et al. (2015); 7. Gomez et al. (2014); 8. Al-Shorbagy et al. (2013); 9. Lima et al. (2015); 10. De Simoni et al. (2000); 11. de Souza Bernardino et al. (2015); 12. Rodriguez et al. (2015); 13. Abdallah (2010).

attributed to these cytokines (Abdallah, 2010; Arisi et al., 2015; De Simoni et al., 2000; Rodriguez et al., 2015), it seems that the celecoxib-induced decrease of their absolute cortical and hippocampal levels was not enough to decrease seizure susceptibility in mice. In fact, since celecoxib decreased basal levels of these cytokines, the PTZ-induced increase of their levels (in terms of respective control-fold values) was not altered by celecoxib. The same applies to the anti-inflammatory cytokine IL-10. Therefore, one might argue that the effects of celecoxib on proinflammatory cytokines and on IL-10 were not specific for PTZ-induced effects. Similarly to celecoxib, nimesulide decreased the absolute levels of proinflammatory cytokines, only in the cerebral cortex. On the other hand, nimesulide selectively increased IL-10 levels in the cerebral cortex and hippocampus of those animals that received PTZ, constituting the only variable that was differentially altered by nimesulide in PTZ-treated animals and that, consequently, might be associated with an increased latency to develop seizures.

IL-10 is a well-known anti-inflammatory cytokine that diminishes immune responses under different inflammatory scenarios (Glocker et al., 2011). Its anti-inflammatory properties have been attributed to the inhibition of antigen-presenting cell function and suppression of the production of proinflammatory cytokines and chemokines (O'Garra et al., 2008). Accordingly, IL-10 inhibits the production of the proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, and TNF- α (Leon et al., 1998) and promotes inflammation resolution within the periphery and the CNS (Saraiva and O'Garra, 2010) by deactivating macrophages which, in turn, decrease T cells cytokine production (Youn et al., 2013). Accumulating evidence also supports an anticonvulsant role for IL-10, since it protects against the development of epileptiform activity evoked by transient episodes of hypoxia in rat hippocampal slices (Levin and Godukhin, 2007) and suppresses the development of focal ictal discharges induced by kindling (Godukhin et al., 2009). In addition, GFAP-IL10Tg mice, which overexpress astrocyte-derived IL-10, present a lower excitability of the CA3-CA1 synapses (Almolada et al., 2015). The finding that nimesulide increases IL-10 production agrees with the findings that COX-2 derived PGE₂ inhibits LPS-induced IL-10 production through EP2 (prostaglandin E type 2 receptor)-mediated activation in microglia. Furthermore, interruption of COX-2 function by NS-398 and Dup-697 and deletion of the COX-2 gene enhance LPS-induced IL-10 production by microglia (Chu et al., 2015). Therefore, it is possible that the currently described anticonvulsant effect of nimesulide is due to the prominent rapid increase in the hippocampal and cortical levels of IL-10. In this context, it is important to point out that IL-10 mRNA stability is a key component in the regulation of the levels of this cytokine. In fact, multiple copies of potential mRNA destabilizing motifs are found in the 3' untranslated region (UTR) of IL-10 mRNA. Several stimuli, such as p38, STAT-3, and adenosine receptor activation induce IL-10 mRNA stabilization and increase IL-10 production in a few minutes (Tudor et al., 2009). In addition, there is also evidence that microRNAs can rapidly upregulate both mRNA and protein expression of IL-10 (Ma et al., 2010). We acknowledge that our experimental design does not allow concluding whether the decrease in cytokine levels is a cause or a consequence of seizures, particularly for proinflammatory (and proconvulsant) cytokines. However, this does not seem to be the case for IL-10. Since PTZ/nimesulide-treated animals presented less seizures and increased levels of IL-10 compared with PTZ/saline-treated animals, the increased levels of IL-10 cannot be explained by increased seizure activity. Even considering this point, we acknowledge that our evidence of the involvement of IL-10 is circumstantial and that more experiments are necessary to define whether IL-10 itself or other metabolite/factor/target(s) is(are) mediating the currently described anticonvulsant effect of nimesulide. In fact, a number of studies suggest that nimesulide has effects other than the well-described inhibition of PGs synthesis in various cell types (Di Battista et al., 1999; Goncalves et al., 2010; Niranjana et al., 2012; Pelletier and Martel-Pelletier, 1993; Pelletier et al., 1997). Pelletier et al. (1997), using human osteoarthritic synovial

fibroblasts in culture, showed that therapeutic concentrations of nimesulide reduce the synthesis of urokinase and IL-6, increase the production of plasminogen activator inhibitor-1 and suppress matrix metalloproteinase synthesis by cartilage explants in vitro (Pelletier and Martel-Pelletier, 1993). Nimesulide prevents the LPS-induced elevation of TNF- α and PGE₂ in brain glial cultures (Shemi et al., 2000), downregulates 1-methyl-4-phenyl 1,2,3,6 tetrahydropyridine-induced TNF- α and IL-1 β expression in rat C6 astrocytoma cells (Niranjan et al., 2012) and suppresses neurogenesis in the adult mouse brain, possibly by microglia-mediated mechanisms (Goncalves et al., 2010). Moreover, nimesulide modulates glucocorticoid receptor (GR) activity possibly by activating downstream mitogen-activated protein kinase and subsequent phosphorylation and activation of the GR (Di Battista et al., 1999). Therefore, we cannot rule out the involvement of these mechanisms in the currently described anti-inflammatory and anticonvulsant effects of nimesulide.

Previous studies have proposed, based on the evaluation of prototype COX-2 inhibitors, that this pharmacological class might inhibit (Dhir et al., 2006; Oliveira et al., 2008b), facilitate (Claycomb et al., 2012) or have no effect on seizures (Claycomb et al., 2011). Briefly, as carefully discussed in recent reviews, the effect of COX-2 inhibitors on seizures may vary depending on the convulsant stimulus, the drug dose, the timing and route of administration, and the species (mouse or rat) used (Dey et al., 2016). In line with this view, while we have previously reported that celecoxib biphasically decreases PTZ-induced seizures in rats (Oliveira et al., 2008b), such an anticonvulsant effect was not confirmed in a different species (*Mus musculus* – of the albino Swiss strain, which was used in the current study).

At last, while it is fairly known that nimesulide, celecoxib and etoricoxib cross the blood-brain barrier (Dembo et al., 2005; Ferrario and Bianchi, 2003; Renner et al., 2010), we cannot rule out that pharmacokinetic differences among these drugs may have accounted for the currently described differential effects of these drugs on seizures and cytokine levels, even considering that three doses of the different COX-2 inhibitors were used in the current study to overcome this limitation.

5. Conclusions

PTZ induces seizures and early increase of cytokine levels in the cerebral cortex and hippocampus. Nimesulide decreases PTZ-induced seizures and proinflammatory cytokine increase. Moreover, it increases cortical and hippocampal levels of IL-10 in PTZ-injected animals, constituting circumstantial evidence that IL-10 increase may be involved in the anticonvulsant effect of nimesulide. Although the COX-2 inhibitors etoricoxib and celecoxib decrease proinflammatory cytokine levels, they do not alter PTZ-induced increase of cytokine levels or PTZ-induced seizures. Our data suggest that a pharmacological class effect of COX-2 inhibitors on seizures in mice is unlikely.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest. MMP and LMR are recipients of DOCFIX (CAPES/FAPERGS) fellowships. FRT, JRM, LHM and TD are recipients of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowships.

Authors' contributions

CFM, FRT, JRM, LHM and TD conceived and designed the experiments. FRT, JRM and LHM performed the behavioral experiments. TD performed the cytokine quantification assay. FRT, LMR, MMP and CFM analyzed the data. CFM, LMR, MMP and FRT wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

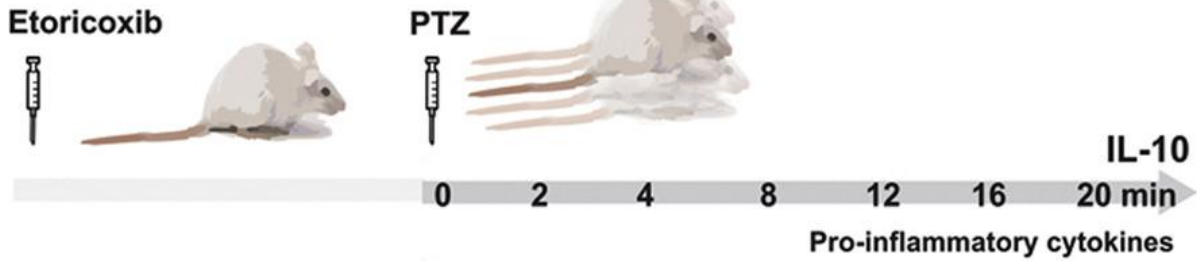
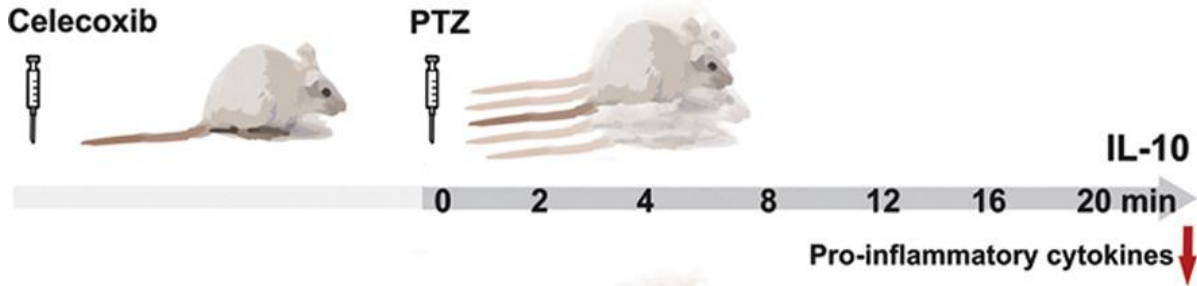
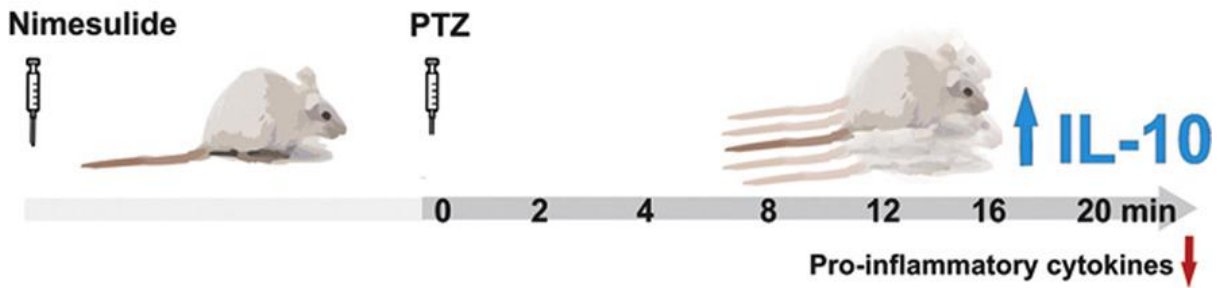
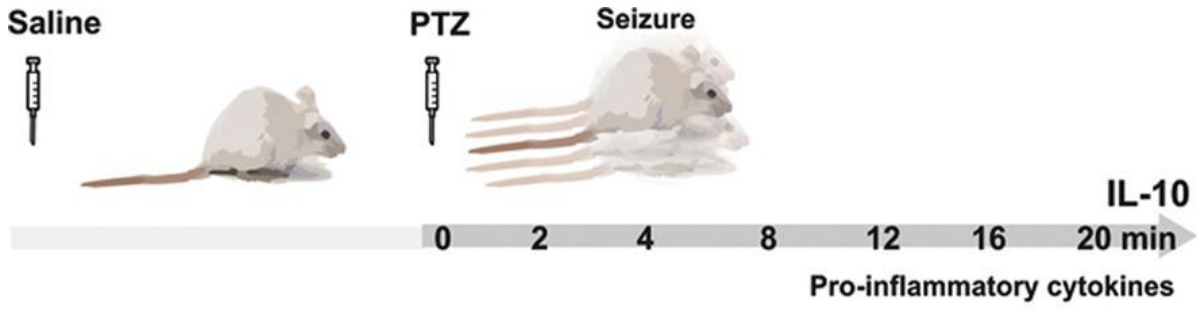
Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, CAPES and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul-FAPERGS (23422551/14-6). MMP is grateful for a postdoctoral fellowship from FAPESP (2015/19478-3). CFM is the recipient of a productivity fellowship of CNPq (307812/2014-6).

References

- Abdallah, D.M., 2010. Anticonvulsant potential of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist pioglitazone in pentylenetetrazole-induced acute seizures and kindling in mice. *Brain Res.* 1351, 246–253.
- Al-Shorbagy, M.Y., El Sayeh, B.M., Abdallah, D.M., 2013. Additional antiepileptic mechanisms of levetiracetam in lithium-pilocarpine treated rats. *PLoS One* 8, e76735.
- Almolda, B., de Labra, C., Barrera, I., Gruart, A., Delgado-García, J.M., Villacampa, N., Vilella, A., Hofer, M.J., Hidalgo, J., Campbell, I.L., González, B., Castellano, B., 2015. Alterations in microglial phenotype and hippocampal neuronal function in transgenic mice with astrocyte-targeted production of interleukin-10. *Brain Behav. Immun.* 45, 80–97.
- Arisi, G.M., Foresti, M.L., Katki, K., Shapiro, L.A., 2015. Increased CCL2, CCL3, CCL5, and IL-1 β cytokine concentration in piriform cortex, hippocampus, and neocortex after pilocarpine-induced seizures. *J. Neuroinflamm.* 12, 129.
- Balosso, S., Maroso, M., Sanchez-Alavez, M., Ravizza, T., Frasca, A., Bartfai, T., Vezzani, A., 2008. A novel non-transcriptional pathway mediates the proconvulsive effects of interleukin-1 β . *Brain* 131, 3256–3265.
- Campbell, I.L., Abraham, C.R., Masliah, E., Kemper, P., Inglis, J.D., Oldstone, M.B., Mucke, L., 1993. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 10061–10065.
- Cazareth, J., Guyon, A., Heurteaux, C., Chabry, J., Petit-Paitel, A., 2014. Molecular and cellular neuroinflammatory status of mouse brain after systemic lipopolysaccharide challenge: importance of CCR2/CCL2 signaling. *J. Neuroinflamm.* 11, 132.
- Chamove, A.S., 1996. Reducing animal numbers: sequential sampling. *AWIC News.* 7, 3–6.
- Chen, C., Bazan, N.G., 2005. Endogenous PGE₂ regulates membrane excitability and synaptic transmission in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J. Neurophysiol.* 93, 929–941.
- Chiu, K.M., Wu, C.C., Wang, M.J., Lee, M.Y., Wang, S.J., 2015. Protective effects of bupivacaine against kainic acid-induced seizure and neuronal cell death in the rat hippocampus. *Biol. Pharm. Bull.* 38, 522–530.
- Choi, S.H., Aid, S., Bosetti, F., 2009. The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. *Trends Pharmacol. Sci.* 30, 174–181.
- Chu, C.H., Chen, S.H., Wang, Q., Langenbach, R., Li, H., Zeldin, D., Chen, S.L., Wang, S., Gao, H., Lu, R.B., Hong, J.S., 2015. PGE₂ inhibits IL-10 production via EP2-mediated beta-arrestin signaling in neuroinflammatory condition. *Mol. Neurobiol.* 52, 587–600.
- Citraro, R., Leo, A., Marra, R., De Sarro, G., Russo, E., 2015. Antiepileptogenic effects of the selective COX-2 inhibitor etoricoxib, on the development of spontaneous absence seizures in WAG/Rij rats. *Brain Res. Bull.* 113, 1–7.
- Claycomb, R.J., Hewett, S.J., Hewett, J.A., 2011. Prophylactic, prandial rofecoxib treatment lacks efficacy against acute PTZ-induced seizure generation and kindling acquisition. *Epilepsia* 52, 273–283.
- Claycomb, R.J., Hewett, S.J., Hewett, J.A., 2012. Neuromodulatory role of endogenous interleukin-1 β in acute seizures: possible contribution of cyclooxygenase-2. *Neurobiol. Dis.* 45, 234–242.
- De Simoni, M.G., Perego, C., Ravizza, T., Moneta, D., Conti, M., Marchesi, F., De Luigi, A., Garattini, S., Vezzani, A., 2000. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur. J. Neurosci.* 12, 2623–2633.
- de Souza Bernardino, T.C., Teixeira, A.L., Miranda, A.S., Guidine, P.M., Rezende, G., Doretto, M.C., Castro, G.P., Drummond, L., Moraes, M.F., Tito, P.A., de Oliveira, A.C., Reis, H.J., 2015. Wistar Audiogenic Rats (WAR) exhibit altered levels of cytokines and brain-derived neurotrophic factor following audiogenic seizures. *Neurosci. Lett.* 597, 154–158.
- Dembo, G., Park, S.B., Kharasch, E.D., 2005. Central nervous system concentrations of cyclooxygenase-2 inhibitors in humans. *Anesthesiology* 102, 409–415.
- 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, 463–484.
- Dhir, A., Naidu, P.S., Kulkarni, S.K., 2006. Effect of cyclooxygenase inhibitors on pentylenetetrazol (PTZ)-induced convulsions: possible mechanism of action. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 30, 1478–1485.
- Di Battista, J.A., Zhang, M., Martel-Pelletier, J., Fernandes, J., Alaeddine, N., Pelletier, J.P., 1999. Enhancement of phosphorylation and transcriptional activity of the glucocorticoid receptor in human synovial fibroblasts by nimesulide, a preferential cyclooxygenase 2 inhibitor. *Arthritis Rheum.* 42, 157–166.
- Ferrario, P., Bianchi, M., 2003. Simultaneous determination of nimesulide and hydroxynimesulide in rat plasma, cerebrospinal fluid and brain by liquid chromatography using solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B* 785, 227–236.
- Ferraro, T.N., Golden, G.T., Smith, G.G., St Jean, P., Schork, N.J., Mullholland, N., Ballas, C., Schill, J., Buono, R.J., Berrettini, W.H., 1999. Mapping loci for pentylenetetrazol-

- induced seizure susceptibility in mice. *J. Neurosci.* 19, 6733–6739.
- Festing, M.F., Altman, D.G., 2002. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J.* 43, 244–258.
- Glocker, E.O., Kollarz, D., Klein, C., Shah, N., Grimbacher, B., 2011. IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1246, 102–107.
- Godukhin, O.V., Levin, S.G., Parnyskova, E.Y., 2009. The effects of interleukin-10 on the development of epileptiform activity in the hippocampus induced by transient hypoxia, bicuculline, and electrical kindling. *Neurosci. Behav. Physiol.* 39, 625–631.
- Gomez, C.D., Buijs, R.M., Sitges, M., 2014. The anti-seizure drugs voprocaine and carbamazepine, but not valproic acid, reduce inflammatory IL-1beta and TNF-alpha expression in rat hippocampus. *J. Neurochem.* 130, 770–779.
- Goncalves, M.B., Williams, E.J., Yip, P., Yanez-Munoz, R.J., Williams, G., Doherty, P., 2010. The COX-2 inhibitors, meloxicam and nimesulide, suppress neurogenesis in the adult mouse brain. *Br. J. Pharmacol.* 159, 1118–1125.
- Ho, Y.H., Liu, Y.T., Wu, C.W., Chao, Y.M., Chang, A.Y., Chan, J.Y., 2015. Peripheral inflammation increases seizure susceptibility via the induction of neuroinflammation and oxidative stress in the hippocampus. *J. Biomed. Sci.* 22, 46.
- Hsiao, H.Y., Mak, O.T., Yang, C.S., Liu, Y.P., Fang, K.M., Tzeng, S.F., 2007. TNF-alpha/IFN-gamma-induced iNOS expression increased by prostaglandin E2 in rat primary astrocytes via EP2-evoked cAMP/PKA and intracellular calcium signaling. *Glia* 55, 214–223.
- Jayaraman, R., Manisenthil, K.T., Anitha, T., Joshi, V.D., Palei, N.N., Gajera, K., Ladani, K., 2010. Influence of etoricoxib on anticonvulsant activity of phenytoin and diazepam in experimental seizure models in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 62, 610–614.
- Katyal, J., Kumar, H., Gupta, Y.K., 2015. Anticonvulsant activity of the cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor etoricoxib in pentylenetetrazole-kindled rats is associated with memory impairment. *Epilepsy Behav.* 44, 98–103.
- Kawai, T., Akira, S., 2008. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1143, 1–20.
- Leon, L.R., Kozak, W., Kluger, M.J., 1998. Role of IL-10 in inflammation. Studies using cytokine knockout mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 856, 69–75.
- Levin, S.G., Godukhin, O.V., 2007. Protective effects of interleukin-10 on the development of epileptiform activity evoked by transient episodes of hypoxia in rat hippocampal slices. *Neurosci. Behav. Physiol.* 37, 467–470.
- Lima, I.V., Campos, A.C., Miranda, A.S., Vieira, E.L., Amaral-Martins, F., Vago, J.P., Santos, R.P., Sousa, L.P., Vieira, L.B., Teixeira, M.M., Fiebich, B.L., Moraes, M.F., Teixeira, A.L., de Oliveira, A.C., 2015. PI3Kgamma deficiency enhances seizures severity and associated outcomes in a mouse model of convulsions induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. *Exp. Neurol.* 267, 123–134.
- Lattjohann, A., Fabens, P.F., van Luijcklaar, G., 2009. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol. Behav.* 98, 579–586.
- Ma, F., Liu, X., Li, D., Wang, P., Li, N., Lu, L., Cao, X., 2010. MicroRNA-4661 upregulates IL-10 expression in TLR-triggered macrophages by antagonizing RNA-binding protein tristetraprolin-mediated IL-10 mRNA degradation. *J. Immunol.* 184, 6053–6059.
- Maroso, M., Balosso, S., Ravizza, T., Liu, J., Aronica, E., Iyer, A.M., Rossetti, C., Molteni, M., Casagrandi, M., Manfredi, A.A., Bianchi, M.E., Vezzani, A., 2010. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in leptoencephalitis and can be targeted to reduce seizures. *Nat. Med.* 16, 413–419.
- Medeiros, A., Peres-Buzalaf, C., Fortino Verdan, F., Serevani, C.H., 2012. Prostaglandin E2 and the suppression of phagocyte innate immune responses in different organs. *Mediat. Inflamm.* 2012, 327568.
- Minami, M., Kuraishi, Y., Satoh, M., 1991. Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 beta, IL-6, TNF alpha and LIF in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176, 593–598.
- Minami, M., Kuraishi, Y., Yamaguchi, T., Nakai, S., Hirai, Y., Satoh, M., 1990. Convulsants induce interleukin-1 beta messenger RNA in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171, 832–837.
- Mino, T., Takeuchi, O., 2013. Post-transcriptional regulation of cytokine mRNA controls the initiation and resolution of inflammation. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 29, 49–60.
- Niranjan, R., Rajasekar, N., Nath, C., Shukla, R., 2012. The effect of guggulipid and nimesulide on MPTP-induced mediators of neuroinflammation in rat astrocytoma cells. *C6. Chem. Biol. Interact.* 200, 73–83.
- O'Banion, M.K., Miller, J.C., Chang, J.W., Kaplan, M.D., Coleman, P.D., 1996. Interleukin-1 beta induces prostaglandin G/H synthase-2 (cyclooxygenase-2) in primary murine astrocyte cultures. *J. Neurochem.* 66, 2532–2540.
- O'Garra, A., Barrat, F.J., Castro, A.G., Vicari, A., Hawrylowicz, C., 2008. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. *Immunol. Rev.* 223, 114–131.
- Oliveira, M.S., Furián, A.F., Rambo, L.M., Ribeiro, L.R., Royes, L.F., Ferreira, J., Calixto, J.B., Mello, C.F., 2008a. Modulation of pentylenetetrazol-induced seizures by prostaglandin E2 receptors. *Neuroscience* 152, 1110–1118.
- Oliveira, M.S., Furián, A.F., Royes, L.F., Figuera, M.R., Fiorenza, N.G., Castelli, M., Machado, P., Bohrer, D., Veiga, M., Ferreira, J., Cavalheiro, E.A., Mello, C.F., 2008b. Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsy Res.* 79, 14–21.
- Oliveira, M.S., Furián, A.F., Rambo, L.M., Ribeiro, L.R., Royes, L.F., Ferreira, J., Calixto, J.B., Otalora, L.F., Garrido-Sanabria, E.R., Mello, C.F., 2009. Prostaglandin E2 modulates Na⁺/K⁺-ATPase activity in rat hippocampus: implications for neurological diseases. *J. Neurochem.* 109, 416–426.
- Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J., 1993. Effects of nimesulide and naproxen on the degradation and metalloproteinase synthesis of human osteoarthritic cartilage. *Drugs* 46 (Suppl. 1), 34–39.
- Pelletier, J.P., Mineau, F., Fernandes, J., Kiansa, K., Ranger, P., Martel-Pelletier, J., 1997. Two NSAIDs, nimesulide and naproxen, can reduce the synthesis of urokinase and IL-6 while increasing PAI-1, in human OA synovial fibroblasts. *Clin. Exp. Rheumatol.* 15, 393–398.
- Renner, B., Zacher, J., Buvanendran, A., Walter, G., Strauss, J., Brune, K., 2010. Absorption and distribution of etoricoxib in plasma, CSF, and wound tissue in patients following hip surgery—a pilot study. *Natunyn-Schmid's. Arch. Pharmacol.* 381, 127–136.
- Rodriguez, R.V., Dorée, V.A., de Freitas, L.A., Dorée, A.L., Lebrun, I., Sobral, A.C., Portaro, F.C., Kuniyoshi, A.K., Carvalho, D.C., Nencioni, A.L., 2015. Intrahippocampal injection of TcTx-1 increases the levels of INF-gamma in the cerebral tissue but not the levels of glutamate. *Toxicol.* 103, 155–159.
- Salvadori, M.G., Banderó, C.R., Jesse, A.C., Gomes, A.T., Rambo, L.M., Bueno, L.M., Bortoluzzi, V.T., Oliveira, M.S., Mello, C.F., 2012. Prostaglandin E2 potentiates methylglutamate-induced seizures. *Epilepsia* 53, 189–198.
- Saravá, M., O'Garra, A., 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 170–181.
- Shemi, D., Azab, A.N., Kaplanski, J., 2000. Time-dependent effect of LPS on PGE2 and TNF-alpha production by rat glial brain culture: influence of COX and cytokine inhibitors. *J. Endotoxin Res.* 6, 377–381.
- Shi, S., Klotz, U., 2008. Clinical use and pharmacological properties of selective COX-2 inhibitors. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 64, 233–252.
- 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, 205–216.
- Trinka, E., Cock, H., Hesdorffer, D., Rossetti, A.O., Scheffer, I.E., Shinnar, S., Shorvon, S., Lowenstein, D.H., 2015. A definition and classification of status epilepticus – Report of the ILAE task force on classification of status epilepticus. *Epilepsia* 56, 1515–1523.
- Tsao, N., Hsu, H.P., Lei, H.Y., 1999. TNFalpha-induced cyclooxygenase 2 not only increases the vasopermeability of blood-brain barrier but also enhances the neutrophil survival in Escherichia coli-induced brain inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 57, 371–382.
- Tudor, C., Marchese, F.P., Hitti, E., Aubareda, A., Rawlinson, L., Gaestel, M., Blackshear, P.J., Clark, A.R., Saklatvala, J., Dean, J.L., 2009. The p38 MAPK pathway inhibits tristetraprolin-directed decay of interleukin-10 and pro-inflammatory mediator mRNAs in murine macrophages. *FEBS Lett.* 583, 1933–1938.
- Vezzani, A., Conti, M., De Luigi, A., Ravizza, T., Moneta, D., Marchesi, F., De Simoni, M.G., 1999. Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. *J. Neurosci.* 19, 5054–5065.
- Vezzani, A., Granata, T., 2005. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia* 46, 1724–1743.
- Youn, Y., Sung, I.K., Lee, I.G., 2013. The role of cytokines in seizures: interleukin (IL)-1beta, IL-1Ra, IL-8, and IL-10. *Korean J. Pediatr.* 56, 271–274.
- Zare-Shahabadi, A., Ashrafi, M.R., Shahrokhi, A., Soltani, S., Zoghi, S., Soleimani, F., Vameghi, R., Badv, R.S., Rezaei, N., 2015. Single nucleotide polymorphisms of TNF-Alpha gene in febrile seizures. *J. Neurol. Sci.* 356, 153–156.



