

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS

**EFEITO DE GAMA-DECANOLACTONA APÓS TRATAMENTO SUBCRÔNICO
EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A MODELO DE CRISE EPILÉPTICA
INDUZIDA POR PENTILENOTETRAZOL**

FERNANDA MARCELIA DOS SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE

2021

FERNANDA MARCELIA DOS SANTOS

**EFEITO DE GAMA-DECANOLACTONA APÓS TRATAMENTO SUBCRÔNICO
EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A MODELO DE CRISE EPILÉPTICA
INDUZIDA POR PENTILENOTETRAZOL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Prof. Dra. Patrícia Pereira

Porto Alegre

2021

“The more we know, the more aware we are of what we know not. Indeed, the most important product of knowledge is ignorance.” David Gross, Nobel em Física 2004

AGRADECIMENTOS

À minha mãe Aparecida, pelo cuidado, educação, liberdade e coragem que me mostrou desde muito cedo na vida. Liberdade para ser quem sou e coragem para enfrentar as tantas adversidades. Palavras são insuficientes para expressar o quanto sou grata.

Aos meus professores, desde a educação básica até os dias de hoje, por todo conhecimento compartilhado. Lembro-me de todos sempre com muita ternura.

Aos meus amigos que compartilham comigo as dores e as graças da vida, com vocês esse caminho ficou mais leve, mais fácil e sei que nunca estarei sozinha. Aos de longa data, principalmente Darcila, Camila, Lessando, Rita e Mariele, e aos que tive prazer de conhecer nessa caminhada da pós-graduação, em especial aos parceiros da neuro, Gustavo e Wesley vocês foram/são essenciais!

Ao meu companheiro e amigo, Felipe Haeblerlin, por todo amor, parceria, confiança, cuidado e principalmente compreensão nesses últimos meses de mestrado. Obrigada por andar comigo por esse caminho doido que é a vida!

À minha orientadora, Prof. Dra. Patrícia Pereira, pelo acolhimento no seu grupo de pesquisa, pela orientação, conhecimento e suporte durante os últimos dois anos, levarei para sempre esses aprendizados que adquiri. Muito obrigada pela oportunidade!

Aos colegas e amigos do Laboratório de Neurofarmacologia e Toxicologia Pré-Clinica do ICBS-UFRGS, Mariana Uczay, Pricila Pflüger, Gabriela Regner, Letícia Lazzarotto, Debóra Gonçalves, Wesley Aguida, Luciana Bastian, pela parceria, auxílio e aprendizados, certamente sem vocês essa etapa teria sido muito mais árdua! Aprendi muito com vocês, sentirei saudades!

Ao Departamento de Farmacologia da UFRGS, em especial a Prof, Dra. Ionara Siqueira e Dra. Lolita pelo empréstimo de materiais e as orientações durante as técnicas de *Western Blot*, sempre muito solícitas e atenciosas. Agradeço também, imensamente, à Chris Krebs, por todo conhecimento compartilhado, pela amizade e companhia de bancada. Espero um dia retribuir o que fez por mim, muito obrigada!

Á CAPES pela bolsa de mestrado, sem ela esse título não seria possível.

Ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e seu corpo docente, que me abriu portas que se quer sabia que existiam, pretendo entrar por elas e seguir abrindo muitas outras, a neurociência é um caminho sem volta.

Finalmente, agradeço a todas àqueles que me disseram que estudar não valeria a pena, que não é lucrativo e que a educação não é ferramenta de mudança, é também por vocês que sigo pelo caminho da ciência e educação. Como disse Paulo Freire:

“Se a educação sozinha não transforma a sociedade, sem ela tampouco a sociedade muda.”

RESUMO

Gama-decanolactona (GD) é um composto monoterpeno e tem sido estudada quanto à sua capacidade neuroprotetora. GD reduz o comportamento epiléptico em diferentes modelos animais de crises epiléticas e epilepsia, além de atenuar parâmetros neuroinflamatórios, de estresse oxidativo e genotoxicidade. Assim, dando continuidade às investigações sobre o perfil farmacológico de GD, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito deste composto em modelo agudo de crise epilética induzida por pentilenotetrazol (PTZ), após tratamento agudo e subcrônico. Buscamos também estudar seu mecanismo de ação por meio da expressão receptores GluN2B e adenosina A₁ e avaliar o potencial anti-inflamatório pela expressão de ciclo-oxigenase-2 (COX-2), bem como a genotoxicidade e mutagenicidade por pelo teste Cometa Alcalino e Micronúcleos, respectivamente. Além disso, investigamos o potencial antinociceptivo de GD, utilizando o teste da Placa Quente. Camundongos machos e fêmeas foram tratados com GD (300 mg/kg) por 12 dias. No décimo dia, foram submetidos ao teste da Placa Quente. No décimo terceiro dia, todos os animais receberam PTZ (90 mg/kg) e seu comportamento foi observado por 30 minutos. Pregabalina (PGB) (30 mg/kg) foi usada como controle positivo neste estudo. Ao final do ensaio comportamental, amostras de hipocampo e sangue foram coletadas para análises de *Western Blotting* e ensaio de Cometa Alcalino. Os resultados demonstraram que apenas o tratamento agudo da GD foi capaz de reduzir a ocorrência das crises e aumentar a latência para a primeira crise. Camundongos machos tratados com GD demonstraram um aumento significativo na expressão do receptor GluN2B e diminuição na expressão de COX-2 após o tratamento subcrônico. O tratamento subcrônico com GD aumentou significativamente a expressão de adenosina A₁ nas fêmeas em relação ao tratamento agudo. Tanto o tratamento agudo quanto subcrônico com GD e PGB reduziram os danos ao DNA produzidos pelo PTZ, em machos e fêmeas. Não foi observado aumento na frequência de micronúcleos entre os tratamentos e sexos, bem como não observamos efeito antinociceptivo de GD no teste da Placa Quente. Este estudo sugere que GD, administrada repetidamente por 12 dias, não foi capaz de reduzir as crises epiléticas induzidas por PTZ, mas protegeu contra danos ao DNA, reduziu a expressão de COX-2 e aumentou a expressão de GluN2B.

Palavras-chave: gama-decanolactona, receptor GluN2B, receptor adenosina A₁, COX-2, pentilenotetrazol, crise epilética.

ABSTRACT

Gamma-decanolactone (GD) is a monoterpene compound and has been studied for its neuroprotective capacity. GD has been shown to reduce epileptic behavior in different animal models of seizures and epilepsy, in addition to attenuating neuroinflammatory parameters, oxidative stress and genotoxicity. Thus, continuing the investigations on the pharmacological profile of GD, this study aimed to evaluate the effect of this compound in an acute model of seizure induced by pentylenetetrazole (PTZ), after acute and subchronic treatment with GD. We seek to study its mechanism of action through the expression GluN2B receptors and adenosine A₁ and to evaluate the anti-inflammatory potential through the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2), as well as genotoxicity and mutagenicity through the Comet Alkaline test and Micronucleus test, respectively. In addition, we investigated the antinociceptive potential of GD, using the Hot Plate test. Male and female mice were treated with GD (300 mg / kg) for 12 days. On the tenth day, they were submitted to the Hot Plate test. On the thirteenth day, all animals received PTZ (90 mg/kg) and their behavior was observed for 30 minutes. Pregabalin (PGB) (30mg/kg) was used as a positive control in this study. At the end of the behavioral assay, hippocampus and blood samples were collected for Western Blotting and Comet Alkaline assays. The results showed that only the acute treatment of GD was able to reduce the occurrence of seizures and increase the latency for the first seizure. Male mice treated with GD demonstrated a significant increase in GluN2B receptor expression and a decrease in COX-2 expression after subchronic treatment. Subchronic treatment with GD significantly increased the expression of adenosine A₁ in females in relation to acute treatment. Both acute and subchronic treatment with GD and PGB, were able to reduce the DNA damage produced by PTZ, in both males and females. There was no increase in the frequency of micronucleus between treatments and sexes, as well as the antinociceptive effect of GD in the Hot Plate test. This study suggests that GD, administered repeatedly for 12 days, was not able to reduce PTZ-induced seizures, but was shown to protect against DNA damage, reduce COX-2 expression and increase GluN2B expression.

Keywords: gamma-decanolactone, GluN2B receptor, adenosine A₁ receptor, COX-2, pentylenetetrazole, seizure.

LISTA DE ABREVIÇÕES

A ₁	Receptor de adenosina do tipo A ₁
A _{2A}	Receptor de adenosina do tipo A _{2A}
AMINOPH	Aminofilina – antagonista não seletivo de receptores de adenosina
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
ATP	Adenosina Trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPCPX	8-Ciclopentil-1,3-dipropilxantina (antagonista receptor adenosina A ₁)
EEG	Eletroencefalograma
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABA _A	Receptor GABA do tipo A
GABA _B	Receptor GABA do tipo B
GABA _C	Receptor GABA do tipo C
GAD	Enzima Glutamato descarboxilase
GD	Gama-decanolactona
GluN1	N-metil-D-aspartato subtipo N1
GluN2	N-metil-D-aspartato subtipo N2
GluN2B	N -metil-D-aspartato subtipo N2 subunidade B
INH	Isoniazida
iNOS	Isoforma induzível da enzima óxido nítrico sintase
LPS	Lipopolissacarídeo
Mg ²⁺	Íon Magnésio
mGlu	Receptor metabotrópico para glutamato
N9	Linhagem de célula microglial
NMDA	N-metil-D-aspartato
PTZ	Pentilenotetrazol
SCN1A	Gene que codifica para canal de sódio, dependente de voltagem, tipo I sub alfa
SE	<i>Status epilepticus</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
ZM241385	antagonista do receptor adenosina A _{2A}

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Classificação das crises epiléticas.....	11
Figura 2 – Definições de epileptogênese.....	12
Figura 3 - Abordagem dinâmica da ictogênese.....	13
Figura 4 – Fluxograma da fisiopatologia da neuroinflamação na epilepsia.....	18
Tabela 1 – Relação dos principais fármacos.....	19
Figura 5 - Fármacos antiepiléticos no mercado de 1853 a 2012.....	22
Figura 6 - Estrutura química da Gama-decanolactona (GD).....	23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Epilepsias	10
1.1.1. Epileptogênese.....	11
1.1.3. Modelos animais.....	13
1.1.4. Papel dos neurotransmissores glutamato e GABA.....	15
1.1.5. Neuroinflamação	17
1.2. Fármacos anticonvulsivantes/antiepilépticos.....	19
1.3. Gama-decanolactona.....	22
1.3.1. Mecanismos de ação de GD.....	24
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivos específicos	26
4. HIPÓTESES E PREDIÇÕES	27
5. RESULTADOS	28
5.1. Artigo científico.....	28
6. DISCUSSÃO GERAL	65
7. CONCLUSÃO	68
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
9. ANEXO	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epilepsias

As epilepsias constituem um grupo heterogêneo de transtornos neurológicos, caracterizados pela duradora predisposição para gerar crises epiléticas, uma alteração transitória da atividade neuronal e por consequência, do comportamento, que pode ser acompanhada por comorbidades de ordem cognitiva, social e psicológica (SAVAGE, 2014). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 70% dos pacientes com epilepsias podem não manifestar crises epiléticas se diagnosticados e tratados adequadamente, porém em países em desenvolvimento, cerca de 90% desses pacientes não são tratados. Além disso, pacientes com epilepsias frequentemente sofrem preconceitos e em algumas partes do mundo, a natureza desse transtorno é negligenciada e encoberta por misticismos e medo.

A causa pelo qual um paciente possui epilepsia é na maioria das vezes desconhecida, porém sabe-se que pode ser adquirida por conta de lesões no sistema nervoso central (SNC), como em traumatismos cranioencefálicos, doenças infecciosas ou autoimunes e ainda por alterações genéticas (DEVINSKY *et al*, 2018). Em nível celular, sabe-se que há uma ativação em padrão sincronizado de neurônios, que é transitória, mas pode recrutar uma ou mais populações dessas células. Além disso, um dos pontos centrais para o estudo da natureza das epilepsias tem sido o desequilíbrio na delicada interação entre as neurotransmissões excitatórias e inibitórias no SNC (EISENSTEIN, 2014).

A Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) revisou a classificação das crises epiléticas em 2017 como condição para melhoria no diagnóstico dos diferentes tipos. Essa classificação inclui alterações observadas em eletroencefalograma (EEG) e registro de imagem que complementam a análise comportamental, aumentando a precisão do diagnóstico e por consequência, do tratamento (Fig. 1) (FISHER *et al*, 2017).

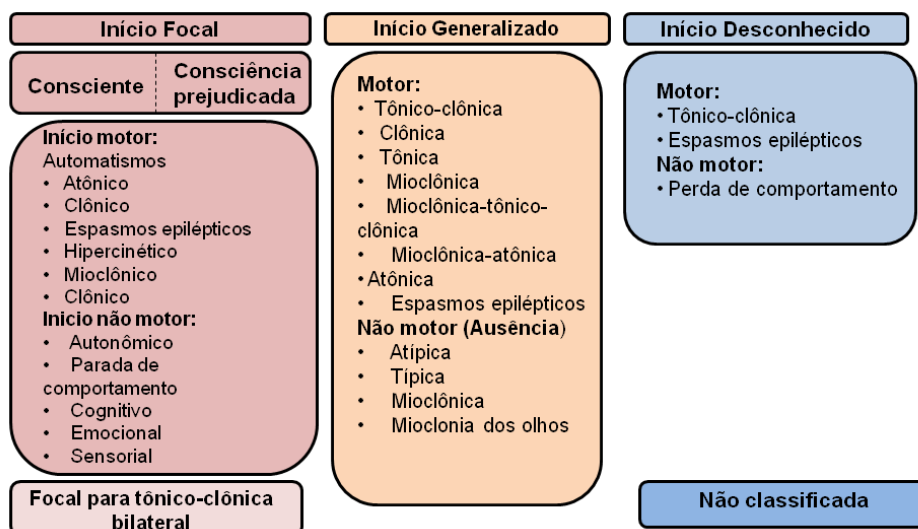


Figura 1. Classificação de crises epiléticas atualizada em 2017, pela Liga Internacional Contra Epilepsia. A presente classificação é direcionada para profissionais da saúde e especialistas no diagnóstico e tratamento das epilepsias. De acordo com a classificação, as crises podem ter início focal (acometendo uma região ou hemisfério cerebral), início generalizado (tem origem simultânea em ambos os hemisférios cerebrais) e de início desconhecido. As crises de início focal podem ainda ter ou não prejuízo da consciência, com ou sem início de atividade motora anormal, essas crises podem ainda progredir para uma crise tônico-clônica bilateral, acometendo ambos os hemisférios. A crise de início generalizado inclui também observações motoras e não motoras que não eram contempladas na versão anterior da classificação. Crises de início desconhecidos contemplam manifestações motoras e não motoras. Figura adaptada de Devinsky *et al*, 2018.

1.1.1. Epileptogênese

Epileptogênese é o processo pelo qual uma rede neuronal funcionalmente normal é alterada, tornando-se suscetível às crises epiléticas, ou seja, apresenta probabilidade aumentada para gerar crises epiléticas espontâneas. Classicamente, a epileptogênese tem sido referida como o período latente entre o insulto epileptogênico, ou seja, o evento que pode levar ao desenvolvimento de uma epilepsia, até a identificação da primeira crise (PITKÄNEN *et al*, 2015; DUDEK; STALEY, 2012). No entanto, estudos mostram que a frequência e a severidade das crises epiléticas espontâneas recorrentes continuam a

aumentar após a primeira crise não provocada, tonando o processo de epileptogênese prolongado e mais complexo do que inicialmente acreditava-se (PITAKÄNEN *et al*, 2020).

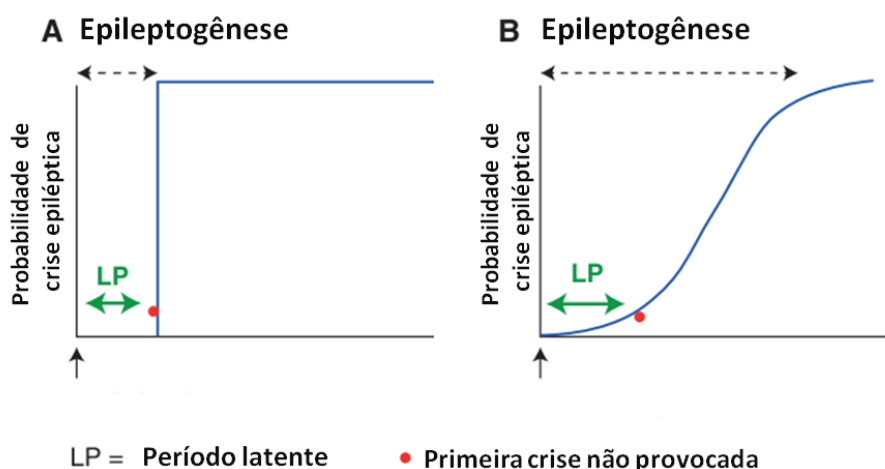


Figura 2. Definições de epileptogênese. A) Definição clássica, a qual considera a epileptogênese o período latente entre um insulto e a primeira crise epiléptica não provocada. B) Baseada em estudos experimentais e em observações clínicas, a definição mais recente considera no período latente eventos subepilépticos que podem aumentar de frequência antes e depois da identificação da primeira crise epiléptica. Adaptado de Pitakänen *et al*, 2020.

1.1.2. Ictogênese

Há mecanismos que levam a geração de crises epilépticas os quais basicamente estão relacionados ao desequilíbrio entre sistemas excitatórios e inibitórios em diferentes níveis do SNC, desde o desequilíbrio molecular, neste caso, iônico até o desequilíbrio à nível de circuitos e redes neuronais. Para além do desbalanço dos sistemas excitatórios e inibitórios, a sincronização neuronal também é um evento conhecido. Fenômenos como esses que levam a geração de crises epilépticas caracterizam-se, portanto, na ictogênese (DA SILVA E CABRAL, 2008).

Como Chvojka *et al*, 2019 propuseram (Fig. 3), em um indivíduo saudável, o SNC funciona sob uma dinâmica de alta estabilidade e muita resiliência, já em um indivíduo com epilepsia, que possui sustentada predisposição para gerar crises epilépticas, essa dinâmica altera para muita instabilidade e pouca resiliência. Em pessoas que não possuem

perturbações conhecidas no SNC, para alterar da dinâmica saudável de operação do seu SNC para uma dinâmica epiléptica, é necessário um forte e intenso insulto, como por exemplo, uma intoxicação, traumatismo encefálico e nesses casos são comuns crises epiléticas agudas. Em sistemas nervosos que operam sob uma dinâmica de muita instabilidade e pouca resiliência, há uma rápida e frequente alteração do estado estável para instável.

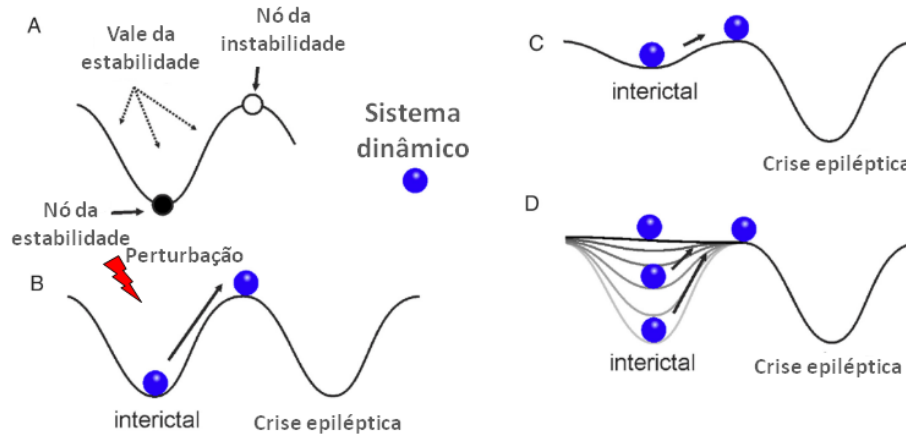


Figura 3. Abordagem dinâmica da ictogênese proposta por Chvojka *et al*, 2019. A) O SNC exemplificado como um sistema dinâmico, podendo operar no estado interictal ou epilético. Cada estado é descrito como vale da estabilidade ou instabilidade, tendo seus respectivos nós que representam o seu ponto extremo, respectivamente. B) Uma crise epilética, derivada da dinâmica operacional do SNC, precisa de uma perturbação para ocorrer. C) Como exemplo em epilepsias generalizadas, que possuem característica de muita instabilidade e pouca resiliência frente a uma – mesmo que fraca - perturbação, pode facilmente alterar seu estado. D) Em um SNC que perde progressivamente a estabilidade e resiliência tem a sensibilidade aumentada à perturbação e sua recuperação é retardada. Interictal = período entre crises epiléticas; Ictal = crise epilética.