3.2 ARTIGO CIENTÍFICO II – SUBCHRONIC NIMESULIDE, CELECOXIB AND ETORICOXIB HAVE DIFFERENTIAL EFFECTS ON PTZ-INDUCED SEIZURES IN MICE

Manuscript Details

Manuscript number	YPHRS_2017_1440
Title	SUBCHRONIC NIMESULIDE, CELECOXIB AND ETORICOXIB HAVE DIFFERENTIAL EFFECTS ON PTZ-INDUCED SEIZURES IN MICE
Article type	Research Paper

Abstract

In this study we investigated whether subchronic administration of three different COX-2 inhibitors alter pentylentetrazol (PTZ)-induced seizures, interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interferon- γ (INF- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-10 (IL-10) levels and prostaglandin E2 receptor 1 (EP1), prostaglandin E2 receptor 2 (EP2), prostaglandin E2 receptor 3 (EP3) immunoreactivity in the hippocampus and cerebral cortex of mice. In addition, we measured the levels of main arachidonic acid-derived metabolites (PGE2, PGF2 α , TXB2 and PGD2) in the cerebral cortex of mice. Adult male albino Swiss mice received nimesulide (0.2, 2 or 20 mg/kg, three times a day, p.o.), celecoxib (0.2, 2 or 20 mg/kg, two times a day, p.o.) or etoricoxib (0.2, 2 or 20 mg/kg, once a day, p.o.) in 0.1% carboxymethylcellulose (CMC) in 5% Tween 80, p.o.), daily for 14 successive days. On the 15th day mice were challenged with PTZ (50 mg/kg, i.p.) and the latency to myoclonic jerks and to generalized tonic-clonic seizures were recorded. Twenty minutes after PTZ injection animals were sacrificed and cytokines, prostaglandin levels and EP1, EP2 and EP3 receptor immunoreactivity were measured. PTZ increased cytokine levels in the cerebral cortex and hippocampus. While subchronic administration of nimesulide and etoricoxib attenuated, celecoxib facilitated PTZ-induced seizures. Nimesulide and etoricoxib decreased PTZ-induced increase of PGE2 and potentiated PTZ-induced IL-10 increase. Celecoxib decreased PTZ-induced increase of proinflammatory cytokines, but did not alter PTZ-induced increase of PGE2 or IL-10 levels. We suggest that the anticonvulsant effect of nimesulide and etoricoxib may be related to their ability to decrease PTZ-induced production of PGE2 and increase PTZ-induced production of IL-10 in mice.

Keywords	nimesulide; celecoxib; etoricoxib; neuroinflammation; cytokines; prostaglandins.
Corresponding Author	C Mello
Corresponding Author's Institution	Universidade Federal de Santa Maria-RS
Order of Authors	Fernanda Temp, Joseane Marafiga, Luciana Gobo, Paula Michelotti, Laura Milanese, Thiago Duarte, Ana Cláudia Jesse, Amanda Hessel, Leandro Carvalho, Micheli Pillat, C Mello
Suggested reviewers	Patric Stanton, Damir Janigro, Maria da Graca Naffah Mazzacoratti, Yoshihiro Urade, James Hewett

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover letter.pdf [Cover Letter]

Graphical abstract.TIF [Graphical Abstract]

Manuscript Temp et al., 2017.docx [Manuscript File]

Conflict of interest.pdf [Conflict of Interest]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia



Pharmacological Research
Editor-in-Chief
Dr. E. Clementi

December 15, 2017.

Dear Dr. Clementi,

It is a pleasure for us to send you our manuscript entitled “Subchronic nimesulide, celecoxib and etoricoxib have differential effects on PTZ-induced seizures in mice” for consideration in the publication in *Pharmacological Research*. In this study, we showed that while subchronic administration of nimesulide and etoricoxib attenuate, celecoxib facilitates PTZ-induced seizures in male albino mice. We present circumstantial evidence that the anticonvulsant effect of nimesulide and etoricoxib may be related to their ability to decrease PTZ-induced production of PGE₂ and increase PTZ-induced production of IL-10 in these animals.

This study is the first to compare the anticonvulsant activity of three different COX-2 inhibitors administrated subchronically. In fact, all studies published so far have inferred a role for COX-2 in seizures based on the study of a single drug of this class (COX-2 inhibitors) and, most of them, using a single dose of the compound. Here we present convincing experimental evidence that anticonvulsant activity is not shared by all COX-2 inhibitors by using dose-effect curves for each of the three COX-2 inhibitors (nimesulide, celecoxib and etoricoxib) tested. Moreover, we present circumstantial evidence that the anticonvulsant effect of nimesulide and etoricoxib may involve the increase of IL-10 and decrease PGE₂ levels in the hippocampus and cerebral cortex. Therefore, our study adds significant data to the debate about the role of COX-2 in seizures, whether any COX-2 inhibitors may decrease (or facilitate or have no effect on) seizures and indicates a possible role for IL-10 and PGE₂ in the anticonvulsant effect of nimesulide and etoricoxib. Considering the sound results obtained, we are confident that our study will be of interest to a wide range of readers and has scientific merit for publication in *Pharmacological Research*.

We look forward hearing from you soon.

Sincerely,



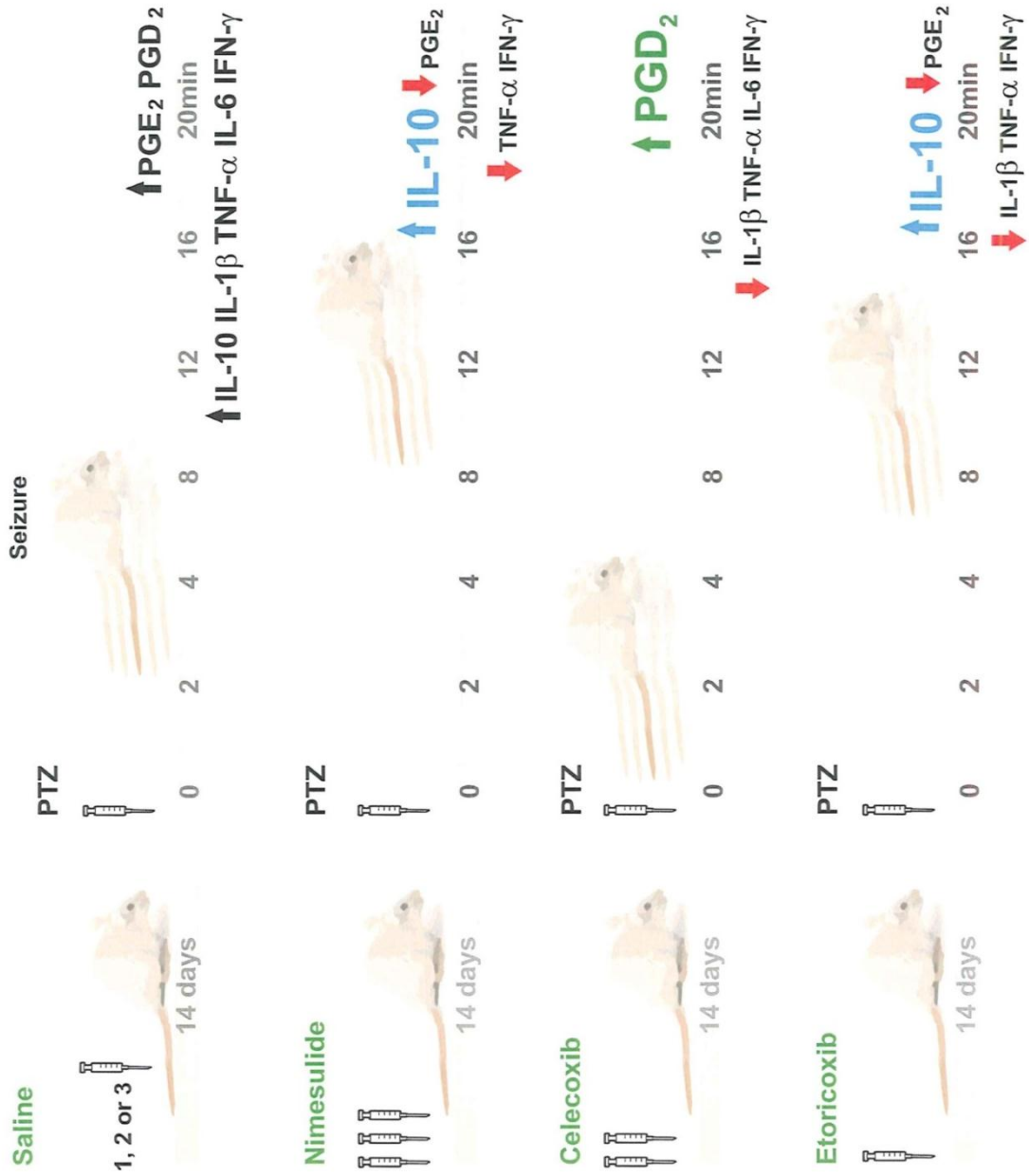
Carlos Fernando Mello, MD, PhD

Full Professor, Department of Physiology and Pharmacology,
Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, BRASIL,
e-mail: cf.mello@smail.ufsm.br Tel. +55-55-3220 8870



Micheli Mainardi Pillat, MD, PhD

Department of Physiology and Pharmacology,
Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, BRASIL,
e-mail: mmpillat@gmail.com Tel. +55-55-3220 8870



1
2
3
4
5 **SUBCHRONIC NIMESULIDE, CELECOXIB AND ETORICOXIB HAVE**
6
7 **DIFFERENTIAL EFFECTS ON PTZ-INDUCED SEIZURES IN MICE**
8
9

10
11 Fernanda Rossatto Temp¹, Joseane Righes Marafiga¹, Luciana Assis Gobo³, Paula
12 Michelotti², Laura Hautrive Milanesi¹, Thiago Duarte¹, Ana Claudia Jesse¹, Amanda
13 Titze Hessel¹, Leandro Machado Carvalho³, Micheli Mainardi Pillat^{1*} and Carlos
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59

Fernando Mello^{1,2*}

¹Graduation Program in Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University
of Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

²Department of Physiology and Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal
University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

³Department of Chemistry, Center of Natural and Exact Science, Federal University of
Santa Maria, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

*Corresponding authors. Tel: +55 55 3220 8870; fax: + 55 55 3220 8870

E-mail addresses: cf.mello@smail.ufsm.br (C.F. Mello); mmpillat@gmail.com
(M.M.Pillat).

60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118

Abstract

In this study we investigated whether subchronic administration of three different COX-2 inhibitors alter pentylenetetrazol (PTZ)-induced seizures, interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), interferon- γ (INF- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-10 (IL-10) levels and prostaglandin E₂ receptor 1 (EP1), prostaglandin E₂ receptor 2 (EP2), prostaglandin E₂ receptor 3 (EP3) immunoreactivity in the hippocampus and cerebral cortex of mice. In addition, we measured the levels of main arachidonic acid-derived metabolites (PGE₂, PGF_{2 α} , TXB₂ and PGD₂) in the cerebral cortex of mice. Adult male albino Swiss mice received nimesulide (0.2, 2 or 20 mg/kg, three times a day, p.o.), celecoxib (0.2, 2 or 20 mg/kg, two times a day, p.o.) or etoricoxib (0.2, 2 or 20 mg/kg, once a day, p.o.) in 0.1% carboxymethylcellulose (CMC) in 5% Tween 80, p.o., daily for 14 successive days. On the 15th day mice were challenged with PTZ (50 mg/kg, i.p.) and the latency to myoclonic jerks and to generalized tonic-clonic seizures were recorded. Twenty minutes after PTZ injection animals were sacrificed and cytokines, prostaglandin levels and EP1, EP2 and EP3 receptor immunoreactivity were measured. PTZ increased cytokine levels in the cerebral cortex and hippocampus. While subchronic administration of nimesulide and etoricoxib attenuated, celecoxib facilitated PTZ-induced seizures. Nimesulide and etoricoxib decreased PTZ-induced increase of PGE₂ and potentiated PTZ-induced IL-10 increase. Celecoxib decreased PTZ-induced increase of proinflammatory cytokines, but did not alter PTZ-induced increase of PGE₂ or IL-10 levels. We suggest that the anticonvulsant effect of nimesulide and etoricoxib may be related to their ability to decrease PTZ-induced production of PGE₂ and increase PTZ-induced production of IL-10 in mice.

Keywords: nimesulide; celecoxib; etoricoxib; neuroinflammation; cytokines; prostaglandins.

119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177

1. Introduction

Since the discovery of selective COX-2 (cyclooxygenase-2) inhibitors, a number of studies have investigated the effects of these compounds on seizures [1-7]. Intriguingly however, inhibitory [8-12], facilitatory [13-16], and no effect [6, 11, 17] of these compounds on seizures have been reported (Table 1). These conflictant findings have motivated good reviews in the field [18-21], as well as the suggestion that methodological issues, such as the use of different convulsant stimuli, drugs, drug doses, timing and route of administration and the species used (mouse or rat) might be determinants of these discrepant findings. In fact, most of the studies that have used kainate as convulsant agent have reported a facilitatory of COX-2 inhibitors on seizures [3, 13, 15, 16]. Interestingly, COX-2 knockout mice are more susceptible to KA-induced seizures [13]. In fact, to the best of our knowledge, no study has shown a protective effect of COX-2 inhibitors on kainate-induced seizures in mice or rats, further supporting the view that the convulsant agent may be a determinant of the effect of the COX-2 inhibitor. On the other hand, the effect of COX-2 inhibitors on GABA_A antagonist-induced seizures seems to be more dependent on the animal used. The majority of the studies in the literature found that COX-2 inhibitors protect from GABA_A antagonists-induced seizures [8, 9, 11, 22] or have no effect [6, 11, 12]. The only study that has found a facilitatory effect of an acute administration of a COX-2 inhibitor on PTZ-induced seizures used C57Bl/6 mice [7]. Toscano and colleagues, besides using C57Bl/6-129/Ola mice, administrated the COX-2 inhibitor (celecoxib) for six weeks before the KA challenge, an administration regimen that contrasts with most of the other studies in the literature, which have acutely administered the COX-2 inhibitor. Considering that COX-2 knockout mice are more susceptible to not only to KA- but also to NMDA-induced seizures [23], we hypothesized that adaptive alterations

178
179
180 due long-lasting lack or inhibition of COX-2 activity (either due genetic or
181
182 pharmacological intervention) might contribute to the facilitation of seizures by COX-2
183
184 inhibitors, regardless of the mouse strain used. Accordingly, we decided to investigate
185
186 whether the subchronic administration of nimesulide, celecoxib and etoricoxib alter the
187
188 susceptibility to PTZ-induced seizures. Since EP1, EP2 and EP3 receptors have been
189
190 implicated in the acute convulsant effect of PTZ [24, 25], we evaluated whether this
191
192 pharmacological treatment alters EP1, EP2 and EP3 immunoreactivity in the
193
194 hippocampus and cerebral cortex of these animals, as well as its effect on cytokine and
195
196 prostanoïd production.
197
198
199
200

201 **2. Materials and Methods**

202 *2.1 Animals*

203
204 Adult male Swiss mice (28 ± 3 g; n =960), housed ten to a cage, and maintained under
205
206 controlled light and environment (12-h light/dark cycle, lights on at 7:00, 22 ± 1 °C,
207
208 55% relative humidity) with free access to food (Supra, Santa Maria, Brazil) and water
209
210 were used. All animals were obtained from the Animal House of the Federal University
211
212 of Santa Maria and habituated to laboratory conditions 48 h before each experiment.
213
214 Behavioral tests were conducted during the light phase of the cycle (between 10:00 a.m.
215
216 and 14:00 p.m.). All experiments reported in this study were conducted in accordance
217
218 with the national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of
219
220 Animal Experimentation – CONCEA – and of EU Directive 2010/63/EU for animal
221
222 experiments), with the approval of Committee on Care and
223
224 Use of Experimental Animal Resources of the Federal University of Santa Maria
225
226 (authorization number: 024/2014). All efforts were made to reduce the number of
227
228 animals used to a minimum, as well as to minimize their suffering.
229
230
231
232
233
234
235
236

237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295

2.2 Reagents

PTZ was purchased from Sigma-Aldrich (USA), nimesulide (Nisulid[®]) was from Aché, celecoxib (Celebra[®]) was from Pfizer and etoricoxib (Arcoxia[®]) was from MSD. Commercial ELISA kits for cytokines assays were purchased from eBIOSCIENCE (San Diego, USA). PTZ was dissolved in 0.9% NaCl and administered intraperitoneally (i.p.). Nimesulide, celecoxib and etoricoxib were suspended in 0.1% carboxymethylcellulose (CMC) plus 5% Tween 80 and, since the three COX-2i permeate the blood-brain barrier [26-28], they were administered by oral gavage (volume: 10 ml/kg).

2.3. Experimental protocol

The effect of subchronic nimesulide, celecoxib or etoricoxib (IC₅₀s around 1 μ M) [29] on PTZ-induced seizures was investigated by orally administering each drug. Nimesulide (three times a day, p.o.), celecoxib (two times a day, p.o.) or etoricoxib (once time a day, p.o.) (0.2, 2 or 20 mg/kg in 0.1% CMC in 5% Tween 80), or vehicle (0.1% CMC in 5% Tween 80, 10 ml/kg), daily for 14 successive days. On the 15th day mice were challenged with PTZ (50 mg/kg, i.p.). After PTZ injection animals were evaluated for the appearance of behavioral seizures, as described below.

2.4. Seizure evaluation

The animals were followed up (and video monitored) after PTZ injection for 20 minutes for the appearance of seizures and the following parameters were recorded: latency to myoclonic jerks and generalized tonic-clonic seizures, according to Ferraro and colleagues [30]. The severity of PTZ-induced seizures was scored by a modified Racine scale [31], as follows: (1) sudden behavioral arrest and/or motionless staring; (2) facial

296
297
298 jerking with muzzle or muzzle and eye; (3) neck jerks; (4) clonic seizure in a sitting
299
300 position; (5) convulsion including clonic and/or tonic-clonic seizure while lying on the
301
302 belly and/or pure tonic seizure; (6) convulsion including clonic and/or tonic-clonic
303
304 seizure while lying on the side and/or wild jumping.
305
306
307
308

309 *2.5. Cytokine assay*

310
311 Animals were treated with vehicle (0.1% CMC in 5% Tween 80, p.o., 10 ml/kg) or
312
313 nimesulide (20 mg/kg) or celecoxib (20 mg/kg) or etoricoxib (20 mg/kg) by oral
314
315 gavage, daily for 14 successive days. On the 15th day mice were challenged with PTZ
316
317 (50 mg/kg, i.p.) or 0.9% NaCl (10 ml/kg, i.p.). Twenty minutes after PTZ (or 0.9%
318
319 NaCl) injection the animals were killed by decapitation and the hippocampi and cerebral
320
321 cortex were dissected and homogenized for cytokine (IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α and
322
323 IL-10) determination. Cytokine quantification was carried out using a commercial
324
325 ELISA kit (eBIOSCIENCE, San Diego, USA), according to manufacturer's
326
327 instructions. The results were expressed as picogram of cytokine per milligram of
328
329 protein. Protein content was measured by the bicinchoninic acid method (Pierce,
330
331 Rockford, IL).
332
333
334
335
336

337 *2.6. Preparation of tissues and Western blot analysis*

338
339 Hippocampi and cerebral cortex were homogenized in an ice-cold lysis buffer (Triton X-
340
341 100, pH=8.0) containing 150 mM sodium chloride, 0.1% Triton X-100, 50 mM Tris, 2
342
343 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM phenylmethanesulphonyl fluoride, 10 mM β -
344
345 glycerophosphate, 1 mM DTT, 2 mM sodium orthovanadate, and a mixture of protease
346
347 and phosphatase inhibitors (Sigma, St. Louis, MO). The homogenates were centrifuged
348
349 (12.700 g for 20 min at 4 °C) and the supernatant was stored at -80°C for later analysis.
350
351
352
353
354

355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413

Protein concentration in the supernatant was measured by bicinchonic acid assay (BCA) using bovine serum albumin as standard. The supernatant (20 µg protein each) was resolved by 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and electroblotted onto nitrocellulose membranes (Millipore). Membranes were blocked with 2.5% albumin plus 2.5% non-fat milk in TBS-T (1% Tween 20 in Tris-borate saline) at room temperature for 1 h, and incubated overnight at 4 C with rabbit primary anti-EP1 or anti-EP2 or anti-EP3 antibody (1:1000; 1:5000; 1:3000, Abcam). Membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:6.000, Santa Cruz Biotechnology) at room temperature for 1 h. Blots were developed by enhanced chemiluminescence (ECL) (Thermo Fisher Scientific) and band intensities were quantified by ImageJ 219 (NIH) and Image Lab. GAPDH (1:60.000, Sigma, St. Louis, MO) was used as an internal reference. The results were normalized for the control group (saline-saline) and reported as the relative amount of prostaglandin E2 receptor 1, 2 and 3 (EP1, EP2 and EP3). Proteins were probed in the same membranes after stripping with 0.5 M NaCl in 0.2% SDS/TBS at 62°C for 60 min.

2.7. Quantification of Eicosanoids

Eicosanoids in the brain were quantified as previously described [32], with minor modifications. Briefly, chemical analysis was performed using an Agilent 1260 Infinity UHLC-MS chromatograph (Santa Clara, CA, United States) with automatic injection and an Agilent 6430 triple quadrupole mass detector. Cortical samples were homogenized in 15% methanol (v/v) containing 1 mM indomethacin [33, 34] and kept in an ice bath for 30 minutes. The homogenate was centrifuged at 12000 rpm for 30 minutes. The resultant supernatant was acidified with 0.1 M HCl and immediately applied to the SPE system, which had been pre-conditioned with 20 mL of methanol

414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472

followed by 20 mL of water. After percolating the samples, the system was washed with 20 ml of 15% methanol (v/v), 20 ml of water and 10 ml of hexane. Prostaglandins were eluted with 15 mL of methyl formate. The eluate obtained was evaporated under a nitrogen atmosphere to a final volume of approximately 500 μL and diluted in 1 mL of ethanol. The diluted extracts (5 μL) were injected into the chromatographic system. The standard addition method, in which known amounts of standard solutions are added to the aforementioned diluted extract, was used to quantify the compounds in the extracts. Internal calibration curves were built in each diluted extract solution by adding three different concentrations within the validated linear ranges of PGs as following: 11.90, 22.72 and 32.61 $\mu\text{g L}^{-1}$ for all compounds. All the data points of the calibration curves were acquired in triplicate.

2.8. Statistical analyses

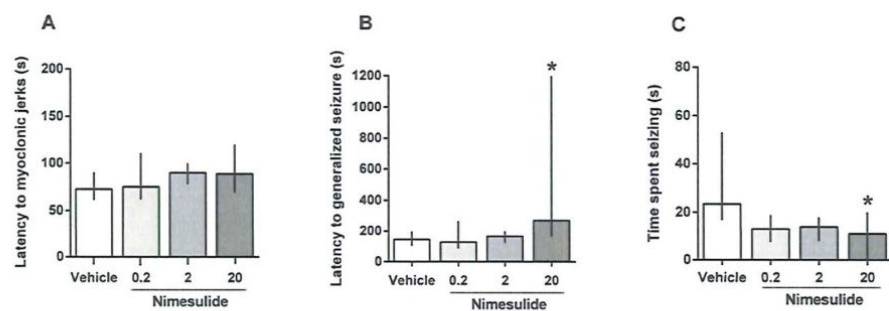
Behavioral data were analyzed by Kruskal–Wallis test followed by nonparametric Dunn's multiple comparison test and are presented as median and interquartile range. Cytokine levels, western blot and PGs were analyzed by two-way ANOVA: pretreatment (vehicle or COX-2 inhibitor) by treatment (saline or PTZ) in each cerebral structure followed by F test for simple effect as *post-hoc* test [35] and are expressed as mean + S.E.M. A probability of $p < 0.05$ was considered significant.

3. Results

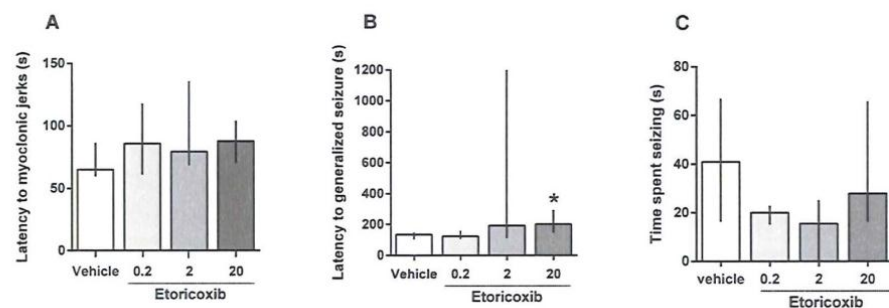
3.1. Effect of subchronic nimesulide, celecoxib or etoricoxib on PTZ-induced seizures

Statistical analysis showed that subchronic administration of nimesulide or etoricoxib significantly increased the latency to PTZ-induced generalized tonic-clonic seizures [H(3)=7.967, Fig. 1B; $p < 0.05$ and H(3)=9.736; $p < 0.05$, Fig. 2B, respectively] and

473
 474
 475
 476 nimesulide decreased total time spent seizing [H(3)=9.696; $p<0.05$, Fig. 1C]. In
 477
 478 contrast, subchronic administration of celecoxib facilitated seizures, significantly
 479
 480 decreasing the latency to PTZ-induced generalized tonic-clonic seizures [H(3)=7.204;
 481
 482 $p<0.05$, Fig. 3B]. Other parameters, such as latency to PTZ-induced myoclonic jerks,
 483
 484 number of seizure episodes and Racine score were not altered by pharmacological
 485
 486 treatment.
 487
 488
 489

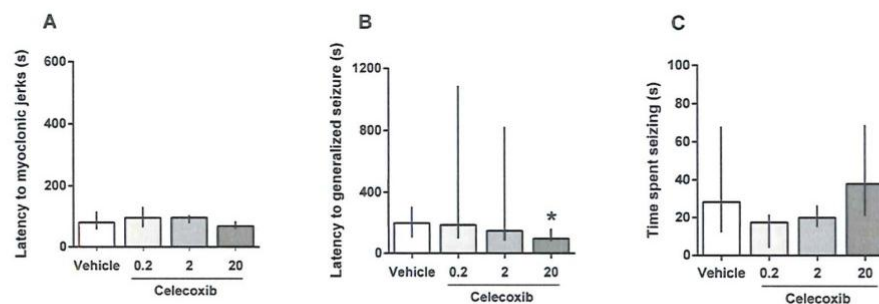


490
 491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498
 499
 500
 501
 502 **Fig. 1.** Effect of subchronic nimesulide (0.2, 2 or 20 mg/kg, p.o.) on PTZ-induced
 503
 504 seizures. Nimesulide did not alter the latency to PTZ (50 mg/kg, i.p.)-induced
 505
 506 myoclonic jerks (A); increased latency to generalized tonic-clonic seizures (B); and
 507
 508 decreased time spent seizing (C). * $P<0.05$ compared with vehicle-PTZ group (Kruskal-
 509
 510 Wallis followed by Dunn's test). Data are presented as median \pm interquartile range for
 511
 512 $n=6-12$ in each group.
 513
 514
 515



473
 474
 475
 476
 477
 478
 479
 480
 481
 482
 483
 484
 485
 486
 487
 488
 489
 490
 491
 492
 493
 494
 495
 496
 497
 498
 499
 500
 501
 502
 503
 504
 505
 506
 507
 508
 509
 510
 511
 512
 513
 514
 515
 516
 517
 518
 519
 520
 521
 522
 523
 524
 525
 526
 527
 528
 529
 530
 531

532
 533
 534 **Fig. 2.** Effect of subchronic etoricoxib (0.2, 2 or 20 mg/kg, p.o.) on PTZ-induced
 535 seizures. Etoricoxib did not alter the latency to PTZ (50 mg/kg, i.p.)-induced myoclonic
 536 jerks (A); increased latency to generalized tonic-clonic seizures (B); and did not alter
 537 the time spent seizing (C). * $P < 0.05$ compared with vehicle-PTZ group (Kruskal-Wallis
 538 followed by Dunn's test). Data are presented as median \pm interquartile range for $n = 6-12$
 539 in each group.
 540
 541
 542
 543
 544
 545
 546
 547
 548
 549



550
 551
 552
 553
 554
 555
 556
 557
 558
 559
 560
 561
 562 **Fig. 3.** Effect of subchronic celecoxib (0.2, 2 and 20 mg/Kg, p.o.) on PTZ-induced
 563 seizures. Celecoxib did not alter the latency to PTZ (50 mg/kg, i.p.)-induced myoclonic
 564 jerks; decreased latency to generalized tonic-clonic seizures (B); and did not alter the
 565 time spent seizing (C). * $P < 0.05$ compared with vehicle-PTZ group (Kruskal-Wallis
 566 followed by Dunn's test). Data are presented as median \pm interquartile range for $n = 6-12$
 567 in each group.
 568
 569
 570
 571
 572
 573
 574
 575

576 3.2. Effect of subchronic nimesulide on cytokine ($IL-1\beta$, $IL-6$, $INF-\alpha$, $TNF-\alpha$ and $IL-10$) 577 levels

578
 579
 580 Statistical analysis [two-way ANOVA: pretreatment (vehicle or nimesulide) by
 581 treatment (saline or PTZ) revealed a significant effect of treatment (saline or PTZ) on
 582 $IL-1\beta$ and $IL-6$ levels in the hippocampus: [$F(1,12) = 150.34$, $p < 0.001$ and
 583 $F(1,12) = 345.73$, $p < 0.001$, respectively] and in the cerebral cortex [$F(1,12) = 355.91$,
 584 $p < 0.001$, respectively]

591
592
593 p<0.001; F(1,12)=765.87, p<0.001, respectively]. *Post-hoc* analyses showed that PTZ
594 increased IL-1 β and IL-6 levels in both cerebral structures (Figs. 4A and 4B). Statistical
595 analysis on IFN- γ levels revealed significant effect of treatment (saline or PTZ) in the
596 hippocampus: [F(1,12)=491.42, p<0.001] and a significant pretreatment (vehicle or
597 nimesulide) by treatment (saline or PTZ) interaction in the cerebral cortex:
598 [F(1,12)=13.11, p=0.004]. *Post-hoc* analyses showed that PTZ increased IFN- γ levels
599 in the cerebral cortex and hippocampus, and that nimesulide attenuated such an increase
600 only in the cerebral cortex (Fig. 4C). Statistical analysis on TNF- α levels revealed a
601 significant pretreatment by treatment interaction in the hippocampus and cerebral
602 cortex: [F(1,12)=6.12, p=0.029 and F(1,12)=8.78, p=0.012, respectively]. *Post-hoc*
603 analyses showed that nimesulide attenuated PTZ-induced increase of TNF- α levels in the
604 hippocampus and cerebral cortex (Fig. 4D). Statistical analysis on IL-10 levels revealed
605 significant pretreatment by treatment interaction in both cerebral structures:
606 [F(1,12)=21.46, p=0.001 and F(1,12)=7.07, p=0.021 for hippocampus and cerebral
607 cortex, respectively]. *Post-hoc* analyses showed that nimesulide potentiated PTZ-
608 induced increase of IL-10 levels in the cerebral cortex and hippocampus (Fig. 4E).
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649

650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708

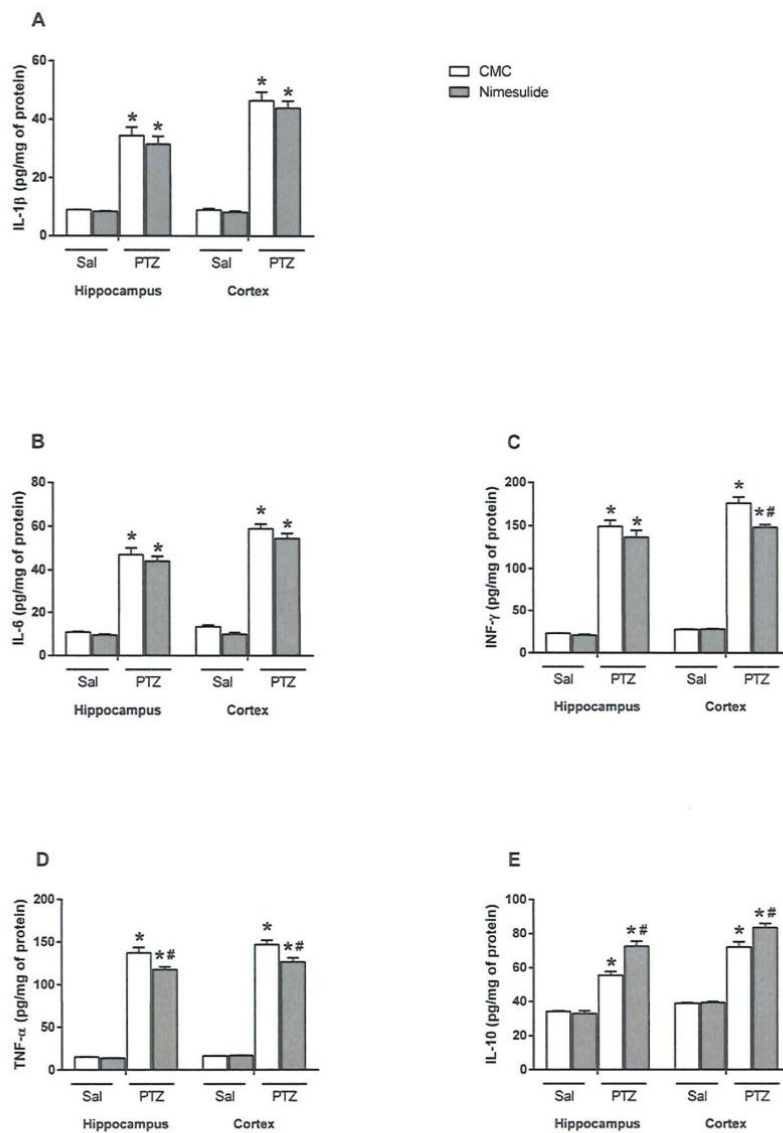


Fig. 4. Effect of subchronic nimesulide (20 mg/Kg, p.o.) on IL-1 β (A), IL-6 (B), INF- γ (C), TNF- α (D) and IL-10 (E) levels in the cerebral cortex and hippocampus after PTZ administration (50 mg/kg, i.p.). * P <0.05 compared with respective saline group, # P <0.05 compared with respective CMC control group (F test for simple effect). Data are presented as mean + S.E.M. for $n=4$ in each group.

709
710
711 3.3. *Effect of subchronic celecoxib on cytokine (IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α and IL-10)*
712
713 *levels*
714

715 Statistical analysis [two-way ANOVA: pretreatment (vehicle or celecoxib) by treatment
716 (saline or PTZ)] on IL-1 β and IL-6 levels revealed a significant pretreatment (vehicle or
717 celecoxib) by treatment (saline or PTZ) interaction in the hippocampus: [F(1,12)=4.82,
718 p=0.049 and F(1,12)=17.22, p<0.001, respectively] and a significant effect of
719 pretreatment (vehicle or celecoxib) and treatment (saline or PTZ) on IL-1 β
720 [F(1,12)=9.17, p=0.010; and F(1,12)= 242.54, p<0.001, respectively] and IL-6 levels
721 [F(1,12)=10.62, p=0.007; and F(1,12)= 359.82, p<0.001, respectively] in the cerebral
722 cortex. *Post-hoc* analyses showed that celecoxib attenuated PTZ-induced increase of IL-
723 1 β and IL-6 levels in the cerebral cortex and hippocampus (Figs. 5A and 5B). Statistical
724 analysis on IFN- γ levels revealed significant effects of pretreatment (vehicle or
725 celecoxib) and treatment (saline or PTZ) in the hippocampus: [F(1,12)=5.38, p=0.039;
726 and F(1,12)= 373.29, p<0.001, respectively] and a significant pretreatment by treatment
727 interaction in the cerebral cortex: [F(1,12)=5.57, p=0.036]. *Post-hoc* analyses showed
728 that celecoxib attenuated PTZ-induced increase of IFN- γ levels in the cerebral cortex
729 and hippocampus (Fig. 5C). The statistical analyses on TNF- α levels in the
730 hippocampus and cerebral cortex revealed a significant pretreatment by treatment
731 interaction: [F(1,12)=8.67, p=0.012 and F(1,12)=6.0, p=0.031, respectively]. *Post-hoc*
732 analyses revealed that celecoxib attenuated PTZ-induced increase of TNF- α levels in
733 both cerebral structures (Fig. 5D). Statistical analysis on IL-10 levels revealed a
734 significant effect of treatment (saline or PTZ) in the hippocampus and cerebral cortex:
735 [F(1,12)=197.83, p<0.001 and F(1,12)=14.11, p=0.003, respectively] and a significant
736 effect of pretreatment in the cerebral cortex [F(1,12)=8.55, p=0.013]. *Post-hoc* analysis
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767

revealed that PTZ increased IL-10 levels in the hippocampus and that celecoxib plus PTZ increased IL-10 levels in the cerebral cortex (Fig. 5E).

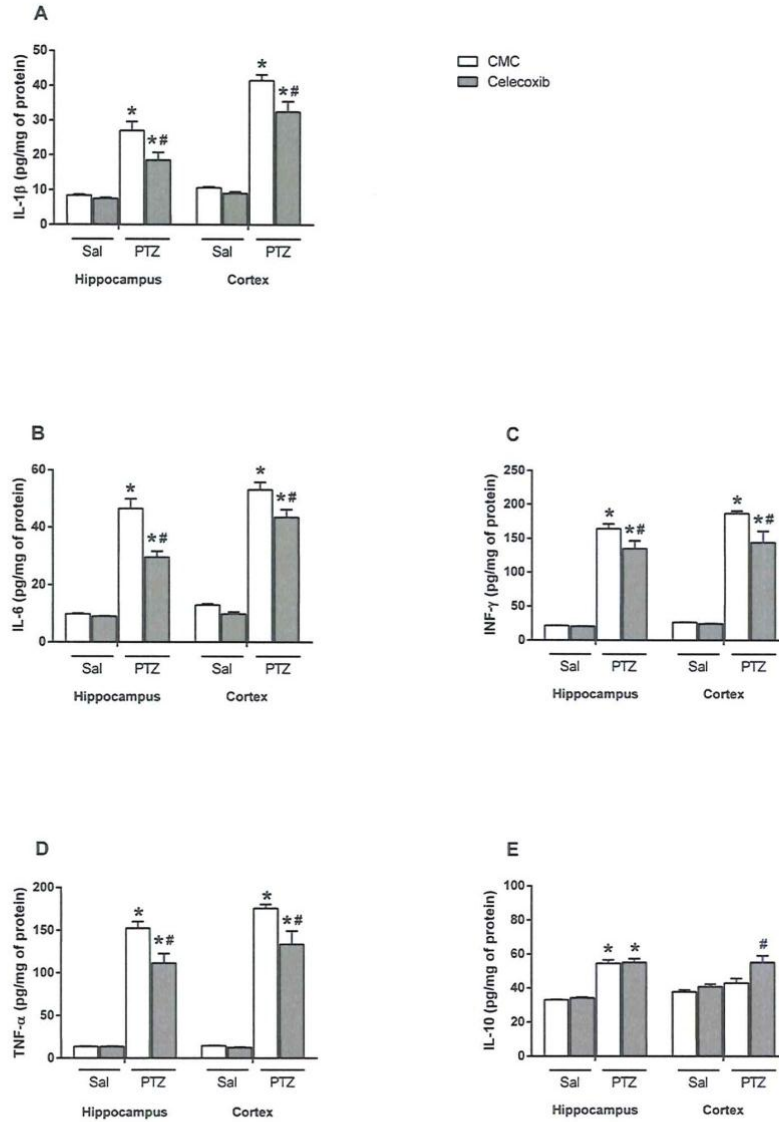


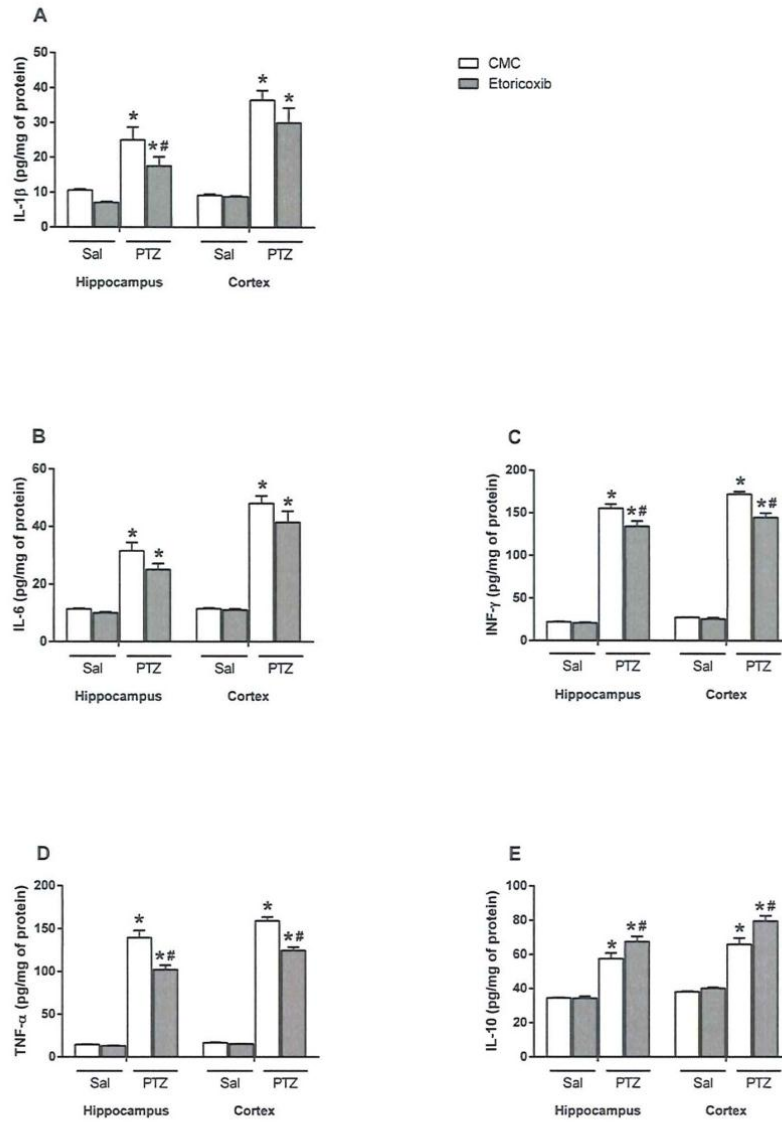
Fig. 5. Effect of subchronic celecoxib (20 mg/Kg, p.o.) on IL-1 β (A), IL-6 (B), INF- γ (C), TNF- α (D) and IL-10 (E) levels in the cerebral cortex and hippocampus after PTZ administration (50 mg/kg, i.p.). * P <0.05 compared with respective saline group,

827
828
829 # $P < 0.05$ compared with respective CMC control group (F test for simple effect). Data
830 are presented as mean + S.E.M. for $n=4$ in each group.
831
832

833
834
835
836 *3.4. Effect of subchronic etoricoxib on cytokine (IL-1 β , IL-6, IFN- γ , TNF- α and IL-10)*
837
838 *levels*