1.1.3. Modelos animais

O uso de animais para o estudo das epilepsias tem sido aplicado há cerca de 40 anos com o objetivo principal de entender os mecanismos que levam às crises epiléticas e/ou epilepsias, desta forma, direcionando para estratégias de tratamento (PITÄKEN *et al*, 2017). Cada modelo animal é único tem como objetivo reproduzir características particulares de um

determinado tipo de crise epiléptica ou epilepsia, possibilitando assim avaliar suas consequências e mecanismos envolvidos (YIN *et al*, 2013).

Portanto, de acordo com o objetivo da pesquisa, determinada espécie é utilizada. Historicamente o uso de mamíferos como gatos, cachorros e primatas não humanos objetivou a experimentação de indução de crises epilépticas com a vantagem de semelhança genética e morfofuncional do cérebro. Demais vertebrados como aves e girinos do gênero *Xenopus*, e invertebrados como moluscos, foram importantes para estudar mecanismos moleculares e celulares. Recentemente o uso de *Drosophila melanogaster* (mosca-das-frutas) tem sido um excelente e promissor modelo para o estudo de epilepsias por mutações genéticas, como exemplo, a mutação no gene *SCN1A*, que codifica canais de sódio, comum na Síndrome de Dravet, uma epilepsia genética e refratária ou tratamento farmacológico (SCHUTTE *et al*, 2014; GRONE; BARBAN, 2015).

Atualmente, roedores, principalmente ratos e camundongos, são os mais amplamente utilizados, tendo em vista o pequeno tamanho corporal, rápida reprodução, fisiologia e genética bem conhecidos pela ciência (GRONE; BARBAN, 2015).

Os modelos animais para estudo de crises epilépticas e/ou epilepsia estão organizados em: químicos, elétricos e genéticos. Alguns dos modelos químicos mais comuns são:

1) Modelo da Pilocarpina: Descrito por Tursky em 1983 no estudo com ratos Wistar. É utilizado para induzir *Status epilepticus* (SE) e possui características semelhantes à Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) em humanos (GRONE; BARBAN, 2015). O período de SE descrito por Tursky caracterizava-se por aproximadamente 45 minutos de observação de movimentos faciais, espasmos e salivação, posterior a isso, um período de latência e após, a manifestação de crises espontâneas e recorrentes. A pilocarpina é um agonista colinérgico muscarínico, e sua atividade depende de receptores M1 (EYO *et al.*, 2016), inclusive, estudos sugerem que o início do processo de epileptogênese depende de M1, porém a continuidade envolve a liberação de glutamato e ativação de receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Como consequência, estudos observam a morte celular em regiões como córtex, amígdala, hipocampo, tálamo e substância negra (TROY *et al*, 2002; REDDY; KURUBA 2013; GREENWOOD *et al*, 2018).

2) Modelo da Picrotoxina: O alcaloide picrotoxina tem atividade epileptogênica por meio do bloqueio de receptores GABA_A (SALIH; MUSTAFA, 2008; CHINDO *et al*, 2014). Diferente da bicuculina (outro modelo químico antagonista GABA_A), a picrotoxina é facilmente solúvel em solução salina.

3) Modelo da Isoniazida: A isoniazida inibe a atividade da enzima GAD, tendo assim ação direta na síntese do neurotransmissor GABA, acarretando uma rápida depleção desse neurotransmissor. A sua atividade, portanto, leva a um prejuízo no sistema inibitório (CHINDO *et al*, 2014).

4) Modelo do Pentilenotetrazol (PTZ): É um modelo bem estabelecido para crises epiléticas generalizadas, através da administração aguda pode se obter crises clônicas, mioclônicas e tônico-clônicas e a administração repetida (*kindling*) induz diminuição do limiar para crises epiléticas e aumenta permanentemente a suscetibilidade do animal para apresentar crises (COITINHO *et al*, 2014; NADER *et al.*, 2018). Sua ação é antagonizar o receptor GABA_A, bloqueando as correntes de cloreto (PSARROPOULOU *et al*, 1994; DHIR, 2012; REDDY; KURUBA, 2013) e seu efeito é mais proeminente no córtex e no hipocampo (NADER *et al*, 2018).

1.1.4. Papel dos neurotransmissores glutamato e GABA

O neurotransmissor glutamato está amplamente presente no SNC de mamíferos e é indispensável nas funções essenciais desse sistema. Este neurotransmissor faz a mediação do efeito excitatório através da ativação de receptores pós-sinápticos ionotrópicos, como AMPA, NMDA e Cainato, bem como através de receptores metabotrópicos, como a classe de receptores mGlu I, II e III (BARKER-HALISI; WHITE, 2020). É conhecido que a concentração extracelular de glutamato tem efeito neurotóxico e transportadores de glutamato e auto-receptores são importantes no processo de reciclagem e tamponamento do glutamato, colaborando para a homeostase do sistema (HANADA, 2020).

Em uma situação de *SE*, por exemplo, há uma super estimulação de receptores glutamatérgicos, sustentando a atividade epilética e levando ao dano de células nervosas, além da internalização de receptores GABA_A, dificultando a ação de equilíbrio entre os

sistemas inibitórios e excitatórios (WASTERLAIN; CHEN; 2008; DORANDEU *et al.* 2013; BARKER-HALISI; WHITE, 2020).

Em termos de conhecimento fisiológico os receptores AMPA e NMDA são os mais estudados. Os receptores AMPA têm papel fundamental na atividade excitatória do SNC, sendo que a regulação da sua composição e localização depende da atividade e intensidade das sinapses, desta forma, as células nervosas podem fortalecer ou enfraquecer suas respostas, e mudanças na plasticidade sináptica mediada por AMPA contribuem para alterações patológicas nas redes neuronais (HANADA, 2020).

Receptores NMDA são bloqueados por Mg^{2+} na membrana em repouso e liberados quando há despolarização da mesma. A atividade do receptor é mais lenta e diferentemente complexa quando comparada ao receptor AMPA (HANADA, 2020). Na caracterização dos receptores NMDA, as subfamílias GluN1 e GluN2, preferencialmente localizadas no retículo endoplasmático e região sináptica, são fundamentais para o sistema excitatório. A subunidade GluN2B tem importante papel nas correntes sinápticas mediadas por NMDA, nos espinhos dendríticos e na regulação do citoesqueleto de células piramidais do hipocampo (AKASHI *et al.*, 2009).

GABA é o principal neurotransmissor inibitório do SNC, a sua atividade é mediada pelos receptores pré e pós-sinápticos classificados nas categorias $GABA_A$ e $GABA_C$, que são ionotrópicos, e $GABA_B$, metabotrópico (BHAGAT *et al.*, 2020). A diminuição de interneurônios GABAérgicos ou diminuição dos seus terminais axonais e falhas no sistema inibitório são conhecidos por contribuir para a persistência de crises epiléticas em caso de epilepsias adquiridas (SHETTY; UPADHYA, 2016). Além disso, no início do desenvolvimento humano GABA despolariza as membranas nos neurônios e exerce funções excitatórias. Em um SNC normal, essas funções são perdidas com a maturação do sistema, porém tal função paradoxal dos neurônios GABAérgicos tem sido observada em hipocampo de adultos com epilepsias PALMA *et al.*, 2006; KHAZIPOV *et al.*, 2015).

O principal recurso inibitório do SNC é oferecido pela atividade dos interneurônios GABAérgicos e tem papel fundamental no processamento de informação, na regulação da atividade neuronal através da sua interação com neurônios excitatórios e inibitórios. O estudo funcional dos interneurônios tem ajudado a entender os mecanismos intrínsecos envolvidos na geração e perpetuação das crises epiléticas (MARAFIGA *et al.*, 2020).

Com a necessidade de manter o equilíbrio entre excitação e inibição, os esforços farmacológicos têm sido feitos para identificar alvos que podem ser modulados nessas duas vias (BARKER-HALISI; WHITE, 2020).

1.1.5. Neuroinflamação

A neuroinflamação pode ser classificada como clássica e neurogênica. A clássica inclui perturbações promovidas por agentes como microrganismos (bactérias, fungos, vírus) e diversas toxinas. Por outro lado, a neuroinflamação neurogênica, termo proposto para o SNC em 2014 por Xanthos e Sandkühler, define processos neuroinflamatórios desencadeados pelo aumento da atividade neuronal, associados muitas vezes com estresse, crises epiléticas e estímulos nocivos.

A neuroinflamação é conhecida por desempenhar um importante papel na fisiopatologia das doenças do sistema nervoso (Fig.4), incluindo as epilepsias (VEZZANI *et al.*, 2011). Fatores inflamatórios, tais como Interleucina-1 β (IL-1 β), Interleucina-6 (IL-6), Fator Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) (citocinas pró-inflamatórias) e a enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2), liberados por células do sistema imune central e periférico, contribuem para a promoção e/ou intensificação da atividade epileptogênica no cérebro (CHEN *et al.*, 1995; GULLO *et al.*, 2014; KAUR *et al.*, 2015; PFLÜGER *et al.*, 2016).

COX-2 é a forma induzida da enzima ciclo-oxigenase, principalmente localizadas nas células imunes e altamente expressas em situações patológicas. A COX-2 faz parte da cascata do ácido araquidônico, catalisa sua conversão em prostaglandinas, importantes na resposta parácrina da neuroinflamação (VANE *et al.*, 1998).

Yagamata *et al.*, 1993 mostrou que o aumento de COX-2 em córtex e hipocampo de ratos foi regulada pela atividade sináptica de receptores NMDA de glutamato. Recentemente a COX-2 tem se tornado alvo para investigação farmacológica, uma vez que diversos estudos têm demonstrado que sua inibição tem efeitos positivos na diminuição da frequência de crises epiléticas, bem como na eficiência de antiepiléticos já administrados (RAWAT *et al.*, 2019).

Na última década ocorreu um aumento de estudos experimentais e clínicos evidenciando que a neuroinflamação tem um papel importante na fisiopatologia das

epilepsias. Estudos emergentes têm observado efeitos anticonvulsivantes de alguns fármacos anti-inflamatórios em crises epilépticas induzidas por febre ou relacionadas com a ativação do sistema imune (VEZZANI *et al*, 2011).

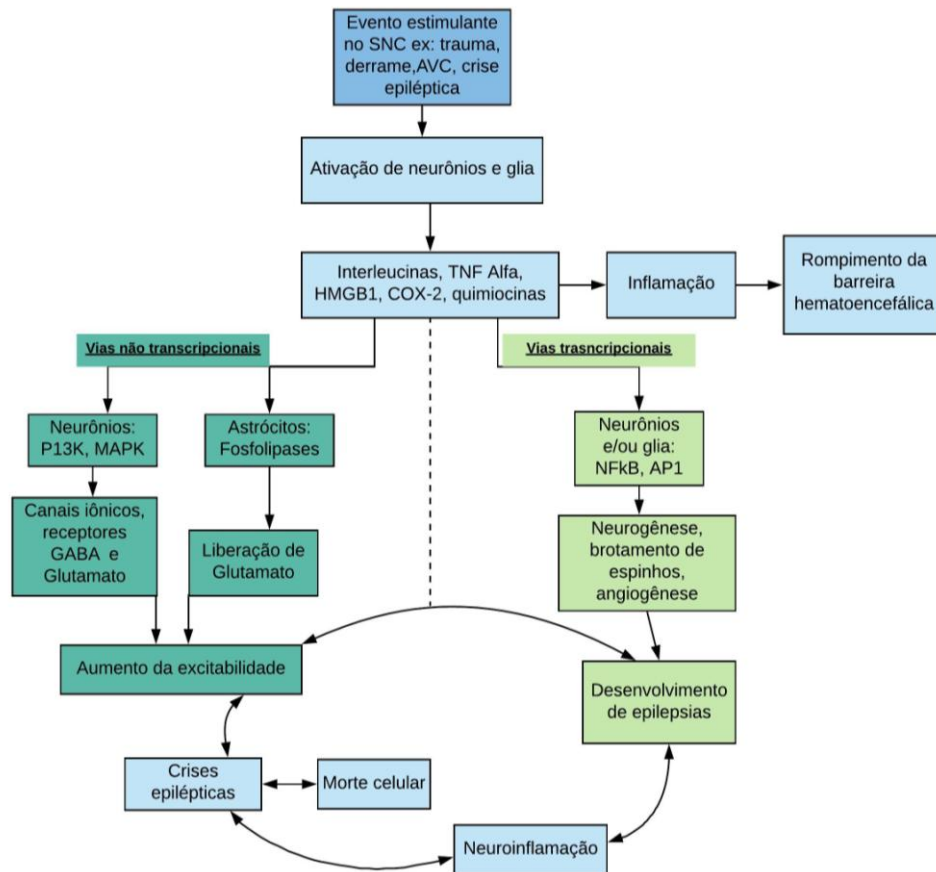


Figura 4. Fluxograma da fisiopatologia da neuroinflamação na epilepsia. Os efeitos da neuroinflamação do SNC contribuem para a geração de crises epilépticas e a morte celular, que, por sua vez, promove inflamações e aumenta a excitabilidade, estabelecendo um círculo vicioso de eventos que culminam na contribuição para o desenvolvimento de uma epilepsia. Abreviações: AP1= Proteína Adaptadora 1; HMGB1 = Proteína 1 do Grupo de Alta Mobilidade; MAPK =Proteína Cinase Ativada por Mitógeno; NFκB = Fator Nuclear Kappa Beta; PI3K = Fosfoinositídeo 3-Quinase; TNF Alfa = Fator Necrose Tumoral Alfa. Adaptado de VEZZANI *et al*, 2011.

1.2. Fármacos anticonvulsivantes/antiepilépticos

Embora em alguns casos a cirurgia seja indicada, o meio mais comum para o tratamento de pacientes com epilepsias é o farmacológico, sendo eficaz em cerca de 70% dos casos, porém os efeitos adversos costumam ser fatores limitantes no tratamento.

Além do tratamento de epilepsias, os fármacos anticonvulsivantes são usados para tratar crises epiléticas comórbidas de outras patologias, como infecções, tumores e também para tratar dor neuropática (Tabela 1 e Fig. 5). Por essa razão são mais conhecidos como anticonvulsivantes e não antiepilépticos (RANG; DALE, 2015).

Os principais anticonvulsivantes são caracterizados em basicamente três diferentes mecanismos de ação: (1) potencialização da ação de GABA, (2) inibição da função de canais de sódio dependentes de voltagem e (3) inibição de canais de cálcio, embora outros fármacos possuam mecanismos como bloqueio de receptores de glutamato e inibição da liberação de glutamato, o tratamento tem se mostrado eficaz apenas em modelos animais (ROGAWSKI; LÖSCHER, 2004, RANG; DALE, 2015).

Tabela 1. Relação dos principais fármacos usados em pacientes com epilepsias sintomáticas, mecanismos de ação e principais efeitos adversos.

Fármaco	Mecanismos de ação	Detalhes da ação	Efeitos adversos comuns	Usos principais
Fenobarbital^a	Potencializa a ativação de receptores GABA	Facilita abertura de receptores GABAA e influxo de cloreto	Intensa sedação, depressão	Crises focais, generalizadas
Valproato de Sódio	Bloqueio de canais de cálcio ativados por baixa voltagem	Altera a despolarização rítmica dos neurônios do tálamo	Náuseas, perda de cabelos, ganho de peso, malformações fetais	Eficaz em crises de ausência, mioclônicas, focais e generalizadas
Carbamazepina	Bloqueio uso-dependente dos canais de sódio dependentes de voltagem		Sedação, ataxia, visão embaçada, retenção hídrica, reações de hipersensibilidade, leucopenia,	Amplamente eficaz, exceto em crises de ausência

Fenitoína	Inibição da função dos canais de sódio dependentes de voltagem	Afetam a excitabilidade da membrana	Ataxia, vertigem, hipertrofia gengival, hirsutismo, anemia megaloblástica, malformação fetal, reações de hipersensibilidade	Crises focais, generalizadas
Etossuximida	Bloqueio de canais de cálcio ativados por baixa voltagem	Altera a despolarização rítmica dos neurônios do tálamo	Náuseas, anorexia, alterações do humor, cefaleia	Crises de ausência
Zonisamida	Bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem		Sedação (discreta) supressão do apetite, e perda de peso	Terapia adjunta nas crises focais e generalizadas
Vigabatrina	Inibe a enzima GABA transaminase	Inibe a inativação de GABA	Sedação, alterações comportamentais e do humor (ocasionalmente psicose), alterações na visão periférica	Eficaz para epilepsias refratárias
Pregabalina	Análogo GABA/Antagonista subunidade $\alpha 2\delta 1$ de canais de cálcio	Reduz o tráfego de cálcio nos terminais nervosos	Poucos efeitos adversos, principalmente sedação	Potente ação em crises de início focal
Gabapentina	Análogo GABA/Antagonista subunidade $\alpha 2\delta 1$ de canais de cálcio	Reduz o tráfego de cálcio nos terminais nervosos	Poucos efeitos adversos, principalmente sedação	Crises focais, analgésico para dor neuropática
Lamotrigina	Inibição da função dos canais de sódio dependentes de voltagem	Afetam a excitabilidade da membrana	Tontura, sedação, erupções cutâneas	Crises focais, generalizadas e de ausência
Levetiracetam	Ligação à proteína vesicular 2A	Interfere na liberação de neurotransmissor	Sedação (discreta), ansiedade, perda de apetite	Crises focais com ou sem generalização, crises mioclônicas
Tiagbina	Inibidor do transportador GAT1	Inibe a remoção de GABA da fenda sináptica	Sedação Tontura Sensação de leveza	Eficaz na terapia adjuvante de crises focais
Topiramato	Potencializa efeito de GABA/diminuiu atividade canais de sódio/Antagonismo		Sedação, menos interações farmacocinéticas que a fenitoína, malformação fetal	Terapia adjuvante em casos refratários de crises focais e generalizadas

AMPA

Perampanel	Antagonismo não competitivo AMPA		Vertigens, ganho de peso, sedação, coordenação comprometida, alterações do humor e do comportamento	Eficaz em crises focais refratárias
Oxcarbazepina	Pró fármaco/Bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem		Instabilidade no humor, sonolência, tremor, diplopia	Eficaz nas crises parciais
Lacosamida	Potencialização da inativação dos canais de sódio dependentes de voltagem	Afeta processos de inativação lentos	Náuseas, vômitos, vertigens, distúrbios visuais, coordenação comprometida, mudanças do humor	Terapia adjuvante para crises focais com ou sem generalização
Medicamentos à base de canabidiol^b	Pouco conhecido, estudam sugerem agonismo inverso CB ₂ , antagonismo CB ₁		Potente interação com outros antiepilépticos, sonolência, diarreia, redução de apetite	Epilepsias refratárias

^a Efeitos adversos importantes, pouco utilizado atualmente

^b O uso terapêutico passou a ser controlado pela ANVISA em 2015 através de emissão de autorizações para importação sob prescrição médica.

Fonte: RANG;DALE, 2015; YACUBIAN *et al*, 2014; GASTON; FRIDMAN, 2017; DE ALMEIDA PEREIRA *et al.*, 2018.