839
840 Statistical analysis [two-way ANOVA: pretreatment (vehicle or etoricoxib) by treatment
841 (saline or PTZ) of IL-1 β levels revealed a significant effect of treatment (saline or PTZ)
842 in the hippocampus and cerebral cortex: [F(1,12)=29.57, $p < 0.001$ and F(1,12)=89.05,
843 $p < 0.001$, respectively] and a significant effect of pretreatment (vehicle or etoricoxib) in
844 the hippocampus: [F(1,12)=5.82, $p = 0.033$]. *Post-hoc* analysis showed that PTZ
845 increased IL-1 β levels in the cerebral cortex and hippocampus, and that etoricoxib
846 reduced IL-1 β in the hippocampus of animals that received PTZ (Fig. 6A). Statistical
847 analysis of IL-6 levels revealed significant effect of treatment (saline or PTZ) in the
848 hippocampus and cerebral cortex: [F(1,12)=91.53, $p < 0.001$ and F(1,12)=204.93,
849 $p < 0.001$, respectively]. *Post-hoc* analysis revealed that PTZ increased IL-6 levels in
850 both cerebral structures (Fig. 6B). Statistical analysis on IFN- γ and TNF- α levels
851 revealed a significant pretreatment (vehicle or etoricoxib) by treatment (saline or PTZ)
852 interaction in hippocampus and cerebral cortex: [F(1,12)=6.73, $p = 0.024$; F(1,12)=13.54,
853 $p = 0.003$; F(1,12)=15.92, $p = 0.002$ and F(1,12)=30.75, $p < 0.001$; respectively]. *Post-hoc*
854 analysis showed that PTZ increased IFN- γ and TNF- α levels in both cerebral
855 structures, and that etoricoxib attenuated such an increase (Figs. 6C and 6D). Statistical
856 analysis on IL-10 levels revealed a significant pretreatment (vehicle or etoricoxib) by
857 treatment (saline or PTZ) interaction in the hippocampus and cerebral cortex:
858 [F(1,12)=4.88, $p = 0.047$ and F(1,12)=5.48, $p = 0.037$, respectively]. *Post-hoc* analysis
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885

886
 887
 888 revealed PTZ increased IL-10 levels in both cerebral structures, and that etoricoxib
 889
 890 potentiated such an increase (Fig. 6E).
 891
 892
 893
 894



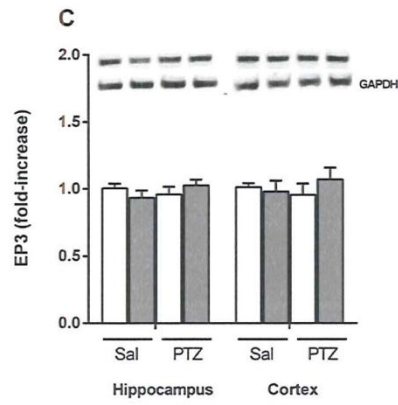
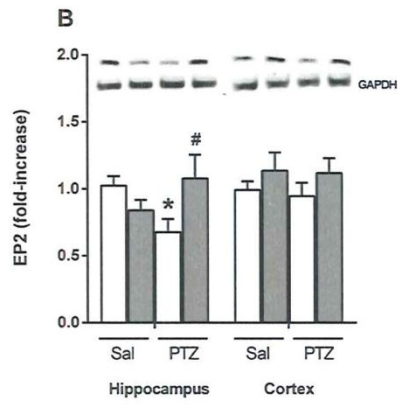
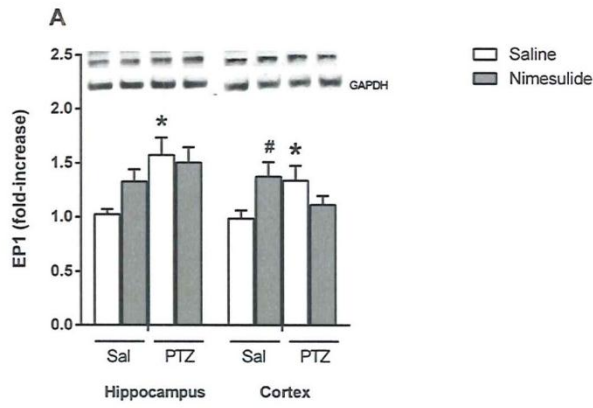
922
 923
 924
 925
 926
 927
 928
 929
 930
 931
 932
 933
 934
 935 **Fig. 6.** Effect of subchronic etoricoxib (20 mg/Kg, p.o.) on IL-1 β (A), IL-6 (B), INF- γ
 936
 937 (C), TNF- α (D) and IL-10 (E) levels in the cerebral cortex and hippocampus after PTZ
 938
 939 administration (50 mg/kg, i.p.). * $P < 0.05$ compared with respective saline group,
 940
 941
 942
 943
 944

945
946
947 # $P < 0.05$ compared with respective CMC control group (F test for simple effect). Data
948 are presented as mean + S.E.M. for $n=4$ in each group.
949
950

951 952 953 3.5. Effect of subchronic nimesulide on EP1, EP2 and EP3 receptor immunoreactivity

954 Statistical analysis [two-way ANOVA: pretreatment (vehicle or nimesulide) by
955 treatment (saline or PTZ)] of EP1 receptor immunoreactivity revealed a significant
956 effect of treatment (saline or PTZ) in the hippocampus: $[F(1,37)=8.7, p=0.006]$. *Post-*
957 *hoc* analysis revealed that PTZ increases EP1 immunoreactivity in the hippocampus.
958 Statistical analysis of EP1 receptor immunoreactivity in the cerebral cortex revealed a
959 significant pretreatment (vehicle or nimesulide) by treatment (saline or PTZ)
960 interaction: $[F(1,37)=7.88, p=0.008]$. *Post-hoc* analysis revealed that PTZ and
961 nimesulide increase EP1 receptor immunoreactivity in the cerebral cortex, but also that
962 nimesulide has no effect in presence of PTZ (Fig. 7A). Statistical analysis on EP2
963 receptor immunoreactivity revealed a significant pretreatment (vehicle or nimesulide)
964 by treatment (saline or PTZ) interaction in hippocampus: $[F(1,37)=5.98, p=0.019]$. *Post-*
965 *hoc* analyses showed that PTZ decreases EP2 immunoreactivity *per se* in the
966 hippocampus and that nimesulide prevented such a decrease (Fig. 7B). However, neither
967 nimesulide nor PTZ altered EP2 receptor immunoreactivity in the cerebral cortex.
968 Pretreatment and treatment had no effect on EP3 receptor immunoreactivity in both
969 cerebral structures (Fig. 7C).
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000
1001
1002
1003

1004
 1005
 1006
 1007
 1008
 1009
 1010
 1011
 1012
 1013
 1014
 1015
 1016
 1017
 1018
 1019
 1020
 1021
 1022
 1023
 1024
 1025
 1026
 1027
 1028
 1029
 1030
 1031
 1032
 1033
 1034
 1035
 1036
 1037
 1038
 1039
 1040
 1041
 1042
 1043
 1044
 1045
 1046
 1047
 1048
 1049
 1050
 1051
 1052
 1053
 1054
 1055
 1056
 1057
 1058
 1059
 1060
 1061
 1062

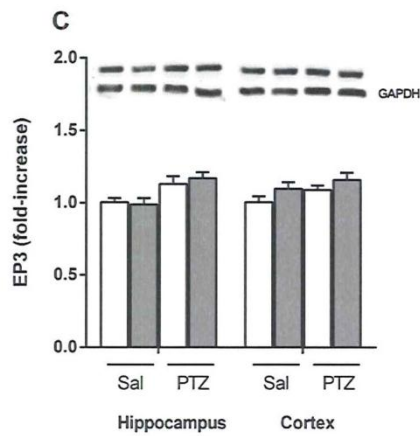
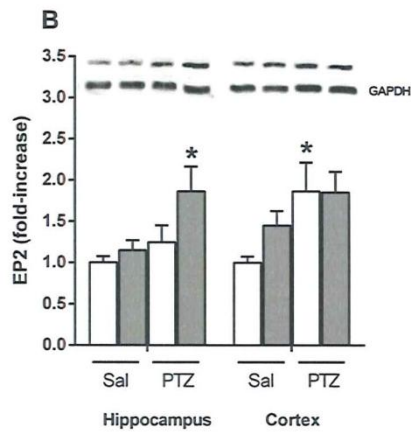
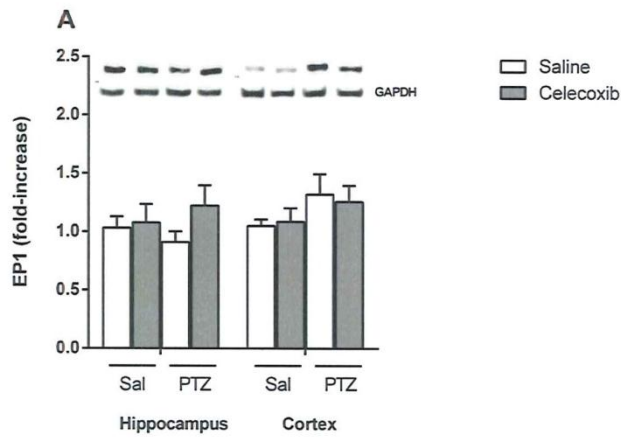


1063
1064
1065 **Fig. 7.** Effect of subchronic nimesulide (20 mg/Kg, p.o.) on EP1 (A), EP2 (B) and EP3
1066 (C) receptor immunoreactivity in the cerebral cortex and hippocampus after PTZ
1067 administration (50 mg/kg, i.p.). * $P < 0.05$ compared with respective saline group,
1068 # $P < 0.05$ compared with respective CMC control group (F test for simple effect). Data
1069 are presented as mean + S.E.M. for $n = 10$ in each group.
1070
1071
1072
1073
1074
1075
1076
1077

1078 3.6. Effect of subchronic celecoxib on EP1, EP2 and EP3 receptor immunoreactivity

1079
1080 Statistical analysis [two-way ANOVA: pretreatment (vehicle or celecoxib) by treatment
1081 (saline or PTZ)] revealed that neither pretreatment nor treatment altered EP1 receptor
1082 immunoreactivity in both cerebral structures (Fig. 8A). Statistical analysis of EP2
1083 receptor immunoreactivity revealed a significant effect of treatment (saline or PTZ) in
1084 the hippocampus and cerebral cortex: [$F(1,35) = 4.72$, $p = 0.037$ and $F(1,35) = 8.5$,
1085 $p = 0.006$, Fig. 8B]. *Post-hoc* analysis revealed that PTZ increased EP2 receptor
1086 immunoreactivity in the cerebral cortex and that celecoxib plus PTZ increased EP2
1087 receptor immunoreactivity in the hippocampus. Pretreatment and treatment had no
1088 effect on EP3 receptor immunoreactivity in both cerebral structures (Fig. 8C).
1089
1090
1091
1092
1093
1094
1095
1096
1097
1098
1099
1100
1101
1102
1103
1104
1105
1106
1107
1108
1109
1110
1111
1112
1113
1114
1115
1116
1117
1118
1119
1120
1121

1122
1123
1124
1125
1126
1127
1128
1129
1130
1131
1132
1133
1134
1135
1136
1137
1138
1139
1140
1141
1142
1143
1144
1145
1146
1147
1148
1149
1150
1151
1152
1153
1154
1155
1156
1157
1158
1159
1160
1161
1162
1163
1164
1165
1166
1167
1168
1169
1170
1171
1172
1173
1174
1175
1176
1177
1178
1179
1180



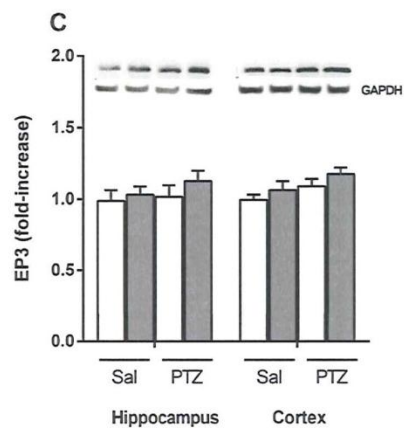
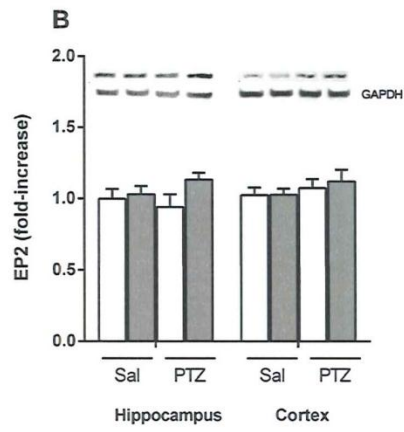
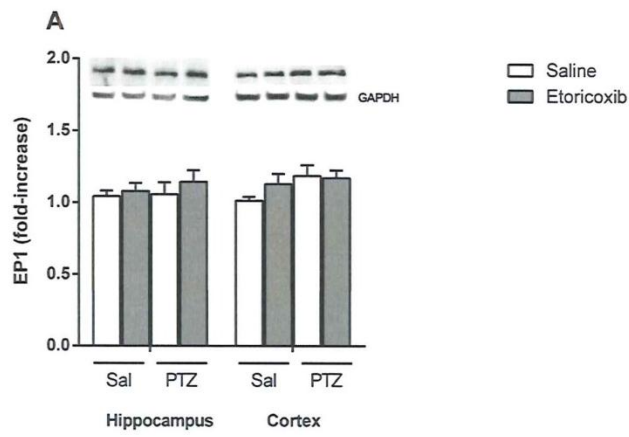
1181
1182
1183
1184
1185
1186
1187
1188
1189
1190
1191
1192
1193
1194
1195
1196
1197
1198
1199
1200
1201
1202
1203
1204
1205
1206
1207
1208
1209
1210
1211
1212
1213
1214
1215
1216
1217
1218
1219
1220
1221
1222
1223
1224
1225
1226
1227
1228
1229
1230
1231
1232
1233
1234
1235
1236
1237
1238
1239

Fig. 8. Effect of subchronic celecoxib (20 mg/Kg, p.o.) on EP1 (A), EP2 (B) and EP3 (C) receptor immunoreactivity in the cerebral cortex and hippocampus after PTZ administration (50 mg/kg, i.p.). * $P < 0.05$ compared with respective saline group, # $P < 0.05$ compared with respective CMC control group (F test for simple effect). Data are presented as mean + S.E.M. for $n = 9-10$ in each group.

3.7. Effect of subchronic etoricoxib on EP1, EP2 and EP3 receptor immunoreactivity

Statistical analysis [two-way ANOVA: pretreatment (vehicle or etoricoxib) by treatment (saline or PTZ)] of EP1 and EP2 and EP3 receptor immunoreactivity revealed no effect of treatment with etoricoxib (Figs. 9A, 9B).

1240
1241
1242
1243
1244
1245
1246
1247
1248
1249
1250
1251
1252
1253
1254
1255
1256
1257
1258
1259
1260
1261
1262
1263
1264
1265
1266
1267
1268
1269
1270
1271
1272
1273
1274
1275
1276
1277
1278
1279
1280
1281
1282
1283
1284
1285
1286
1287
1288
1289
1290
1291
1292
1293
1294
1295
1296
1297
1298



1299
1300
1301
1302
1303
1304
1305
1306
1307
1308
1309
1310
1311
1312
1313
1314
1315
1316
1317
1318
1319
1320
1321
1322
1323
1324
1325
1326
1327
1328
1329
1330
1331
1332
1333
1334
1335
1336
1337
1338
1339
1340
1341
1342
1343
1344
1345
1346
1347
1348
1349
1350
1351
1352
1353
1354
1355
1356
1357

Fig. 9. Effect of subchronic etoricoxib (20 mg/Kg, p.o.) on EP1 (A), EP2 (B) and EP3 (C) receptor immunoreactivity in the cerebral cortex and hippocampus after PTZ administration (50 mg/kg, i.p.). * $P < 0.05$ compared with respective saline group, # $P < 0.05$ compared with respective CMC control group (F test for simple effect). Data are presented as mean + S.E.M. for $n=10$ in each group.

3.8. Effect of subchronic nimesulide on PG production in the mice cerebral cortex after systemic PTZ administration

Statistical analysis [two-way ANOVA: pretreatment (vehicle or nimesulide) by treatment (saline or PTZ)] of PGE₂ levels revealed a significant pretreatment (vehicle or nimesulide) by treatment (saline or PTZ) interaction: [F(1,21)=20.3, $p < 0.001$, Fig. 10A]. *Post-hoc* analysis showed that nimesulide blunts the PTZ-induced increase of PGE₂. Nimesulide and PTZ did not alter PGF_{2 α} , TXB₂ and PGD₂ levels (Figs. 10B, C, D).

1358
 1359
 1360
 1361
 1362
 1363
 1364
 1365
 1366
 1367
 1368
 1369
 1370
 1371
 1372
 1373
 1374
 1375
 1376
 1377
 1378
 1379
 1380
 1381
 1382
 1383
 1384
 1385
 1386
 1387
 1388
 1389
 1390
 1391
 1392
 1393
 1394
 1395
 1396
 1397
 1398
 1399
 1400
 1401
 1402
 1403
 1404
 1405
 1406
 1407
 1408
 1409
 1410
 1411
 1412
 1413
 1414
 1415
 1416

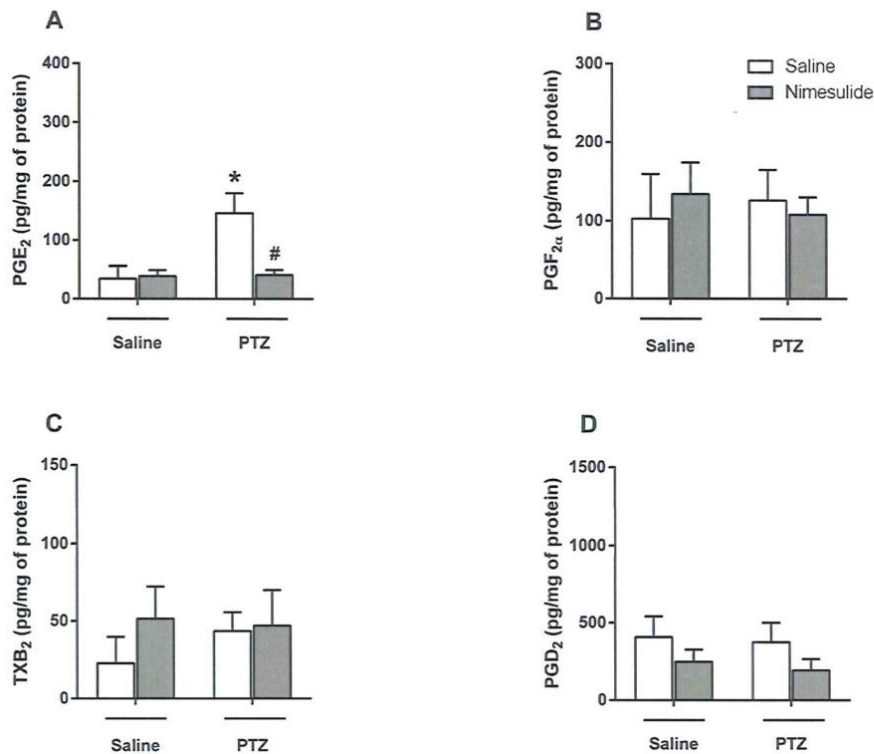


Fig. 10. Effect of subchronic nimesulide (20 mg/Kg, p.o.) on PGE₂ (A), PGF_{2α} (B), TXB₂ (C) and PGD₂ (D) levels in the cerebral cortex after PTZ administration (50 mg/kg, i.p.). * $P < 0.05$ compared with respective saline group, # $P < 0.05$ compared with respective CMC control group (F test for simple effect). Data are presented as mean + S.E.M. for $n = 6-7$ in each group.

3.9. Effect of subchronic celecoxib and systemic PTZ administration on PG levels in the cerebral cortex

Statistical analysis [two-way ANOVA: pretreatment (vehicle or celecoxib) by treatment (saline or PTZ)] of PGE₂ and PGF_{2α} levels revealed a significant effect of treatment (saline or PTZ): $F(1,18) = 11.88$, $p = 0.003$ and $F(1,18) = 9.34$, $p = 0.007$, respectively].

1417
1418
1419
1420
1421
1422
1423
1424
1425
1426
1427
1428
1429
1430
1431
1432
1433
1434
1435
1436
1437
1438
1439
1440
1441
1442
1443
1444
1445
1446
1447
1448
1449
1450
1451
1452
1453
1454
1455
1456
1457
1458
1459
1460
1461
1462
1463
1464
1465
1466
1467
1468
1469
1470
1471
1472
1473
1474
1475

Post-hoc analysis revealed that PTZ increased PGE₂ levels and that celecoxib plus PTZ increased PGF_{2α} levels in the cerebral cortex (Figs. 11A, 11B). Furthermore, celecoxib and PTZ did not alter TXB₂ levels (Fig. 11C). Statistical analysis of PGD₂ levels revealed a significant pretreatment (vehicle or celecoxib) by treatment (saline or PTZ) interaction: [F(1,18)=5.4, p<0.05]. *Post-hoc* analysis revealed that celecoxib increased PGD₂ levels only in presence of PTZ (Fig. 11D).

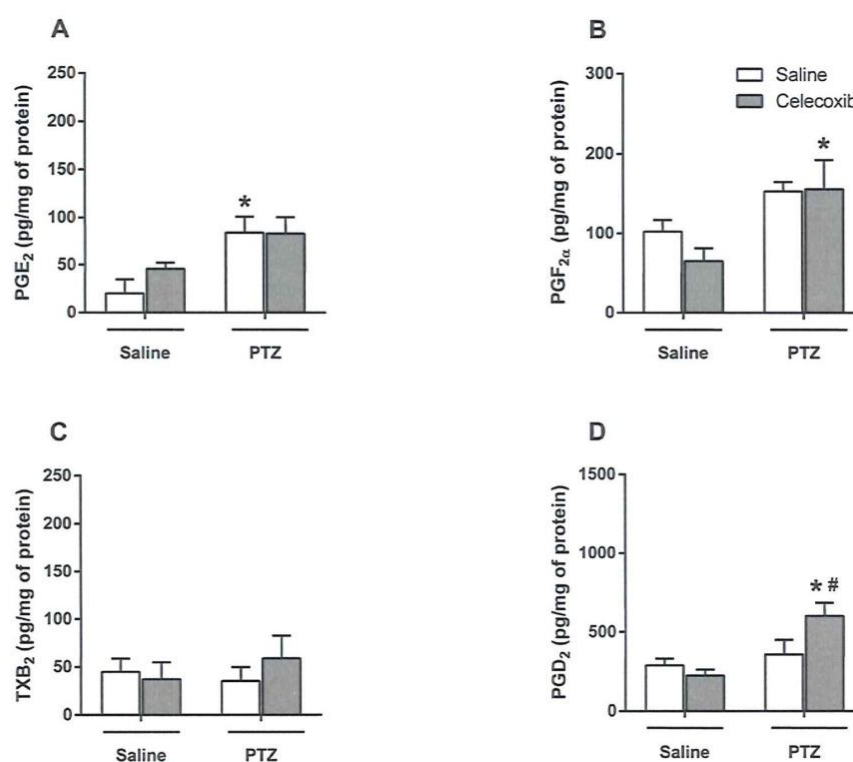


Fig. 11. Effect of subchronic celecoxib (20 mg/Kg, p.o.) on PGE₂ (A), PGF_{2α} (B), TXB₂ (C) and PGD₂ (D) levels in the cerebral cortex after PTZ administration (50 mg/kg, i.p.). *P<0.05 compared with respective saline group, #P<0.05 compared with respective CMC control group (F test for simple effect). Data are presented as mean + S.E.M. for n=5-6 in each group.

1476
1477
1478
1479
1480
1481
1482
1483
1484
1485
1486
1487
1488
1489
1490
1491
1492
1493
1494
1495
1496
1497
1498
1499
1500
1501
1502
1503
1504
1505
1506
1507
1508
1509
1510
1511
1512
1513
1514
1515
1516
1517
1518
1519
1520
1521
1522
1523
1524
1525
1526
1527
1528
1529
1530
1531
1532
1533
1534

3.10. *Effect of subchronic etoricoxib on PG production in the mice cerebral cortex after systemic PTZ administration*

Statistical analysis [two-way ANOVA: pretreatment (vehicle or etoricoxib) by treatment (saline or PTZ)] of PGE₂ levels revealed a significant pretreatment (vehicle or etoricoxib) by treatment (saline or PTZ) interaction: [F(1,20)=12.88, p=0.002]. *Post-hoc* analysis revealed that etoricoxib prevented PTZ-induced increase of PGE₂ levels (Fig. 12A). However, etoricoxib and PTZ did not alter PGF_{2α} levels (Fig. 12B). Statistical analysis of TXB₂ levels revealed a significant pretreatment (vehicle or etoricoxib) by treatment (saline or PTZ) interaction: [F(1,20)=5.09, p=0.035]. *Post-hoc* analysis revealed that PTZ increases TXB₂ levels only in the presence of saline (Fig. 12C). Statistical analysis of PGD₂ levels revealed a significant pretreatment (vehicle or etoricoxib) by treatment (saline or PTZ) interaction: [F(1,20)=7.51, p<0.02]. *Post-hoc* analysis revealed that etoricoxib prevents PTZ-induced increase of PGD₂ levels (Fig. 12D).

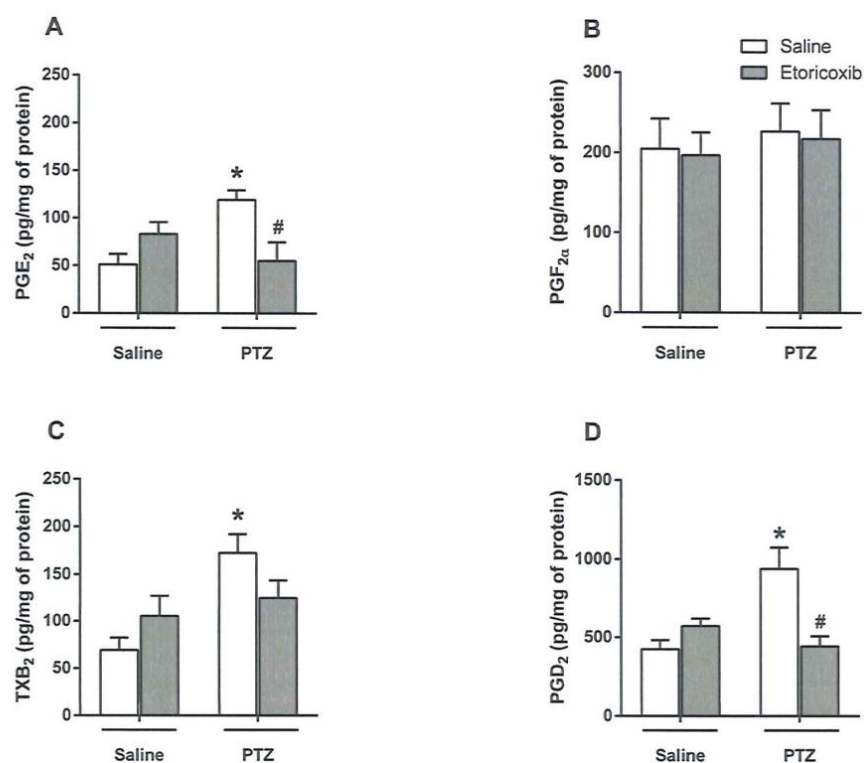


Fig. 12. Effect of subchronic etoricoxib (20 mg/Kg, p.o.) on PGE₂ (A), PGF_{2α} (B), TXB₂ (C) and PGD₂ (D) levels in the cerebral cortex after PTZ administration (50 mg/kg, i.p.). * $P < 0.05$ compared with respective saline group, # $P < 0.05$ compared with respective CMC control group (F test for simple effect). Data are presented as mean + S.E.M. for n=6 in each group.

4. Discussion

In the current study we tested the hypothesis that the subchronic administration of a COX-2 inhibitor could facilitate seizures in Swiss albino mice. Our results showed that while the subchronic administration of nimesulide and etoricoxib attenuated, celecoxib facilitated PTZ-induced seizures. Therefore, considering that three doses of three

1594
1595
1596
1597
1598
1599
1600
1601
1602
1603
1604
1605
1606
1607
1608
1609
1610
1611
1612
1613
1614
1615
1616
1617
1618
1619
1620
1621
1622
1623
1624
1625
1626
1627
1628
1629
1630
1631
1632
1633
1634
1635
1636
1637
1638
1639
1640
1641
1642
1643
1644
1645
1646
1647
1648
1649
1650
1651
1652

different COX-2 inhibitors (with different affinities for the enzyme) were used in this study, one might initially suggest that the currently observed effects may not be related to the ability of these drugs to inhibit COX-2, but to singular properties of each drug [29]. Otherwise, a similar anticonvulsant/proconvulsant profile for celecoxib, etoricoxib and nimesulide would be expected [4, 13, 36]. In fact, though all three compounds are regarded as COX-2 inhibitors they, due to their singular molecular structure, may affect other cellular targets that may contribute to the anti and proconvulsant effects reported here [37-40]. Notwithstanding, one might also consider that, upon repeated administration, the compounds might have different capacity to inhibit COX-2 activity (or cause adaptations) and, consequently, impact on PTZ-induced seizures. In line with this view, the three compounds induced different effects on PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, TXB₂ and cytokine levels, which may be related to their differential effects on seizures. For instance, celecoxib attenuated PTZ-induced increase of all proinflammatory cytokines, but not of IL-10 levels, in cerebral cortex and hippocampus. Curiously, celecoxib did not decrease the levels of the main COX-2-derived metabolites in our assays. Instead, it increased PGD₂ levels in animals injected with PTZ, a finding that may be secondary to the increased convulsions in these animals. Therefore, one might propose that repeated administration of celecoxib caused adaptive (pharmacokinetic or pharmacodynamic) changes that impaired its capacity to decrease prostaglandin production at the dose tested, though it could consistently attenuate PTZ-induced increase of proinflammatory cytokines. On the other hand, the two COX-2 inhibitors that decreased seizures, nimesulide and etoricoxib, presented a similar differential profile in what concerns the effects on COX-2-derived metabolites and IL-10 levels in our assays. Both COX-2 inhibitors decreased PTZ-induced PGE₂ levels and potentiated PTZ-induced increase of IL-10 levels. Therefore, one might argue that the anticonvulsant effect of nimesulide

1653
1654
1655
1656
1657
1658
1659
1660
1661
1662
1663
1664
1665
1666
1667
1668
1669
1670
1671
1672
1673
1674
1675
1676
1677
1678
1679
1680
1681
1682
1683
1684
1685
1686
1687
1688
1689
1690
1691
1692
1693
1694
1695
1696
1697
1698
1699
1700
1701
1702
1703
1704
1705
1706
1707
1708
1709
1710
1711

and etoricoxib are associated with the COX-2 inhibitor-induced decrease in the PGE₂ levels and increase of IL-10 levels (Figs. 4E, 6E, 10A and 12A). In fact, there a body of evidence suggesting that while PGE₂ facilitates [8, 9, 41], IL-10 attenuates seizures [42-45], supporting this view. Nimesulide and etoricoxib also attenuated PTZ-induced increase of TNF- α levels in the cerebral cortex and hippocampus and INF- γ levels in the cerebral cortex. Although TNF- α and INF- γ have been reported to facilitate seizures [46-55], the decrease in the levels of these cytokines probably plays a minor role in nimesulide- and etoricoxib-induced seizure attenuation, since celecoxib decreased all pro-inflammatory cytokines, including TNF- α and INF- γ (Fig. 4, 5 and 6), but facilitated PTZ-induced seizures.

In this study we also hypothesized that the subchronic administration of COX-2 inhibitors alters the amount of arachidonic acid derivatives in the cellular milieu and, consequently, may also alter EP receptor immunoreactivity [21]. However, the alterations in EP1 and EP2 receptor immunoreactivity found in our study does not seem to be related to alterations in basal or PTZ-induced alterations of PGE₂ levels in the cerebral cortex (Fig. 6 and 7). In fact, none of the COX-2 inhibitors altered the basal levels of PGE₂. Seizure activity also does not seem to alter EP receptor immunoreactivity, as far as etoricoxib and PTZ did not alter EP1, EP2 and EP3 immunoreactivity. In this regard, it is intriguing that in the experiments with etoricoxib, celecoxib and nimesulide we found contradicting alterations in the EP2 receptor immunoreactivity of animals injected with vehicle and PTZ. While PTZ injection increased EP2 immunoreactivity *per se* in the cerebral cortex in the experiment with celecoxib (but had no effect in the EP2 immunoreactivity in the hippocampus), it decreased EP2 immunoreactivity in the hippocampus (but had no effect in the EP2 immunoreactivity in the cerebral cortex) in the experiments with nimesulide. To further

1712
1713
1714
1715
1716
1717
1718
1719
1720
1721
1722
1723
1724
1725
1726
1727
1728
1729
1730
1731
1732
1733
1734
1735
1736
1737
1738
1739
1740
1741
1742
1743
1744
1745
1746
1747
1748
1749
1750
1751
1752
1753
1754
1755
1756
1757
1758
1759
1760
1761
1762
1763
1764
1765
1766
1767
1768
1769
1770

complicate the interpretation of the results, PTZ did not alter EP2 immunoreactivity in the experiments with etoricoxib. These puzzling results led us to suppose that the administration scheme itself (and the different levels of stress induced by one, two or three gavages a day used to respectively administer etoricoxib, celecoxib and nimesulide) could alter the PTZ-induced alteration in EP2 immunoreactivity, as far as this was the only difference between these experimental groups. Accordingly, inflammation-related stress increases EP1, EP2 and EP3 expression in the brain [56, 57], suggesting that EP receptors may be upregulated during stress. COX-2 expression (and very probably EP signaling) is also increased in the cerebral cortex by mild stress, such as forced swim and immobility [58, 59], though glucocorticoids are known to decrease COX-2 expression in the brain [58]. In summary, it is possible that the currently reported discrepant effect of PTZ on EP2 (and probably on EP1) immunoreactivity is related to the different levels of stress that these animals were subjected during the course of the experiments, and more studies are necessary to clarify this point.

5. Conclusion

In this study we showed that while subchronic administration of nimesulide and etoricoxib attenuate, celecoxib facilitates PTZ-induced seizures in male albino mice. We also present circumstantial evidence that the anticonvulsant effect of nimesulide and etoricoxib may be related to their ability to decrease PTZ-induced production of PGE₂ and increase PTZ-induced production of IL-10 in these animals.

6. Conflict of interest

1771
1772
1773
1774
1775
1776
1777
1778
1779
1780
1781
1782
1783
1784
1785
1786
1787
1788
1789
1790
1791
1792
1793
1794
1795
1796
1797
1798
1799
1800
1801
1802
1803
1804
1805
1806
1807
1808
1809
1810
1811
1812
1813
1814
1815
1816
1817
1818
1819
1820
1821
1822
1823
1824
1825
1826
1827
1828
1829

The authors declare that they have no conflict of interest. MMP was recipient of DOCFIX (CAPES/FAPERGS) fellowships. FRT, JRM, LHM, ACJ, LAG, PM, ATH and TD are recipients of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) fellowships.

7. Authors' contributions

CFM, FRT, JRM, LAG, LMC and TD conceived and designed the experiments. FRT, JRM, LHM, ATH, ACJ performed the behavioral experiments. TD performed the cytokine quantification assay. FRT and LAG performed the quantification of eicosanoids assay. FRT, JRM and PM performed the Western blot analysis. FRT, MMP, LAG and CFM analyzed the data. CFM, MMP and FRT wrote the paper. All authors read and approved the final manuscript.

8. Acknowledgements

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq and Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul-FAPERGS. CFM and LMC are the recipients of a productivity fellowship of CNPq (307812/2014-6).

Table 1: Effect of COX-2 inhibitors in seizure models

Drug	Route	Dosage/Treatment protocol	Convulsant	Effect on seizures	Animal	Ref.
	p.o.	0.2, 2 and 20 mg/kg, 60 min before PTZ	PTZ (50 mg/kg, i.p.)	No effect	Swiss mice	Temp et al., 2017 [11]
	p.o.	2 mg/kg, 60 min before PTZ	PTZ (60 mg/kg, i.p.)	Decreases seizures	male Wistar rats	Oliveira et al., 2008 [8]
	p.o.	0.2 mg/kg or 20 mg/kg, 60 min before PTZ	PTZ (60 mg/kg, i.p.)	No effect	male Wistar rats	Oliveira et al., 2008 [8]
	p.o.	2 mg/kg, 60 min before MMA	MMA (2.5 μ mol, i.c.v.)	Decreases seizures	male Wistar rats	Salvadori et al., 2012 [9]
	i.p.	10, 20 and 30 mg/kg,	Electroshock	Decreases seizures	Wistar rats	Shafiq et al., 2003 [65]
	p.o.	Approx. 1500 mg/kg/day for 6 weeks (6000 ppm in the diet)	KA (10 mg/kg, i.p.)	Increases seizures	C57Bl/6-129/Ola	Toscano et al., 2008 [13]
	p.o.	Approx. 750 mg/kg/day for 6 weeks (3000 ppm in the diet)	KA (10 mg/kg, i.p.)	No effect	C57Bl/6-129/Ola	Toscano et al., 2008 [13]
	p.o.	10 mg/kg, 60 min before KA or 10–20 min after KA	KA (10 or 20 mg/kg, i.p.)	Increases seizures	ICR mice	Kim et al., 2008 [15]
Celecoxib	i.p.	10 mg/kg, 30 min before KA	KA (50 mg/kg, i.p.)	No effect	Adult male Mice	Baik et al., 1999 [3]
	i.p.	2.5-5 mg/kg, 60 min before PTZ	PTZ (80 mg/kg, i.p.)	Decreases seizures	Adult male Swiss mice	Zandieh et al., 2010 [12]
	i.p.	1 mg/kg, 60 min before PTZ	PTZ (80 mg/kg, i.p.)	No effect	Adult male Swiss mice	Zandieh et al., 2010 [12]
	p.o.	20 mg/kg, 14 and 28 days after SE onset	Pilocarpine (30 mg/kg, i.p.)	Decreases seizures	Male Sprague-Dawley rats	Jung et al., 2006 [2]
	i.p.	20 mg/kg, 7 injections in 12-h intervals of either	Pilocarpine (30 mg/kg, i.p.)	Decreases seizures-induced up-regulation of P-glycoprotein expression in brain capillaries	Male Sprague-Dawley rats	Zibell et al., 2009 [64]
	i.p.	6 mg/kg. Before KA injection: once a day for 5 days or once 2 h prior to KA; after KA injection: once a day for 5 days or once 2	KA (12 or 6 mg/kg, i.p.)	Increases seizures	Male Wistar rats	Gobbo and O'Mara, 2004 [14]

1871
1872
1873
1874
1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900
1901
1902
1903
1904
1905
1906
1907
1908
1909
1910
1911

h post KA-treatment						
	i.p.	10 mg/kg, 30 min before kindling	Electrical stimulation of amygdala	No effect	Male NMRI mice	Fischhorn et al., 2010 [63]
Paracetamol	i.p.	10 mg/kg twice a day for 18 days following SE	Pilocarpine (30 mg/kg, i.p.)	Decreases severity of spontaneous seizures	Female Sprague-Dawley rats	Pollaschek et al., 2010 [1]
	p.o.	20 mg/kg, 60 min before PTZ	PTZ (50 mg/kg, i.p.)	Decreases seizures	Male Swiss mice	Temp et al., 2017 [11]
	p.o.	0.2 and 2 mg/kg, 60 min before PTZ	PTZ (50 mg/kg, i.p.)	No effect	Male Swiss mice	Temp et al., 2017 [11]
	p.o.	2.5 and 5 mg/kg, 45 min before PTZ	PTZ (80 mg/kg, i.p.)	Decreases seizures	Male Laka mice	Dhir et al., 2006 [22]
	i.p.	2.5 mg/kg, 60 min before bicuculline	Bicuculline (4 mg/kg, i.p.)	Decreases seizures	Male Laka mice	Dhir et al., 2006 [17]
	i.p.	2.5 mg/kg, 60 min before picrotoxin	Picrotoxin (8 mg/kg, i.p.)	Decreases seizures	Male Laka mice	Dhir et al., 2006 [17]
Nimesulide	i.p.	2.5 mg/kg, 60 min before MIES	Electroshock	No effect	Male Laka mice	Dhir et al., 2006 [17]
	i.p.	10 mg/kg, 60 min before KA or 10–20 min after KA	KA (10 or 20 mg/kg, i.p.)	Increases seizures	Male ICR mice	Kim et al., 2008 [15]
	p.o.	2.5 or 5 mg/kg, 45 min before either PTZ injection	PTZ (40 mg/kg, i.p.)	Decreases seizures	Male Laka mice	Dhir et al., 2007 [4]
	i.p.	10 mg/kg, 1 hr before and 8 hr after KA injection, twice daily for two additional days	KA (10 mg/kg, i.p.)	Increases seizures	Male Sprague-Dawley rats	Kunz and Olivé, 2001 [16]
	p.o.	0.2 and 2 mg/kg, 60 min before PTZ	PTZ (50 mg/kg, i.p.)	No effect	Male Swiss mice	Temp et al., 2017 [11]
Etoricoxib	p.o.	10 mg/kg/day for 17 consecutive weeks	epileptogenic process underlying the development of absence seizures	Decreases seizures	Male WAG/Rij rats	Citraro et al., 2015 [36]
	i.p.	1 mg/kg and 10 mg/kg in kindled rats for nine days (days 6–14)	PTZ (30 mg/kg, i.p.)	1 mg/kg: anticonvulsant effect; 10 mg/kg: anticonvulsant effect reduced or	Male Wistar rats	Kanyal et al., 2015 [60]

1912
1913
1914
1915
1916
1917
1918
1919
1920
1921
1922
1923
1924
1925
1926
1927
1928
1929
1930
1931
1932
1933
1934
1935
1936
1937
1938
1939
1940
1941
1942
1943
1944
1945
1946
1947
1948
1949
1950
1951
1952

		reversed			
	i.p.	10 mg/kg, 30 min before KA	KA (50mg/kg, i.p.)	Increases seizures	Adult male Mice Baik et al., 1999 [3]
	p.o.	10 mg/kg, 5 doses 12/12h and 30 min before KA	KA (10mg/kg, i.p.)	No effect	Kim et al., 2000 [61]
NS-398	i.p.	10 mg/kg, twice daily for 3 days. On the fourth day the animals received a seventh injection (NS-398 or vehicle) 1 h prior to decapitation	Pilocarpine (10 mg/kg)	Decreases SE-associated increase in P-glycoprotein expression	Female Wistar (Inlever rats) van Vliet et al., 2010 [62]
	i.p.	10 mg/kg, 30 min before electrical stimulation	Electrical stimulation of amygdala	No effect	Adult male NMRI mice Fischborn et al., 2010 [63]
	p.o.	2 and 4 mg/kg, 45 min before PTZ	PTZ (80 mg/kg, i.p.)	Decreases seizures	Male Laka mice Dhir et al., 2006 [5]
	i.p.	2.5 mg/kg, 60 min before bicuculline	Bicuculline (4 mg/kg, i.p.)	Decreases seizures	Male Laka mice Dhir et al., 2006 [17]
	i.p.	2.5 mg/kg, 60 min before picrotoxin	Picrotoxin (8 mg/kg, i.p.)	Decreases seizures	Male Laka mice Dhir et al., 2006 [17]
Rofecoxib	i.p.	2 mg/kg, 60 min before electroshock	Electroshock	Decreases seizures	Male Laka mice Dhir et al., 2006 [17]
	i.p.	2 and 4 mg/kg, 45 min before PTZ	PTZ (threshold)	Decreases seizure	Male Laka mice Akula et al., 2008 [10]
	p.o.	30 mg/kg/day for 5 days	55 mg/kg PTZ (acute paradigm) or 40 mg/kg PTZ delivered daily (kindling paradigm)	No effect	Male CDI mice Claycomb et al., 2011 [6]
	p.o.	30 mg/kg, 60 min before PTZ	PTZ (60 mg/kg, i.p.)	Increases seizures	Female C57BL/6 mice Claycomb et al., 2012 [7]

i.p.: intraperitoneally; p.o.: oral route (gavage); K.A.: Kainic acid; SE: status epilepticus; PTZ: pentylenetetrazol; MMA: methylmalonate.