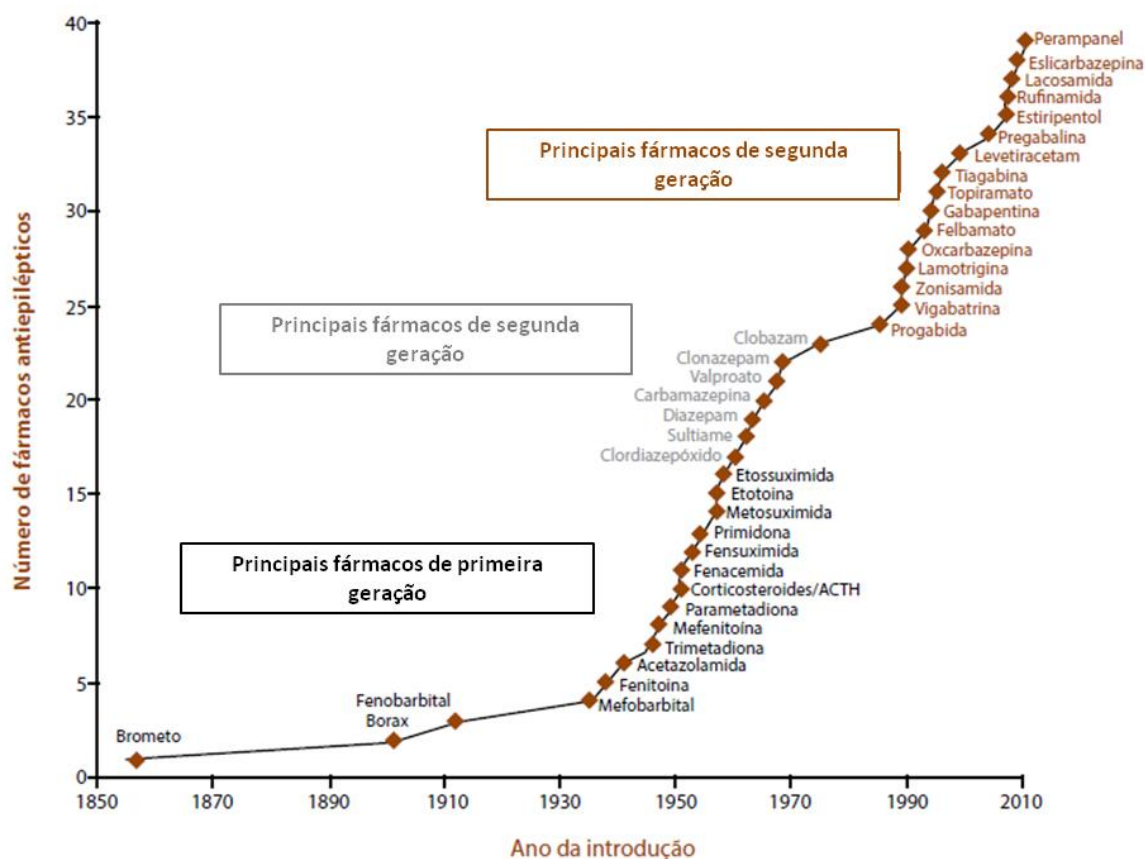


Figura 5. Fármacos antiepilépticos no mercado de 1853 a 2012, classificados como primeira, segunda e terceira geração. Adaptado de YACUBIAN *et al.*, 2014.

1.3. Gama-decanolactona

A procura por tratamentos alternativos aos fármacos convencionais tem aumentado, considerando os importantes efeitos adversos dos fármacos antiepilépticos, bem como o custo benefício (impacto e amplitude de sua eficácia). A procura por fármacos orgânicos, por exemplo, é uma prática relacionada à insatisfação com os tratamentos convencionais (RATES, 2001).

Dentre os compostos orgânicos estudados para o tratamento de patologias do SNC estão as lactonas. Tais substâncias têm sido reconhecidas pelas propriedades neuroativas (FERRENDELI *et al.*, 1989; HOLLAND *et al.*, 1992) dentre elas, efeitos anestésicos, anti-inflamatórios e hipnóticos (DUKE, 1992; VIANA *et al.*, 2006).

Gama-decanolactona (GD) é um composto sintético monoterpênico com estrutura química semelhante às lactonas presentes no óleo essencial da planta *Aeollanthus suaveolens* (Fig. 6) (ELISABETSKY *et al.*, 1995; COELHO DE SOUZA *et al.*, 1997; PFLÜGER *et al.*, 2016).

Estudos precursores de GD mostraram que quando testada modelo animal de crise epiléptica induzida por PTZ em camundongos, apresentou atividade hipnótica, antiepiléptica e hipotérmica (COELHO DE SOUZA *et al.*, 1997). Em ensaios de depressão e ansiedade (experimentos com nado forçado e labirinto em cruz elevada, respectivamente), GD não demonstrou efeito positivo, sugerindo que não possui atividade do tipo antidepressiva e ansiolítica (VIANA *et al.*, 2007). No modelo de *kindling* com PTZ, considerado um importante modelo de epileptogênese, apresentou significativo efeito neuroprotetor, bem como atividade antígeno-tóxica, uma vez que reparou o dano ao DNA, induzido por PTZ (DE OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Estudos mais recentes realizados por Pflüger *et al.*, 2016, *in vitro*, demonstraram que GD atenuou a ativação de células microgliciais N9 induzidas por LPS, uma endotoxina, presente em bactérias gram-negativas, além disso, foi observada diminuição na expressão de marcadores inflamatórios como a enzima iNOS, TNF- α e inibição da formação de EROS nas células microgliciais. Nesse mesmo modelo GD bloqueou marcadores de apoptose como a fosforilação da p38 e ativação da caspase-9 clivada, diminuindo o dano causado ao DNA.

Em modelo agudo de pilocarpina, camundongos que receberam 300 mg de GD demonstraram aumento da latência para a primeira crise epiléptica. Nas análises bioquímicas, tanto 300 mg/kg como 100 mg/kg de GD protegeram os animais do estresse oxidativo e dano ao DNA produzido pela pilocarpina, mostrando-se também efetivo no teste Ames de mutagenicidade (PFLÜGER *et al.*, 2018a).

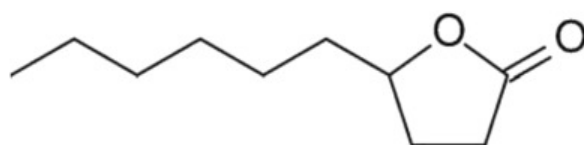


Figura 6. Estrutura química da Gama-decanolactona (GD). Fonte: PFLÜGER *et al.*, 2016.

1.3.1. Mecanismos de ação de GD

Glutamato e GABA

A ruptura entre o balanço da neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica é conhecido pela ciência e explica a hiperexcitabilidade em redes neuronais. Além disso, é também um fato muito explorado para estudar os mecanismos envolvidos nas epilepsias (DINUZZO *et al*, 2014).

A exacerbada concentração extracelular de glutamato tem sido relacionada com neurotoxicidade, falhas nos seus transportadores e autoreceptores têm efeitos importantes na reciclagem e tamponamento do glutamato, dificultando a homeostase do SNC após uma crise epiléptica (DINUZZO *et al*, 2014; HANADA, 2020).

A inibição GABAérgica é considerada o principal mecanismo para limitar e impedir que atividades excitatórias paradoxais propaguem-se pelas redes neuronais (KHAZIPOV *et al*, 2015). A neuroproteção exercida pela funcionalidade inibitória tem inspirado estudos farmacológicos para tratamentos de epilepsias através do investimento em estratégias para aumentar a disponibilidade de GABA, como por exemplo o aumento de receptores GABA_A e bloqueio da recaptção e da degradação desse neurotransmissor (TREVELYAN; SHEVON, 2013; KHAZIPOV *et al*, 2015).

Apesar dos conhecidos efeitos de GD em modelos animais, como muitas substâncias que atuam no SNC, o mecanismo de ação ainda não é bem compreendido.

O primeiro estudo que investigou mecanismo de ação de GD foi realizado por Pereira *et al*, 1997. Esse estudo utilizou a técnica de *Binding* de Glutamato *in vitro* e verificou efeito inibitório de GD sobre a interação do neurotransmissor com seus receptores.

Pflüger *et al*, 2018b avaliou o perfil farmacológico e possível mecanismos de ação de GD em modelos animais de crises epilépticas induzidas pelos composto isoniazida (INH) (inibidor da síntese de GABA), picrotoxina (PTX) (antagonista do receptor GABA_A) e 4-aminopiridina (4AP) (antagonista seletivo de canais de potássio KV1). Tais experimentos demonstraram aumento da latência para primeira crise clônica, bem como diminuição da porcentagem de crises nos modelos INH e 4AP em animais que receberam a dose de 300mg/kg de GD. Esses resultados sugerem que o efeito de GD sobre as crises pode estar

relacionado com a sua capacidade em modular a enzima GAD (responsável pela síntese de GABA) e ativar, direta ou indiretamente, canais de potássio.

Adenosina

Adenosina é um mensageiro purinérgico que regula muitas funções fisiológicas, particularmente em tecidos excitáveis. Considerada um regulador endógeno das atividades neuronais, sua deficiência tem sido identificada em cérebros com hiperexcitabilidade (DUNWIDDIE; MASINO, 2001; ARONICA *et al*, 2013). Em encéfalos adultos, a adenosina pode ser liberada pelos neurônios ou ainda derivada da clivagem de ATP extracelular. Por outro lado, a enzima Adenosina Kinase (ADK) encontrada em astrócitos controla a quantidade de adenosina via fosforilação para adenosina monofosfato (AMP) (BOISON, 2013).

Os receptores de adenosina constituem-se por sete domínios transmembrana, são acoplados a proteína G e relacionados a uma grande variedade de mecanismos de transdução. O receptor A₁ é o mais abundante no SNC, está relacionado à modulação de abertura de canais de potássio e inibição de canais de cálcio. O receptor A_{2A}, menos frequente no SNC, está relacionado à ativação da Adenilato Ciclase (AC). O antagonismo de ambos receptores tem sido relacionado com efeitos estimulantes (DUNWIDDIE; MASINO, 2001).

Estudos tem demonstrado que falhas na modulação do sistema adenosinérgico contribuem para a geração de crises epiléticas. Em 2009, Boison publicou uma importante revisão que discute estratégias de terapia baseada no aumento direcionado da adenosina como terapêutica em crises epiléticas.

Pflüger *et al*, 2020 investigou possível interação de GD com o sistema adenosinérgico utilizando o modelo de *kindling* induzido por PTZ e agudo, de crise epilética induzida por aminofilina (AMINOPH). O mecanismo de ação de GD foi avaliado pela administração de antagonistas dos receptores A₁, com uso de DPCPX e A_{2A}, com ZM241385. O antagonismo de receptores A₁ bloqueou o efeito de GD, enquanto o bloqueio de A_{2A} não mostrou efeitos significativos no comportamento epilético dos animais. Portanto, este estudo sugere o envolvimento de GD no sistema adenosinérgico via receptor A₁. Além disso, esse estudo também demonstrou que GD aumentou a expressão de receptores GABA α 1, sugerindo efeito relacionado com a modulação de TNF- α (observado

no estudo *in vitro* citado anteriormente), uma vez que o aumento dessa citocina é conhecida para a endocitose dos receptores GABA, o que conseqüentemente diminui a função inibitória.

2. JUSTIFICATIVA

Os efeitos neuroprotetores de GD observados nos modelos de crises epiléticas e epilepsia observados até o momento, bem como o perfil farmacológico dessa substância foram estudados principalmente por meio da administração aguda deste composto. Considerando que fármacos antiepiléticos são utilizados, na maioria das situações, de forma contínua, é essencial conhecer seus efeitos neuroprotetores e potencial toxicológico após tratamento contínuo. Entende-se como de especial importância o conhecimento dos mecanismos de ação e dos efeitos comportamentais das substâncias candidatas ao tratamento de crises epiléticas, a médio/longo prazo no organismo, bem como sua ação analgésica e modulatória sobre parâmetros inflamatórios, bioquímicos e genotóxicos.

3. OBJETIVOS

Avaliar o efeito do tratamento subcrônico com GD *in vivo* em modelo de crise epilética induzida por pentilenotetrazol, através da investigação de mecanismos de ação, parâmetros bioquímicos, genotóxicos, mutagênicos e comportamentais.

3.1. Objetivos específicos

Avaliar o efeito da administração subcrônica de GD sobre:

- a) Latência e ocorrência de crise epilética induzida por PTZ;
- b) Parâmetro inflamatório (expressão de COX-2);
- c) Modelo comportamental de dor (placa quente);
- d) Genotoxicidade (Cometa Alcalino);
- e) Mutagenicidade (Micronúcleos)
- f) Comparar o tratamento agudo de GD, em modelo de crise epilética, com o tratamento subcrônico deste composto;

- g) Avaliar mecanismo de ação através da expressão de receptores GluN2B e Adenosina A₁;
- h) Avaliar todos os parâmetros descritos nos itens acima em machos e fêmeas.

4. HIPÓTESES E PREDIÇÕES

Hipótese 1 - GD administrada em tratamento subcrônico aumentará a latência para a crise epiléptica induzida por PTZ e diminuirá a ocorrência destas crises em comparação com o tratamento agudo.

Predição 1 - O período de latência no tratamento com GD será significativamente maior quando comparado ao grupo controle negativo que receberá salina e PTZ.

Predição 2 - Animais tratados com GD em modelo subcrônico apresentarão menores escores de crise epiléptica, de acordo com a Escala de Racine (ER), quando compararmos com o grupo de tratamento agudo. Tal observação também valerá quando compararmos o grupo de tratamento subcrônico com GD com os demais.

Hipótese 2 - GD diminuirá o comportamento nociceptivo e a expressão de parâmetro inflamatório, bem como a genotoxicidade.

Predição 1. Pelos conhecidos efeitos neuroprotetores, animais tratados com GD em modelo subcrônico irão apresentar menor expressão de marcadores envolvidos no processo de neuroinflamação, como a COX-2 quando comparados com os grupos controle.

Predição 2- Tanto o processo neuroinflamatório provocado pela crise quanto o teste da placa quente causam dor, entretanto, pelos conhecidos efeitos neuroprotetores, incluindo a atenuação de processos inflamatórios, animais tratados com GD em modelo subcrônico diminuirão o comportamento associado à dor, sugerindo ação analgésica do composto em teste.

Hipótese 3 – Considerando a influência hormonal no comportamento e fisiologia dos animais, machos e fêmeas apresentarão padrões de respostas diferentes.

Predição 1 - Será observada diferença entre os grupos de machos e fêmeas, considerando a complexidade hormonal de ambos os sexos, bem como a já estabelecida atividade de interação entre substâncias anticonvulsivantes e hormônios sexuais.

5. RESULTADOS

5.1. Artigo científico

Gamma-decanolactone alters the expression of GluN2B, A₁ receptors and COX-2 and reduces DNA damage in the PTZ-induced seizure model after subchronic treatment in mice

Fernanda Marcelia dos Santos¹, Pricila Fernandes Pflüger¹, Leticia Lazzarotto¹, Mariana Uczay¹, Wesley Roberto de Aguida¹, Lisiane Santos da Silva², Jayne Torres De Sousa³, Jaqueline Nascimento Picada³, Iraci Lucena da Silva Torres², Patrícia Pereira^{1*}

Será submetido à publicação na revista *Neurochemical Research*

ISSN Eletrônico 1573-6903

Qualis CAPES B1/ Fator de impacto 3.038 (2019)

Title page

Gamma-decanolactone alters the expression of GluN2B, A₁ receptors, and COX-2 and reduces DNA damage in the PTZ-induced seizure model after subchronic treatment in mice

Fernanda Marcelia dos Santos¹, Pricila Fernandes Pflüger¹, Leticia Lazzarotto¹, Mariana Uczay¹, Wesley Roberto de Aguida¹, Lisiane Santos da Silva², Jayne Torres De Sousa³, Jaqueline Nascimento Picada³, Iraci Lucena da Silva Torres², Patrícia Pereira^{1*},

¹ Laboratory of Neuropharmacology and Preclinical Toxicology, Health Basic Sciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

² Laboratory of Pain Pharmacology and Neuromodulation: Preclinical Research, Health Basic Sciences Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

³Laboratory of Genetic Toxicology, Lutheran University of Brazil, Canoas, RS, Brazil.

*Corresponding author: Patricia Pereira, Laboratory of Neuropharmacology and Preclinical Toxicology, Department of Pharmacology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite 500/305, Porto Alegre, RS, CEP 90050-170, Brazil. Tel/Fax.: +55 51 33083121. E-mail address: patriciapereira@ufrgs.br

Fernanda Marcelia dos Santos <https://orcid.org/0000-0001-6446-0725>

Pricila Fernandes Pflüger <https://orcid.org/0000-0002-6067-1266>

Mariana Uczay <https://orcid.org/0000-0002-1152-3777>

Wesley Roberto de Aguida <https://orcid.org/0000-0002-2802-0172>

Jaqueline Nascimento Picada <https://orcid.org/0000-0003-2360-1557>

Iraci Lucena da Silva Torres <https://orcid.org/0000-0002-3081-115X>

Patricia Pereira <https://orcid.org/0000-0001-7987-1359>

Abstract

Gamma-decanolactone (GD) has been shown to reduce epileptic behavior in different models, inflammatory decreasing, oxidative stress, and genotoxic parameters. This study aimed to assess the GD effect on the pentylenetetrazole (PTZ) model, after acute and subchronic treatment and to investigate its mechanism of action, through the expression of the inflammatory marker ciclo-oxygenase-2 (COX-2), genotoxicity, mutagenicity, and GluN2B, a subunit of NMDA glutamate receptor, and adenosine A₁ receptor expression. Male and female mice were treated with GD (300 mg/kg) for 12 days. On the tenth day, they were tested in the Hot Plate test. On the thirteenth day, all animals received PTZ (90 mg/kg) and epileptic behavior PTZ-induced was observed for 30 minutes. Pregabalin (PGB) (30 mg/kg) was used as a positive control. After, samples of the hippocampus and blood were collected for Western Blotting analyzes and Alkaline Comet Assay and bone marrow to Micronucleus test. The results demonstrated that only the acute treatment of GD reduced the seizure occurrence and increased the latency to the first score 3 seizure. Males treated with GD for 12 days demonstrated a significant increase in the expression of the GluN2B receptor and a decrease in the COX-2 expression. Acute and subchronic treatment with GD and PGB reduced the DNA damage produced by PTZ, in males and females. There is no increase in the micronucleus frequency in bone marrow evaluated in the subchronic treatment. This study suggests that GD, after 12 days, was not able to reduce PTZ-induced seizures, but it has been shown to protect against DNA damage, reduce COX-2 and increase GluN2B expression.

Keywords: Adenosine A₁ receptor; cyclooxygenase; pentylenetetrazole; NMDA; epilepsy; Hot Plate Test; Alkaline Comet Assay; Micronucleus Test.

Declarations

Not applicable.

Funding

This research received financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 307515/2019-2), and Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS, 36326).

Conflicts of interest/competing interests

There is no conflict of interest.

Code availability

Not applicable.

Data availability statement

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Introduction

Epilepsy is the most common neurological disease in the world and around 50 million people are affected by this [1]. One of the most important characteristics of this pathology is the occurrence of seizures, a behavioral manifestation generated by abnormal neuronal synchronization and activity (DEVINSKY *et al.*, 2018) [2], in addition to cognitive changes, behavioral, and psychological impairments [3]. Currently, several cellular processes are associated with epilepsy and have helped to elucidate their pathophysiology.

Neuroinflammation has an important role in epilepsy pathogenesis since the increase in neuronal activity during seizures could increase chemical mediator release, leading to intense excitability of affected tissue, this intense excitability is responsible for to extend and intensify the seizure activity [4-6].

The Cyclooxygenase-2 (COX-2) is an inducible enzyme involved in the neuroinflammatory process through the conversion of arachidonic acid into prostaglandins. Its expression contributes not only to repair but also to injury and chronicity [7-8]. This inducible enzyme is expressed in several pathological processes, such as inflammation and pain [9]. Studies that evaluated neuroinflammation in epilepsy models demonstrated that the seizure induction up-regulates the expression of COX-2, and on the other hand, neuroprotection and increased latency for seizures to appear can be observed when COX-2 is inhibited [10-12].