1953
1954
1955
1956
1957
1958
1959
1960
1961
1962
1963
1964
1965
1966
1967
1968
1969
1970
1971
1972
1973
1974
1975
1976
1977
1978
1979
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990
1991
1992
1993
1994
1995
1996
1997
1998
1999
2000
2001
2002
2003
2004
2005
2006
2007
2008
2009
2010
2011

39. References

- 4 [1] Polascheck N, Bankstahl M, Loscher W. The COX-2 inhibitor parecoxib is neuroprotective but not antiepileptogenic in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol* 2010, 224:219-233.
- 5
6
7 [2] Jung KH, Chu K, Lee ST, Kim J, Sinn DI, Kim JM, Park DK, Lee JJ, Kim SU, Kim M, Lee SK, Roh JK. Cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, inhibits the altered hippocampal neurogenesis with attenuation of spontaneous recurrent seizures following pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurobiol Dis* 2006, 23:237-246.
- 8
9
10
11
12 [3] Baik EJ, Kim EJ, Lee SH, Moon C. Cyclooxygenase-2 selective inhibitors aggravate kainic acid induced seizure and neuronal cell death in the hippocampus. *Brain Res* 1999, 843:118-129.
- 13
14
15 [4] Dhir A, Naidu PS, Kulkarni SK. Neuroprotective effect of nimesulide, a preferential COX-2 inhibitor, against pentylenetetrazol (PTZ)-induced chemical kindling and associated biochemical parameters in mice. *Seizure* 2007, 16:691-697.
- 16
17
18
19 [5] Dhir A, Naidu PS, Kulkarni SK. Effect of rofecoxib, a cyclo-oxygenase-2 inhibitor, on various biochemical parameters of brain associated with pentylenetetrazol-induced chemical kindling in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 2006, 20:255-261.
- 20
21
22
23 [6] Claycomb RJ, Hewett SJ, Hewett JA. Prophylactic, prandial rofecoxib treatment lacks efficacy against acute PTZ-induced seizure generation and kindling acquisition. *Epilepsia* 2011, 52:273-283.
- 24
25
26 [7] Claycomb RJ, Hewett SJ, Hewett JA. Neuromodulatory role of endogenous interleukin-1beta in acute seizures: possible contribution of cyclooxygenase-2. *Neurobiol Dis* 2012, 45:234-242.
- 27
28
29 [8] Oliveira MS, Furian AF, Royes LF, Figuera MR, Fiorenza NG, Castelli M, Machado P, Bohrer D, Veiga M, Ferreira J, Cavalheiro EA, Mello CF. Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsy Res* 2008, 79:14-21.
- 30
31
32
33 [9] Salvadori MG, Bandero CR, Jesse AC, Gomes AT, Rambo LM, Bueno LM, Bortoluzzi VT, Oliveira MS, Mello CF. Prostaglandin E(2) potentiates methylmalonate-induced seizures. *Epilepsia* 2012, 53:189-198.
- 34
35
36 [10] Akula KK, Dhir A, Kulkarni SK. Rofecoxib, a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor increases pentylenetetrazol seizure threshold in mice: possible involvement of adenosinergic mechanism. *Epilepsy Res* 2008, 78:60-70.
- 37
38
39
40 [11] Temp FR, Marafija JR, Milanese LH, Duarte T, Rambo LM, Pillat MM, Mello CF. 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* 2017, 810:15-25.
- 41
42
43
44 [12] Zandieh A, Maleki F, Hajimirzabeigi A, Zandieh B, Khalilzadeh O, Dehpour AR. Anticonvulsant effect of celecoxib on pentylenetetrazole-induced convulsion: Modulation by NO pathway. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2010, 70:390-397.
- 45
46
47
48 [13] Toscano CD, Ueda Y, Tomita YA, Vicini S, Bosetti F. Altered GABAergic neurotransmission is associated with increased kainate-induced seizure in prostaglandin-endoperoxide synthase-2 deficient mice. *Brain Res Bull* 2008, 75:598-609.
- 49
50
51

2012
 2013
 2014
 2015
 2016
 2017
 2018
 2019
 2020
 2021
 2022
 2023
 2024
 2025
 2026
 2027
 2028
 2029
 2030
 2031
 2032
 2033
 2034
 2035
 2036
 2037
 2038
 2039
 2040
 2041
 2042
 2043
 2044
 2045
 2046
 2047
 2048
 2049
 2050
 2051
 2052
 2053
 2054
 2055
 2056
 2057
 2058
 2059
 2060
 2061
 2062
 2063
 2064
 2065
 2066
 2067
 2068
 2069
 2070

- 52 [14] Gobbo OL, O'Mara SM. Post-treatment, but not pre-treatment, with the selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib markedly enhances functional recovery from kainic acid-induced neurodegeneration. *Neuroscience* 2004, 125:317-327.
- 53
- 54
- 55 [15] Kim HJ, Chung JI, Lee SH, Jung YS, Moon CH, Baik EJ. Involvement of endogenous prostaglandin F2alpha on kainic acid-induced seizure activity through FP receptor: the mechanism of proconvulsant effects of COX-2 inhibitors. *Brain Res* 2008, 1193:153-161.
- 56
- 57
- 58
- 59 [16] Kunz T, Oliw EH. Nimesulide aggravates kainic acid-induced seizures in the rat. *Pharmacol Toxicol* 2001, 88:271-276.
- 60
- 61 [17] Dhir A, Naidu PS, Kulkarni SK. Effect of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in various animal models (bicuculline, picrotoxin, maximal electroshock-induced convulsions) of epilepsy with possible mechanism of action. *Indian J Exp Biol* 2006, 44:286-291.
- 62
- 63
- 64
- 65 [18] Rojas A, Jiang J, Ganesh T, Yang MS, Lelutiu N, Gueorguieva P, Dingledine R. Cyclooxygenase-2 in epilepsy. *Epilepsia* 2014, 55:17-25.
- 66
- 67 [19] Shimada T, Takemiya T, Sugiura H, Yamagata K. Role of inflammatory mediators in the pathogenesis of epilepsy. *Mediators Inflamm* 2014, 2014:901902.
- 68
- 69
- 70 [20] Dey A, Kang X, Qiu J, Du Y, Jiang J. Anti-Inflammatory Small Molecules To Treat Seizures and Epilepsy: From Bench to Bedside. *Trends Pharmacol Sci* 2016, 37:463-484.
- 71
- 72
- 73 [21] Radu BM, Epureanu FB, Radu M, Fabene PF, Bertini G. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in clinical and experimental epilepsy. *Epilepsy Res* 2017, 131:15-27.
- 74
- 75
- 76 [22] Dhir A, Naidu PS, Kulkarni SK. Effect of cyclooxygenase inhibitors on pentylenetetrazol (PTZ)-induced convulsions: Possible mechanism of action. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006, 30:1478-1485.
- 77
- 78
- 79 [23] Caracciolo L, Barbon A, Palumbo S, Mora C, Toscano CD, Bosetti F, Barlati S. Altered mRNA editing and expression of ionotropic glutamate receptors after kainic acid exposure in cyclooxygenase-2 deficient mice. *PLoS One* 2011, 6:e19398.
- 80
- 81
- 82
- 83 [24] Oliveira MS, Furian AF, Rambo LM, Ribeiro LR, Royes LF, Ferreira J, Calixto JB, Mello CF. Modulation of pentylenetetrazol-induced seizures by prostaglandin E2 receptors. *Neuroscience* 2008, 152:1110-1118.
- 84
- 85
- 86 [25] Santos AC, Temp FR, Marafija JR, Pillat MM, Hessel AT, Ribeiro LR, Miyazato LG, Oliveira MS, Mello CF. EP2 receptor agonist ONO-AE1-259-01 attenuates pentylenetetrazole- and pilocarpine-induced seizures but causes hippocampal neurotoxicity. *Epilepsy Behav* 2017, 73:180-188.
- 87
- 88
- 89
- 90 [26] Renner B, Zacher J, Buvanendran A, Walter G, Strauss J, Brune K. Absorption and distribution of etoricoxib in plasma, CSF, and wound tissue in patients following hip surgery--a pilot study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2010, 381:127-136.
- 91
- 92
- 93
- 94 [27] Dembo G, Park SB, Kharasch ED. Central nervous system concentrations of cyclooxygenase-2 inhibitors in humans. *Anesthesiology* 2005, 102:409-415.
- 95
- 96 [28] Ferrario P, Bianchi M. Simultaneous determination of nimesulide and hydroxynimesulide in rat plasma, cerebrospinal fluid and brain by liquid chromatography using solid-phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003, 785:227-236.
- 97
- 98
- 99
- 100 [29] Shi S, Klotz U. Clinical use and pharmacological properties of selective COX-2 inhibitors. *European Journal of Clinical Pharmacology* 2008, 64:233-252.
- 101

- 2071
2072
2073
2074 102 [30] Ferraro TN, Golden GT, Smith GG, St Jean P, Schork NJ, Mulholland N, Ballas
2075 103 C, Schill J, Buono RJ, Berrettini WH. Mapping loci for pentylenetetrazol-
2076 104 induced seizure susceptibility in mice. *J Neurosci* 1999, 19:6733-6739.
2077 105 [31] Luttjohann A, Fabene PF, van Luijtelaar G. A revised Racine's scale for PTZ-
2078 106 induced seizures in rats. *Physiol Behav* 2009, 98:579-586.
2079 107 [32] Masoodi M, Nicolaou A. Lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and
2080 108 isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry.
2081 109 *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006, 20:3023-3029.
2082 110 [33] Anoopkumar-Dukie S, Lack B, McPhail K, Nyokong T, Lambat Z, Maharaj D,
2083 111 Daya S. Indomethacin reduces lipid peroxidation in rat brain homogenate by
2084 112 binding Fe²⁺. *Metab Brain Dis* 2003, 18:1-9.
2085 113 [34] Golovko MY, Murphy EJ. An improved LC-MS/MS procedure for brain
2086 114 prostanoid analysis using brain fixation with head-focused microwave
2087 115 irradiation and liquid-liquid extraction. *J Lipid Res* 2008, 49:893-902.
2088 116 [35] Keppel G, Wickens TD. *Design and Analysis: a Researcher's Handbook*, 2004,
2089 117 Chapter 12, p. 242-265, Pearson Prentice Hall, New Jersey, USA.
2090 118 [36] Citraro R, Leo A, Marra R, De Sarro G, Russo E. Antiepileptogenic effects of
2091 119 the selective COX-2 inhibitor etoricoxib, on the development of spontaneous
2092 120 absence seizures in WAG/Rij rats. *Brain Res Bull* 2015, 113:1-7.
2093 121 [37] Maier TJ, Tausch L, Hoernig M, Coste O, Schmidt R, Angioni C, Metzner J,
2094 122 Groesch S, Pergola C, Steinhilber D, Werz O, Geisslinger G. Celecoxib inhibits
2095 123 5-lipoxygenase. *Biochem Pharmacol* 2008, 76:862-872.
2096 124 [38] Glaser ST, Kaczocha M. Cyclooxygenase-2 mediates anandamide metabolism in
2097 125 the mouse brain. *J Pharmacol Exp Ther* 2010, 335:380-388.
2098 126 [39] Holtman L, van Vliet EA, van Schaik R, Queiroz CM, Aronica E, Gorter JA.
2099 127 Effects of SC58236, a selective COX-2 inhibitor, on epileptogenesis and
2100 128 spontaneous seizures in a rat model for temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Res*
2101 129 2009, 84:56-66.
2102 130 [40] Holtman L, van Vliet EA, Edelbroek PM, Aronica E, Gorter JA. Cox-2
2103 131 inhibition can lead to adverse effects in a rat model for temporal lobe epilepsy.
2104 132 *Epilepsy Res* 2010, 91:49-56.
2105 133 [41] Takemiya T, Yamagata K. Intercellular signaling pathway among Endothelia,
2106 134 astrocytes and neurons in excitatory neuronal damage. *Int J Mol Sci* 2013,
2107 135 14:8345-8357.
2108 136 [42] Levin SG, Godukhin OV. Protective effects of interleukin-10 on the
2109 137 development of epileptiform activity evoked by transient episodes of hypoxia in
2110 138 rat hippocampal slices. *Neurosci Behav Physiol* 2007, 37:467-470.
2111 139 [43] Godukhin OV, Levin SG, Parnyshkova EY. The effects of interleukin-10 on the
2112 140 development of epileptiform activity in the hippocampus induced by transient
2113 141 hypoxia, bicuculline, and electrical kindling. *Neurosci Behav Physiol* 2009,
2114 142 39:625-631.
2115 143 [44] Leon LR, Kozak W, Kluger MJ. Role of IL-10 in inflammation. Studies using
2116 144 cytokine knockout mice. *Ann N Y Acad Sci* 1998, 856:69-75.
2117 145 [45] Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat*
2118 146 *Rev Immunol* 2010, 10:170-181.
2119 147 [46] Gomez CD, Buijs RM, Sitges M. The anti-seizure drugs vinpocetine and
2120 148 carbamazepine, but not valproic acid, reduce inflammatory IL-1beta and TNF-
2121 149 alpha expression in rat hippocampus. *J Neurochem* 2014, 130:770-779.
2122
2123
2124
2125
2126
2127
2128
2129

- 2130
2131
2132 150 [47] Abdallah DM. Anticonvulsant potential of the peroxisome proliferator-activated
2133 151 receptor gamma agonist pioglitazone in pentylenetetrazole-induced acute
2134 152 seizures and kindling in mice. *Brain Res* 2010, 1351:246-253.
- 2135 153 [48] Rodriguez RV, Dorce VA, de Freitas LA, Dorce AL, Lebrun I, Sobral AC,
2136 154 Portaro FC, Kuniyoshi AK, Carvalho DC, Nencioni AL. Intrahippocampal
2137 155 injection of TsTX-I increases the levels of INF-gamma in the cerebral tissue but
2138 156 not the levels of glutamate. *Toxicon* 2015, 103:155-159.
- 2140 157 [49] de Souza Bernardino TC, Teixeira AL, Miranda AS, Guidine PM, Rezende G,
2141 158 Doretto MC, Castro GP, Drummond L, Moraes MF, Tito PA, de Oliveira AC,
2142 159 Reis HJ. Wistar Audiogenic Rats (WAR) exhibit altered levels of cytokines and
2143 160 brain-derived neurotrophic factor following audiogenic seizures. *Neurosci Lett*
2144 161 2015, 597:154-158.
- 2145 162 [50] Chiu KM, Wu CC, Wang MJ, Lee MY, Wang SJ. Protective effects of
2146 163 bupivacaine against kainic acid-induced seizure and neuronal cell death in the
2147 164 rat hippocampus. *Biol Pharm Bull* 2015, 38:522-530.
- 2148 165 [51] Minami M, Kuraishi Y, Satoh M. Effects of kainic acid on messenger RNA
2149 166 levels of IL-1 beta, IL-6, TNF alpha and LIF in the rat brain. *Biochem Biophys*
2150 167 *Res Commun* 1991, 176:593-598.
- 2151 168 [52] Arisi GM, Foresti ML, Katki K, Shapiro LA. Increased CCL2, CCL3, CCL5,
2152 169 and IL-1beta cytokine concentration in piriform cortex, hippocampus, and
2153 170 neocortex after pilocarpine-induced seizures. *J Neuroinflammation* 2015,
2154 171 12:129.
- 2156 172 [53] Al-Shorbagy MY, El Sayeh BM, Abdallah DM. Additional antiepileptic
2157 173 mechanisms of levetiracetam in lithium-pilocarpine treated rats. *PLoS One*
2158 174 2013, 8:e76735.
- 2159 175 [54] Lima IV, Campos AC, Miranda AS, Vieira EL, Amaral-Martins F, Vago JP,
2160 176 Santos RP, Sousa LP, Vieira LB, Teixeira MM, Fiebich BL, Moraes
2161 177 MF, Teixeira AL, de Oliveira AC. PI3Kgamma deficiency enhances seizures
2162 178 severity and associated outcomes in a mouse model of convulsions induced by
2163 179 intrahippocampal injection of pilocarpine. *Exp Neurol* 2015, 267:123-134.
- 2164 180 [55] De Simoni MG, Perego C, Ravizza T, Moneta D, Conti M, Marchesi F, De
2165 181 Luigi A, Garattini S, Vezzani A. Inflammatory cytokines and related genes are
2166 182 induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci*
2167 183 2000, 12:2623-2633.
- 2168 184 [56] Zhang J, Rivest S. Distribution, regulation and colocalization of the genes
2169 185 encoding the EP2- and EP4-PGE2 receptors in the rat brain and neuronal
2170 186 responses to systemic inflammation. *Eur J Neurosci* 1999, 11:2651-2668.
- 2171 187 [57] Ma Y, Matsuwaki T, Yamanouchi K, Nishihara M. Glucocorticoids Suppress
2172 188 the Protective Effect of Cyclooxygenase-2-Related Signaling on Hippocampal
2173 189 Neurogenesis Under Acute Immune Stress. *Mol Neurobiol* 2017, 54:1953-1966.
- 2174 190 [58] Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE, Barnes CA, Worley PF.
2175 191 Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation
2176 192 by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron* 1993, 11:371-386.
- 2177 193 [59] Garcia-Bueno B, Madrigal JL, Perez-Nievas BG, Leza JC. Stress mediators
2178 194 regulate brain prostaglandin synthesis and peroxisome proliferator-activated
2179 195 receptor-gamma activation after stress in rats. *Endocrinology* 2008, 149:1969-
2180 196 1978.
- 2181 197 [60] Katyal J, Kumar H, Gupta YK. Anticonvulsant activity of the cyclooxygenase-2
2182 198 (COX-2) inhibitor etoricoxib in pentylenetetrazole-kindled rats is associated
2183 199 with memory impairment. *Epilepsy Behav* 2015, 44:98-103.
- 2184
2185
2186
2187
2188

2189		
2190		
2191	200	[61] Kim HC, Jhoo WK, Bing G, Shin EJ, Wie MB, Kim WK, Ko KH. Phenydone
2192	201	prevents kainate-induced neurotoxicity via antioxidant mechanisms. <i>Brain Res</i>
2193	202	2000, 874:15-23.
2194		
2195	203	[62] van Vliet EA, Zibell G, Pekcec A, Schlichtiger J, Edelbroek PM, Holtman L,
2196	204	Aronica E, Gorter JA, Potschka H. COX-2 inhibition controls P-glycoprotein
2197	205	expression and promotes brain delivery of phenytoin in chronic epileptic rats.
2198	206	<i>Neuropharmacology</i> 2010, 58:404-412.
2199	207	[63] Fischborn SV, Soerensen J, Potschka H. Targeting the prostaglandin E2 EP1
2200	208	receptor and cyclooxygenase-2 in the amygdala kindling model in mice.
2201	209	<i>Epilepsy Res</i> 2010, 91:57-65.
2202	210	[64] Zibell G, Unkruer B, Pekcec A, Hartz AM, Bauer B, Miller DS, Potschka H.
2203	211	Prevention of seizure-induced up-regulation of endothelial P-glycoprotein by
2204	212	COX-2 inhibition. <i>Neuropharmacology</i> 2009, 56:849-855.
2205	213	[65] Shafiq N, Malhotra S, Pandhi P. Anticonvulsant action of celecoxib (alone and
2206	214	in combination with sub-threshold dose of phenytoin) in electroshock induced
2207	215	convulsion. <i>Methods Find Exp Clin Pharmacol</i> 2003, 25:87-90.
2208	216	
2209	217	
2210		
2211	218	
2212		
2213	219	
2214		
2215	220	
2216		
2217	221	
2218		
2219	222	
2220		
2221	223	
2222		
2223	224	
2224		
2225	225	
2226		
2227	226	
2228		
2229	227	
2230		
2231	228	
2232		
2233	229	
2234		
2235	230	
2236		
2237	231	
2238		
2239	232	
2240		
2241	233	
2242		
2243		
2244		
2245		
2246		
2247		

Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia



PHARMACOLOGICAL RESEARCH

December 15, 2017.

All authors declare that they have no conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work.

Sincerely,

Corresponding Author

A handwritten signature in black ink that reads "Carlos Mello".

Carlos Fernando Mello, MD, PhD

Full Professor, Department of Physiology and Pharmacology,
Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, BRASIL,
e-mail: cf.mello@smail.ufsm.br Tel. +55-55-3220 8870

A handwritten signature in black ink that reads "Micheli Mainardi Pillat".

Micheli Mainardi Pillat, MD, PhD

Department of Physiology and Pharmacology,
Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, BRASIL,
e-mail: mmpillat@gmail.com Tel. +55-55-3220 8870

4 DISCUSSÃO INTEGRADA

Os resultados apresentados nesta tese mostraram que o tratamento agudo e subcrônico com os inibidores da COX-2 nimesulida, celecoxibe e etoricoxibe alteram o desenvolvimento de crises convulsivas induzidas por PTZ. No primeiro artigo observamos que a administração aguda de nimesulida atenuou as crises convulsivas induzidas por PTZ, entretanto celecoxibe e etoricoxibe não alteraram as crises. Indo de encontro aos resultados apresentados nesta tese, estudos do nosso grupo de pesquisa verificaram que o tratamento com celecoxibe pela via oral previne o desenvolvimento das crises convulsivas induzidas por PTZ e ácido metilmalônico em ratos (OLIVEIRA et al., 2008a, SALVADORI et al., 2012). Além do mais foi visto que, a injeção i.c.v. de PGE₂ facilita o aparecimento das crises convulsivas induzidas por estes agentes convulsivantes, e diminui a atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase no hipocampo de ratos (OLIVEIRA et al., 2009). Também, a administração de anticorpos monoclonais anti-PGE₂ atenua as crises convulsivas induzidas por PTZ (OLIVEIRA et al., 2008a) (Figura 13). Em nosso estudo verificamos ainda, que enquanto etoricoxibe não modificou, nimesulida e celecoxibe atenuaram o aumento das citocinas pró-inflamatórias induzido por PTZ. Visto que em nosso estudo a nimesulida foi o único inibidor da COX-2 que potencializou o aumento de IL-10 induzido por PTZ, sugerimos que o efeito anticonvulsivante da nimesulida pode estar causalmente relacionado ao aumento dos níveis de IL-10. Sabe-se que as propriedades anti-inflamatórias da IL-10 têm sido atribuídas à supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias (O'GARRA et al., 2008; LEON et al., 1998), tais como as avaliadas nesta tese (IL-1 β , IL-6, INF- γ e TNF- α). Além disso, estudos na literatura evidenciam um papel anticonvulsivante da IL-10, uma vez que esta citocina protege contra o desenvolvimento da atividade epileptiforme provocadas por episódios transitórios de hipóxia em fatias hipocampais de ratos (LEVIN E GODUKHIN, 2007) e suprime o desenvolvimento de descargas ictais focais induzidas por abrasamento (GODUKHIN et al., 2009).

No segundo artigo verificamos que enquanto a administração subcrônica de nimesulida e etoricoxibe atenuaram, celecoxibe facilitou as crises convulsivas induzidas por PTZ. Também observamos que a administração subcrônica de celecoxibe atenuou o aumento de todas as citocinas pró-inflamatórias induzidas por PTZ, enquanto que nimesulida e etoricoxibe atenuaram somente TNF- α e INF- γ no hipocampo e córtex cerebral. A administração subcrônica de celecoxibe não teve efeito nos níveis de IL-10 e PGE₂, contudo nimesulida e etoricoxibe potencializaram o aumento nos níveis de IL-10 induzido por PTZ no hipocampo e córtex cerebral, e diminuíram os níveis de PGE₂ no córtex cerebral. Nossas

descobertas de que nimesulida e etoricoxibe aumentam a produção de IL-10 e diminuem PGE₂, concordam com os achados de que a PGE₂, via receptor EP2, inibe a produção de IL-10 induzida por LPS em micróglia. Similarmente aos nossos achados, a interrupção da atividade da COX-2 por NS-398 e Dup-697 e a deleção do gene COX-2 aumentam a produção de IL-10 induzida por LPS na micróglia (CHU et al., 2015). Adicionalmente, demonstrando a estreita relação entre COX-2/PGE₂ e IL-10, a via oposta também foi observada, ou seja, a citocina IL-10 é capaz de reduzir a expressão de COX-2 e logo, a produção de PGE₂ (BERG et al., 2001). Nesse contexto, observamos que somente administração subcrônica de nimesulida e etoricoxibe foi capaz de induzir um significativo aumento de IL-10 ao longo dos 14 dias de tratamento, resultando assim em uma menor produção de PGE₂ e conseqüentemente atenuação das crises. Concluímos também que doses repetidas, em intervalos que representem a meia-vida, são necessárias para se obter a concentração máxima plasmática suficiente para alcançar os efeitos sobre as crises. Entretanto, administração subcrônica de celecoxibe não potencializou o aumento dos níveis de IL-10 induzidos por PTZ e não diminuiu os níveis de PGE₂, e facilitou episódios convulsivos.

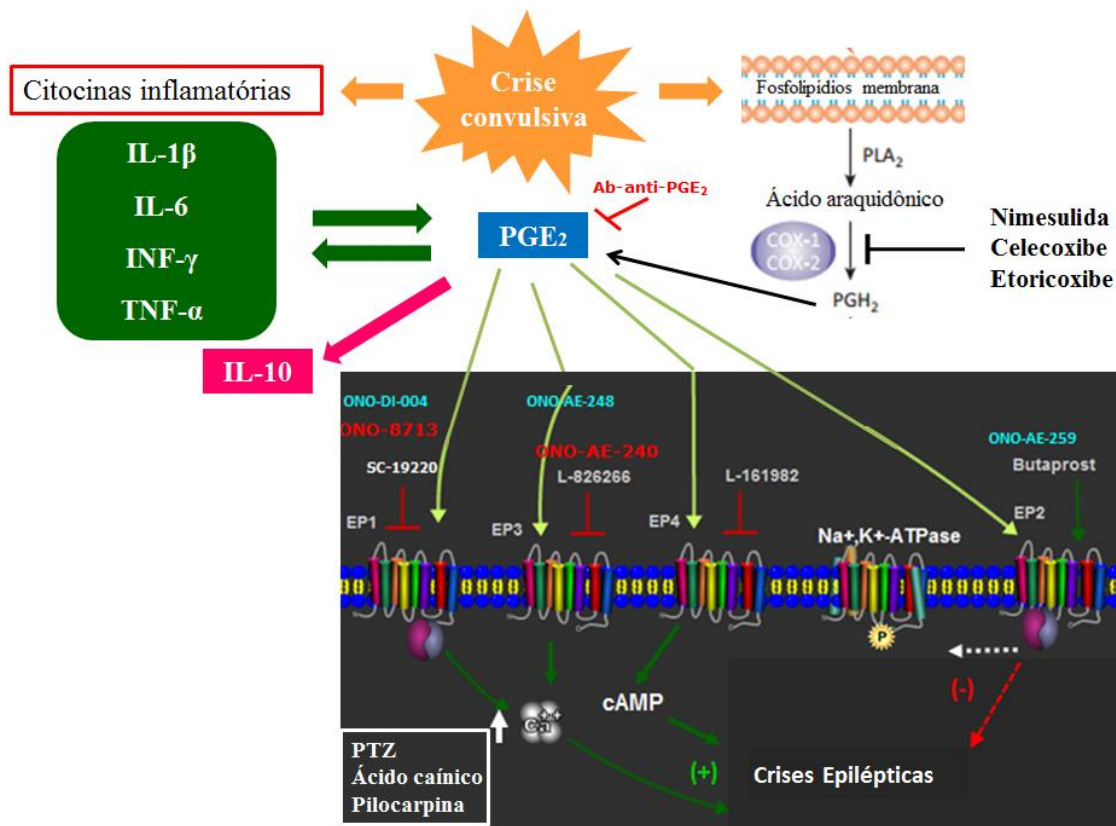
Estudos como de Maier e colaboradores (2008) observaram que celecoxibe inibe a enzima 5-LOX, enzima chave na síntese de LTs e que animais que receberam celecoxibe (i.p.), apresentam níveis reduzidos de LTB₄ no sangue. Esses autores observaram, ainda, que o celecoxibe não afetou a expressão de 12-LOX e 15-LOX. Curiosamente, outros inibidores da COX-2 ou AINES não seletivos não inibem a 5-LOX. Estes resultados fornecem uma possível base molecular para alguns dos efeitos farmacológicos do celecoxibe independentes da inibição da COX-2. Entretanto, estudos como de Fowler e colaboradores (2003) relataram que inibidores da COX-2 como celecoxibe têm efeito sobre o metabolismo de endocanabinóides através da inibição da atividade da enzima ácido graxo amida hidrolase (FAAH). Ainda, Glaser e Kaczocha (2010) reportaram que, embora a anandamida (AEA) seja hidrolisada principalmente pela enzima FAAH, autorradiografia *ex-vivo* revelou que a inibição da COX-2 pela nimesulida redirecionou o substrato AEA a partir da COX-2 para FAAH no córtex, hipocampo, tálamo e substância cinzenta periaquedutal. Estes dados indicam que a COX-2 possui a capacidade de metabolizar AEA *in vivo* e pode competir com FAAH para AEA em várias regiões cerebrais. Dessa forma, acreditamos que outras vias de sinalização como reportado acima podem estar envolvidas nos efeitos ocasionados pelo celecoxibe quando administrado subcronicamente.