Anti-inflammatory drugs have a neuroprotective effect on seizures PTZ- induced and the effects appear to be related to inhibition of cytokines and the COX-2. In the Kindling PTZ model, a decrease in Interleukin 1 β (IL-1 β) and Tumor Necrosis Factor α (TNF- α) was demonstrated, as well as less seizure severity in rats treated with dexamethasone [13], it was also observed that sodium diclofenac (a COX-2 inhibitor), was able to decrease TNF- α and Interleukin 6 (IL-6) in the hippocampus of rats [14].

Several antiseizure drugs are available for therapeutic use. Among the most recent antiseizure drugs, pregabalin (PGB) is a GABA analog, approved by the Food and Drug Administration (FDA) in 1999 [15] for refractory epilepsy treatment. It has shown the effects of monotherapy and adjuvant therapy for focal and generalized seizures [16]. PGB is also given to chronic pain, mainly neuropathic pain [17-19].

The drastic adverse effects of traditional antiseizure drugs, the difficulty of finding treatments that address all patients, as well as the cost/benefit of standard treatments, has increased the demand for new drugs. Several natural products can influence GABAergic function. Some of these compounds have also been shown to reduce the frequency of epileptic seizures in models of epilepsy, also having neuroprotective effects [20]. Lactones are among the organic compounds that have bioactive properties that act on the central nervous

system. Such substances have been recognized for some properties like anesthetic, anti-inflammatory, and hypnotic activity [21-24].

GD, a synthetic monoterpene lactone, has been evaluated for its neuroprotective ability in different animal models [25-28]. Studies carried out by our group investigated the effect of GD in a PTZ model, both acute and chronic, as well as seizure induced by pilocarpine, 4-aminopyridine, and isoniazid [25, 27-28]. GD has been shown to reduce the occurrence of seizures and increase latency for the first score 3 seizure in some of these models, demonstrating a significant neuroprotective effect. Also, still, an *in vitro* study conducted by our group, demonstrated that GD inhibited TNF- α and the intracellular formation of reactive oxygen species (ROS), also decreasing genotoxicity and apoptosis in microglial cells [26].

Although several behavioral studies of GD effect have been carried out, its ability to modulate neurotransmission systems is still scarce. Pereira et al 1997 [29] demonstrated an inhibitory effect of GD on glutamate binding in cortex samples.

N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) are ionotropic glutamate receptors (iGluRs) that play essential roles in physiological and pathophysiological in the mammalian CNS [30]. Studies have indicated that NMDARs play different roles under different conditions, for instance, under normal activation and overactivation. Under normal activation, activated GluN2B is mainly located in the synapses. In contrast, under overactivation, extrasynaptic GluN2B will be additionally activated [31-34]. The NMDARs subunits, GluN2A, and GluN2B are the main in the adult forebrain. GluN2B has a bidirectional activity of the signaling of ERK, CREB, BDNF, and PI3K. Moreover, GluN2B may play a more active role in change the NMDARs effect from normal activation to overactivation [35].

Adenosine is an important neuromodulator and it is known for homeostatic and endogenous anticonvulsant effects on the neural network activities, as well as its deficiency could conduce to excitotoxicity in patients with epilepsy [36-38]. The known adenosine anticonvulsant effect is attributed to the adenosine A₁ receptor, which is distributed throughout the brain, and in the hippocampus, there is high density [38-40].

Thus, studies aiming to investigate NMDA and Adenosine's role in the GD mechanism of action are necessary. Besides, behavioral studies carried out to date have only evaluated the acute effect of GD, and it is also important to demonstrate its effects after repeated administrations. Therefore, this study aimed to evaluate a possible neuroprotective effect of the GD subchronic treatment using the PTZ model of seizure and to make a comparison with the acute treatment with the same compound. Also, inflammatory marker expression COX-2, mutagenicity, genotoxicity, and a possible GluN2B and adenosine A₁ modulation, were investigated.

Material and Methods

Animals

To conduct this study, we needed eighty-seven male and eighty-seven female CF-1 mice, of these animals, five of each sex were driven to pilot test, all of them were 45 days old. 4-5 animals were kept per box (33 x 17 x 40 cm), with food and water *ad libitum*, under a 12-h light/dark cycle (lights on 7:00 A.M) and a constant temperature $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ at the Reproduction and Research Center (CREAL), in the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS). The project was approved by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA/UFRGS), under number 36326/2019. The entire experiment was conducted following the National Council for Animal Experimentation Control (CONCEA), prioritizing animal comfort and respect.

Drugs and Pharmacological Procedures

GD and PTZ were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). GD was solubilized in tween 80 (5%) and PTZ in saline solution (0,9%), considering previous studies, the dose of 300 mg/kg of GD was tested [24, 41]. A pilot test and previous studies were considered to define the dose of 90 mg/kg PTZ [41]. PGB (Prefiss®; Aché Laboratórios Farmacêuticos S.A), has been used to treat epilepsy and chronic pain, and in this study, it was used for comparison purposes in subchronic treatment. It was solubilized in tween 80 (5%) and administered at a dose of 30 mg/kg [16]. Tween 80 (5%) and saline (0,9%) were administered as controls.

The animals were randomly divided into seven groups: twelve animals for the groups Saline; Sal12; Tween; PGB; GD 12 and GD 1 and ten animals for group Sal 1. Administrations were performed intraperitoneally for these drugs. PTZ, used as a convulsant agent, was administered subcutaneously. The experimental design of this study is shown in Figure 1. The experiment was conducted for 13 days, pharmacological administrations were always performed in the morning, between 7 am-11 am. The animals had their weights recorded every three days.

PTZ-induced Seizure Model

For the acute trial, Sal or GD was administered 30 minutes before PTZ injection. For the subchronic evaluation, after 12 days of treatment, the animals were submitted to the PTZ-induced seizure model of the thirteenth day, one day after the last drug administration. Both in the acute and subchronic tests, the animals

were observed for 30 minutes by a blinded researcher, and the behavior was registered according to an adapted Racine scale [42]. The adapted scale consists of five scores: 0 - No epileptic behavior; 1-*Jerkings, playing piano*; 2- Clonic forelimb seizures lasting less than 3s; 3- Clonic forelimb seizures lasting more than 3s; 4- Generalized seizures with tonic extension episodes and full *status epilepticus*; 5- Death. The latency for the first clonic forelimb seizure (score 3) and the percentage of occurrence of these seizures were recorded., We used score 3 seizure for comparison purposes since it is very clear and easy to observe in mice. At the end of the treatments, the animals were killed by decapitation, and the hippocampus samples were collected immediately, using surgical instruments on a frozen platform. The hippocampus samples were identified in individual tubes and kept at -80°C until the tests described in figure 1 [43].

Hot Plate Test

The Hot Plate Test was used to assess central analgesia in treated animals [44], considering that some types of antiseizure drugs are administered to treat chronic pain as well [45-47]. The test protocol was applied on the tenth day of the experiment, after 30, 60, 90, and 120 minutes of pharmacological administration. 24 hours before the test the animals were placed under the hot plate for habituation [48-49]. The test was performed with a plate at 55 ± 0.5 ° C and the researcher was blinded. The recorded behaviors were: Changing feet (tapping), jumping, and standing or licking one of the paws [50]. To avoid tissue damage, the nociceptive limit was 20 seconds per animal, according to previous studies [49, 51-52].

Western Blotting Assay

Frozen hippocampus samples were homogenized in lysis buffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris, 5 mM EDTA, 10% glycerol, 10% NP 40, pH 7.4) and centrifuged at 7000 g for 15 min at 4 °C. The supernatant was collected and the protein concentration was determined by the method described by Bradford et al. (1976) using BSA (1 mg/ml) as standard. A sample of 80 µg of total proteins was separated by electrophoresis on 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE). After electrophoresis, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with a 1% BSA for 1 hour at room temperature and then were incubated with the primary rabbit polyclonal antibodies overnight at 4 °C. For these experiments we used anti-GluN2B (190 kDa), anti-adenosine A₁ (37 kDa), anti-COX-2 (69 kDa), and anti-βactin (45 kDa), the concentration of antibodies was: 1:1000. After incubation, the membranes were washed three times in TTBS

(Tris Buffer Salina with 0,05% Tween 20) and then incubated with peroxidase-bound anti-rabbit secondary antibody (1:5.000) at room temperature for 2 hours. The membranes were washed with TBS, 3 times for 10 minutes. Protein bands were then visualized using an Enhanced Chemiluminescent Reagent (ECL) in the iBright™ Analysis Software, then quantified by ImageJ 1.52a software.

Alkaline Comet Assay

The Alkaline Comet assay was carried out to evaluate genotoxic effects following the recommendation described by Tice et al 2000 [53], with minor modification [54]. The samples of peripheral blood and hippocampus were collected immediately after epileptic behavior observation. Blood samples (50 IL) were transferred to heparin tubes (25.000 UI, 10 IL) and samples of the hippocampus were transferred to PBS buffer. Cell suspension (10 IL) were embedded in 90 IL low melting point agarose 0,75% (GibcoBRL) and spread onto agarose-precoated microscope slides. After solidification, slides were placed in lysis buffer (2,5 M NaCl, 100 Mm EDTA, and 10 mM Tris, freshly added 1% Triton X-100 (Sigma) and 10% DMSO, pH 10) for 48 h at 4 °C. The slides were incubated in a freshly prepared alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) for 20 min at 4 °C in an electrophoresis cube. An electric current of 300 mA at 25 V (0.90 V/cm) was applied for 15 min to induce DNA electrophoresis. The slides were then neutralized (0,4 M Tris, pH 7,5), stained with silver, and analyzed under a microscope. Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each slide) were analyzed from each duplicated sample. Cells were visually scored according to tail size into five classes, ranging from undamaged (0) to maximum damaged (4), resulting in a single DNA-damage score for each sample. Therefore, the damage index (DI) ranged from 0 (undamaged, 100 cells×0) to 400 (with maximum damage, 100×4). Damage frequency (DF) was calculated based on the number of cells with tail versus those with no tail [55].

Micronucleus (MN) test in bone marrow

The MN test was performed according to the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program guidelines [56]. Bone marrow from both femurs was suspended in fetal calf serum and smears were prepared on clean glass slides. Slides were air-dried, fixed in methanol, stained in 10% Giemsa and coded for blind analysis. To avoid false-negative results and obtain a value of bone marrow toxicity, the polychromatic erythrocyte/normochromatic erythrocyte (PCE/NCE) ratio was determined in 1000 cells. The incidence of MN

was observed in 2000 PCE for each animal using bright-field optical microscopy at 1000× magnification.

Statistical Analyses

RM two-way ANOVA followed by Tukey's test was applied to analyze mice's weight. The Generalized Estimate Equation (GEE) was applied to analyze the Hot Plate data. The behavior data and Western Blotting results were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's test. Alkaline Comet Assay and Micronucleus test were analyzed using the one-way ANOVA followed by Dunnett's test. Two-way ANOVA followed by Tukey's was used to compare sexes, 2x2 Fisher's Exact Test was used to compare the occurrence of seizures in percentage (%). GraphPad Prism 7.0 software was used for all variance analyses and IBM SPSS Statistics 20 Software was used for GEE analysis.

Results

GD induces weight change

In this study, the animal's body weight was recorded throughout the treatment. The mice that received GD significantly decreased their body weight when compared to the other groups at the third and fourth weights measurements in males (Fig.2A, $F_{(3,44)}=4,01$, $P=0,0132$ RM two-way ANOVA) and only at the fourth weights measurements in females (Fig.2B, $F_{(3,44)}=1.488$, $P=0,2309$ RM two-way ANOVA).

GD did not affect nociception on the Hot Plate test

To evaluate the antinociceptive activity of GD, the Hot Plate Test was used. This test assesses the time that animals remain on a metal plate heated until they react to the thermal stimulus. The GEE presented no significant interaction between treatment and time measurements ($X^2=14,963$, $P=0,092$), as shown in Fig.3 (A) and (B), however, there was an increase in the latency to nociceptive behaviors in females ($X^2=7,774$, $P=0,005$ data not shown), which was independent of group and time ($X^2=16,269$, $P=0,179$ data not shown).

Effect of GD subchronic and acute treatments in latency to the first score 3 seizure and their occurrence

Both male and female mice that received GD, showed no significant difference in the latency to score 3 seizure (Fig. 4A, males: $F_{(3,41)}=0,09356$, $P=0,4322$ $n=9-12$, females: $F_{(3,44)}=1,205$, $P=0,3189$ $n=12$, one-way ANOVA) there was no sex difference as well ($F_{(1,85)}=3,628$, $P=0,0602$ two-way ANOVA). There was no

difference in the seizure occurrence between groups compared by 2x2 Fisher's Exact Test (Fig 4B, $P > 0,05$ for all comparison, $n=9-12$), animals that died after the occurrence of score 3 seizure were excluded from the analysis. Unlike subchronic treatment, a single administration of GD increased the latency for score 3 seizure in males and in females (Fig 5A, males: $F_{(3,37)}=9,628$, $P= <0,0001$, $n=9-12$, females: $F_{(3,42)}=8,193$, $P=0,0002$, $n=10-12$, one-way ANOVA, without difference between sex $F_{(1,79)}=0,1398$, $P=0,7095$ two-way ANOVA . Acute treatment with GD showed a significant decrease in the occurrence of seizures compared to controls in males (Fig 5B, $P = 0,031$, 2x2 Fisher Exact Test) and females (Fig. 5B, $P =0,005$, Fisher Exact Test), but was not different to subchronic GD treatment (Fig. 5B, males: $P =0,089$ and females: $P = 0.096$, 2x2 Fisher Exact Test). There was no difference between sex (Fig. 5B, $P=1.000$). Animals that died after the occurrence of score 3 seizure were excluded from the analysis. Score 5 was used to compare the mortality between the treatments. The results showed that GD in repeat doses increase significantly the mortality when compared with PGB in males (Fig 6A. $P=0,0020$, 2x2 Fisher's Exact Test) and when compared with all controls groups in female (SAL12, $P=0,001$, Tween, $P=0,0138$, PGB, $P=0,0138$, 2x2 Fisher's Exact Test). However, the acute dose of GD reduced significantly the animal's mortality compared with control (Fig 6B, males: $P=0,015$, females: $P=0,0001$, 2x2 Fisher's Exact Test) and also when compared with GD given for 12 days ($P <0,0001$ for both sex, 2x2 Fisher's Exact Test). There was no difference between sex in any analyses of mortality ($P >0,05$, 2x2 Fisher's Exact Test).

GD treatments affect the expression of GluN2B receptor, adenosine A₁ receptor, and COX-2

Males treated with GD during 12 days, demonstrated a significant increase in the expression of the GluN2B-containing glutamate NMDA receptor compared to saline and Sal12 (Fig 7B, $F_{(6,22)} = 4,725$, $P= 0,0031$, $n=3-6$, one-way ANOVA) but there was no difference in females between groups (Fig. 7B, $F_{(6,18)} =0,9703$, $P= 0,4727$, $n=3-5$ one-way ANOVA), neither between sex (Fig 7B, $F_{(1,41)}=1,654$, $P=0,2056$, $n=3-6$, two-way ANOVA).

When COX-2 expression was evaluated (Fig. 8), the results showed that the group of males treated with GD for 12 days reduced the expression of this protein, but this effect was not repeated in the group of females (Fig 8B, males: $F_{(6,23)}= 5,143$, $P = 0,0018$, females: $F_{(6,29)}= 0,6614$, $P=0,6811$, $n=3-6$, one-way ANOVA), without a sex difference (Fig. 8B, $F_{(1,52)} = 1,253$, $P = 0,2681$, two-way ANOVA).

In addition, adenosine A₁ expression was evaluated. In males, no difference was observed (Fig. 9B, $F_{(6,18)} =1,352$, $P=0,2860$, $n=3-5$, one-way ANOVA). In females, the groups treated with GD12 and PGB

showed an increase in the expression of adenosine A₁ compared to the GD1 group (Fig. 9B, $F_{(6,19)}=3,324$, $P = 0,0207$, $n=3,5$, one-way ANOVA), no difference was observed between sex (Fig. 9B, $F_{(1,37)} = 0,1214$, $P = 0,7295$).

DNA damage PTZ-induced was mitigated by GD treatment

The Comet assay was used to assess the genotoxic effect of GD and compare the effects between males and females (Fig.10 and Fig.11). As observed in previous studies, PTZ induced DNA damage observed by the increase in the damage index (DI) and damage frequency (DF) (SAL 1 and Sal12), when compared to the saline group, both in males and females.

Also, GD reduced DNA damage in acute and subchronic treatments. GD decreased DI and DF in peripheral blood and hippocampus, excepting DF in GD12 group that did not decrease significantly in the hippocampus in both sexes. PGB reduced DI and DF in male and female mice in both analyzed tissues in subchronic treatment.

Treatments did not increase the micronucleus frequency

The micronucleus test showed that the treatments did not increase the micronucleus frequency in polychromatic erythrocytes (MNPCE) from bone marrow in female and male mice (Fig.12). The polychromatic erythrocytes/normochromatic erythrocytes (PCE/NCE) ratio was similar in all groups (data not shown).

Discussion

This study was the first that aimed to evaluate the effect of repeated GD administration on the seizure model induced by PTZ in male and female mice. The animals received GD 300 mg/kg for 12 consecutive days and had their behavior evaluated after acute administration of PTZ. Throughout the treatment with GD, the animals' weights were recorded every 3 days (four measurements). The results showed that males had a significant weight reduction concerning the control group after the third measurement. (Fig. 2), while in females, a significant reduction was observed only at the fourth measurement. GD 300mg when given acutely did not show a toxic effect [41], but perhaps its repeated administration may interfere with some metabolic pathway or determine more pronounced toxic effects, which should be investigated in the future.

A previous study showed that the acute administration of GD at a dose of 300 mg/kg was able to block seizure induced by a single dose of PTZ [41]. Also, in the PTZ-kindling model, commonly used for drug evaluation, GD demonstrated a neuroprotective effect [25]. In more recent work, GD reduced acute seizures induced by isoniazid and 4-aminopyridine, and it was able to protect against neuronal damage induced by pilocarpine [27-28]. Finally, a study of action mechanism suggested that the anticonvulsant effect of GD may be related to the possible modulation of the adenosine A₁ receptor [43].

On the other hand, in this study, the GD 300 mg/kg repeated administration has not been shown to protect against acute PTZ-induced seizures. There was no significant difference to the control in the latency for the first score 3 seizure, but there was an increase in score 3 seizure occurrence in the GD12 group, which could be helpful to understand the possible toxic effect in this dose and time of treatment, as observed in body weight. Perhaps, the lack of protection observed in this study is related to the action of GD on different molecular targets, which would not be modulated by acute administrations of this compound. Little is known about the mechanism of GD action. The neurochemical evaluation, carried out employing a binding assay, showed that GD was able to dose-dependently inhibit the specific union of L- [3H] -glutamate, and this action could be involved in the anticonvulsant activity of this compound [29]. Here, GD was tested only at a dose of 300 mg/kg after 12 consecutive days, which could, through repeated administrations, modulate targets other than glutamate receptors.

Our study shows that GD increased the expression of the GluN2B receptors in the male hippocampus compared to the SAL 12 group, while it did not protect against PTZ-induced seizure. This result is a curious finding, because Pereira et al. 1997 [29], using a binding technique, demonstrated that GD was able to antagonize glutamate binding in rat cortex receptors. The GluN2B ability to play different roles in the brain under overactivation and the activation of different signaling pathways could explain the results observed here since in this study GD was administered repeatedly for 12 days. For instance, GluN2B bidirectionally regulates BDNF expression, which depends on the activation degree of NMDARs. In a previous study with cortical neurons *in vitro*, ifenprodil, a selective antagonist of the GluN2B subunit, prevented the increase in BDNF levels after moderate activation of GluN2B, induced by a low dose of NMDA, in contrast, under overactivation conditions, ifenprodil enhanced BDNF expression after high-dose NMDA exposure [34]. In this sense, likely GD administered acutely or repeatedly, could stimulate the expression of glutamate receptors differently, including the GluN2B receptor, and thus determine different behavioral effects.

Previous studies have shown that treatment with lactonic compounds can modulate the expression of GluN2B receptors. The increase in the GluN2B receptor expression and phosphorylation was observed in mice

hippocampus after chronic treatment with simvastatin, an important lactone used to reduce hepatic cholesterol biosynthesis [57]. Those authors found that increased expression of GluN2B has resulted in the farnesyl-pyrophosphate (FPP) decrease, a mevalonate pathway intermediate. This study has also shown an increase of histone H3K9 and H3K27 acetylation of GluN2B promoter, resulting from this statin treatment. Other studies have indicated epigenetic GluN2B modulation through acetylation and deacetylation of histones. Histone acetylation alters the chromatin compact structure and makes it accessible for DNA regulation by proteins [58]. Fujita et al [49] observed that vorinostat, an HDAC (a class of histones deacetylase) inhibitor increased the GluN2B expression in rat hippocampus using histone acetylation. Furthermore, Nghia et al [59] studied chronic treatment with antidepressant imipramine and observed an increase in histones H3K9 and H3K27 in GluN2B promoter, this effect was implicated by a decrease in HDAC activity. We did not measure histone acetylation in this study, but the mentioned studies reinforce the importance of epigenetics modifications in GluN2B expression and it is being considered in the next studies.

Despite in our study females did not show a significant difference in GluN2B receptor, gonadal hormones, such as 17 β -estradiol, have been observed to play an important role in the synaptic activity mediated by NMDARs and in the expression of the receptor itself in the hippocampus, this can be direct, mediated by ERs (Estradiol Receptors) or indirect, through the modulation of neurotrophic factors such as BDNF [60-62]. Therefore, for the next studies, it will be important to assess whether the expression pattern of this receptor may be under the influence of sex hormones.

Here, we observed a significant decrease in the COX-2 expression in males, but not in females, in groups treated with GD for 12 days. Although our treatment did not change the animal behavior (latency and seizure occurrence), the decrease in COX-2 observed in animals treated with GD may indicate a possible anti-inflammatory effect which already suggested by Pflüger et al [26], when identified that GD inhibited TNF- α (a pro-inflammatory cytokine) in N9 microglial culture. As already mentioned, we did not evaluate the levels of female gonadal hormones. It is known that their role goes beyond reproduction and we suspect that these may be associated with the expression of COX-2 as well since studies have shown that estrogen can inhibit the production of pro-inflammatory cytokines that cause a direct and indirect impact on COX-2- induction pathway [63-64]. This is a complex and interesting issue and deserves to be assessed using a specific methodology.

Our results show that in animals treated 12 days with GD, the adenosine A₁ receptor expression increased when compared with animals treated 1 day with GD, in females, but not in males. This result corroborates another study carried out by our research group, in which no changes in the expression of the

adenosine A₁ receptor were detected in the hippocampus of mice treated with acute GD in the western blotting test [43].

A rapid increase in the adenosine A₁ receptor density is seen in the hippocampus and cortex of animals after the acute-seizures induction [65-67]. This increase might be a receptor adenosine A₁ compensatory antiepileptic mechanism, the tissue attempts to recover and avoid hyperactivity-induced damage [69]. Although do not be significant when compared with the control group, we observed that GD for 12 days seems to increase the density of these receptors, especially in females, but it did not increase latency for the first score 3 seizure. An interesting observation about the lack of effect on epileptic behavior is the GluN2B receptor increase in male mice treated 12 days with GD. It seems that, although GD may be acting as an adenosine A₁ receptors modulator, the GluN2B properties in mediating excitatory currents can be minimizing the chances of observing the effects mediated by adenosine A₁ in the epileptic behavior of animals. On male mice, PGB group shows an adenosine A₁ increase, at the moment, this is new information in the literature and could be a property related mechanism of action.

The antiseizure drugs (AEDs) treatment can have dramatic side effects, even *in utero*. There is evidence of malformation as neural tube defects, congenital heart disease, and orofacial clefts, on children who were exposed to AEDs by mother treatment during pregnancy and this causes impairments on lifelong [68]. These adverse effects reinforce the need to evaluate the genotoxicity and mutagenicity of candidate compounds for the treatment of epilepsy. Moreover, mutagenic evaluation using a micronucleus test is required to assess the safety of compounds with pharmacological potential as well as to approve new drugs [69]. In the present study, PTZ alone or in combination with GD did not increase the micronucleus frequency, indicating these drugs were not able to induce chromosomal mutations in the tested conditions, suggesting that the substances do not induce clastogenesis or aneuploidy in bone marrow cells, detectable in micronucleus test [70-72]. Besides, GD decreased DNA damage caused by PTZ in the hippocampus, both in subchronic and acute treatment, which had already been observed by our group in previous studies with assessment of DNA damage in the total brain of male mice [25], cortex [27] and N9 murine microglial cell line [26]. Here, the evaluation was carried out in both sexes, which is new data regarding the potential protection against DNA damage produced by GD in a seizure model. The results obtained are more specific since we evaluated the hippocampus, the most important target brain structure of PTZ [73]. GD1 decreased both parameters DI and DF assessed to detect DNA damage while GD12 decreased significantly only DI in the hippocampus in male and female mice. Since in acute but not subchronic treatment GD decreased the number of seizures and increased the latency for seizure, this anticonvulsant effect likely contributed to higher DNA protection in

GD1. Indeed, an anti-inflammatory activity in subchronic treatment appears to be more relevant to explain the decrease in DNA damage compared to Sal 12.

The Hot Plate Test is used to assess the potential antinociceptive effect of compounds by applying a thermal stimulus [50]. The test allows evaluating the supraspinal pain responses, since the choice of which paw lift to avoid thermal discomfort requires superior structures of the nervous system [74]. Here, GD did not show a difference in the response compared to the control group, both in males and females neither at different times. Despite this, there was a difference between sexes that was independent of time and treatment group. Stress-induced analgesia in rats was more pronounced in females than in males, besides that, factors such as body weight as hormonal changes, skin sensitivity, and habituation to the plate, were not evaluated in this study, and perhaps they could explain the absence of GD effect in this model [75, 76-77].

PGB administered over ten days showed no difference from the control group in the hot plate latency. A different result was demonstrated by Hamada et al 2018 [78], which observed the antinociceptive effect of acute PGB administration (40 mg/kg) in the same model. Łuszczki, 2010 [79] observed a dose-dependent effect of PGB, in which the dose of 175.26 mg/kg was able to increase the antinociceptive effect by 50%. Thus, the antinociceptive action of PGB seems to be associated with higher doses than that tested in this study, explaining the lack of antinociceptive effect.

Conclusion

This study showed that GD under subchronic treatment did not protect animals from seizures induced by PTZ. In contrast, this compound confirmed its neuroprotective effect after acute treatment. This activity may be related to the increased expression of GluN2B-containing glutamate NMDA receptors, especially in males. On the other hand, as already demonstrated in previous studies, GD seems to have an anti-inflammatory effect, decreasing COX-2 expression, in addition to protecting against DNA damage generated by PTZ and increasing the adenosine A₁ receptor expression in females. For the first time, GD was tested on female mice, showed a different response pattern than that observed in males regarding the expression of adenosine A₁ receptor, GluN2B receptors, and COX-2, reinforcing the importance of neuropharmacological evaluation in both sexes. Further studies on the GD neuropharmacological profile are needed to complement the data obtained in this investigation.

References

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION (2019) Epilepsy. <https://www.who.int/health-topics/epilepsy>. Accessed 30 July 2020
2. Devinsky O, Vezzani A, O'Brien TJ, et al (2018) Epilepsy. *Nat Rev Dis Prim* 4:. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.24>
3. Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, et al (2014) ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55:475–482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
4. Shimada T, Takemiya T, Sugiura H, Yamagata K (2014) Role of inflammatory mediators in the pathogenesis of epilepsy. *Mediators Inflamm* 2014:. <https://doi.org/10.1155/2014/901902>
5. Xanthos DN, Sandkühler J (2014) Neurogenic neuroinflammation: Inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. *Nat Rev Neurosci* 15:43–53. <https://doi.org/10.1038/nrn3617>
6. Vezzani A, Balosso S, Ravizza T (2019) Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. *Nat Rev Neurol* 15:459–472. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0217-x>
7. Temp FR, Marafija JR, Milanesi LH, et al (2017) Cyclooxygenase-2 inhibitors differentially attenuate pentylentetrazol-induced seizures and increase of pro- and anti-inflammatory cytokine levels in the cerebral cortex and hippocampus of mice. *Eur J Pharmacol* 810:15–25. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.05.013>
8. Rawat C, Kukal S, Dahiya UR, Kukreti R (2019) Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: future therapeutic strategies for epilepsy management. *J Neuroinflammation* 16:197. <https://doi.org/10.1186/s12974-019-1592-3>
9. Dhir A (2019) An update of cyclooxygenase (COX)-inhibitors in epilepsy disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 28:191–205. <https://doi.org/10.1080/13543784.2019.1557147>
10. Akula KK, Dhir A, Kulkarni SK (2008) Rofecoxib, a selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor increases pentylentetrazol seizure threshold in mice: Possible involvement of adenosinergic mechanism. *Epilepsy Res*. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2007.10.008>
11. Dhir A, Naidu PS, Kulkarni SK (2007) Neuroprotective effect of nimesulide, a preferential COX-2 inhibitor, against pentylentetrazol (PTZ)-induced chemical kindling and associated biochemical parameters in mice. *Seizure*. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2007.05.016>
12. Katyal J, Kumar H, Gupta YK (2015) Anticonvulsant activity of the cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor etoricoxib in pentylentetrazole-kindled rats is associated with memory impairment. *Epilepsy Behav*. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2014.12.032>

13. Guzzo F E, Rodrigues M K, et al (2018) Effect of dexamethasone on seizures and inflammatory profile induced by Kindling Seizure Model. 325:92–98. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2018.10.005>
14. Vieira V, Glassmann D, Marafon P, et al (2016) Effect of diclofenac sodium on seizures and inflammatory profile induced by kindling seizure model. *Epilepsy Res* 127:107–113. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2016.08.020>
15. Blommel ML, Blommel AL (2007) Pregabalin: An antiepileptic agent useful for neuropathic pain. *Am J Heal Pharm* 64:1475–1482. <https://doi.org/10.2146/ajhp060371>
16. Nader MA, Ateyya H, El-shafey M, El-sherbeeney NA (2018) Neurochemistry International Sitagliptin enhances the neuroprotective effect of pregabalin against pentylenetetrazole-induced acute epileptogenesis in mice: Implication of oxidative, inflammatory, apoptotic and autophagy pathways. *Neurochem Int* 115:11–23. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.10.006>
17. Kruszewski SP, Shane JA (2007) Pregabalin in central neuropathic pain associated with spinal cord injury: A placebo-controlled trial. *Neurology* 68:2158–2160. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000269479.84817.0a>
18. RA M, Straube S, Pj W, et al (2010) Pregabalin for acute and chronic pain in adults (Review). *Cochrane Libr.* <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007076.pub2.www.cochranelibrary.com>
19. PJ W, HJ M, Edwards J, RA M (2005) Gabapentin for acute and chronic pain (Review). *Cochrane Database Syst Rev*
20. Woodbury A, Yu SP, Wei L, García P (2013) Neuro-modulating effects of honokiol: A review. *Front Neurol* 4 SEP:1–6. <https://doi.org/10.3389/fneur.2013.00130>
21. Ferrendelli JA, Holland KD, McKeon AC, Covey DF (1989) Comparison of the Anticonvulsant Activities of Ethosuximide, Valproate, and a New Anticonvulsant, Thiobutylolactone. *Epilepsia* 30:617–622. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1989.tb05482.x>
22. Holland KD, McKeon AC, Canney DJ, et al (1992) Relative Anticonvulsant Effects of GABA-mimetic and GABA Modulatory Agents. *Epilepsia* 33:981–986. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1157.1992.tb01747.x>
23. Duke, J.A (1992) *Handbook of Biologically Active Phytochemicals and their Activities*. CRC Press, Boca Raton, pp. 3–183.
24. Viana CCS, de Oliveira PA, Brum LF da S, et al (2007) Gamma-decanolactone effect on behavioral and genotoxic parameters. *Life Sci* 80:1014–1019. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.11.042>
25. De Oliveira PA, Lino FL, Cappelari SE, et al (2008) Effects of gamma-decanolactone on seizures induced by PTZ-kindling in mice. *Exp Brain Res* 187:161–166. <https://doi.org/10.1007/s00221-008-1295-y>

26. Pflüger P, Viau CMA, Coelho VR, et al (2016) Gamma-decanolactone inhibits iNOS and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia in N9 cells. *Eur J Pharmacol* 780:38–45. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.03.029>
27. Pflüger P, Regner GG, Coelho VR, et al (2018) Gamma-Decanolactone Improves Biochemical Parameters Associated with Pilocarpine-Induced Seizures in Male Mice. *Curr Mol Pharmacol* 11:162–169. <https://doi.org/10.2174/1874467210666171002114954>
28. Pflüger P, Coelho VR, Regner GG, et al (2018) Neuropharmacological Profile of Gamma-Decanolactone on hemically-induced Seizure in Mice. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* 18:222–227. <https://doi.org/10.2174/1871524918666180611103802>
29. Pereira P, Elisabetsky E, Souza DO (1997) Effect of γ -decanolactone on glutamate binding in the rat cerebral cortex. *Neurochem Res* 22:1507–1510. <https://doi.org/10.1023/A:1021962714034>
30. Wyllie DJA, Livesey MR, Hardingham GE (2013) Influence of GluN2 subunit identity on NMDA receptor function. *Neuropharmacology* 74:4–17. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.01.016>
31. Kim MJ, Dunah AW, Wang YT, Sheng M (2005) Differential Roles of NR2A- and NR2B-Containing NMDA Receptors in Ras-ERK Signaling and AMPA Receptor Trafficking. *J Neurosci* 25:765–776. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.031>
32. Lai TW, Zhang S, Wang YT (2014) Excitotoxicity and stroke: Identifying novel targets for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 115:157–188. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.11.006>
33. Waxman EA, Lynch DR (2005) N-methyl-D-aspartate receptor subtype mediated bidirectional control of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 280:29322–29333. <https://doi.org/10.1074/jbc.M502080200>
34. Zhou X, Ding Q, Chen Z, et al (2013) Involvement of the GluN2A and GluN2B Subunits in Synaptic and Extrasynaptic N -methyl- D -aspartate Receptor Function and Neuronal Excitotoxicity . *J Biol Chem* 288:24151–24159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.482000>
35. Sun Y, Xu Y, Cheng X, et al (2018) The differences between GluN2A and GluN2B signaling in the brain. *J Neurosci Res* 96:1430–1443. <https://doi.org/10.1002/jnr.24251>
36. Aronica E, Sandau US, Iyer A, Boison D (2013) Glial adenosine kinase - A neuropathological marker of the epileptic brain. *Neurochem Int* 63:688–695. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.01.028>
37. Boison D (2013) Role of adenosine in status epilepticus: A potential new target? *Epilepsia* 54:20–22. <https://doi.org/10.1111/epi.12268>

38. Ghislandi AB, Garcez ML, Zambon GM, et al (2020) Adenosine and NMDA Receptors Modulate Neuroprotection-Induced NMDA Preconditioning in Mice. 2:590–599
39. Vianna Paulo E, M, Ferreira AT, Jos M (2005) Modulation of Seizures and Synaptic Plasticity by Adenosinergic Receptors in an Experimental Model of Temporal Lobe Epilepsy Induced by Pilocarpine in Rats. 46:166–173
40. Zhou Q, Zhu S, Guo Y, et al (2018) Adenosine A1 Receptors Play an Important Protective Role Against Cognitive Impairment and Long-Term Potentiation Inhibition in a Pentylentetrazol Mouse Model of Epilepsy. 3316–3327. <https://doi.org/10.1007/s12035-017-0571-x>
41. Coelho De Souza GP, Elisabetsky E, Nunes DS, et al (1997) Anticonvulsant properties of γ -decanolactone in mice. *J Ethnopharmacol* 58:175–181. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(97\)00102-5](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(97)00102-5)
42. Da Silva LF, Pereira P, Elisabetsky E (1998) A neuropharmacological analysis of PTZ-induced kindling in mice. *Gen Pharmacol*. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(97\)00423-0](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(97)00423-0)
43. Pflüger P, Gregory G, Luft J, et al (2020) Gamma-decanolactone attenuates acute and chronic seizures in mice : a possible role of adenosine A 1 receptors. <https://doi.org/10.1097/FBP.0000000000000554>
44. Pérez-Saad H, Buznego MT (2008) Behavioral and antiepileptic effects of acute administration of the extract of the plant *Cestrum nocturnum* Lin (lady of the night). *Epilepsy Behav*. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2007.12.012>
45. Gilron I, Baron R, Jensen T (2015) Neuropathic pain: Principles of diagnosis and treatment. *Mayo Clin Proc* 90:532–545. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2015.01.018>
46. Enke O, New HA, New CH, et al (2018) Anticonvulsants in the treatment of low back pain and lumbar radicular pain: A systematic review and meta-analysis. *Cmaj* 190:E786–E793. <https://doi.org/10.1503/cmaj.171333>
47. St. John Smith E (2018) Advances in understanding nociception and neuropathic pain. *J Neurol* 265:231–238. <https://doi.org/10.1007/s00415-017-8641-6>
48. Silva JC, Raquel S, Lima G De, et al (2013) Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais : uma revisão. *Rev Bras Farm* 94:18–23
49. Scarabelot VL, Medeiros LF, de Oliveira C, et al (2016) Melatonin Alters the Mechanical and Thermal Hyperalgesia Induced by Orofacial Pain Model in Rats. *Inflammation* 39:1649–1659. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0399-y>

50. Bannon AW, Malmberg AB (2007) Models of nociception: hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents. *Curr Protoc Neurosci* Chapter 8:1–16. <https://doi.org/10.1002/0471142301.ns0809s41>
51. Leite, JPV (2009) *Fitoerapia: bases científicas e tecnológicas*. Atheneu, Brasil
52. Scarabelot VL, de Oliveira C, Medeiros LF, et al (2019) Transcranial direct-current stimulation reduces nociceptive behaviour in an orofacial pain model. *J Oral Rehabil* 46:40–50. <https://doi.org/10.1111/joor.12726>
53. Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al (2000) Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206–221. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J)
54. Antunes FTT, Angelo SG, Dallegrave E, et al (2020) Recombinant peptide derived from the venom the *Phoneutria nigriventer* spider relieves nociception by nerve deafferentation. *Neuropeptides* 79:. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2019.101980>
55. Lazzarotto L, Pflüger P, Regner GG, et al (2020) Lacosamide improves biochemical, genotoxic and mitochondrial parameters after PTZ-kindling model in mice. *Fundam Clin Pharmacol* 1–13. <https://doi.org/10.1111/fcp.12598>
56. Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, et al (2008) The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood . A report of the U . S . Environmental Protection Agency Gene-Tox Program . 239:29–80.
57. Chen T, Zhang B, Li G, et al (2016) Simvastatin enhances NMDA receptor GluN2B expression and phosphorylation of GluN2B and GluN2A through increased histone acetylation and Src signaling in hippocampal CA1 neurons. *Neuropharmacology* 107:411–421. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.03.028>
58. Fujita Y, Morinobu S, Takei S, et al (2012) Vorinostat , a histone deacetylase inhibitor , facilitates fear extinction and enhances expression of the hippocampal NR2B-containing NMDA receptor gene. *J Psychiatr Res* 46:635–643. <https://doi.org/10.1016/j.jpsychires.2012.01.026>
59. Nghia NA, Hirasawa T, Kasai H, et al (2015) Long-term imipramine treatment increases N-methyl-d-aspartate receptor activity and expression via epigenetic mechanisms. *Eur J Pharmacol* 752:69–77. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.02.010>
60. Morissette M, Le Saux M, D’Astous M, et al (2008) Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 108:327–338. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2007.09.011>

61. McCarthy CR, Du X, Wu YC, Hill RA (2018) Investigating the Interactive Effects of Sex Steroid Hormones and Brain-Derived Neurotrophic Factor during Adolescence on Hippocampal NMDA Receptor Expression. *Int J Endocrinol* 2018:.. <https://doi.org/10.1155/2018/7231915>
62. Adkins JM, Lynch JF, Hagerdorn P, et al (2019) Anterior cingulate cortex and dorsal hippocampal glutamate receptors mediate generalized fear in female rats. *Psychoneuroendocrinology* 107:109–118. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2019.05.009>
63. Ospina JA, Brevig HN, Krause DN, et al (2020) Estrogen suppresses IL-1 β -mediated induction of COX-2 pathway in rat cerebral blood vessels. *4625:2010–2019*
64. Stacey W, Bhave S, Uht RM (2016) Mechanisms by Which 17 β -Estradiol (E₂) Suppress Neuronal cox-2 Gene Expression. 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161430>
65. Vanore G, Giraldez L, Arnaiz GRDL, Girardi E (2001) Seizure Activity Produces Differential Changes in Adenosine A₁ Receptors within Rat Hippocampus. *26:225–230*
66. Boison D (2005) Adenosine and Epilepsy: From Therapeutic Rationale to New Therapeutic Strategies. *11:25–36*. <https://doi.org/10.1177/1073858404269112>
67. Davoudi M, Shojaei A, Reza M, et al (2013) Comparison between standard protocol and a novel window protocol for induction of pentylenetetrazol kindled seizures in the rat. *Epilepsy Res* 106:54–63. <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2013.03.016>
68. Kardoost M, Hajizadeh-Saffar E, Ghorbanian MT, et al (2019) Genotoxicity assessment of antiepileptic drugs (AEDs) in human embryonic stem cells. *Epilepsy Res*. <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2019.106232>
69. Coelho VR, Prado LS, Rossato R, et al (2018) A 28-day Sub-acute Genotoxic and Behavioural Assessment of Garcinielliptone FC. *207–212*. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13010>
70. Hayashi M (2016) The micronucleus test-most widely used *in vivo* genotoxicity test. *Genes Environ* 38:4–9. <https://doi.org/10.1186/s41021-016-0044-x>
71. Knasmüller S, Fenech M. *The Micronucleus Assay in Toxicology*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2019.
72. Sommer S, Buraczewska I, Kruszewski M (2020) Micronucleus assay: The state of art, and future directions. *Int J Mol Sci* 21:7–9. <https://doi.org/10.3390/ijms21041534>
73. Samokhina E, Samokhin A (2018) Neuropathological profile of the pentylenetetrazol (PTZ) kindling model. *Int J Neurosci* 128:1086–1096. <https://doi.org/10.1080/00207454.2018.1481064>

74. Gregory NS, Harris AL, Robinson CR, et al (2013) An Overview of Animal Models of Pain: Disease Models and Outcome Measures. *J Pain* 14:1255–1269. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2013.06.008>
75. Gunn A, Bobeck EN, Weber C, Morgan MM (2011) The influence of non-nociceptive factors on hot-plate latency in rats. *J Pain*. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2010.06.011>
76. Vendruscolo LF, Pamplona A, Takahashi RN (2004) Strain and sex differences in the expression of nociceptive behavior and stress-induced analgesia in rats. *1030:277–283*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.10.016>
77. Kavaliers M, Douglas DC (1991) Sex differences in opioid and non-opioid mediated predator-induced analgesia in mice. *568:173–177*
78. Hamada NM, Ashour RH, Shalaby AA, El-Beltagi HM (2018) Calcitonin potentiates the anticonvulsant and antinociceptive effects of valproic acid and pregabalin in pentylenetetrazole-kindled mice. *Eur J Pharmacol* 818:351–355. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.11.003>
79. Łuszczki JJ (2010) Dose-response relationship analysis of pregabalin doses and their antinociceptive effects in hot-plate test in mice. *Pharmacol Reports* 62:942–948. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(10\)70355-8](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(10)70355-8)

Figure captions

Fig.1 Scheme of experimental design. The mice were daily treated with SAL, Tween, PGB, or GD. On the tenth day, we performed the Hot Plate test. On the thirteenth day, we performed acute treatments with SAL or GD. Immediately after observing epileptic behavior, the animals were killed and the hippocampus, blood, and marrow samples were collected. i.p (intraperitoneal injections), s.c (subcutaneous injections).

Fig.2 Weight measurement of males (A) and females (B) during the 12 days of treatment. Weights measurements 1, 2, 3, 4 were performed on experimental days 3, 6, 9, 12, respectively. (A) $F_{(3, 44)} = 4,01$, $P=0,0132$. (B) $F_{(3,44)}=1,488$, $P=0,2309$. RM two-Way ANOVA, $n=12$,. Results of Tukey's test is represented as * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $p < 0,001$. Values represent means \pm SEM.

Fig.3 Latency of male (A) and female (B) to Hot Plate response. The evaluations were performed on the tenth day of the treatment, at 30, 60, 90, and 120 min after the administration of the drugs. No significant interaction between treatment and time measurements was observed ($X^2 = 14,963$, $P=0,092$), as shown in A and B. Generalized Estimating Equation, values represent means \pm SEM, $n=12$.

Fig.4 Score 3 seizures evaluation in the PTZ-induced seizure model. (A) Latency to the first score 3 seizure between GD and controls in subchronic treatment. (A) $F_{(3,41)}=0,09356$, $P=0,4322$ $n=9-12$ males, $F_{(3,44)}=1,205$, $P=0,3189$ $n=12$ females, one-way ANOVA. There was no difference between sex ($F_{(1,85)}=3,628$, $P=0,0602$, two-way ANOVA). Values represent mean \pm SEM. (B) No difference in the seizure occurrence was observed in any pair comparison ($P > 0,05$, $n=9-12$, 2x2 contingency table by Fisher's Exact Test). Values represent percentage.

Fig.5 Score 3 seizures evaluation in the PTZ-induced seizure model. (A) Latency to the first seizure in acute treatment with GD. (A) Latency to score 3 seizure in acute treatment with GD compared with control and subchronic GD treatment ($F_{(3,37)}=9,628$, $P= < 0,0001$, $n=9-12$, males, $F_{(3,42)}=8,193$, $P=0,0002$, $n=10-12$, females, on-way ANOVA), comparison between sex ($F_{(1,79)}=0,01398$, $P=0,7095$ two-way ANOVA). Results of Tukey's test is represented as * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $p < 0,001$. Values represent means \pm SEM. (B) Occurrence of score 3 seizure in acute treatment with GD compared to controls ($P = 0,031$, males, $P = 0,005$,

females,), comparasion between acute e subchronic GD treatment (P =0,089, males, P = 0,096, females) as well between sex (P= <0,05). 2x2 contingency table by Fisher's Exact Test. Values represent percentage.

Fig.6 Mortality (**score 5**) evaluation in the PTZ-induced seizure model. (A) GD in repeat dose compared with controls in males (only different of PGB, P=0,0020) and females (P <0,05). (B) The acute dose of GD compared with control (P=0,015, males, P=0,0001, females) and also compared with GD in repeat doses (P=0,0001 for both sexes). Comparason between sex (all mortality analysis, P>0,05). 2x2 contingency table by Fisher's Exact Test. *P < 0,05, **P< 0,01, ***p <0,001. Values represent percentage.

Fig.7 Effect of the GD acute (Sal1 and GD1) and subchronic (Sal12, Tween, PGB and and GD12) treatment on the expression of GluN2B, in male and female mice, after PTZ-induced seizure. The group called saline (control) did not receive PTZ administration. (A) Bands representative of an experiment on males. (B) Comparative GluN2B expression in males ($F_{(6,22)} = 4,725$, P= 0,0031, n=3-6, one-way ANOVA) and females ($F_{(6,18)} = 0,9703$, P= 0,4727, n=3-5, one-way ANOVA). Comparasion between sex ($F_{(1,41)} = 1,654$, P=0,2056, n=3-6, two-way ANOVA). Results of Tukey's test is represented as *P < 0,05, **P< 0,01, ***p <0,001. Values represent means \pm SEM.

Fig.8 Effect of the GD acute (Sal1 and GD1) and subchronic (Sal12, Tween, PGB and GD12) treatment on the expression of COX2, in male and female mice, after PTZ-induced seizure. The group called saline (control) did not receive PTZ administration. (A) Bands representative of an experiment on females (B) Comparative COX-2 expression in males ($F_{(6,23)} = 5,143$, P = 0,0018, n=3-6, one-way ANOVA) and in females ($F_{(6,29)} = 0,6614$, P=0,6811, n=3-6, one-way ANOVA). Comparasion between sex ($F_{(1,52)} = 1,253$, P = 0,2681, two-way ANOVA). Results of Tukey's test is represented as *P < 0,05, **P< 0,01, ***p <0,001. Values represent means \pm SEM.

Fig.9 Effect of the GD acute (Sal1 and GD1) and subchronic (Sal12, Tween, PGB and GD12) treatment on the expression of adenosine A₁, in male and female mice, after PTZ-induced seizure. The group called saline (control) did not receive PTZ administration. (A) Bands representative of an experiment on males (B) Comparative adenosine A₁ expression in males ($F_{(6,18)} = 1,352$, P=0,2860, n=3-5, one-way ANOVA), and in females ($F_{(6,19)} = 3,324$, P = 0,0207, n=3,5, one-way ANOVA). Comparasion between sex ($F_{(1,37)} = 0,1214$, P = 0,7295). Results of Tukey's test is represented as *P < 0,05, **P< 0,01, ***p <0,001. Values represent means \pm SEM.

Fig.10 Comet assay in peripheral blood and hippocampus from male mice of the different groups. Damage index can range from 0 (completely undamaged, 100 cells×0) to 400 (with maximum damage 100×4). Damage frequency was calculated based on number of cells with tail versus those with no tail. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 in comparison to Saline group; ^aP < 0.05; ^{aa}P < 0.01; ^{aaa}P < 0.001 in comparison to Sal 1 group; .^bP < 0.05; ^{bb}P < 0.01; ^{bbb}P < 0.001 in comparison to Sal 12 group. N= 4- 6.

Fig.11 Comet assay in peripheral blood and hippocampus from female mice of the different groups. Damage index can range from 0 (completely undamaged, 100 cells×0) to 400 (with maximum damage 100×4). Damage frequency was calculated based on number of cells with tail versus those with no tail. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001 in comparison to Saline group; ^aP < 0.05; ^{aa}P < 0.01; ^{aaa}P < 0.001 in comparison to Sal 1 group; .^bP < 0.05; ^{bb}P < 0.01; ^{bbb}P < 0.001 in comparison to Sal 12 group. N= 4- 6.

Fig.12 Evaluation of the mutagenic activity of the different treatments using micronucleus test in the bone marrow. No significant difference among the groups was found using one-way ANOVA and Tukey's test. N = 5-6. ^aMNPCE: micronucleus in polychromatic erythrocytes.

b

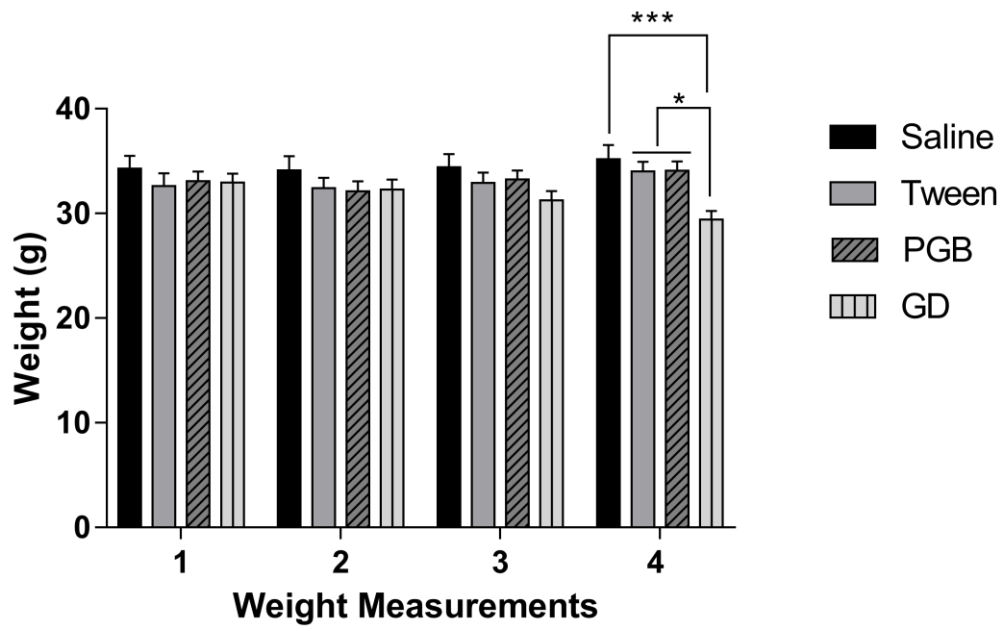
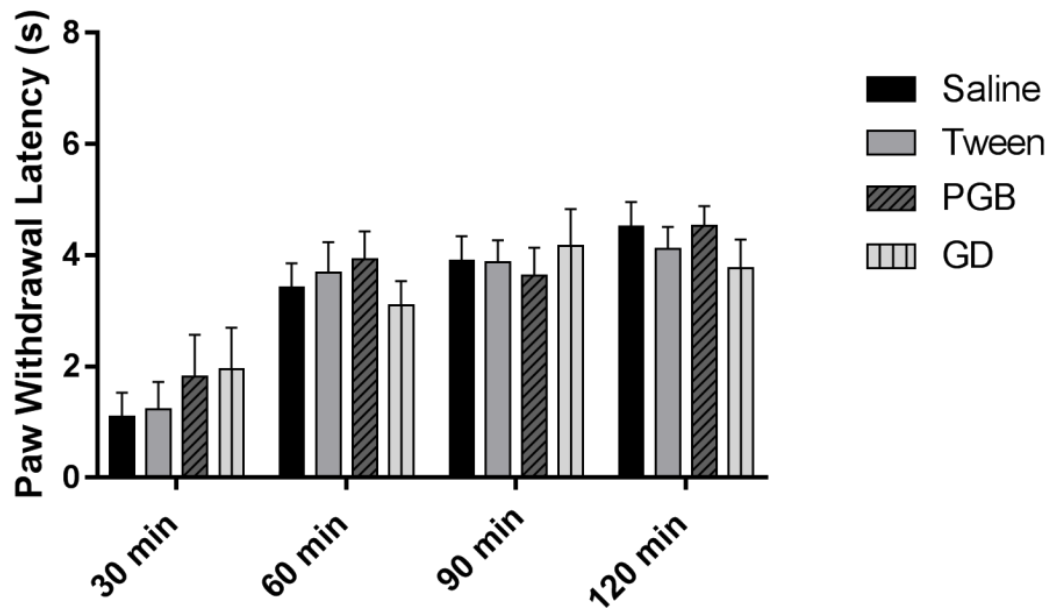


Figure 3

a



b

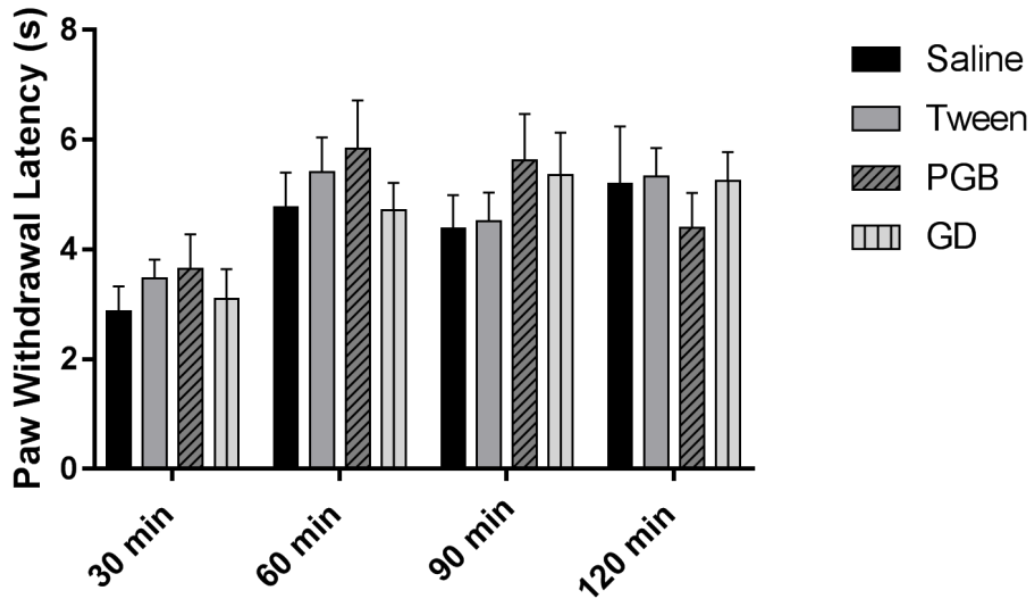
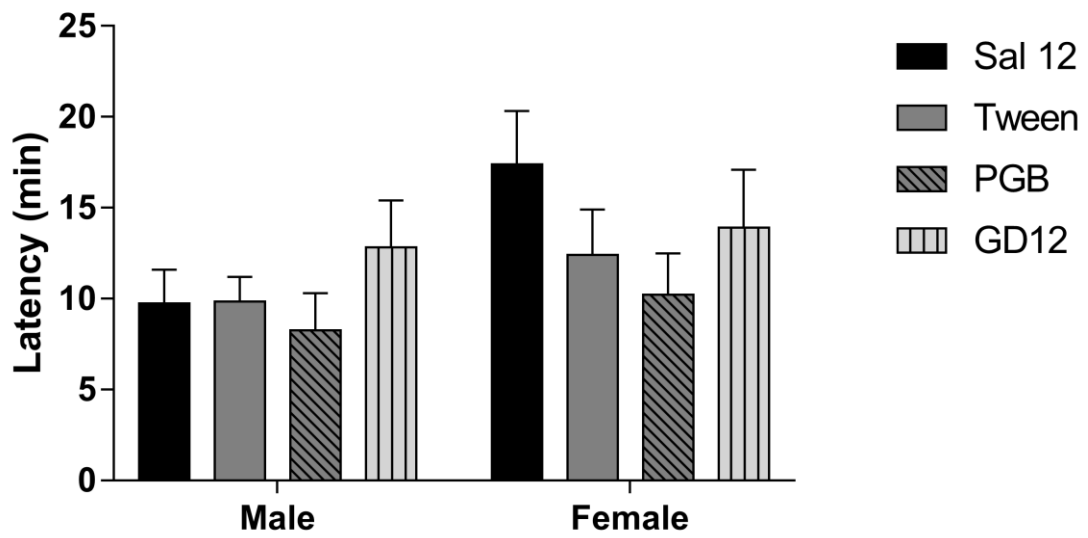


Figure 4

a



b

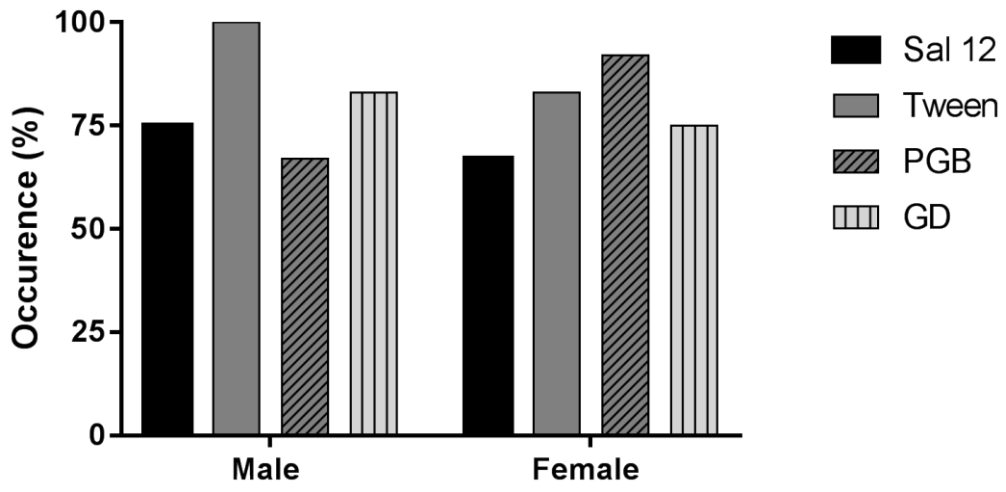
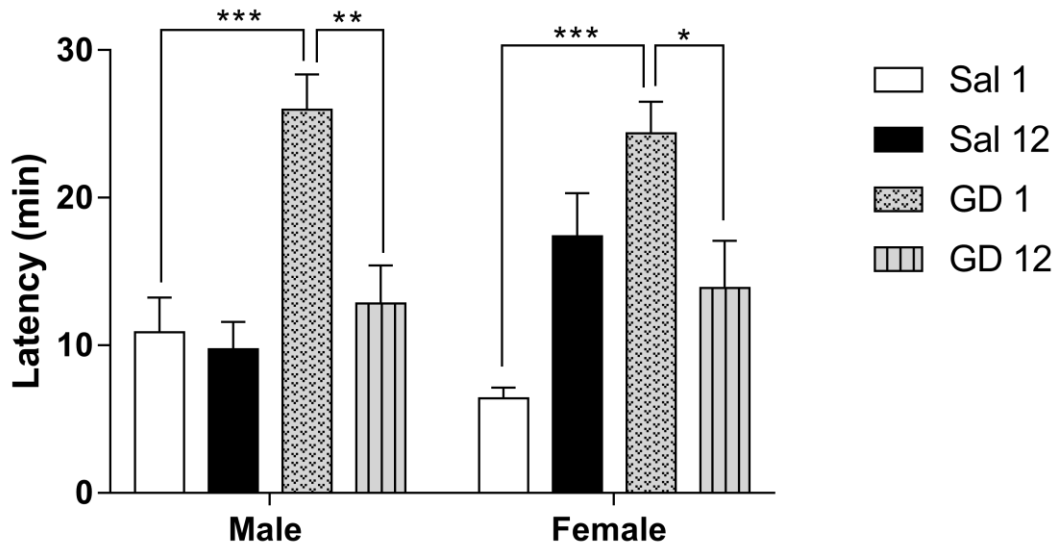


Figure 5

a



b

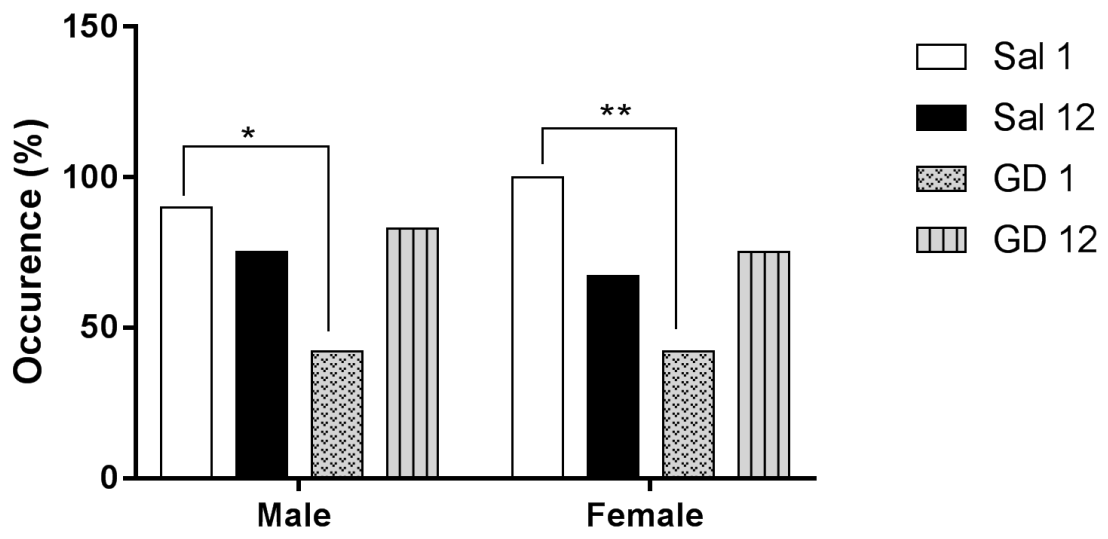
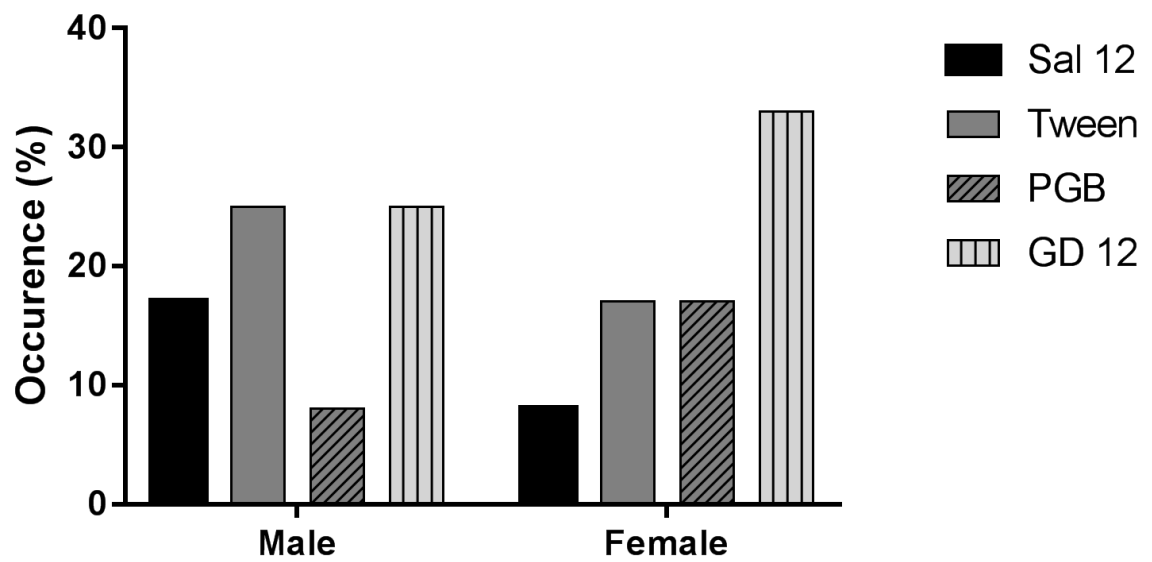


Figure 6

a



b

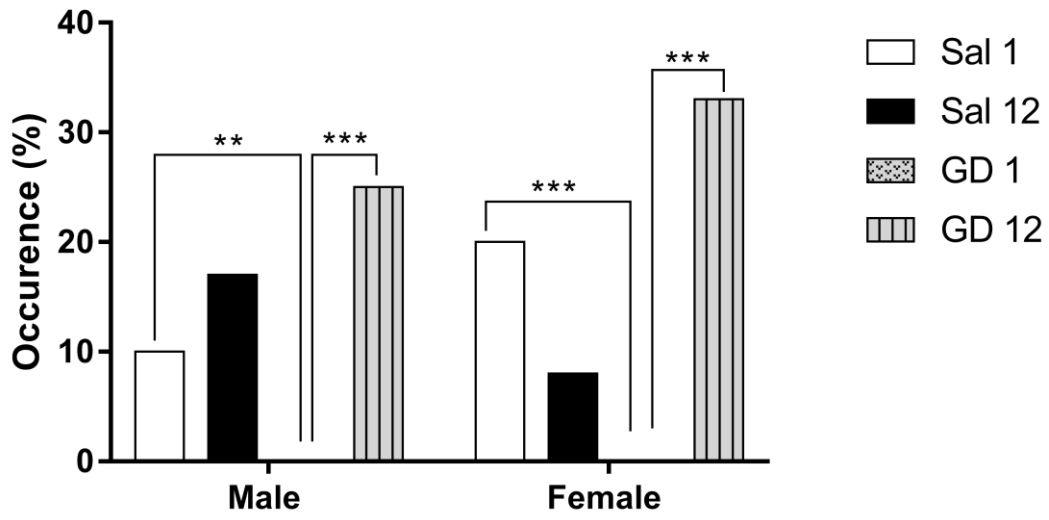
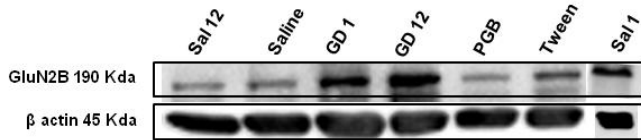


Figure 7

a



b

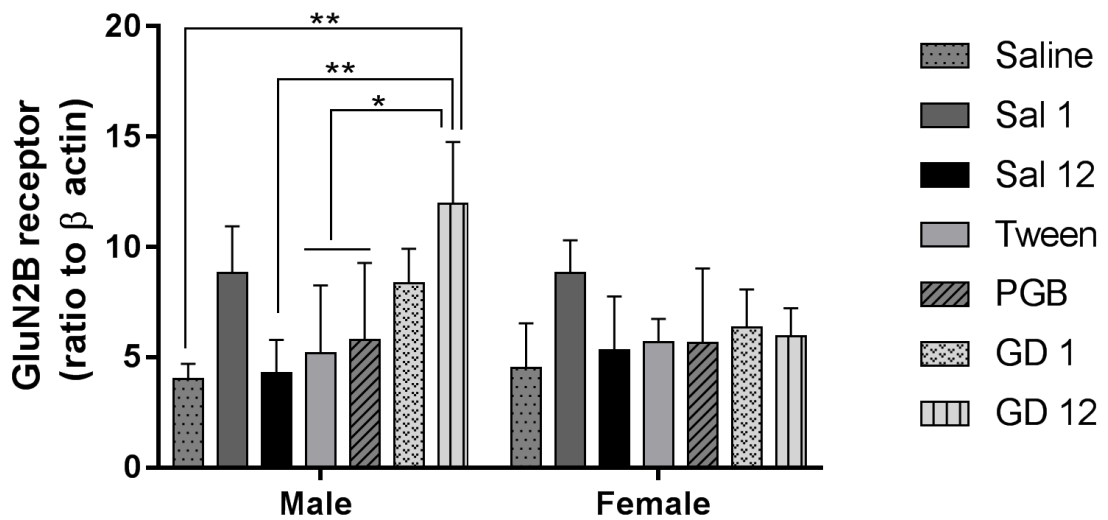
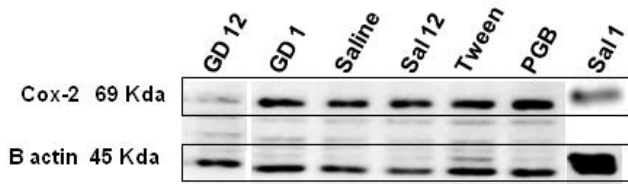


Figure 8

a



b

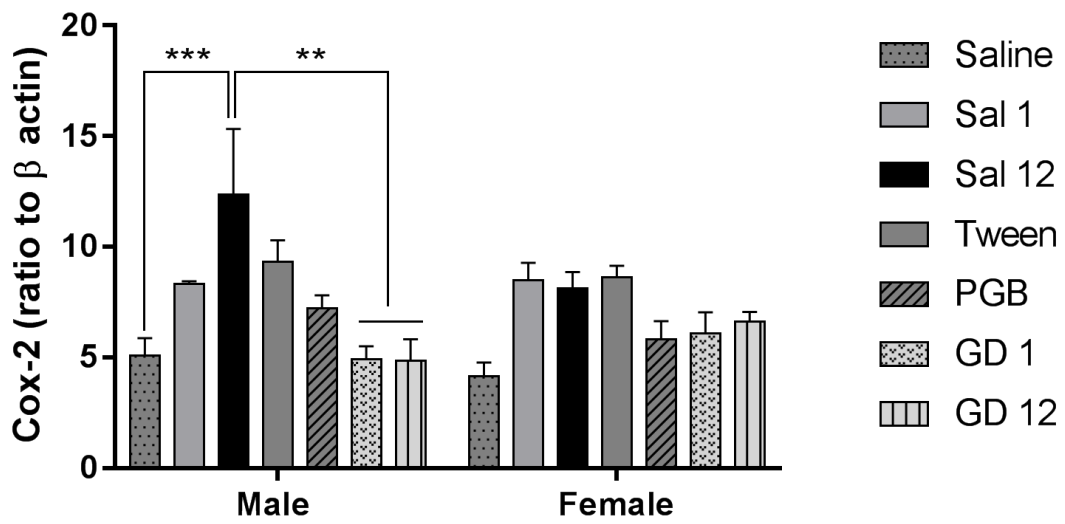
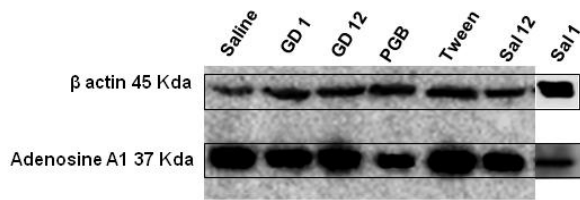


Figure 9

a



b

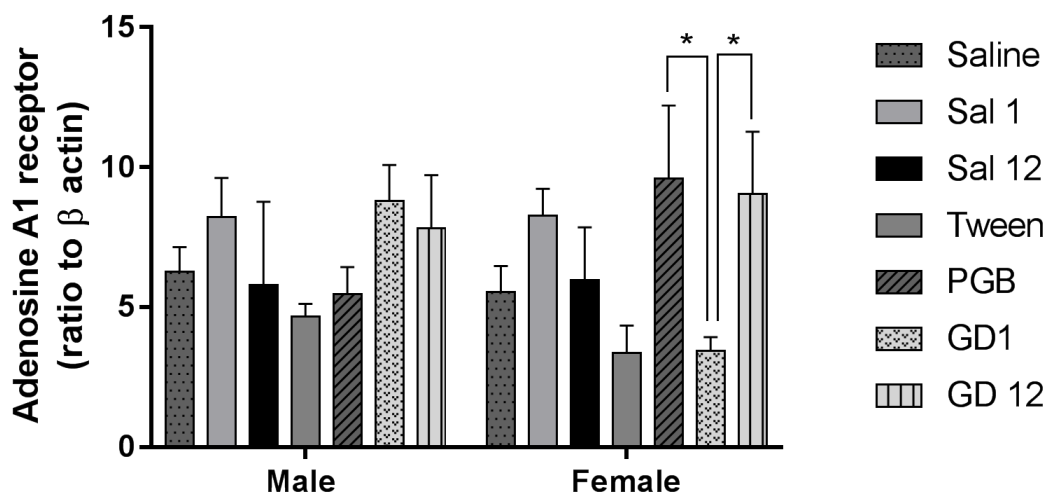


Figure 10

	Damage index	Damage frequency
	Mean ± SD	Mean ± SD
Peripheral blood		
Saline	3.3±1.5	2.7±0.6
Sal 1	13.5±4.1 ^{***}	8.3±2.0 ^{***}
GD 1	4.0±2.3 ^{aa}	2.4±1.5 ^{aaa}
Sal 12	11.3±2.5 ^{***}	6.7±0.6 [*]
GD 12	2.8±1.3 ^{bb}	2.5±1.3 ^b
PGB	2.8±1.7 ^{bb}	2.8±1.7 ^b
Hippocampus		
Saline	10.3±6.2	10.0±5.9
Sal 1	248.2±63.6 ^{***}	87.6±21.2 ^{***}
GD 1	78.7±21.1 ^{aaa}	46.7±7.5 ^{aa**}
Sal 12	213.7±48.9 ^{***}	80.3±26.4 ^{***}
GD 12	96.8±16.6 ^{bbb**}	60.3±6.8 ^{***}
PGB	66.8±21 ^{bbb}	56.0±14.1 ^{b***}

Figure 11

	Damage index	Damage frequency
	Mean ± SD	Mean ± SD
Peripheral blood		
Saline	3.3±2.2	2.8±1.7
Sal 1	20.3±3.1 ^{***}	11.5±5.4 ^{***}
GD 1	7.2±3.7 ^{aa}	5.5±3.0 ^a
Sal 12	20.5±4.0 ^{***}	10.5±6.4 ^{***}
GD 12	6.0±4.8 ^{bbb}	3.8±2.4 ^b
PGB	5.0±4.1 ^{bbb}	3.0±0.8 ^{bb}
Hippocampus		
Saline	9.3±6.0	9.0±6.0
Sal 1	177.6±37.0 ^{***}	68.4±19.6 ^{***}
GD 1	71.2±15.1 ^{aaa}	35.6±10.0 ^{aa}
Sal 12	187.3±48.8 ^{***}	61.3±24.1 ^{***}
GD 12	95.7±24.6 ^{bbb**}	42.0±13.0 [*]
PGB	70.4±22.2 ^{bbb}	38.0±11.1 ^b

Figure 12

MNPCE ^a in 2,000 PCE		
Treatment Group	Female	Male
	Mean ± SD	Mean ± SD
Saline	4.7±1.8	3.8±1.0
Sal 12	7.3±2.9	5.8±3.0
Tween	7.3±2.7	5.4±0.5
GD 12	4.8±1.6	6.5±1.0
PGB	5.7±2.3	6.2±1.3

6. DISCUSSÃO GERAL

As epilepsias são um conjunto de transtornos neurológicos crônicos, caracterizadas principalmente pela sustentada predisposição para gerar crises epiléticas. As causas para um cérebro ser ou se tornar hiperexcitável são as mais variadas, desde mutações genéticas, traumas, infecções, transtornos metabólicos, doenças autoimunes a origens desconhecidas (DEVINSK *et al.*, 2018; VEZZANI *et al.*, 2019). As comorbidades associadas, como a depressão, ansiedade, prejuízos cognitivos, a refratariedade aos tratamentos e os efeitos adversos dos fármacos disponível na clínica (DEVINSK *et al.*, 2018; BEGHI, 2019) torna as epilepsias extremamente dramáticas para o paciente e para os familiares, representando um alerta emergente para a ciência que busca compreender melhor as epilepsias e desenvolver tratamentos eficientes.

Estudo com modelos animais de epilepsia investigam as dinâmicas que ocorrem no funcionamento do cérebro durante a epileptogênese e as suas consequências neurofisiológicas, com isso, muitos mecanismos têm sido identificados, demonstrando contribuição para essas alterações funcionais conhecidas para as epilepsias (ARONICA *et al.*, 2017; VEZZANI *et al.*, 2015; VEZZANI *et al.*, 2019). A neuroinflamação, por exemplo, é identificada como de especial importância na progressão das crises e também tem sido alvo de vários estudos com fármacos anti-inflamatórios (VEZZANI *et al.*, 2019).

GD tem demonstrado efeitos promissores na atenuação de estresse oxidativo e neuroinflamação em modelos de epilepsia e crises epiléticas. Pflüger *et al.*, 2016 observou que GD foi eficiente em atenuar ativação de células microgliais N9, *in vitro*, em modelo de inflamação induzido por LPS, inibindo EROS e diminuindo a expressão de iNOS, TNF- α , fosforilação da p38 e caspase-9 clivada. Complementando esses achados, no presente estudo observamos diminuição na expressão de COX-2, enzima essencial para conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas. Esses resultados em conjunto nos sugerem que GD tem importante papel na atenuação da neuroinflamação, mecanismo relacionado com o desenvolvimento e a progressão das crises epiléticas, como mencionado anteriormente.

Tais resultados podem ser sustentados por diferentes estudos do nosso grupo que demonstraram o aumento da latência e diminuição de ocorrência de crises epiléticas induzidas por pilocarpina (PFLÜGER *et al.*, 2018a), INH e 4AP (PFLUGER *et al.*, 2018b) e AMINOPH (PFLÜGER *et al.*, 2020) em animais tratados com GD 300 mg/Kg, em única

dose. No presente estudo também observamos aumento da latência e diminuição da ocorrência de crises epiléticas induzidas por PTZ em animais tratados com uma única dose de GD 300 mg/kg.

Conforme justificamos inicialmente, este foi o primeiro estudo que avaliou o tratamento subcrônico com GD 300 mg/kg. A dose do composto usada nesse estudo é apoiada por De Oliveira *et al.*, 2008, que identificou efeito dose-dependente de GD em modelo *Kindling* de PTZ. Nesse estudo prévio, somente a dose de GD 300 mg/kg, mas não a de 100 mg/kg, foi eficiente em reduzir a porcentagem de crises epiléticas induzidas pelo PTZ.

Em nosso estudo, o tratamento subcrônico com GD 300 mg/kg por 12 dias não produziu aumento para a latência e diminuição de ocorrência de crises. Com base nestes resultados levantamos a hipótese de que a administração subcrônica do composto pode ativar vias de neurotransmissão não estudadas até o momento. Além disso, talvez GD possa modular alvos moleculares distintos pelo tratamento agudo e assim, o ajuste da dose se torna importante no caso de experimentos de caráter crônico como esse.

Não podemos deixar de avaliar uma possível relação entre a falha em proteger contra as crises epiléticas induzidas pelo PTZ em tratamento subcrônico de GD e o aumento na expressão dos receptores GluN2B no hipocampo dos camundongos machos. O aumento na expressão desses receptores já foi relacionado com epileptogênese e excitotoxicidade, sendo que o aumento sináptico é encontrado em diferentes condições, como causa primária de epileptogênese ou consequência de uma prolongada crise epilética (OKUDA *et al.*, 2017). Desta forma, mesmo que GD tenha modulado o sistema adenosinérgico através do aumento de receptores adenosina A₁, (resultado significativo somente nas fêmeas), observado também por Pfüger *et al.*, 2020, o papel neuroprotetor como anticonvulsivante endógeno da adenosina (VIANNA *et al.*, 2005) pode não ter sido efetivo para contrabalancear os efeitos excitatórios exacerbados mediados pelo aumento de GluN2B.

PGB, um fármaco antiepilético também usado para tratamento de pacientes com dor crônica (BLOOMEL; BLOOMEL, 2007; MOORE *et al.*, 2009) foi incluído como controle positivo nesta investigação. Não obtivemos resultados significativos para nenhum dos compostos (GD e PGB) no teste *Hot Plate*. A dose utilizada foi baseada no trabalho de Nader *et al.*, 2018, que obteve resultados promissores para PGB na proteção de crises epiléticas em modelo *Kindling* de PTZ. Porém, a dose pode ter sido insuficiente para

proteger os animais do estímulo nociceptivo, mesmo que Salat *et al.*, 2013 e Furgała *et al.*, 2018 tenham observado efeito antinociceptivo com a mesma dose de PGB em camundongos no teste *Hot Plate*, outros autores só observaram tais efeitos com doses mais altas, como a de 40 mg/kg observado por Hamada *et al.*, 2018 e a de 200 mg/kg observado por Meymandi *et al.*, 2012. Além disso, o teste foi realizado no décimo dia do protocolo experimental, em todos os dias anteriores os animais foram manipulados para administração farmacológica, talvez o estresse induzido por tais manipulações possa ter influenciado no nosso teste, no entanto, essa hipótese precisa ser melhor investigada.

Apesar da falha no efeito de PGB nos nossos experimentos, o aumento na expressão de receptores adenosina A₁ identificado nas fêmeas tratadas com PGB significa um novo dado na literatura.

GD falhou em proteger os animais das crises epiléticas induzidas por PTZ no presente estudo, mas mesmo assim tem demonstrado bons resultados como composto neuroprotetor. A partir dos resultados encontrados nesse estudo, a administração subcrônica desse composto parece modular vias diferentes daquelas observadas para o tratamento agudo, indicando a complexidade da atividade de GD no SNC. É necessário, portanto, entender melhor seu mecanismo de ação, uma vez que o envolvimento na modulação de expressão do receptor GluN2B pode aumentar a excitabilidade das redes neuronais hipocâmpais e colaborar para progressão das crises epiléticas.

Além da avaliação do envolvimento de GD na acetilação e desacetilação das histonas, proposto no artigo, o ajuste da dose em experimentos subcrônicos é de especial interesse, uma vez que a principal diferença nesse trabalho em comparação com os anteriores foi ausência de efeito nos parâmetros comportamentais.

Assim como discutido no artigo que elaboramos a partir dos dados obtidos com nossos experimentos, esse é o primeiro estudo do nosso grupo de pesquisa utilizando camundongos fêmeas. Obtivemos resultados interessantes, demonstrando que machos e fêmeas respondem de formas diferentes ao tratamento com GD na expressão de COX-2, GluN2B e adenosina A₁, reforçando a necessidade de incluir roedores fêmeas nos estudos pré-clínicos.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo complementam os achados dos estudos anteriores e reforçam que os efeitos de GD na proteção contra crises epiléticas estão relacionados à modulação de vias neuroinflamatórias. No entanto é necessário incluir outros marcadores neuroinflamatórios nos próximos experimentos. O tratamento subcrônico com GD 300mg/kg não demonstrou efeitos protetores contra as crises induzidas pelo PTZ, avaliamos a necessidade de adequar a dose para o próximo protocolo subcrônico e investigar os mecanismos de ação que possam estar envolvidos nos efeitos neuroprotetores deste composto.

Compostos e fármacos com efeitos anti-inflamatórios têm sido identificados como promissores nos tratamentos experimentais de crises epiléticas e a sua manipulação em estudos pré-clínicos são de especial importância para entendermos as bases neuroinflamatórias envolvidas na patogênese das epilepsias.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKASHI, K. *et al.* NMDA receptor GluN2B (GluR ϵ 2/NR2B) subunit is crucial for channel function, postsynaptic macromolecular organization, and actin cytoskeleton at hippocampal CA3 synapses. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 35, p. 10869-10882, 2009.

ARONICA, E. *et al.* Glial adenosine kinase—a neuropathological marker of the epileptic brain. **Neurochemistry international**, v. 63, n. 7, p. 688-695, 2013.

BOISON, D. Adenosine augmentation therapies (AATs) for epilepsy: prospect of cell and gene therapies. **Epilepsy research**, v. 85, n. 2-3, p. 131-141, 2009.

BOISON, D. Role of adenosine in status epilepticus: a potential new target? **Epilepsia**, v. 54, p. 20-22, 2013.

BARKER-HALISKI, Melissa; WHITE, H. Steve. Glutamatergic Mechanisms Associated with Seizures and Epilepsy. **Perspectives in Medicine**, p. 1–16, 2020.

BEGHI, Ettore. Social functions and socioeconomic vulnerability in epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 100, p. 106363, 2019.

BHAGAT, K. *et al.* Rational approaches for the design of various GABA modulators and their clinical progression. **Molecular Diversity**, p. 1-51, 2020.

COELHO DE SOUZA, G. P. *et al.* Anticonvulsant of properties of gamma-decanolactone in mice. **J Ethnopharmacol** 58:175–181, 1997.

COITINHO, A.S *et al.* Convulsão e Epilepsia. **In: FUNCHAL,C; DANIL, C (Orgs). Neurociências: modelos experimentais em animais.** Porto Alegre: EDIPUCRS, 2014.

CHEN, Jun *et al.* Expression of cyclo-oxygenase 2 in rat brain following kainate treatment. **Neuroreport**, v. 6, n. 2, p. 246-248, 1995.

CHINDO, B. A. *et al.* Behavioral and anticonvulsant effects of the standardized extract of *Ficus platyphylla* stem bark. **Journal of ethnopharmacology**, v. 154, n. 2, p. 351-360, 2014.

CHVOJKA, J. et al. The role of interictal discharges in ictogenesis—A dynamical perspective. **Epilepsy & Behavior**, p. 106591, 2019.

CRAFT, Rebecca M. ; LEE, Darla A. NMDA antagonist modulation of morphine antinociception in female vs . male rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 80, p. 639–649, 2005.

DE ALMEIDA PEREIRA, Fernanda *et al.* Efeitos do canabidiol na frequência das crises epilépticas: uma revisão sistemática. **Revista Brasileira de Neurologia e Psiquiatria**, v. 22, n. 1, 2018.

DE OLIVEIRA, P.A *et al.* Effects of gamma-decanolactone on seizures induced by PTZ-kindling in mice. **Exp Brain Res** 187: 161-166, 2008.

DEVINSKY, Orrin *et al.* Epilepsy. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p.1, 2018.

DHIR, A. Pentylentetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. **Current protocols in neuroscience**, v. 58, n. 1, p. 9.37. 1-9.37. 12, 2012.

DINUZZO, Mauro *et al.* Physiological bases of the K⁺ and the glutamate/GABA hypotheses of epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 108, n. 6, p. 995–1012, 2014.

DORANDEU, F. *et al.* Treatment of status epilepticus with ketamine, are we there yet?. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 19, n. 6, p. 411-427, 2013.

DUDEK, F. E.; STALEY, K.J. The time course and circuit mechanisms of acquired epileptogenesis. In: **Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies [Internet]. 4th edition.** National Center for Biotechnology Information (US), 2012.

DUKE, J.A. Handbook of Biologically Active Phytochemicals and their Activities. **CRC Press**, Boca Raton, pp. 3–183, 1992.

DUNWIDDIE, T.V.; MASINO, S. A. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. **Annual review of neuroscience**, v. 24, n. 1, p. 31-55, 2001.

- ELISABETSKY, E. Effects of linalool on glutamatergic system in the rat cerebral cortex. **Neurochemical research**, v. 20, n. 4, p. 461-465, 1995.
- EISENSTEIN, Michael. Neurobiology: Unrestrained excitement. **Nature**, v. 511, n. 7508, p. S4–S6, 2014.
- EYO, U. B. *et al.* Regulation of physical microglia–neuron interactions by fractalkine signaling after status epilepticus. **Eneuro**, v. 3, n. 6, 2016.
- FERRENDELLI, J. A. *et al.* Comparison of the anticonvulsant activities of ethosuximide, valproate, and a new anticonvulsant, thiobutyrolactone. **Epilepsia**, v. 30, n. 5, p. 617-622, 1989.
- FISHER, R. S. The new classification of seizures by the International League Against Epilepsy 2017. **Current neurology and neuroscience reports**, v. 17, n. 6, p. 48, 2017.
- FURGAŁA, Anna *et al.* Time-shifted co-administration of sub-analgesic doses of ambroxol and pregabalin attenuates oxaliplatin-induced cold allodynia in mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 106, n. June, p. 930–940, 2018.
- GASTON, Tyler E.; FRIEDMAN, Daniel. Pharmacology of cannabinoids in the treatment of epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 70, p. 313-318, 2017.
- GREENWOOD, S. G. *et al.* A novel neuroprotective mechanism for lithium that prevents association of the p75NTR-sortilin receptor complex and attenuates proNGF-induced neuronal death in vitro and in vivo. **Eneuro**, v. 5, n. 1, 2018.
- GRONE, B.P.; BARABAN, S. C. Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. **Nature neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 339-343, 2015.
- GULLO, F. *et al.* Atypical “seizure-like” activity in cortical reverberating networks in vitro can be caused by LPS-induced inflammation: a multi-electrode array study from a hundred neurons. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, p. 361, 2014.
- GUNN, Amanda *et al.* The influence of non-nociceptive factors on hot-plate latency in rats. **Journal of Pain**, 2011.

HAMADA, Nada M. *et al.* Calcitonin potentiates the anticonvulsant and antinociceptive effects of valproic acid and pregabalin in pentylenetetrazole-kindled mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 818, n. October 2017, p. 351–355, 2018.

HANADA, T. Iontropic Glutamate Receptors in Epilepsy: A Review Focusing on AMPA and NMDA Receptors. **Biomolecules**, v. 10, n. 3, p. 464, 2020.

HOLLAND, K.D. *et al.* Relative anticonvulsant effects of GABA mimetic and GABA modulatory agents. **Epilepsia**, v.33 (6), p.981–986, 1992

KAUR, H. *et al.* Curcumin attenuates inflammatory response and cognitive deficits in experimental model of chronic epilepsy. **Neurochemistry international**, v. 89, p. 40-50, 2015.

HOSSENI, Mahmoud *et al.* The effect of chronic administration of L-arginine and L-NAME on morphine-induced antinociception in ovariectomized rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v.43, n.5, p.541, 2011.

KHAZIPOV, R. *et al.* Depolarizing GABA and developmental epilepsies. **CNS neuroscience & therapeutics**, v. 21, n. 2, p. 83-91, 2015.

MARAFIGA, J. R. *et al.* GABAergic interneurons in epilepsy: More than a simple change in inhibition. **Epilepsy & Behavior**, p. 106935, 2020.

MEYMANDI, Manzumeh Shamsi; KEYHANFAR, Fariborz. Pregabalin antinociception and its interaction with tramadol in acute model of pain. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 3, p. 576–585, 2012.

NADER, M. A. *et al.* Sitagliptin enhances the neuroprotective effect of pregabalin against pentylenetetrazole-induced acute epileptogenesis in mice: implication of oxidative, inflammatory, apoptotic and autophagy pathways. **Neurochemistry international**, v. 115, p. 11-23, 2018.

OKUDA, Kosuke *et al.* CDKL5 controls postsynaptic localization of GluN2B-containing NMDA receptors in the hippocampus and regulates seizure susceptibility. **Neurobiology of Disease**, 106, p. 158–170, 2017.

OLIVEIRA ASC, COSTA LML, ZOGHBI MGB, CONCEIÇÃO CCC, MOTA MGC. Rendimentos dos principais componentes químicos do óleo essencial de *Aeollanthus suaveolens* (Mart ex K. Spreng) em diferentes partes vegetativas. In: **XVIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, p.513, 16 a 19 de novembro, Manaus - AM, 2004.

PALMA, E. *et al.* Anomalous levels of Cl⁻ transporters in the hippocampal subiculum from temporal lobe epilepsy patients make GABA excitatory. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 22, p. 8465-8468, 2006.

PEREIRA, P. *et al.* Effect of γ -decanolactone on glutamate binding in the rat cerebral cortex. **Neurochemical research**, v. 22, n. 12, p. 1507-1510, 1997.

PFLÜGER, P. *et al.* Gamma-decanolactone attenuates acute and chronic seizures in mice: a possible role of adenosine A₁ receptors. **Behavioural Pharmacology**, v.32, p.544-552, 2020.

PFLÜGER, P. *et al.* Gamma-Decanolactone Improves Biochemical Parameters Associated with Pilocarpine-Induced Seizures in Male Mice. **Current molecular pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 162-169, 2018a

PFLÜGER P. *et al.* Gamma-decanolactone inhibit's iNOS and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia in N9 cells. **European Journal of Pharmacology**, 2016.

PFLÜGER, P. *et al.* Neuropharmacological Profile of Gamma-Decanolactone on hemically-induced Seizure in Mice. **Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Central Nervous System Agents)**, v. 18, n. 3, p. 222-227, 2018b

PITKÄNEN, A. *et al.* Epileptogenesis. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 5, n. 10, p. a022822, 2015.

PITKÄNEN, A. *et al.* (Ed.). Models of seizures and epilepsy. **Academic Press**, 2017.

PSARROPOULOU, C. *et al.* Pentylentetrazol-induced seizures decrease γ -aminobutyric acid-mediated recurrent inhibition and enhance adenosine-mediated depression. **Epilepsia**, v. 35, n. 1, p. 12-19, 1994.

RANG, Rang *et al.* Rang & Dale Farmacologia. **Elsevier Brasil**, cap. 45, 2015.

RATES, S. M. k. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

RAWAT, Chitra *et al.* Cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors: future therapeutic strategies for epilepsy management. **Journal of Neuroinflammation**, v. 16, n. 1, p. 197, 2019.

REDDY, D. S.; KURUBA, R. Experimental models of status epilepticus and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 9, p. 18284-18318, 2013.

ROGAWSKI, M. A.; LÖSCHER, W. The neurobiology of antiepileptic drugs. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 7, p. 553-564, 2004.

ROMERO, M.T.; KEPLER, K. L.; COOPER, M. L.; KOMISARUK, B. R. Modulation of Gender-Specific Effects Upon Swim Analgesia in Gonadectomized Rats. **Physiology & Behavior**, v. 40, 1987.

SALAAT, Kinga *et al.* Evaluation of analgesic, antioxidant, cytotoxic and metabolic effects of pregabalin for the use in neuropathic pain. **Neurological Research**, v. 35, n. 9, p. 948–958, 2013.

SALIH, M. A. M.; MUSTAFA, A. A. A substance in broad beans (*Vicia faba*) is protective against experimentally induced convulsions in mice. **Epilepsy & Behavior**, v. 12, n. 1, p. 25-29, 2008.

SAVAGE, Neil. The complexities of epilepsy. **Nature**, v. 511, n. 7508, p. 50–51, 2014.

SHETTY, A. K.; UPADHYA, D. GABA-ergic cell therapy for epilepsy: Advances, limitations and challenges. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 62, p. 35-47, 2016.

SCHUTTE, R.J. *et al.* Knock-in model of Dravet syndrome reveals a constitutive and conditional reduction in sodium current. **Journal of neurophysiology**, v. 112, n. 4, p. 903-912, 2014.

SILVA, A. V.; CABRAL, F. R. Ictogênese, epileptogênese e mecanismo de ação das drogas na profilaxia e tratamento da epilepsia. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 14, p. 39-45, 2008.

TREVELYAN, Andrew J.; SCHEVON, Catherine A. How inhibition influences seizure propagation. **Neuropharmacology**, v. 69, p. 45–54, 2013.

TROY, C. M. *et al.* Mechanisms of p75-mediated death of hippocampal neurons Role of caspases. **Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 37, p. 34295-34302, 2002.

TURSKI, W. A. *et al.* Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural brain research**, v. 9, n. 3, p. 315-335, 1983.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v.3, p. 97–120, 1998.

VENDRUSCOLO, Leandro Franco; PAMPLONA, Alano; TAKAHASHI, Reinaldo Naoto. Strain and sex differences in the expression of nociceptive behavior and stress-induced analgesia in rats. **Brain Research**, v. 1030, p. 277–283, 2004.

VEZZANI, Annamaria; LANG, Bethan; ARONICA, Eleonora. Immunity and Inflammation in Epilepsy. **Perspectives in Medicine**, p. 1–22, 2016.

VEZZANI, Annamaria; BALOSSO, Silvia; RAVIZZA, Teresa. Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. **Nature Reviews Neurology**, v. 15, n. 8, p. 459–472, 2019.

VEZZANI, Annamaria *et al.* The role of inflammation in epilepsy. **Nature Reviews Neurology**, v. 7, n. 1, p. 31–40, 2011.

VIANA, C.C.S. *et al.* Gamma-decanolactone effect on behavioral and genotoxic parameters. **Life Sciences**, v. 80, p. 1014 – 1019, 2006.

VIANNA, Paulo Eduardo *et al.* Modulation of Seizures and Synaptic Plasticity by Adenosinergic Receptors in an Experimental Model of Temporal Lobe Epilepsy Induced by Pilocarpine in Rats. **Epilepsia**, v. 46, p. 166–173, 2005.

WASTERLAIN, C. G.; CHEN, J. WY. Mechanistic and pharmacologic aspects of status epilepticus and its treatment with new antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 49, p. 63-73, 2008.

XANTHOS, D. N.; SANDKÜHLER, J. Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 43-53, 2014.

YACUBIAN, E. M. T. Evolução da terapêutica medicamentosa das epilepsias. **Farmacológico Epilepsias**, p. 51, 2014.

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. 371-386, 1993.

YIN, Yow Hui; AHMAD, Nurulumi; MAKMOR-BAKRY, Mohd. Pathogenesis of Epilepsy : Challenges in Animal Models. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, V. 16, P.1119-1132, 2013.

9. ANEXO



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 36326

Título: Avaliação do efeito de Gama-decanolactona após tratamento subcrônico submetidos à modelo de crise epiléptica induzido por pentilenotetrazol

Vigência: 01/03/2019 à 31/12/2020

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

PATRÍCIA PEREIRA - coordenador desde 01/03/2019
DEBORA AGUIRRE GONCALVES - Outra Função desde 01/03/2019
LETÍCIA LAZZAROTTO - Aluno de Mestrado desde 01/03/2019
Pricila Fernandes Pfluger - Aluno de Doutorado desde 01/03/2019
Fernanda Marcelia dos Santos - Aluno de Mestrado desde 01/03/2019

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 11/02/2019 - Plenarinho - Andar Térreo do Prédio da Reitoria - Campus Centro da UFRGS- Bairro Farroupilha - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 154 camundongos CF-1, machos e fêmeas (77 machos e 77 fêmeas), com até 02 meses de idade, peso médio de 25g, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação (CREAL) da UFRGS; de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Terça-Feira, 12 de Março de 2019

MARCELO MELLER ALIEVI
Coordenador da comissão de ética