Hipotetizamos ainda, que a administração subcrônica de inibidores de COX-2 alteraria os níveis de agonistas dos receptores EPs e, conseqüentemente, também poderia alterar a imunorreatividade destes (SANTOS et al., 2007; JIANG E DINGLEDINE, 2013; ZHEN et al., 2012). No entanto, tais alterações na imunorreatividade dos receptores EPs, encontradas em nosso estudo, não parecem estar relacionadas às alterações dos níveis de PGE₂ no córtex cerebral, uma vez que nenhum dos inibidores da COX-2 alterou os níveis basais de PGE₂. O etoricoxibe não alterou a imunorreatividade dos receptores EP1, EP2 e EP3, enquanto que a nimesulida modificou a imunorreatividade para EP1 e EP2 e celecoxibe modificou somente a imunorreatividade para o receptor EP2. Ao compararmos tais resultados de imunorreatividade com as respectivas ações dos inibidores da COX-2 sobre as crises, observamos que as modificações na expressão dos receptores EPs não parecem ser cruciais para as ações destes fármacos sobre as crises convulsivas induzidas por PTZ. Entretanto, como já evidenciado por nosso grupo de pesquisa, os receptores EPs modulam as crises convulsivas induzidas por PTZ (Figura 13). Oliveira e colaboradores (2008b) observaram que antagonistas seletivos para os receptores EP1 (SC-19220), EP3 (L-826266) e EP4 (L-161982), e agonista seletivo para o receptor EP2, butaprosté aumentaram a latência para as crises convulsivas tônico-clônicas clônicas generalizadas induzidas por PTZ. Santos e colaboradores (2017) analisaram que administração sistêmica do ONO-AE1-259-01 atenuou as crises induzidas por PTZ e pilocarpina. Ainda assim, Reschke e colaboradores (dados não publicados) verificaram que antagonistas EP1 e EP3 (ONO-8713 e ONO-AE3-240, respectivamente) atenuaram as crises convulsivas induzidas por PTZ e ácido caínico. E os seus respectivos agonistas (ONO-DI-004 e ONO-AE-248) facilitaram as crises convulsivas em ambos os modelos agudos de crises epiléticas. Os animais submetidos a administração de PTZ apresentaram atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase diminuída no córtex e hipocampo de camundongos. Por outro lado, animais que receberam ácido caínico apresentaram aumento na atividade da enzima Na⁺,K⁺-ATPase em ambas as estruturas. Esses dados constituem evidências farmacológicas que suportam um papel para os receptores EPs nas crises convulsivas induzidas por PTZ e ácido caínico. Sendo assim, mais estudos são necessários para esclarecer os efeitos sobre a imunorreatividade dos receptores EPs nas crises convulsivas induzidas por PTZ em animais que recebem administração subcrônicamente (Figura 13).

Na literatura há muitos estudos demonstrando o efeito de inibidores da COX-2 sobre as crises convulsivas, como demonstrado na tabela 1 do manuscrito. Nesses estudos os fatores prováveis de variabilidade para o efeito anticonvulsivante dos inibidores da COX-2 são, por exemplo, o inibidor da COX-2 utilizado, tipo de estímulo (químico e/ou físico), agente convulsivante e a espécie animal empregada. Avaliando os estudos podemos observar que

geralmente animais (ratos e/ou camundongos) que recebem administração de ácido cáinico apresentam mais crises do que quando recebem outro agente convulsivante como PTZ ou pilocarpina. Em vista disso, nosso estudo apresenta alguns diferenciais em relação aos outros já publicados na literatura: avaliamos três diferentes inibidores para COX-2 em diferentes doses e intervalos de administração. Além disso, fomos os primeiros a investigar os níveis de citocinas e imunoreatividade para os receptores EP em intervalo de tempo de 20 minutos após as crises induzidas por PTZ (Figura 13).

Figura 13 – Esquema referente aos estudos do nosso grupo de pesquisa



5 CONCLUSÕES

- * Administração aguda de nimesulida diminuiu as crises convulsivas induzidas por PTZ, enquanto a administração aguda de celecoxibe e etoricoxibe não teve efeito sobre as crises;
- * Nimesulida e celecoxibe, mas não etoricoxibe agudamente atenuaram o aumento das citocinas pró-inflamatórias induzidas por PTZ no hipocampo e córtex cerebral;
- * Administração aguda de nimesulida potencializou o aumento da IL-10 induzido por PTZ no hipocampo e córtex cerebral;
- * A administração subcrônica de nimesulida e etoricoxibe atenuaram, celecoxibe facilitou as crises convulsivas induzidas por PTZ;
- * Celecoxibe administrado subcronicamente atenuou o aumento de todas as citocinas pró-inflamatórias induzidas por PTZ, enquanto que nimesulida e etoricoxibe atenuaram somente TNF- α e INF- γ no hipocampo e córtex cerebral;
- * Administração subcrônica de nimesulida e etoricoxibe potencializaram o aumento nos níveis de IL-10 e diminuíram os níveis de PGE₂ induzidos por PTZ, entretanto celecoxibe não alterou o aumento de PGE₂ e IL-10 induzido por PTZ;
- * Administração subcrônica de nimesulida *per se* aumentou a imunorreatividade para o receptor EP1 no córtex cerebral e a injeção de PTZ *per se* aumentou a imunorreatividade para o receptor EP1 no hipocampo e córtex cerebral. Entretanto, injeção aguda de PTZ diminuiu a imunorreatividade do receptor EP2 no hipocampo e nimesulida subcrônica preveniu tal aumento;
- * Injeção aguda de PTZ aumentou a imunorreatividade do receptor EP2 *per se* no córtex cerebral e administração de celecoxibe subcrônico mais PTZ aumentaram a imunorreatividade do receptor EP2 no hipocampo;
- * Administração subcrônica de etoricoxibe e a injeção de PTZ não alteraram a imunorreatividade para os receptores EPs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**, 6^a ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2008.
- AGRAWAL, N. G. et al. Pharmacokinetics of etoricoxib in patients with hepatic impairment. **J Clin Pharmacol**, v. 43, n. 10, p. 1136-48, 2003.
- AJUEBOR, M. N.; SINGH, A.; WALLACE, J. L. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin D(2) is an early anti-inflammatory signal in experimental colitis. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, v. 279, n. 1, p. G238-44, 2000.
- AKARSU, E. S.; MAMUK, S.; COMERT, A. Inhibition of pentylentetrazol-induced seizures in rats by prostaglandin D2. **Epilepsy Res**, v. 30, n. 1, p. 63-8, 1998.
- AKASSOGLU, K. et al. Astrocyte-specific but not neuron-specific transmembrane TNF triggers inflammation and degeneration in the central nervous system of transgenic mice. **J Immunol**, v. 158, n. 1, p. 438-45, 1997.
- AKDIS, M. et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, n. 3, p. 701-21 e1-70, 2011.
- AKIBA, S.; SATO, T. Cellular function of calcium-independent phospholipase A2. **Biol Pharm Bull**, v. 27, n. 8, p. 1174-8, 2004.
- ALHOUAYEK, M., MUCCIOLI, G. G. COX-2-derived endocannabinoid metabolites as novel inflammatory mediators. **Trends Pharmacol Sci.**, v. 35, p. 284-92, 2014.
- ANDREASSON, K. Emerging roles of PGE2 receptors in models of neurological disease. **Prostaglandins Other Lipid Mediat.**, v. 91, p. 104–112, 2010.
- ANTMAN, E. M. et al. Use of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update for clinicians: a scientific statement from the American Heart Association. **Circulation.**, v. 115, p. 1634-42, 2007.
- AUVIN, S. et al. Inflammation induced by LPS enhances epileptogenesis in immature rat and may be partially reversed by IL1RA. **Epilepsia**, v. 51 Suppl 3, p. 34-8, 2010.
- 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, 1999.
- BALOSSO, S. et al. A novel non-transcriptional pathway mediates the proconvulsive effects of interleukin-1beta. **Brain**, v. 131, n. Pt 12, p. 3256-65, 2008.
- BARAÑANO, D. E.; FERRIS, C. D.; SNYDER, S. H. Atypical neural messengers. **Trends Neurosci.**, v. 24, p. 99-106, 2001.

- BARTFAI, T.; SCHULTZBERG, M. Cytokines in neuronal cell types. **Neurochem. Int.**, v. 22, p. 435-444, 1993
- BARTFAI, T. et al. Interleukin-1 system in CNS stress: seizures, fever, and neurotrauma. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1113, p. 173-7, 2007.
- BATSHAKE, B.; NILSSON, C.; SUNDELIN, J. Molecular characterization of the mouse prostanoid EP1 receptor gene. **Eur J Biochem**, v. 231, n. 3, p. 809-14, 1995.
- BAUER, B. et al. Seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier through glutamate and cyclooxygenase-2 signaling. **Mol Pharmacol**, v. 73, n. 5, p. 1444-53, 2008.
- BAZAN, N. G. et al. The accumulation of free arachidonic acid, diacylglycerols, prostaglandins, and lipoxygenase reaction products in the brain during experimental epilepsy. **Adv Neurol**, v. 44, p. 879-902, 1986.
- BAZAN, N. G.; TU, B.; RODRIGUEZ DE TURCO, E. B. What synaptic lipid signaling tells us about seizure-induced damage and epileptogenesis. **Prog Brain Res**, v. 135, p. 175-85, 2002.
- BEN-ARI, Y.; TREMBLAY, E.; OTTERSEN, O. P. Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. **Neuroscience**, v. 5, n. 3, p. 515-28, 1980.
- 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, 2010.
- BERGSTROM, S.; SAMUELSSON, B. Isolation of prostaglandin E1 from human seminal plasma. Prostaglandins and related factors. 11. **J Biol Chem**, v. 237, p. 3005-6, 1962.
- BERT, B. et al. Rethinking 3R strategies: Digging deeper into AnimalTestInfo promotes transparency in in vivo biomedical research. **PLoS Biol.**, v. 15:e2003217, 2017.
- BERTAGNOLLI, M. M. et al. Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. **N Engl J Med**, v. 355, n. 9, p. 873-84, 2006.
- BIDMON, H. J. et al. Glutamine synthetase becomes nitrated and its activity is reduced during repetitive seizure activity in the pentylentetrazole model of epilepsy. **Epilepsia**, v. 49, n. 10, p. 1733-48, 2008.
- BOMBARDIER, C. et al. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. **N Engl J Med**, v. 343, n. 21, p. 1520-8, 2 p following 1528, 2000.
- BOTTING, R. M. Inhibitors of cyclooxygenases: mechanisms, selectivity and uses. **J Physiol Pharmacol**, v. 57 Suppl 5, p. 113-24, 2006.

BREYER, M. D.; HAO, C.; QI, Z. Cyclooxygenase-2 selective inhibitors and the kidney. **Curr Opin Crit Care**, v. 7, n. 6, p. 393-400, 2001.

BRINK, C. et al. International Union of Pharmacology XXXVII. Nomenclature for leukotriene and lipoxin receptors. **Pharmacol Rev**, v. 55, n. 1, p. 195-227, 2003.

BROOKS, P. et al. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. **Rheumatology (Oxford)**, v. 38, n. 8, p. 779-88, 1999.

CAMPBELL, I. L. et al. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 21, p. 10061-5, 1993.

CAPRA, V. et al. Eicosanoids and their drugs in cardiovascular diseases: focus on atherosclerosis and stroke. **Med Res Rev**, v. 33, n. 2, p. 364-438, 2013.

CARVALHO, W. A. et al. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxygenase-2: Avanços Terapêuticos. **Rev Bras Anesthesiol.**, v. 54, p. 448-464, 2004.

CHOI, S. H.; AID, S.; BOSETTI, F. The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. **Trends Pharmacol Sci**, v. 30, n. 4, p. 174-81, 2009.

CHOI, S. H. et al. Cyclooxygenases-1 and -2 differentially modulate leukocyte recruitment into the inflamed brain. **Pharmacogenomics J**, v. 10, n. 5, p. 448-57, 2010.

CHOI, S. H.; LANGENBACH, R.; BOSETTI, F. Genetic deletion or pharmacological inhibition of cyclooxygenase-1 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory response and brain injury. **FASEB J**, v. 22, n. 5, p. 1491-501, 2008.

CHUNG, J. I. et al. Seizure susceptibility in immature brain due to lack of COX-2-induced PGF₂alpha. **Exp Neurol**, v. 249, p. 95-103, 2013.

CICERI, P. et al. Pharmacology of celecoxib in rat brain after kainate administration. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 302, n. 3, p. 846-52, 2002.

CLAYCOMB, R. J.; HEWETT, S. J.; HEWETT, J. A. Prophylactic, prandial rofecoxib treatment lacks efficacy against acute PTZ-induced seizure generation and kindling acquisition. **Epilepsia**, v. 52, n. 2, p. 273-83, 2011.

CLAYCOMB R. J. et al. Neuromodulatory role of endogenous interleukin-1beta in acute seizures: possible contribution of cyclooxygenase-2. **Neurobiol. Dis.**, v. 45, p. 234-242, 2012.

CONSTABLE, A. L.; ARMATI, P. J.; HARTUNG, H. P. DMSO induction of the leukotriene LTC₄ by Lewis rat Schwann cells. **J Neurol Sci**, v. 162, n. 2, p. 120-6, 1999.

COOK, H. W. Incorporation, metabolism and positional distribution of trans-unsaturated fatty acids in developing and mature brain. Comparison of elaidate and oleate administered intracerebrally. **Biochim Biophys Acta**, v. 531, n. 3, p. 245-56, 1978.

CREMER, C. M. et al. Pentylentetrazole-induced seizures affect binding site densities for GABA, glutamate and adenosine receptors in the rat brain. **Neuroscience**, v. 163, n. 1, p. 490-9, 2009.

DEDEURWAERDERE, S. et al. Finding a better drug for epilepsy: antiinflammatory targets. **Epilepsia**, v. 53, n. 7, p. 1113-8, 2012.

DEMBO, G.; PARK, S. B.; KHARASCH, E. D. Central nervous system concentrations of cyclooxygenase-2 inhibitors in humans. **Anesthesiology**, v. 102, n. 2, p. 409-15, 2005.

DENZLINGER, C. Biology and pathophysiology of leukotrienes. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 23, n. 3, p. 167-223, 1996.

DEUTSCH, D. G.; CHIN, S. A. Enzymatic synthesis and degradation of anandamide, a cannabinoid receptor agonist. **Biochem Pharmacol**, v. 46, n. 5, p. 791-6, 1993.

DEY, A. et al. Anti-inflammatory small molecules to treat seizures and epilepsy: from bench to bedside. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 37, p. 463–484, 2016.

DHIR, A.; KULKARNI, S. K. Rofecoxib, a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor potentiates the anticonvulsant activity of tiagabine against pentylentetrazol-induced convulsions in mice. **Inflammopharmacology**, v. 14, n. 5-6, p. 222-5, 2006.

DHIR, A.; NAIDU, P. S.; KULKARNI, S. K. Effect of naproxen, a non-selective cyclooxygenase inhibitor, on pentylentetrazol-induced kindling in mice. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 32, n. 7, p. 574-84, 2005.

DHIR, A.; NAIDU, P. S.; KULKARNI, S.K. Neuroprotective effect of nimesulide, a preferential COX-2 inhibitor, against pentylentetrazol (PTZ)-induced chemical kindling and associated biochemical parameters in mice. **Seizure**, v. 16, n. 8, p. 691-7, 2007.

DHOPESHWARKAR, G. A.; SUBRAMANIAN, C. Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids in the developing brain: I. Metabolic transformations of intracranially administered 1-¹⁴C linolenic acid. **Lipids**, v. 11, n. 1, p. 67-71, 1976.

DI MARZO, V. et al. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. **Nature**, v. 372, n. 6507, p. 686-91, 1994.

DIVECHA, N.; IRVINE, R. F. Phospholipid signaling. **Cell**, v. 80, n. 2, p. 269-78, 1995.

DOGNE, J. M. et al. Effects of a novel non-carboxylic thromboxane A2 receptor antagonist (BM-531) derived from torasemide on platelet function. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 62, n. 5, p. 311-7, 2000.

DUBOIS, R. N. et al. Cyclooxygenase in biology and disease. **FASEB J**, v. 12, n. 12, p. 1063-73, 1998.

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

FABENE, P. F.; BRAMANTI, P.; CONSTANTIN, G. The emerging role for chemokines in epilepsy. **J Neuroimmunol**, v. 224, n. 1-2, p. 22-7, 2010.

FIACCO, T. A.; MCCARTHY, K. D. Multiple Lines of Evidence Indicate That Gliotransmission Does Not Occur under Physiological Conditions. **J Neurosci.**, v. 38, p. 3-13, 2018.

FISHER, R. S. Redefining epilepsy. **Curr Opin Neurol**, v. 28, n. 2, p. 130-5, 2015.

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, 2005.

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, p. 522-530, 2017.

FITZGERALD, G. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, coxibs, and cardio-renal physiology: a mechanism-based approach. **Am J Cardiol**, v. 89, n. 6A, p. 1D-2D, 2002.

FITZGERALD, G. A.; PATRONO, C. The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. **N Engl J Med**, v. 345, n. 6, p. 433-42, 2001.

FRANKOWSKI, J.C. et al. Detrimental role of the EP1 prostanoid receptor in blood-brain barrier damage following experimental ischemic stroke. **Sci. Rep.**, v. 5, p. 17956, 2015.

FU, Y. et al. EP2 receptor signaling regulates microglia death. **Mol. Pharmacol.**, v.88, p. 161-170, 2015.

GALIC, M. A.; RIAZI, K.; PITTMAN, Q. J. Cytokines and brain excitability. **Front Neuroendocrinol**, v. 33, n. 1, p. 116-25, 2012.

GAMANIEL, K.; WUORELA, H.; VAPAATALO, H. Effects of iloprost, prostaglandin E1 (PGE1) and prostacyclin (PGI2) on chemically and electrically induced seizures in mice. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 35, n. 2, p. 63-8, 1989.

GIUFFRIDA, A.; BELTRAMO, M.; PIOMELLI, D. Mechanisms of endocannabinoid inactivation: biochemistry and pharmacology. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 298, n. 1, p. 7-14, 2001.

GLASER, S. T., KACZOCHA, M. Cyclooxygenase-2 mediates anandamide metabolism in the mouse brain. **J Pharmacol Exp Ther.**, v. 335, p. 380-8, 2010.

GLASS, C. K. et al. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, v. 140, p.918-934, 2010.

GLOERICH, M.; BOS, J. L. Epac: defining a new mechanism for cAMP action. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 50, p. 355-75, 2010.

GODUKHIN, O. V. et al. The effects of interleukin-10 on the development of epileptiform activity in the hippocampus induced by transient hypoxia, bicuculline, and electrical kindling. **Neurosci. Behav. Physiol.**, v. 39, p. 625–631, 2009.

GOODMAN e GILAMN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 12^oed., Mc-Graw Hill, Porto Alegre, 2012.

GOLDBLATT, M. W. Constituents of human seminal plasma. **Biochem J**, v. 29, n. 6, p. 1346-57, 1935.

GROSSER, T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G. A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **J Clin Invest**, v. 116, n. 1, p. 4-15, 2006.

HAWKEY, C. J. COX-2 chronology. **Gut.**, v. 54, p. 1509-14, 2005.

HEBERT, R. L.; JACOBSON, H. R.; BREYER, M. D. PGE2 inhibits AVP-induced water flow in cortical collecting ducts by protein kinase C activation. **Am J Physiol**, v. 259, n. 2 Pt 2, p. F318-25, 1990.

HEMDAN, N. Y. et al. Interleukin-17-producing T helper cells in autoimmunity. **Autoimmun Rev**, v. 9, n. 11, p. 785-92, 2010.

HERTTING, G.; SEREGI, A.; FORSTERMANN, U. Formation and functions of prostaglandins in the central nervous system in rodents. **Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res**, v. 15, p. 573-6, 1985.

HEWETT, S. J.; SILAKOVA, J. M.; HEWETT, J. A. Oral treatment with rofecoxib reduces hippocampal excitotoxic neurodegeneration. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 319, n. 3, p. 1219-24, 2006.

HEWETT, S. J. et al. Cyclooxygenase-2 contributes to N-methyl-D-aspartate-mediated neuronal cell death in primary cortical cell culture. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 293, n. 2, p. 417-25, 2000.

HILDEBRANDT, F. Pentamethylenetetrazol (Cardiazol[®]). **Archiv für experimentelle Pathologie and Pharmakologie.**, v. 116, p. 100-109, 1926.

HINZ, B. et al. Dipyrone elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: new insights into the pharmacology of an old analgesic. **FASEB J.**, v. 21, p. 2343-51, 2007.

HONMA, S. et al. Thromboxane A2 receptor-mediated G12/13-dependent glial morphological change. **Eur J Pharmacol**, v. 545, n. 2-3, p. 100-8, 2006.

HUTCHINSON, A. J. et al. Activation of EP2 prostanoid receptors in human glial cell lines stimulates the secretion of BDNF. **Neurochem Int**, v. 54, n. 7, p. 439-46, 2009.

ILAE. International League Against Epilepsy. <http://epilepsia.org.br/wp-content/uploads/2017/04/Classificacao-crisis-2017-Publico-traducao.pdf>. Acesso em: 07 nov. 2017.

IRIE, A. et al. Third isoform of the prostaglandin-E-receptor EP3 subtype with different C-terminal tail coupling to both stimulation and inhibition of adenylate cyclase. **Eur J Biochem**, v. 217, n. 1, p. 313-8, 1993.

ISHIZUKA, T. et al. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid stimulates nuclear factor-kappaB activation and the production of inflammatory cytokines in human endothelial cells. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 324, n. 1, p. 103-10, 2008.

JAYARAMAN, R. et al. Influence of etoricoxib on anticonvulsant activity of phenytoin and diazepam in experimental seizure models in mice. **J Pharm Pharmacol**, v. 62, n. 5, p. 610-4, 2010.

JIANG, J.; DINGLEDINE, R. Prostaglandin receptor EP2 in the crosshairs of anti-inflammation, anti-cancer, and neuroprotection. **Trends Pharmacol Sci**, v. 34, n. 7, p. 413-23, 2013.

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, 2006.

KADUCE, T. L. et al. 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) metabolism in coronary endothelial cells. **J Biol Chem**, v. 279, n. 4, p. 2648-56, 2004.

KATSUKI, H.; OKUDA, S. Arachidonic acid as a neurotoxic and neurotrophic substance. **Prog Neurobiol**, v. 46, n. 6, p. 607-36, 1995.

KATZUNG, B.G. **Basic and Clinical Pharmacology**. 9^oed. McGraw-Hill Publishing Co., Porto Alegre, 2004.

KAWABATA, A. Prostaglandin E2 and pain--an update. **Biol Pharm Bull**, v. 34, n. 8, p. 1170-3, 2011.

KAWANO, T. et al. Prostaglandin E2 EP1 receptors: downstream effectors of COX-2 neurotoxicity. **Nat. Med.** v. 12, p. 225-229, 2006.

KIM, J., ALGER, B. E. Inhibition of cyclooxygenase-2 potentiates retrograde endocannabinoid effects in hippocampus. **Nat Neurosci.**, v. 7, p. 697-8, 2004.

KIM, Y. T. et al. Prostaglandin FP receptor inhibitor reduces ischemic brain damage and neurotoxicity. **Neurobiol Dis**, v. 48, n. 1, p. 58-65, 2012.

KIMOULI, M. et al. The effect of an exon 12 polymorphism of the human thromboxane synthase (CYP5A1) gene in stroke patients. **Med Sci Monit**, v. 15, n. 1, p. BR30-5, 2009.

KISHIMOTO, K. et al. Cytosolic phospholipase A2 alpha amplifies early cyclooxygenase-2 expression, oxidative stress and MAP kinase phosphorylation after cerebral ischemia in mice. **J Neuroinflammation**, v. 7, p. 42, 2010.

KITANAKA, J. et al. Expression pattern of messenger RNAs for prostanoid receptors in glial cell cultures. **Brain Res**, v. 707, n. 2, p. 282-7, 1996.

KLEEN, J. K.; HOLMES, G. L. Brain inflammation initiates seizures. **Nat Med**, v. 14, n. 12, p. 1309-10, 2008.

KONSTAM, M. A. et al. Cardiovascular thrombotic events in controlled, clinical trials of rofecoxib. **Circulation**, v. 104, n. 19, p. 2280-8, 2001.

KONTOGIORGIS, C. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J. Non steroidal anti-inflammatory and anti-allergy agents. **Curr Med Chem**, v. 9, n. 1, p. 89-98, 2002.

KOZAK, K. R. et al. Metabolism of the endocannabinoids, 2-arachidonylglycerol and anandamide, into prostaglandin, thromboxane, and prostacyclin glycerol esters and ethanolamides. **J Biol Chem.**, v. 22, p. 277, 2002.

KRALL, R.L.; PENRY, J. K.; WHITE, B. G.; KUPFERBERG, H. J.; SWINYARD, E. A. Antiepileptic drug development: II. Anticonvulsant drug screening. **Epilepsia.**, v. 19, p. 409-428, 1978.

KUMAR, V. et al. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. [Cyclooxygenase-2 inhibitors nonsteroid anti-inflammatory drugs: current issues. **Rev Bras Anesthesiol**, v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.

LAUGWITZ, K. L. et al. The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 93, n. 1, p. 116-20, 1996.

LEHTIMÄKI, K. A. et al. Expression of cytokines and cytokine receptors in the rat brain after kainic acid-induced seizures. **Brain Res Mol Brain Res.**, v. 110, p. 253-60, 2003.

LEON, L. R. et al. Role of IL-10 in inflammation. Studies using cytokine knockout mice. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 856, p. 69-75, 1998.

LEVIN, S.G., GODUKHIN, O.V. Protective effects of interleukin-10 on the development of epileptiform activity evoked by transient episodes of hypoxia in rat hippocampal slices. **Neurosci. Behav. Physiol.**, v. 37, p. 467-470, 2007

LIBRIZZI, L. et al. Seizure-induced brain-borne inflammation sustains seizure recurrence and blood-brain barrier damage. **Ann Neurol**, v. 72, n. 1, p. 82-90, 2012.

LOBO-SILVA D. et al. Balancing the immune response in the brain: IL-10 and its regulation. **J Neuroinflammation.**, v. 13, p. 297, 2016.

- LOCKSLEY, R. M. et al. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T-cell subsets. **Ann Inst Pasteur Immunol**, v. 138, n. 5, p. 744-9, 1987.
- LORENZO, A. V. et al. Increased penetration of horseradish peroxidase across the blood-brain barrier induced by Metrazol seizures. **Brain Res**, v. 88, n. 1, p. 136-40, 1975.
- 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, 2009.
- MAIER, T. J. et al. Celecoxib inhibits 5-lipoxygenase. **Biochem Pharmacol**, v. 76, n. 7, p. 862-72, 2008.
- MANEV, H.; UZ, T.; QU, T. Early upregulation of hippocampal 5-lipoxygenase following systemic administration of kainate to rats. **Restor Neurol Neurosci**, v. 12, n. 2-3, p. 81-5, 1998.
- MANTOVANI, A. et al. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 8, p. 519-31, 2011.
- MARNETT, L. J. The COXIB experience: a look in the rearview mirror. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 49, p. 265-90, 2009.
- MAROSO, M. et al. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in iktogenesis and can be targeted to reduce seizures. **Nat Med**, v. 16, n. 4, p. 413-9, 2010.
- MASOODI, M.; NICOLAOU, A. Lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 20, n. 20, p. 3023-9, 2006.
- MATSUO, M. et al. Increased IL-1beta production from dsRNA-stimulated leukocytes in febrile seizures. **Pediatr Neurol**, v. 35, n. 2, p. 102-6, 2006.
- MCGINLEY, S.; CENTRA, M.; LYSZ, T. W. The effect of inhibiting brain thromboxane biosynthesis on pentylentetrazole-induced seizure threshold. **J Neurosci Res**, v. 13, n. 4, p. 563-7, 1985.
- MEADE, E. A. et al. Differential inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) isozymes by aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. **J Biol Chem.**, v. 268, p. 6610-4, 1993.
- MEDEIROS, A. et al. Prostaglandin E2 and the suppression of phagocyte innate immune responses in different organs. **Mediators Inflamm**, v. 2012, p. 327568, 2012.
- MINUZ, P. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular risk: is prostacyclin inhibition the key event? **J Am Coll Cardiol**, v. 52, n. 20, p. 1637-9, 2008.
- MOHAN, S. et al. Putative role of prostaglandin receptor in intracerebral hemorrhage. **Front Neurol**, v. 3, p. 145, 2012.

- MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**, v. 7, p. 145-73, 1989.
- MUCK, S. et al. The bovine thromboxane A2 receptor: molecular cloning, expression, and functional characterization. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 357, n. 1, p. 10-6, 1998.
- MUKHERJEE, D.; NISSEN, S. E.; TOPOL, E. J. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. **JAMA**, v. 286, n. 8, p. 954-9, 2001.
- NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G.; BELLISSIMO, M. I.; CAVALHEIRO, E. A. Profile of prostaglandin levels in the rat hippocampus in pilocarpine model of epilepsy. **Neurochem Int**, v. 27, n. 6, p. 461-6, 1995.
- NAKAMURA, K. et al. Immunohistochemical localization of prostaglandin EP3 receptor in the rat nervous system. **J Comp Neurol**, v. 421, n. 4, p. 543-69, 2000.
- NAKAYAMA, T. Prostacyclin synthase gene: genetic polymorphisms and prevention of some cardiovascular diseases. **Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents**, v. 3, n. 2, p. 157-64, 2005.
- NARUMIYA, S. Prostanoids and inflammation: a new concept arising from receptor knockout mice. **J Mol Med (Berl)**, v. 87, n. 10, p. 1015-22, 2009.
- NARUMIYA, S.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. **Physiol Rev**, v. 79, n. 4, p. 1193-226, 1999.
- NIWA, K. et al. Cyclooxygenase-2 contributes to functional hyperemia in whisker-barrel cortex. **J Neurosci**, v. 20, n. 2, p. 763-70, 2000.
- O'BANION, M. K. et al. Interleukin-1 beta induces prostaglandin G/H synthase-2 (cyclooxygenase-2) in primary murine astrocyte cultures. **J Neurochem**, v. 66, n. 6, p. 2532-40, 1996.
- O'GARRA, A. et al. Strategies for use of IL-10 or its antagonists in human disease. **Immunol. Rev.**, v. 223, p. 114-131, 2008.
- OIDA, H. et al. Expression of messenger RNA for the prostaglandin D receptor in the leptomeninges of the mouse brain. **FEBS Lett**, v. 417, n. 1, p. 53-6, 1997.
- OIDA, H. et al. In situ hybridization studies of prostacyclin receptor mRNA expression in various mouse organs. **Br J Pharmacol**, v. 116, n. 7, p. 2828-37, 1995.
- 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, 2001.
- OLIVEIRA, M. S. et al. Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylentetrazol-induced seizures. **Epilepsy Res**, v. 79, n. 1, p. 14-21, 2008a.

OLIVEIRA, M. S. et al. Modulation of pentylene-tetrazol-induced seizures by prostaglandin E2 receptors. **Neuroscience**, v. 152, n. 4, p. 1110-8, 2008b.

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, 2009.

OTTERNESS, I. G. The discovery of drugs to treat arthritis. A historical view. In: **The Search for Antiinflammatory Drugs**. VJ Merluzzi, J. Adams, eds. Boston: Birkhäuser, p. 1–26, 1995.

OTTO, J. C.; SMITH, W. L. Prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2. **J Lipid Mediat Cell Signal**, v. 12, n. 2-3, p. 139-56, 1995.

OUYANG, W.; KOLLS, J. K.; ZHENG, Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. **Immunity**, v. 28, n. 4, p. 454-67, 2008.

PANIGRAHY, D. et al. EET signaling in cancer. **Cancer Metastasis Rev**, v. 30, n. 3-4, p. 525-40, 2011.

PAULSON, S. K. et al. Pharmacokinetics of celecoxib after oral administration in dogs and humans: effect of food and site of absorption. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 297, n. 2, p. 638-45, 2001.

PAULSON, S. K. et al. Pharmacokinetics, tissue distribution, metabolism, and excretion of celecoxib in rats. **Drug Metab Dispos**, v. 28, n. 5, p. 514-21, 2000.

PERRY, V. H., HOLMES, C. Microglial priming in neurodegenerative disease. **Nat Rev Neurol.**, v. 10, p. 217-224, 2014.

PITKÄNEN, A. et al. **Models of Seizure and Epilepsy**. USA: Elsevier, 2006.

PHILLIS, J. W.; HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, A. A. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. **Brain Res Rev**, v. 52, n. 2, p. 201-43, 2006.

PIOMELLI, D. Arachidonic acid in cell signaling. **Curr Opin Cell Biol**, v. 5, n. 2, p. 274-80, 1993.

POLASCHECK, N.; BANKSTAHL, M.; LOSCHER, W. The COX-2 inhibitor parecoxib is neuroprotective but not antiepileptogenic in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Exp Neurol**, v. 224, n. 1, p. 219-33, 2010.

QUAN, Y. et al. EP2 receptor signaling pathways regulate classical activation of microglia. **J Biol. Chem.**, v. 288, p. 9293–9302, 2013.

RAINSFORD, K. D. Profile and mechanisms of gastrointestinal and other side effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **Am J Med**, v. 107, n. 6A, p. 27S-35S; discussion 35S-36S, 1999.

- RAINSFORD K. D. History and development of the salicylates. In: **Aspirin and Related Drugs**, K.D. Rainsford, ed. London & New York: Taylor & Francis, p. 1–23, 2004.
- RAINSFORD, K. D. Nimesulide -- a multifactorial approach to inflammation and pain: scientific and clinical consensus. **Curr Med Res Opin**, v. 22, n. 6, p. 1161-70, 2006.
- RAINSFORD K. D. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. **Subcell Biochem.**, v. 42, p. 3-27, 2007.
- RAKSHAN, F. et al. Carrier-mediated uptake of the endogenous cannabinoid anandamide in RBL-2H3 cells. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 292, n. 3, p. 960-7, 2000.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**, 6^a ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2011.
- RAVIZZA, T.; BALOSSO, S.; VEZZANI, A. Inflammation and prevention of epileptogenesis. **Neurosci Lett**, v. 497, n. 3, p. 223-30, 2011.
- RENNER, B. et al. Absorption and distribution of etoricoxib in plasma, CSF, and wound tissue in patients following hip surgery--a pilot study. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 381, n. 2, p. 127-36, 2010.
- RIVEST, S. Regulation of innate immune responses in the brain. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 6, p. 429-39, 2009.
- RODGERS, K. M. et al. The cortical innate immune response increases local neuronal excitability leading to seizures. **Brain**, v. 132, n. Pt 9, p. 2478-86, 2009.
- RODRIGUES, A. D. et al. Absorption, metabolism, and excretion of etoricoxib, a potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in healthy male volunteers. **Drug Metab Dispos**, v. 31, n. 2, p. 224-32, 2003.
- ROJAS, A. et al. The prostaglandin EP1 receptor potentiates kainate receptor activation via a protein kinase C pathway and exacerbates status epilepticus. **Neurobiol. Dis.**, v. 70, p. 74–89, 2014.
- ROMAN, R. J. P-450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. **Physiol Rev**, v. 82, n. 1, p. 131-85, 2002.
- SALAGA, M.; SOBCZAK, M.; FICHNA, J. Inhibition of fatty acid amide hydrolase (FAAH) as a novel therapeutic strategy in the treatment of pain and inflammatory diseases in the gastrointestinal tract. **Eur J Pharm Sci**, v. 52, p. 173-9, 2014.
- SALEEM, S. et al. PGF(2alpha) FP receptor contributes to brain damage following transient focal brain ischemia. **Neurotox Res**, v. 15, n. 1, p. 62-70, 2009.
- SALVADORI, M. G. et al. Prostaglandin E(2) potentiates methylmalonate-induced seizures. **Epilepsia**, v. 53, n. 1, p. 189-98, 2012.

SAKATA, R.K.; ISSY, A.M. **Fármacos para o tratamento da dor**. Ed Manole. 1° Ed, São Paulo, 2008.

SAMLAND, H. et al. Profound increase in sensitivity to glutamatergic- but not cholinergic agonist-induced seizures in transgenic mice with astrocyte production of IL-6. **J Neurosci Res**, v. 73, n. 2, p. 176-87, 2003.

SAWYER, N. et al. Molecular pharmacology of the human prostaglandin D2 receptor, CRTH2. **Br J Pharmacol**, v. 137, n. 8, p. 1163-72, 2002.

SCHLICHTIGER, J. et al. Celecoxib treatment restores pharmacosensitivity in a rat model of pharmacoresistant epilepsy. **Br J Pharmacol**, v. 160, n. 5, p. 1062-71, 2010.

SCHONBECK, U. et al. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. **Am J Pathol**, v. 155, n. 4, p. 1281-91, 1999.

SCHWARTZMAN, M. L. et al. Metabolism of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid by cyclooxygenase. Formation and identification of novel endothelium-dependent vasoconstrictor metabolites. **J Biol Chem**, v. 264, n. 20, p. 11658-62, 1989.

SENANAYAKE, N.; ROMAN, G. C. Epidemiology of epilepsy in developing countries. **Bull World Health Organ**, v. 71, n. 2, p. 247-58, 1993.

SERHAN, C. N. et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **FASEB J**, v. 21, n. 2, p. 325-32, 2007.

SHENKER, A. et al. The G protein coupled to the thromboxane A2 receptor in human platelets is a member of the novel Gq family. **J Biol Chem**, v. 266, n. 14, p. 9309-13, 1991.

SHI, S.; KLOTZ, U. Clinical use and pharmacological properties of selective COX-2 inhibitors. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 64, n. 3, p. 233-52, 2008.

SHIMADA, T. et al. Role of Inflammatory Mediators in the Pathogenesis of Epilepsy. **Mediators Inflamm.**, v. 2014, p.:901902, 2014.

SHIMAMURA, M. et al. Prostaglandin E2 type 1 receptors contribute to neuronal apoptosis after transient forebrain ischemia. **J. Cereb. Blood Flow Metab.**, v.33, p. 1207–1214, 2013.

SHINOHARA, H. et al. Regulation of delayed prostaglandin production in activated P388D1 macrophages by group IV cytosolic and group V secretory phospholipase A2s. **J Biol Chem**, v. 274, n. 18, p. 12263-8, 1999.

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, 2004.

SOLOMON, D. H. et al. Relationship between selective cyclooxygenase-2 inhibitors and acute myocardial infarction in older adults. **Circulation.**, v. 109, p. 2068-73, 2004.

SOLOMON, D. H. Selective cyclooxygenase 2 inhibitors and cardiovascular events. **Arthritis Rheum.**, v. 52, p. 1968-78, 2005.

SUGIMOTO, M. et al. Analysis of structure-function relationships in the platelet membrane glycoprotein Ib-binding domain of von Willebrand's factor by expression of deletion mutants. **J Biol Chem**, v. 268, n. 16, p. 12185-92, 1993.

SUGIMOTO, Y. et al. Distinct cellular localization of mRNAs for three subtypes of prostaglandin E receptor in kidney. **Am J Physiol**, v. 266, n. 5 Pt 2, p. F823-8, 1994.

SUGIMOTO, Y.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E receptors. **J Biol Chem**, v. 282, n. 16, p. 11613-7, 2007.

SUGIMOTO, Y. et al. Failure of parturition in mice lacking the prostaglandin F receptor. **Science**, v. 277, n. 5326, p. 681-3, 1997.

SUGIURA, T. et al. Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 66, n. 2-3, p. 173-92, 2002.

SUGIURA, T. et al. 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 215, n. 1, p. 89-97, 1995.

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, 2003.

TELLEZ-ZENTENO, J. F. et al. A validation of the new definition of drug-resistant epilepsy by the International League Against Epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 6, p. 829-34, 2014.

TIAN, J.; KIM, S. F.; HESTER, L.; SNYDER, S. H. S-nitrosylation/activation of COX-2 mediates NMDA neurotoxicity. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 105 p. 10537-10540, 2008.

TOH, H.; ICHIKAWA, A.; NARUMIYA, S. Molecular evolution of receptors for eicosanoids. **FEBS Lett**, v. 361, n. 1, p. 17-21, 1995.

TOSCANO, C. D. et al. Altered GABAergic neurotransmission is associated with increased kainate-induced seizure in prostaglandin-endoperoxide synthase-2 deficient mice. **Brain Res Bull**, v. 75, n. 5, p. 598-609, 2008.

TRACEY, K. J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor, other cytokines and disease. **Annu Rev Cell Biol**, v. 9, p. 317-43, 1993.

UEDA, H. et al. A possible pathway of phosphoinositide metabolism through EDTA-insensitive phospholipase A1 followed by lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain. **J Neurochem**, v. 61, n. 5, p. 1874-81, 1993.

ULLRICH, V.; ZOU, M. H.; BACHSCHMID, M. New physiological and pathophysiological aspects on the thromboxane A(2)-prostacyclin regulatory system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1532, n. 1-2, p. 1-14, 2001.

VANE, J. R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. **Nat New Biol**, v. 231, n. 25, p. 232-5, 1971.

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

VASILACHE, A. M.; ANDERSSON, J.; NILSBERTH, C. Expression of PGE2 EP3 receptor subtypes in the mouse preoptic region. **Neurosci Lett**, v. 423, n. 3, p. 179-83, 2007.

VEZZANI, A.; VIVIANI, B. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. **Neuropharmacology**, v. 96, p. 70-82, 2015.

VEZZANI, A. et al. Epilepsy and brain inflammation. **Exp Neurol**, v. 244, p. 11-21, 2013.

VEZZANI, A. et al. Therapeutic potential of new antiinflammatory drugs. **Epilepsia**, v. 52 Suppl 8, p. 67-9, 2011.

VEZZANI, A. et al. Interleukin-1beta immunoreactivity and microglia are enhanced in the rat hippocampus by focal kainate application: functional evidence for enhancement of electrographic seizures. **J Neurosci**, v. 19, n. 12, p. 5054-65, 1999.

VEZZANI, A. et al. The role of inflammation in epilepsy. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 1, p. 31-40, 2011.

VEZZANI, A.; FRIEDMAN, A.; DINGLELINE, R. J. The role of inflammation in epileptogenesis. **Neuropharmacology**, v. 69, p. 16-24, 2013.

VEZZANI, A.; GRANATA, T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. **Epilepsia**, v. 46, n. 11, p. 1724-43, 2005.

VON EULER, U. S. On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). **J Physiol**, v. 88, n. 2, p. 213-34, 1936.

VONKEMAN, H. E., VAN DE LAAR, M. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: adverse effects and their prevention. **Semin Arthritis Rheum.**, v. 39, p. 294-312, 2010.

WALKER, L.; SILLS, G. J. Inflammation and epilepsy: the foundations for a new therapeutic approach in epilepsy? **Epilepsy Curr**, v. 12, n. 1, p. 8-12, 2012.

WARNER, T. D.; MITCHELL, J. A. COX-2 selectivity alone does not define the cardiovascular risks associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Lancet**, v. 371, n. 9608, p. 270-3, 2008.

WERNER, U. et al. Investigation of the pharmacokinetics of celecoxib by liquid chromatography-mass spectrometry. **Biomed Chromatogr**, v. 16, n. 1, p. 56-60, 2002.

WOODWARD, D. F.; LIANG, Y.; KRAUSS, A. H. Prostanoids (prostaglandin-ethanolamides) and their pharmacology. **Br J Pharmacol**, v. 153, n. 3, p. 410-9, 2008.

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, 1993.

YANG, H.; CHEN, C. Cyclooxygenase-2 in synaptic signaling. **Curr Pharm Des**, v. 14, n. 14, p. 1443-51, 2008.

YOSHIKAWA, K. et al. Profiling of eicosanoid production in the rat hippocampus during kainic acid-induced seizure: dual phase regulation and differential involvement of COX-1 and COX-2. **J Biol Chem**, v. 281, n. 21, p. 14663-9, 2006.

YU, M. et al. Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. **J Biol Chem.**, v. 272, p.272, 1997.

ZHANG, J.; RIVEST, S. Distribution, regulation and colocalization of the genes encoding the EP2- and EP4-PGE2 receptors in the rat brain and neuronal responses to systemic inflammation. **Eur J Neurosci**, v. 11, n. 8, p. 2651-68, 1999.

ZHANG, J. M.; AN, J. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin**, v. 45, n. 2, p. 27-37, 2007.

ZHEN, G. et al. (2012) PGE2 EP1 receptor exacerbated neurotoxicity in a mouse model of cerebral ischemia and Alzheimer's disease. **Neurobiol. Aging**, v. 33, p. 2215–2219, 2012.

ZHOU, P. et al. Neuroprotection by PGE2 receptor EP1 inhibition involves the PTEN/AKT pathway. **Neurobiol. Dis.** v. 29, p. 543–551, 2008.

ZHU, P. et al. Heterogeneous expression and regulation of hippocampal prostaglandin E2 receptors. **J Neurosci Res**, v. 81, n. 6, p. 817-26, 2005.

ZORDOKY, B. N.; EL-KADI, A. O. Effect of cytochrome P450 polymorphism on arachidonic acid metabolism and their impact on cardiovascular diseases. **Pharmacol Ther**, v. 125, n. 3, p. 446-63, 2010.

ANEXO

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA O USO DE ANIMAIS – UFSM



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM**

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Determinação das consequências da inibição ou falta da atividade da enzima cox-2 sobre o desenvolvimento de crises."

Número do Parecer: 024/2014

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Carlos Fernando de Mello

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

OBS: Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 07/05/2014.

Santa Maria, 07 de maio de 2014.

Vania Lucia Loro

Prof.^a Dr.^a Vania Lucia Loro
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM