

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

CARLA RIBEIRO ÁLVARES BATISTA

**PAPEL DOS RECEPTORES TRPA1 E TRPV1 EM MODELOS DE CRISES  
EPILEPTICAS**

BELO HORIZONTE

2020

CARLA RIBEIRO ÁLVARES BATISTA

**PAPEL DOS RECEPTORES TRPA1 E TRPV1 EM MODELOS DE CRISES  
EPILEPTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Biológicas - Área de Concentração: Farmacologia

Orientador: Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira

Coorientador: Fabrício de Araújo Moreira

BELO HORIZONTE

2020

043

Batista, Carla Ribeiro Álvares.

Papel dos receptores TRPA1 e TRPV1 em modelos de crises epiléticas  
[manuscrito] / Carla Ribeiro Álvares Batista. - 2020.

131 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira. Coorientador:  
Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Epilepsia. 2. Convulsões. 3. Canal de Cátion TRPA1. 4. Canais de Cátion  
TRPV. 5. Pilocarpina. 6. Pentilenotetrazol. 7. Estado Epiléptico. I. Oliveira,  
Antônio Carlos Pinheiro de. II. Moreira, Fabrício de Araújo. III. Universidade  
Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

### ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO N°326 DE CARLA RIBEIRO ÁLVARES BATISTA

Às **09:00** horas do dia 08 do mês de outubro de 2020, através de Webconferência da Rede Nacional de Pesquisa, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **Carla Ribeiro Álvares Batista**. A presidência da sessão coube ao **Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **Prof. Dr. Antônio Lúcio Teixeira Júnior**, Health Science Center/University of Texas, **Prof. Dr. Daniel de Castro Medeiros**, Neuroscience Department/Karolinska Institutet, **Prof. Dr. Victor Rodrigues Santos**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Profa. Dra. Juliana Carvalho Tavares**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, **Prof. Dr. Fabrício de Araújo Moreira**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, coordenador e **Prof. Dr. Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais, orientador. Em seguida, a candidata fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: **"Papel dos Receptores TRPA1 e TRPV1 em Modelos de Crises Epilépticas"**. Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença da candidata e do público e decidiu considerar **aprovada** a **Tese de Doutorado**. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 08 de outubro de 2020.**

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Carvalho Tavares, Professora do Magistério Superior**, em 08/10/2020, às 14:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Lucio Teixeira Junior, Usuário Externo**, em 08/10/2020, às 15:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira, Professor do Magistério Superior**, em 08/10/2020, às 15:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Castro Medeiros, Usuário Externo**, em 09/10/2020, às 03:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Victor Rodrigues Santos, Professor do Magistério Superior**, em 19/10/2020, às 11:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabricio de Araujo Moreira, Professor do Magistério Superior**, em 21/10/2020, às 15:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0276887** e o código CRC **23E4B48F**.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela proteção e amparo, por me conceder sabedoria e fé! Pela oportunidade do estudo e pela força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, Antonio Carlos e Tânia, sempre me dando suporte nas minhas escolhas, pelo incentivo nos meus estudos e pelo carinho. Sem eles eu não chegaria até aqui! À minha irmã, Rafaela, pela torcida!

Ao Gerson, meu marido, pelo amor, pela confiança, pela motivação e pela paciência que foram infinitamente e diariamente sendo acumulados. Obrigada por seguir ao meu lado e partilhar comigo esta conquista!

Ao meu orientador, Antônio Carlos Pinheiro de Oliveira, por ter aberto as portas do laboratório de Neurofarmacologia e por ter acreditado em mim, mostrando-me o caminho da Ciência! Pelos ensinamentos, pela ajuda e pelo incentivo direto e indireto. Você é para mim exemplo de mestre e de pessoa! Exemplo de profissionalismo e sabedoria! Você, sempre que possível e preciso esteve presente durante os experimentos, tem grande mérito neste trabalho!

Ao meu orientador, Fabrício de Araújo Moreira, pela paciência, pela dedicação, pela cooperação, pelos conselhos e pela enorme contribuição para a realização deste trabalho. Sempre disponível para discussões e sugestões que tanto contribuíram para este trabalho!

Aos professores Dr. Helton José dos Reis e Dra. Luciene Bruno Vieira pelo acolhimento e pela convivência diária no laboratório de Neurofarmacologia.

Aos colegas do Laboratório de Neurofarmacologia, pela amizade, colaboração e conhecimentos compartilhados durante todos esses anos de convivência. Com vocês foi mais fácil trilhar este caminho! Vocês tornaram meus dias de experimento mais divertidos e com certeza, meus resultados, mais valiosos! Agradeço especialmente à Isabel e à Paula, pelos ensinamentos e à Carol Ferrari e Maria Carolina pelo apoio e pelas colaborações!

Em especial, agradeço ao amigo Giovanni, pela paciência, pela amizade, pela dedicação e pelo apoio fundamental no desenvolvimento e concretização deste trabalho.

Aos Laboratórios de Neuropsicofarmacologia, Laboratório de neurobiologia profa. Conceição Machado, pela estrutura oferecida para realização de experimentos de minha tese.

Aos laboratórios Neuropsicofarmacologia, LAFACI, Laboratório de Biologia Vascular pela amizade e pelo carinho!

À banca examinadora, por investir tempo e conhecimento na avaliação desta tese.

Aos professores do Departamento de Farmacologia e do Departamento de Fisiologia e Biofísica, por contribuírem imensamente para meu desenvolvimento profissional.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia pelo auxílio durante o doutorado, principalmente ao Rinaldo e ao Webster, pela disponibilidade e atenção.

## **APOIO FINANCEIRO**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de doutorado - processo: 142400/2016-5 e projetos: 424588/2016-1 e 310347/2018-1.

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) - Processo: CBB-APQ-02044-15.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - concessão de bolsa de doutorado – Processo: 88882.348367/2019-01.

## RESUMO

A epilepsia é um distúrbio neurológico que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, enquanto a epilepsia do lobo temporal (ELT) responde por 40% de todos os casos de epilepsia, sendo a forma mais comum em adultos. A família de receptores de potencial transiente (TRP) é um grupo de canais catiônicos envolvidos em diferentes processos fisiológicos, como a homeostase iônica. O acúmulo de cálcio nos neurônios do hipocampo tem sido associado à etiologia da epilepsia, o que motiva o estudo da família TRP, cujos canais são altamente permeáveis a esse íon. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos dos bloqueadores TRPA1 e TRPV1 nas crises epiléticas, alterações histológicas e bioquímicas, além da liberação de glutamato e do conteúdo de cálcio citosólico em modelo de crise epilética induzida por pilocarpina ou pentilenotetrazol ou em preparações sinaptossomais de córtex. Para isso, animais C57Bl/6 (8-12 semanas de idade) receberam injeção intra-hipocampal de pilocarpina (40 µg), 30 minutos após a injeção intraperitoneal de bloqueador de TRPA1, TRPV1 ou veículo. Os bloqueadores do receptor TRPA1, AP18 (1, 3 e 10 mg/Kg) e do receptor TRPV1, SB366791 (0,1; 0,3 e 1 mg/Kg) foram utilizados nos experimentos *in vivo*. As concentrações de 0,1; 1; 10 e 30 µM foram usadas nas preparações de sinaptossomas para ambos os bloqueadores. Vinte e quatro horas após o *status epilepticus* (SE) induzido pela pilocarpina, os animais foram eutanasiados para a coleta dos tecidos cerebrais. Metade de seus cérebros foram removidos e processados para posteriores análises histológicas para avaliação de morte e viabilidade neuronal, marcação microglial e astrocitária. A outra metade dos cérebros dos animais foi removida para posterior análise de BDNF e dos níveis de citocinas, além da ativação da proteína quinase B (Akt) e da quinase regulada por sinal extracelular (Erk). As crises epiléticas induzidas pela pilocarpina foram avaliadas de acordo com a escala de Racine. Foi revelada forte associação entre AP18 e o desenvolvimento de SE, bem como o bloqueador e crises tônico-clônicas. O AP18 (3 mg/Kg) aumentou as crises classificadas como 3, 4 e 5. Por outro lado, o AP18 (10 mg/Kg) aumentou a latência mediana para os animais desenvolverem SE em relação ao grupo pilocarpina. A pilocarpina aumentou a marcação de neurônios em processo de degeneração evidenciada pela marcação por Fluoro-Jade C (FJC), sendo esta exacerbada pela administração de AP18 (1 e 3 mg/kg). De forma surpreendente, a droga induziu uma resposta dicotômica na microgliose induzida pela pilocarpina, pois exacerbou este parâmetro no giro denteado (GD) (3 mg/Kg) e reduziu em CA1 (1 e 3 mg/Kg). Observamos uma redução na reatividade astrocitária com AP18 (1 e 10 mg/Kg) induzida por pilocarpina, enquanto a dose de 3 mg/Kg de AP18 aumentou essa marcação no GD. Além disso, o AP18 reduziu os níveis de BDNF, TNF- $\alpha$  e CX3CL1 e aumentou os níveis de IL-10 comparado ao grupo pilocarpina. Em relação ao receptor TRPV1, foi observada forte associação entre SB366791 e o desenvolvimento do SE. A frequência de SE e convulsões tônico-clônicas no grupo SB366791 (0,1 e 0,3 mg/Kg) foi maior do que no grupo pilocarpina. A crise comportamental foi acompanhada por um aumento da morte neuronal. AP18 e SB366791 não alteraram nenhuma das análises com preparações de sinaptossomas corticais. Finalmente, nas crises induzidas por pentilenotetrazol, AP18 e SB366791 não alteraram a latência para o desenvolvimento de SE. O presente estudo mostrou que a administração sistêmica dos bloqueadores de TRPA1 e TRPV1, AP18 ou SB366791, respectivamente, aumentou a gravidade das crises epiléticas e danos neuronais decorrentes do SE induzido pela injeção intra-hipocampal de pilocarpina. Nossos resultados sugerem que AP18 e SB366791 apresentam efeitos pró-convulsivantes no modelo de pilocarpina, mas não de pentilenotetrazol. Estudos complementares nos ajudarão a caracterizar os mecanismos subjacentes desses canais na ELT.

**Palavras chave:** Epilepsia, TRPA1, TRPV1, pilocarpina, pentilenotetrazol, *status epilepticus*.

## ABSTRACT

Epilepsy is a neurological disorder that affects millions of people around the world, while temporal lobe epilepsy (ELT) accounts for 40% of all epilepsy cases, being the most common form in adults. The family of transient potential receptors (TRP) are a group of cation channels involved in different physiological processes, such as ion homeostasis. Calcium accumulation in the neurons of the hippocampus has been associated with the etiology of epilepsy, which motivates the study of the TRP family, whose channels are highly permeable to this ion. The aim of this study was to evaluate the effects of TRPA1 and TRPV1 blockers on seizures, histological, and biochemical changes, besides glutamate release and cytosolic calcium content in model of pilocarpine or pentylenetetrazole -induced seizures or in cortex synaptosomal preparations. For this, C57Bl/6 animals (8-12 weeks of age) received intrahippocampal pilocarpine injection (40 µg), 30 minutes after intraperitoneal injection of TRPA1, TRPV1 blocker or vehicle. Blockers of the TRPA1, AP18 receptor (1, 3 and 10 mg/Kg) and TRPV1 receptor, SB366791 (0.1; 0.3 and 1 mg/Kg) were used in the *in vivo* experiments. Concentrations of 0.1; 1; 10 and 30 µM were used in the preparation of synaptosomes for both blockers. Twenty-four hours after pilocarpine-induced status epilepticus (SE), animals were euthanized to collect brain tissues. Half of their brains were removed and processed, for further histological techniques to evaluate neuronal death and viability, microglia and astrocyte staining. The other half of the animal's brains were removed for further analysis of BDNF and cytokines levels, besides the protein kinase B (Akt) and extracellular-signal-regulated kinase (Erk) activation. The seizures induced by pilocarpine were evaluated according to Racine's scale of seizures. Strong association between AP18 and the development of SE was revealed, as well as the blocker and tonic-clonic seizures. AP18 (3 mg/Kg) increased the seizures classified as 3, 4 and 5. On the other hand, AP18 (10 mg/Kg) increased the median latency for the animals to develop the SE as compared with pilocarpine group. Pilocarpine increased the labeling of neurons in the degeneration process evidenced by Fluoro-Jade C (FJC) staining, which was exacerbated by the administration of AP18 (1 and 3 mg/kg). Surprisingly, the drug induced a dichotomous response in microgliosis induced by pilocarpine, as it exacerbated in dentate gyrus (DG) with AP18 (3 mg/kg) and decreased in CA1 with doses of 1 and 3 mg/kg of AP18. We observed a reduction in astrocyte reactivity with AP18 (1 and 10 mg/kg) induced by pilocarpine, while the dose of 3 mg/kg of AP18 increased this marking in DG. In addition, AP18 reduced the levels of BDNF, TNF- $\alpha$  and CX3CL1, and enhanced IL-10 levels compared to the pilocarpine group. In relation to TRPV1, strong association was observed between SB366791 and the development of the SE. The frequency of SE and tonic-clonic seizures in the SB366791 group (0.1 and 0.3 mg/Kg) was higher than the pilocarpine group. The behavioral seizure was accompanied by an enhancement of neuronal death. AP18 and SB366791 did not change any of the analysis with cortical synaptosomes preparations. Finally, in the pentylenetetrazole-induced seizures AP18 and SB366791 did not change the latency for SE development. The present study showed that the systemic administration of the TRPA1 and TRPV1 blockers, AP18 or SB366791, respectively, increased the severity of epileptic seizures and neuronal damage resulting from the SE induced by the intra-hippocampal injection of pilocarpine. Our results suggested that AP18 and SB366791 show pro-convulsive effects in the pilocarpine model, but not in pentylenetetrazole- induced seizures. Further studies will allow the characterization of the underlying mechanisms of these channels in TLE.

**Keywords:** Epilepsy, TRPA1, TRPV1, pilocarpine, pentylenetetrazole, *status epilepticus*.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Formação hipocampal e vias responsáveis pelo fluxo de informações nessa estrutura (via trisináptica excitatória hipocampal). Rodríguez-Iglesias *et al.*, 2019.

**Figura 2:** Representação esquemática dos principais mecanismos de entrada de  $Ca^{2+}$  na célula. Maklad *et al.*, 2019.

**Figura 3:** Sinalização intracelular dos canais TRPA1 e TRPV1. Fernández-Carvajal *et al.*, 2012.

**Figura 4:** Local de implantação da cânula guia está representado pelos pontos em vermelho.

**Figura 5:** Injeção de pilocarpina através de bomba de infusão, após 8 dias da cirurgia estereotáxica.

**Figura 6:** Desenho experimental do tratamento com AP18 ou SB366791 e injeção intra-hipocampal de pilocarpina.

**Figura 7:** Desenho experimental da perfusão cardíaca e obtenção de fatias em criostato para realização de imunofluorescência e determinação de neurônios em processo de degeneração.

**Figura 8:** Esquema da obtenção do sinaptossoma a partir do terminal nervoso e parte da membrana pós-sináptica durante a homogeneização mecânica. Wu *et al.*, 2012.

**Figura 9:** Efeito da injeção intra-hipocampal de pilocarpina (35, 40 ou 50  $\mu$ g) sobre a latência para atingir o SE (A), o número de crises 4 e 5 (B) e o número de crises tônico-clônicas (C).

**Figura 10:** Efeito do AP18 em crises epiléticas induzidas por injeção intra-hipocampal de pilocarpina.

**Figura 11:** Imagens representativas do efeito do tratamento com AP18 no processo de neurodegeneração hipocampal no aumento de 20x das regiões CA1 e GD do hipocampo.

**Figura 12:** Efeito do tratamento com AP18 no processo de neurodegeneração hipocampal.

**Figura 13:** Imagens representativas do efeito do tratamento com AP18 na marcação de neurônios com NeuN no aumento de 20x das regiões CA1 e GD do hipocampo.

**Figura 14:** Efeito do AP18 sobre a marcação de neurônios com NeuN.

**Figura 15:** Imagens representativas do efeito do tratamento com AP18 na marcação microglial com Iba-1<sup>+</sup> no aumento de 20x das regiões CA1 e GD do hipocampo.

**Figura 16:** Efeito do AP18 sobre a marcação microglial com Iba-1.

**Figura 17:** Imagens representativas do efeito do tratamento com AP18 na marcação da ativação microglial com CD68 no aumento de 20x das regiões CA1 e GD do hipocampo.

**Figura 18:** Efeito do AP18 sobre a marcação da ativação microglial com CD68.

**Figura 19:** Imagens representativas do efeito do tratamento com AP18 na marcação astrocitária com GFAP no aumento de 20x das regiões CA1 e GD do hipocampo.

**Figura 20:** Efeito do AP18 sobre a marcação de astrócitos com GFAP.

**Figura 21:** Efeito do AP18 na expressão de Akt e Erk<sub>1/2</sub> após a injeção intra-hipocampal de pilocarpina.

**Figura 22:** Efeito do AP18 na concentração de BDNF no hipocampo de animais após a injeção de pilocarpina.

**Figura 23:** Efeito do AP18 na concentração das citocinas no hipocampo de animais após a injeção de pilocarpina.

**Figura 24:** Análise da liberação de glutamato (A), do conteúdo de cálcio citosólico (B) e exocitose (C) de preparações de sinaptossomas obtidas do córtex de animais C57Bl/6 pré-tratadas com o AP18 (0,1; 1; 10 ou 30  $\mu$ M) e estimuladas com KCl.

**Figura 25:** Análise da liberação de glutamato (A) e do conteúdo de cálcio citosólico (B) de preparações de sinaptossomas obtidas do córtex de animais C57Bl/6 pré-tratadas com o HC030031 (0,1; 1; 10 ou 30  $\mu$ M) e estimuladas com KCl.

**Figura 26:** Efeito do SB366791 em crises epiléticas induzidas por injeção intra-hipocampal de pilocarpina.

**Figura 27:** Imagens representativas do efeito do tratamento com SB366791 no processo de neurodegeneração hipocampal no aumento de 20x das regiões CA1 e GD do hipocampo.

**Figura 28:** Efeito do tratamento com SB366791 na neurodegeneração hipocampal.

**Figura 29:** Imagens representativas do efeito do tratamento com AP18 na marcação microglial com Iba-1 no aumento de 20x das regiões CA1 e GD do hipocampo.

**Figura 30:** Efeito do SB366791 sobre a marcação microglial com Iba-1.

**Figura 31:** Efeito do SB366791 na concentração de BDNF no hipocampo de animais após a injeção de pilocarpina.

**Figura 32:** Efeito do SB366791 na concentração das citocinas no hipocampo de animais após a injeção de pilocarpina.

**Figura 33:** Análise da liberação de glutamato (A) e do conteúdo de cálcio citosólico (B) de preparações de sinaptossomas obtidas do córtex de animais C57Bl/6 pré-tratadas com o SB366791 (0,1; 1; 10 ou 30  $\mu$ M), estimuladas com KCl.

**Figura 34:** Efeito do AP18 e do SB366791 na latência para a primeira crise tônico-clônica no modelo de crises epiléticas induzidas por PTZ.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Média do número de crises 3, 4 e 5 e tônico-clônicas em animais tratados com AP18 ou veículo.

**Tabela 2:** Média do número de crises 3, 4 e 5 e tônico-clônicas em animais tratados com SB366791 ou veículo.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AC: adenilato ciclase

Akt: proteína quinase B

AMPA:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

ATP: adenosina trifosfato

BDNF: fator neurotrófico derivado do cérebro

BSA: soroalbumina bovina

Ca<sup>2+</sup>: íon cálcio

CA1, CA2 e CA3: Corno de Ammon - regiões 1, 2 e 3

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CX3CL1: fractalquina

ELISA: ensaio de imunoabsorção enzimática

ELT: Epilepsia do Lobo Temporal

FAAH: hidrolase de amidas de ácidos graxos

FJC: Fluoro-Jade C

GABA: ácido gama-aminobutírico

GD: giro denteado

GDH: glutamato desidrogenase

GDNF: fator neurotrófico derivado de células da glia

GFAP: proteína glial fibrilar ácida (do inglês: *glial fibrillary acidic protein*)

Iba-1: molécula adaptadora ligante de cálcio ionizado 1 (do inglês: ionized calcium binding adaptor molecule 1)

IL: interleucina

ILAE: Liga Internacional Contra a Epilepsia (do inglês: International League Against Epilepsy)

KRH: Krebs-Ringer-Hepes

mGluR: receptor metabotrópico

NADP<sup>+</sup>: β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato

NADPH: β-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, reduzido

NGF: fator de crescimento neural

NMDA: N-metil-D-aspartato

PBS: tampão fosfato-salina

PFA: paraformaldeído

PKA: proteínas quinase A

PKC: proteínas quinase C

PLC: fosfolipase C

PTZ: pentilenotetrazol

TNF-α: fator de necrose tumoral alfa

TrkB: quinase B relacionada à tropomiosina

TRPA: potencial transitório anquirina

TRPC: potencial transitório canônico

TRPM: potencial transitório melastatina

TRPN: (sem potencial mecanorreceptor)

TRP: potencial transitório mucolipina

TRPV: potencial transitório vaniloide

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b>	17
1.1 Crise epiléptica e epilepsia: conceitos e aspectos gerais	17
1.2 Epilepsia do Lobo Temporal e formação hipocampal	18
1.3 Modelos experimentais para o estudo de epilepsias e crises epilépticas	20
1.4 Alterações histológicas e bioquímicas relacionadas à epileptogênese	23
1.5 Envolvimento do cálcio em crises epilépticas	27
1.6 Receptores potenciais transitórios: sinalização e funções gerais	30
1.6.1 Papel de receptores potenciais transitórios nas crises epilépticas	33
<b>2. Objetivos</b>	35
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivos específicos	35
<b>3. Material e métodos</b>	36
3.1 Animais	36
3.2 Drogas	36
3.3 Cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas e microinjeção de pilocarpina	36
3.4 Protocolo de tratamento farmacológico nos animais	37
3.5 Análise comportamental do <i>status epilepticus</i> (SE) induzido pela administração de pilocarpina	38
3.6 Perfusão transcardíaca	39
3.7 Marcação com Fluoro-Jade C <sup>®</sup> para avaliação de neurônios em processo de neurodegeneração	40
3.8 Marcação de células Iba-1 <sup>+</sup> , CD68 <sup>+</sup> , GFAP <sup>+</sup> e Neun por imunofluorescência	40
3.9 Análise das imagens	41
3.10 Avaliação da ativação de Akt e Erk no hipocampo por <i>western blotting</i>	41
3.11 Avaliação de citocinas inflamatórias e de fatores neurotróficos no hipocampo por ELISA	42
3.12 Análise comportamental das crises epilépticas induzidas pela administração intraperitoneal de pentilenotetrazol	42
3.13 Preparação dos sinaptossomas corticais	42
3.14 Ensaio para liberação de glutamato	43
3.15 Medida da concentração de cálcio livre intrasinaptossomal	44
3.16 Medidas de exocitose	44
3.17 Análise estatística	45
<b>4. Resultados</b>	47
4.1 Padronização da dose intra-hipocampal de pilocarpina em animais C57Bl/6	47
4.2 Avaliação do efeito do AP18 sobre as crises epilépticas induzidas pela administração intra-hipocampal de pilocarpina	48
4.3 AP18 aumentou a marcação por FJC no hipocampo e a perda neuronal induzidas pela administração intra-hipocampal de pilocarpina	50
4.4 AP18 alterou a marcação de neurônios no hipocampo de animais após a administração intra-hipocampal de pilocarpina	52
4.5 AP18 aumentou a microgliose no GD e a ativação microglial em CA1 após a administração intra-hipocampal de pilocarpina	54

4.6 AP18 alterou a marcação de astrócitos no GD, mas não em CA1 após a administração intra-hipocampal de pilocarpina.....	58
4.7 AP18 não alterou a fosforilação de Akt e Erk no hipocampo 24 h após a injeção intra-hipocampal de pilocarpina.....	60
4.8 AP18 reduziu os níveis de BDNF no hipocampo 24 h após a injeção intra-hipocampal de pilocarpina.....	61
4.9 AP18 alterou a concentração de citocinas inflamatórias no hipocampo 24 h após a injeção intra-hipocampal de pilocarpina.....	62
4.10 AP18 não alterou a liberação de glutamato, o conteúdo de cálcio citosólico e a exocitose nos terminais pré-sinápticos corticais.....	64
4.11 HC030031 não altera a liberação de glutamato e o conteúdo de cálcio citosólico nos terminais pré-sinápticos corticais.....	64
4.12 Avaliação do efeito do SB366791 sobre as crises epiléticas induzidas pela administração intra-hipocampal de pilocarpina.....	65
4.13 SB366791 aumentou o processo de degeneração de neurônios na região CA1, mas não no GD do hipocampo.....	68
4.14 O estímulo com pilocarpina aumentou a microgliose, mas não o pré-tratamento com SB366791.....	70
4.15 SB366791 não alterou a concentração do fator neurotrófico BDNF no hipocampo 24 h após a injeção intra-hipocampal de pilocarpina.....	72
4.16 SB366791 reduziu a concentração da quimiocina CX3CL1 no hipocampo 24 h após a injeção intra-hipocampal de pilocarpina.....	73
4.17 SB366791 não alterou a liberação de glutamato e o conteúdo de cálcio citosólico em preparações de sinaptossomas corticais.....	74
4.18 AP18 e SB366791 não alteram a latência para o desenvolvimento do SE pela administração intraperitoneal de pentilenotetrazol.....	74
<b>5. Discussão .....</b>	<b>76</b>
5.1 Efeito do bloqueador de TRPA1 em modelos de crises epiléticas induzidas por pilocarpina ou pentilenotetrazol.....	76
5.2 Efeito do bloqueador de TRPV1 em modelos de crises epiléticas induzidas por pilocarpina ou pentilenotetrazol.....	85
5.3 Efeito dos bloqueadores de TRPA1 e TRPV1 na liberação de glutamato, na concentração de cálcio citosólico e na exocitose em sinaptossomas corticais.....	88
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>90</b>
<b>7. Referências .....</b>	<b>91</b>
<b>Apêndices.....</b>	<b>121</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Crise epiléptica e epilepsia: conceitos e aspectos gerais

Crise epiléptica é definida como “a ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas secundários a atividade neuronal cerebral anormal excessiva ou síncrona” (Fisher *et al.*, 2005). Alterações funcionais, metabólicas e sinápticas desenvolvem-se em decorrência de crises epilépticas que podem estar envolvidas na sua autolimitação e no estado interictal ou pós-ictal (Engel *et al.*, 2008). Dentre as alterações pós-ictais observadas estão as mudanças no eletroencefalograma e no comportamento, nas sinapses e no metabolismo, na atividade de neurotransmissores e neuromoduladores, além de perda neuronal no hipocampo, aumento da reatividade de células gliais, neurogênese e inflamação (Lado e Moshe, 2008; Löscher e Köhling, 2010; Pitkänen e Sutula, 2002).

A crise epiléptica é o evento, enquanto a epilepsia é a doença associada a crises recorrentes e espontâneas. A Liga Internacional contra Epilepsia (*International League Against Epilepsy-ILAE*) propôs em 2014 que a epilepsia deve ser considerada uma doença do cérebro caracterizada por qualquer uma das seguintes condições: “1) Pelo menos duas crises epilépticas não provocadas (ou reflexas) ocorrendo em um intervalo superior a 24 h; 2) uma crise epiléptica não provocada (ou reflexa) e a probabilidade de ocorrência de crises epilépticas similar ao risco de recorrência em geral (de pelo menos 60%) após duas crises epilépticas não provocadas, ocorrendo nos próximos 10 anos; 3) diagnóstico de uma síndrome epiléptica”. Epilepsia é considerada resolvida para os indivíduos que tenham uma síndrome epiléptica idade-dependente, mas que já estão além da idade aplicável ou para aqueles que tenham permanecido livres de crises nos últimos 10 anos, sem medicamentos antiepilépticos nos últimos 5 anos (Fisher *et al.*, 2014).

A epilepsia é uma doença crônica que afeta mais de 50 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que 30% dessas são refratárias ao tratamento medicamentoso disponível. Quase 80% das pessoas com epilepsia vivem em países de baixa e média renda (WHO, 2019). A epilepsia pode ter causas genéticas ou adquiridas. No geral, indivíduos mais jovens tendem a apresentar formas genéticas, enquanto pessoas mais velhas apresentam maior prevalência das formas adquiridas, decorrentes de acidente vascular encefálico ou de tumores cerebrais (Allone *et al.*, 2017). Diferentes causas como anormalidades estruturais, genéticas, metabólicas, imunes e, ainda aquelas de etiologia desconhecida podem ser associadas à epilepsia (Scheffer *et al.*, 2017).

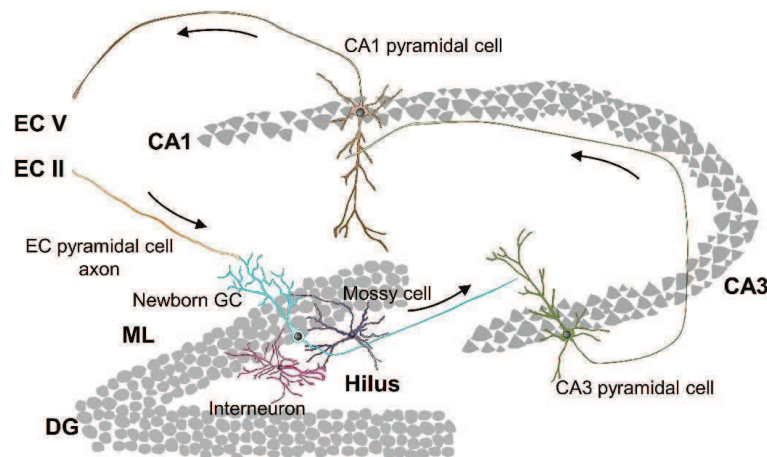
Com relação às causas genéticas, na maioria dos casos, os genes responsáveis ainda não são conhecidos, sendo a classificação baseada apenas em uma história familiar de doença autossômica dominante (Scheffer *et al.*, 2017). As causas metabólicas apresentam alterações bioquímicas como a porfiria, a uremia, as aminoacidopatias ou as crises por dependência de piridoxina, nas quais o sintoma central do distúrbio são as crises epiléticas. De forma semelhante, as crises epiléticas são sintomas apresentados pelos pacientes com epilepsia imune. Neste caso, a epilepsia é uma manifestação neurológica encontrada em condições auto-imunes, como na encefalite anti-receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) e na encefalite anti-proteína 1 inativada por glioma (anti-LGI1) (Arsov *et al.*, 2012). Na epilepsia de causa desconhecida, não é possível diagnosticar a etiologia de forma específica baseado nos sinais e sintomas do paciente (Scheffer *et al.*, 2017). Epilepsia resultante de uma infecção é a etiologia mais comum em todo o mundo. Neurocisticercose, tuberculose, malária cerebral, toxoplasmose cerebral e infecções congênitas como pelo Zika vírus e citomegalovírus podem gerar crises, que são os sintomas centrais da afecção (Scheffer *et al.*, 2017; Vezzani *et al.*, 2016). Anormalidades estruturais incluem acidente vascular cerebral, trauma e infecção, ou malformações genéticas (Gaillard *et al.*, 2009).

Indivíduos acometidos por algum tipo de lesão no tecido cerebral podem sofrer uma reorganização dos circuitos cerebrais que podem transformar-se, com o tempo, em um foco gerador de atividade elétrica anormal (Tenkim, 2009). Este fenômeno, denominado epileptogênese, classicamente ocorre em três fases: primeiro, a ocorrência de uma lesão ou evento precipitante; segundo, um período "latente" durante o qual mudanças ocorrem devido à lesão precedente e transformam o cérebro previamente normal em um cérebro epilético; e terceiro, a epilepsia crônica estabelecida (Goldberg e Coutler, 2013). Na epileptogênese, um cérebro normal torna-se, então, funcionalmente alterado e passa a gerar atividade elétrica anormal desenvolvendo crises epiléticas crônicas (Goffin *et al.*, 2007). Tradicionalmente, a epileptogênese tem sido considerada no contexto do "período latente", um período entre o insulto epileptogênico e o aparecimento da primeira crise clínica. Entretanto, uma nova definição foi proposta na qual o termo "epileptogênese" inclui também os mecanismos de progressão que podem continuar a ocorrer mesmo após o diagnóstico de epilepsia (Pitkänen *et al.*, 2015; Pitkänen e Engel, 2014).

## **1.2 Epilepsia do Lobo Temporal e formação hipocampal**

A epilepsia do lobo temporal (ELT) corresponde a 40% de todos os casos de epilepsia, sendo a forma mais comum em adultos (Manford *et al.*, 1992). Dois tipos de ELT foram descritas pela ILAE: a ELT extra-mesial - início das crises no neocórtex temporal, e a ELT mesial – associada a alterações na amígdala, no giro parahipocampal e no hipocampo, sendo essa a forma mais frequente em adultos (ILAE, 1981; McIntosh e Das, 2020). ELT é caracterizada pela presença de crises focais complexas com início nas estruturas límbicas, as quais incluem o hipocampo e o giro denteado (GD; Engel, 2001; Pitkänen e Sutula, 2002; Sutula *et al.*, 1998).

A formação hipocampal é compreendida pelo giro denteado, hipocampo, complexo subicular e córtex entorrinal. O GD é dividido nas camadas molecular - camada de células granulares, e camada polimórfica - hilo. O hipocampo propriamente dito é subdividido em corno de Ammon 3 (CA3), CA2 e CA1. A circuitaria hipocampal constitui a via clássica trisináptica excitatória unidirecional: córtex entorrinal–GD–CA3–CA1– córtex entorrinal. Neurônios do córtex entorrinal projetam-se para as células granulares do GD através da via perfurante. O GD por sua vez, envia projeções para as células piramidais em CA3 através das fibras musgosas. Os neurônios piramidais de CA3 levam informação aos neurônios piramidais de CA1 através dos colaterais de Schaffer. Neurônios piramidais de CA1 enviam projeções de volta para os neurônios da camada mais profunda do córtex entorrinal. CA3 também recebe projeções diretas do córtex entorrinal através da via perfurante. CA1 recebe conexões diretas do córtex entorrinal através da via têmpero-amônica (Figura 1) (Deng *et al.*, 2010; Leite & Cavalheiro, 1998).



**Figura 1:** Formação hipocampal e vias responsáveis pelo fluxo de informações nessa estrutura (via trisináptica excitatória hipocampal). Rodríguez-Iglesias *et al.*, 2019.

ELT é o tipo mais comum de epilepsia refratária. Adultos com ELT refratária a medicamentos apresentam como achado patológico mais comum a esclerose hipocampal (Blümcke *et al.*,

2002; Cavanagh e Meyer, 1956). Um aspecto marcante da esclerose hipocampal é a perda neuronal, principalmente no hipocampo (CA1) e também na amígdala e córtex entorrinal (Babb, 1987; Thom, 2014). Em 2013, através da análise histopatológica de ressecções de hipocampo de pacientes com ELT, a ILAE classificou a esclerose hipocampal em três subtipos. O tipo 1 que envolve a perda neuronal e gliose em CA1 e CA4; o tipo 2 envolve a perda neuronal e gliose apenas em CA1; e no tipo 3 a perda neuronal e a gliose são restritas a CA4. A perda de neurônios hipocampais está sempre associada a um padrão grave de astrogliose, definido por marcação positiva intensa da proteína glial fibrilar ácida (GFAP; Blümcke *et al.*, 2013).

### 1.3 Modelos experimentais para o estudo de epilepsias e crises epiléticas

Abordagens utilizando modelos animais têm ajudado no entendimento dos mecanismos relacionados à epileptogênese e à ELT. Diversos modelos usando roedores refletem aspectos distintos da epilepsia focal em humanos, além de superarem a ausência ou indisponibilidade de hipocampus humanos para o estudo da epileptogênese (Becker, 2018). Modelos que induzem crises epiléticas através de agentes químicos têm sido muito utilizados, como a pilocarpina, um agonista muscarínico e o ácido caínico, um agonista glutamatérgico, os quais constituem os estímulos químicos mais utilizados (Leite *et al.*, 2002; Lévesque *et al.*, 2016).

Diversos modelos experimentais têm sido utilizados para mimetizar as condições da ELT humana, buscando solucionar problemas, como potenciais tratamentos para as crises epiléticas em ELT refratário a medicamentos e o entendimento dos mecanismos subjacentes às crises epiléticas. Um único modelo animal não é capaz de representar todas as características relativas à ELT humana. Modelos com aspectos e limitações distintas estão disponíveis para o uso experimental, como a estimulação elétrica que reproduz as crises parciais complexas desenvolvidas na ELT, o modelo induzido por hipertermia gerando convulsões febris, que evoluem para *status epilepticus* (SE) seguidas de neurodegeneração e o modelo genético, no qual crises têm início através da estimulação acústica de alta intensidade (Dube *et al.*, 2000; Nirwan *et al.*, 2018; Ross and Coleman, 2000).

O modelo de injeção sistêmica ou intra-hipocampal de ácido caínico, um análogo de L-glutamato, é um modelo bem estabelecido para estudar a ELT, que induz despolarização de neurônios e crises epiléticas em roedores, com perda de células piramidais nas regiões CA1, CA3 e CA4 do hipocampo (Chung e Han, 2003; Nadler *et al.*, 1978; Sharma *et al.*, 2007). A administração intra-hipocampal de ácido caínico está associada a menores taxas de mortalidade

e gera descargas epileptiformes nas estruturas límbicas que avançam para outras áreas do cérebro (Carriero *et al.*, 2012). Por outro lado, a administração sistêmica se relaciona a maiores taxas de mortalidade, podendo ser reduzida pela utilização de doses múltiplas ao invés de uma única dose (Sharma *et al.*, 2007). Este estímulo leva a perda de neurônios em CA1 e CA3 do hipocampo (Chakravarty *et al.*, 1997), brotamento de fibras musgosas na camada molecular interna do GD (Sommer *et al.*, 2001) e crises recorrentes espontâneas (Sharma *et al.*, 2007). Esse estímulo químico ativa os receptores ionotrópicos  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA) e de ácido caínico (Lévesque e Avoli, 2013) e as crises geradas podem ser avaliadas segundo a escala de Racine (Racine, 1972).

Um outro modelo animal utilizado para estudar a epilepsia humana e os mecanismos envolvidos na epileptogênese, assim como o estudo de agentes antiepileptogênicos, é a administração sistêmica de pentilenotetrazol (PTZ), um antagonista não competitivo do receptor do ácido gama-aminobutírico A (GABA<sub>A</sub>), um canal de cloreto (Dhir, 2012). Esse modelo é útil, considerando-se que as crises resultam em parte de uma função GABAérgica diminuída com consequente aumento da atividade glutamatérgica (Corda *et al.*, 1992).

O modelo de pilocarpina, descrito por Turski em 1983, promove alterações comportamentais, crises límbicas e neurodegeneração (Hamilton *et al.*, 1997; Turski *et al.*, 1983a, b). As primeiras alterações eletrográficas observadas são restritas ao hipocampo e, em seguida, a atividade epileptiforme se espalha para outras estruturas límbicas, como amígdala e, finalmente, para o córtex (Turski *et al.*, 1983a). Após a administração de pilocarpina os animais desenvolvem SE, situação na qual ocorre uma falha nos mecanismos responsáveis pelo início ou fim das crises, provocando crises anormalmente prolongadas. As crises induzidas por pilocarpina podem ser classificadas segunda a escala de Racine (Racine, 1972). O SE pode gerar consequências a longo prazo, como morte neuronal e alteração das redes neuronais, dependendo do tipo e duração das crises (Trinka *et al.*, 2015). O SE desenvolvido após a administração do estímulo é caracterizado por crises tônico-clônicas, seguidas de um período sem crises (período de latência) e com posterior aparecimento de crises recorrentes e espontâneas (Curia *et al.*, 2008; Leite *et al.*, 1990). O hipocampo de roedores responde à pilocarpina induzindo o SE e leva cerca de 7 dias para desenvolver crises recorrentes (Goffin *et al.*, 2007). Após a SE inicial, algumas semanas são necessárias para desenvolver fibras musgosas na camada molecular interna da GD e perda inter-neuronal semelhante às alterações que acontecem na ELT em pacientes (Mello e Covolan, 1996; Mello *et al.*, 1993). Áreas como CA1 e CA3 do hipocampo,

amígdala e córtex piriforme são altamente propensas a danos neuronais induzidos pela pilocarpina (Turski *et al.*, 1983a, b; Mello e Covolan, 1996). Esse estímulo químico pode ser administrado tanto por via periférica (intraperitoneal) quanto intra-hipocampal, sendo que este último se correlaciona com uma menor taxa de mortalidade quando comparada ao primeiro (Curia *et al.*, 2008; Furtado *et al.*, 2002).

As crises induzidas pela pilocarpina têm início devido à ativação do sistema colinérgico - via receptores muscarínicos M1, os quais são acoplados à proteína Gq e, portanto, excitatórios (Fryer *et al.*, 2012; Hamilton *et al.*, 1997). No hipocampo, o receptor M1 pode ser expresso pré ou pós-sinápticamente e é o subtipo de receptor muscarínico mais abundante, desenvolvendo um importante papel na regulação da excitabilidade de neurônios hipocâmpais (Lawrence *et al.*, 2006; Levey, 1996). A ativação de receptores M1 pela pilocarpina ativa a fosfolipase C (PLC), produzindo diacilglicerol e inositol trifosfato, o que leva a alteração da corrente dos íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ), aumentando a excitabilidade neuronal (Segal, 1988). O aumento nos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  nos neurônios despolariza a membrana, levando a um recrutamento secundário da sinalização glutamatérgica excitatória (Lallement *et al.*, 1991; Pumain *et al.*, 1983). O glutamato, atuando em receptores do tipo AMPA ou cainato, permite a entrada de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) e  $\text{Ca}^{2+}$  na célula, promovendo assim a remoção do magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) dos receptores do tipo NMDA. Uma vez removido, ocorre a ativação deste receptor pelo glutamato, permitindo a entrada de mais  $\text{Ca}^{2+}$  na região pós-sináptica da célula, que induzirá excitotoxicidade e morte celular (Scorza *et al.*, 2009).

Enquanto a acetilcolina é responsável pelo início das crises induzidas por pilocarpina, a manutenção das mesmas se dá via ativação de receptores de glutamato NMDA (Hamilton *et al.*, 1997). O glutamato é o neurotransmissor excitatório predominante do cérebro de mamíferos adultos e é fundamental em vários processos fisiológicos, como aprendizagem, memória e desenvolvimento neuronal (Nakanishi e Masu, 1994). Níveis elevados de glutamato têm sido descritos em tecidos cerebrais humanos e em modelos animais de epilepsia, e sabe-se que a excitotoxicidade induzida por glutamato causa a morte neuronal na epilepsia (Coulter e Eid, 2012; Haglid *et al.*, 1994). Glutamato reproduz no hipocampo todos os aspectos dos danos relacionados à epilepsia observados no cérebro de pacientes e em animais submetidos a crises experimentais (Sloviter e Dempster, 1985). Tanto os receptores de glutamato ionotrópicos pós-sinápticos, AMPAs e NMDAs quanto os receptores metabotrópicos pré e pós-sinápticos (mGluRs) estão relacionados à epilepsia (Barker-Haliski e White, 2015).

O desequilíbrio entre excitação e inibição é o mecanismo mais claro que leva à hiperexcitabilidade. No cérebro adulto, esse mecanismo implica um aumento da neurotransmissão glutamatérgica e / ou supressão da neurotransmissão GABAérgica. De forma semelhante ao glutamato, o efeito do GABA é mediado tanto por receptores ionotrópicos (GABA<sub>A</sub>), quanto metabotrópicos (GABA<sub>B</sub>). A ativação dos receptores GABA<sub>A</sub> leva a hiperpolarização da membrana através do influxo de Cl<sup>-</sup>. Uma vez ativados, os receptores GABA<sub>B</sub> hiperpolarizam a membrana, aumentando a condutância ao K<sup>+</sup>, além de reduzirem a entrada de Ca<sup>2+</sup> (DiNuzzo *et al.*, 2014). A perda de função dos receptores GABA<sub>A</sub> tem sido associada a síndromes epilépticas em humanos e roedores (Arain *et al.*, 2012; Laschet *et al.*, 2007; Reid *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2013). Por outro lado, a condutância mediada pelo receptor GABA<sub>A</sub> também pode gerar eventos despolarizantes síncronos que envolvem redes neuronais durante a ictogênese (Avoli e de Curtis, 2011).

Inúmeras alterações neuroquímicas ocorrem durante a fase aguda das crises induzidas por pilocarpina, destacando a ocorrência de um desequilíbrio excitatório / inibitório, resultando em disfunção no mecanismo mitocondrial energético, liberação de grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio e entrada neuronal de altas correntes de cálcio (Scorza *et al.*, 2009).

#### **1.4 Mecanismos neuroinflamatórios relacionados à epileptogênese**

Algumas condições que levam a mudanças patológicas no cérebro como trauma, doenças infecciosas, convulsão febril ou SE estão associadas a alterações estruturais, neuroquímicas e inflamatórias, incluindo neurodegeneração e hiperexcitabilidade, que podem facilitar a epileptogênese (Laxer *et al.*, 2014).

A epileptogênese está associada tanto a danos neuronais quanto a gliose e a um estado inflamatório cerebral (Alyu e Dikmen, 2016). A maior parte das informações sobre epileptogênese vem de estudos relacionados ao SE e têm como foco o hipocampo (Pitkänen *et al.*, 2015). Acredita-se que processos inflamatórios não regulados levem a hiperexcitabilidade neuronal, mediando o início da epilepsia (Musto *et al.*, 2016).

Na epilepsia, a ativação microglial leva a liberação de glutamato que gera excitotoxicidade neuronal, culminando em neurodegeneração (Gebicke-Haerter, 2001; Henshall, 2007; Pocock e Liddle, 2001). Esse efeito foi demonstrado pela ação da melatonina em atenuar a neurodegeneração hipocampal induzida por ácido caínico através da inibição microglial (Chung

e Han, 2003). Morte neuronal pode ocorrer em poucas horas ou até semanas após o SE no modelo de pilocarpina. Enquanto Lima e colaboradores (2016) mostraram um aumento da perda neuronal em CA1, CA3 e GD 72 horas após o estímulo com pilocarpina, um outro estudo observou morte nessas regiões uma semana após o SE (do Nascimento *et al.*, 2012).

Os primeiros estudos de imagem, usando ressonância magnética, revelaram a atrofia hipocampal (Jackson *et al.*, 1990; 1993), assim como gliose no hipocampo-, características da esclerose hipocampal (Woermann *et al.*, 1998). Já foi demonstrado também que a neurodegeneração encontrada no corno de Ammon é frequentemente acompanhada por gliose, predominantemente em CA1 e menos comum em CA4. A gliose, proliferação e hipertrofia de astrócitos, micróglia e oligodendrócitos, costuma ser marcante no cérebro de pessoas com ELT (Thom, 2014).

A micróglia possui relevante papel na neuroinflamação e na perda neuronal após SE (Bosco *et al.*, 2018; Tian *et al.*, 2017). Em modelos animais de epilepsia, a micróglia torna-se cronicamente ativada com o aumento do número de células no hipocampo (Drage *et al.*, 2002; Shapiro *et al.*, 2008). Um aumento da reatividade microglial nessa região pode ser observada tanto em modelos animais de epilepsia (Drage *et al.*, 2002; Shapiro *et al.*, 2008) quanto em humanos (Beach *et al.*, 1995; Tikka *et al.*, 2001). Um estudo que utilizou o modelo de pilocarpina para indução do SE encontrou um aumento significativo na proliferação microglial em CA1, CA3 e GD do hipocampo (Lima *et al.*, 2016). A gliose com hipertrofia de astrócitos também é uma alteração morfológica importante nos focos de crise de pacientes e de animais epiléticos (Khurgel e Ivy, 1996; Shapiro *et al.*, 2008). A ativação de astrócitos foi observada nas camadas moleculares de células piramidais CA3 e CA1 em 1 e 3 semanas após o início do SE induzido por pilocarpina (do Nascimento *et al.*, 2012).

Considerando as evidências apresentadas com relação a gliose no cérebro de pessoas com epilepsia e animais epiléticos, pode-se deduzir que os mediadores inflamatórios serão encontrados no tecido cerebral como resultado de células gliais ativadas. Citocinas, que modulam processos inflamatórios, são produzidas principalmente por células da glia e neurônios (Alyu e Dikmen, 2016). Foi mostrado tanto em pacientes, quanto em modelos animais de ELT altos níveis de expressão de citocinas no cérebro, o que leva a um aumento da excitabilidade neuronal, sugerindo o envolvimento desses mediadores inflamatórios na epileptogênese (Vezzani *et al.*, 2001; 2013).

A estimulação microglial e astrocitária, pode aumentar os níveis do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), da interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-17, IL-6 e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Erta *et al.*, 2012; Gruol, 2015). IL-1 $\beta$  induz um aumento da liberação de glutamato pelos astrócitos e aumento da disponibilidade deste neurotransmissor na fenda sináptica. Além disso, reduz a neurotransmissão GABAérgica na ELT gerando crises epilépticas devido a hiperexcitabilidade neuronal (Alyu e Dikmen, 2016; Roseti *et al.*, 2015). Peltola e colaboradores (2000) observaram que uma crise tônico-clônica aumenta IL-6 no líquido cefalorraquidiano. Ravizza e colaboradores (2008) mostraram que o receptor de IL-1 $\beta$  é amplamente expresso por astrócitos, micróglia e neurônios tanto em modelos experimentais, quanto em pacientes com ELT. Foi demonstrado que IL-1 $\beta$ , um marcador de inflamação cerebral regulado positivamente no cérebro após crises epilépticas, apresenta um efeito pró-ictogênico (Jankowsky e Patterson, 2001; Vezzani e Granata, 2005). Isso porque IL-1 $\beta$  é capaz de reduzir o limiar de indução de crises (Dubé *et al.*, 2005; Heida e Pittman, 2005), prolongar a atividade epiléptica (De Simoni *et al.*, 2000) e promover a morte de células neuronais excitotóxicas (Allan *et al.*, 2005; Bernardino *et al.*, 2005).

Tanto as citocinas pró-inflamatórias microgliais (IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ ), quanto as citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) apresentaram expressão aumentada 3 dias após SE induzido por pilocarpina, indicando um papel da micróglia no cérebro epiléptico (Benson *et al.*, 2015). Outros trabalhos mais recentes também mostraram o aumento das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-2 e IL-6 após crises epilépticas tanto em animais (Scorza *et al.*, 2018) quanto em humanos (Shi *et al.*, 2017). Um estudo clínico mostrou um aumento dos níveis das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  no líquido cefalorraquidiano decorrente de convulsões febris (Ichiyama *et al.*, 1998). Ainda, fatias cerebrais revelaram uma superexpressão de IL-1 $\beta$  e IL-10 no hipocampo e córtex temporal anterior de pacientes com ELT mesial com esclerose hipocampal (Leal *et al.*, 2017).

A citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  é liberada pela micróglia ativada e pelos astrócitos. Foi relatado que o TNF- $\alpha$  aumenta a liberação de glutamato microglial (Takeuchi *et al.*, 2006), regula positivamente os receptores AMPA, aumentando a transmissão glutamatérgica e a entrada excessiva de cálcio, o que gera neurotoxicidade (Galic *et al.*, 2012). A neurotransmissão excitatória também ocorre graças a endocitose do receptor GABA induzida por TNF- $\alpha$  (Stellwagen *et al.*, 2005).

A fractalquina (CX3CL1), uma quimiocina inflamatória secretada por neurônios e astrócitos, que atuam principalmente em micróglia, desempenha um papel na patogênese da epilepsia (Ali *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2012). Foi sugerido que essa quimiocina possa atuar como biomarcador de inflamação cerebral em pacientes epiléticos (Xu *et al.*, 2012), uma vez que os níveis da proteína CX3CL1 estão aumentados no hipocampo de pacientes com ELT (Alyu e Dikmen, 2016; Xu *et al.*, 2012). Dados do estudo de Roseti e colaboradores (2013) mostraram que a função GABAérgica reduzida pode ser modulada por CX3CL1 em fatias hipocampais e em pacientes com ELT mesial.

Os fatores de crescimento podem mediar os eventos que seguem a crise epilética, pois têm papéis bem conhecidos na regulação da neurogênese, morte e reorganização sináptica. É importante ressaltar que a expressão de muitos fatores de crescimento é regulada positivamente após a crise epilética no cérebro adulto, como acontece com o fator de crescimento do nervo (NGF) e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (Jankowsky e Patterson, 2001; Zafra *et al.*, 1991). Foi demonstrado que o bloqueio dos receptores de glutamato e / ou estimulação do sistema GABAérgico reduz os níveis de mRNAs de BDNF e NGF no hipocampo e da proteína desse último no hipocampo e septo, sugerindo que esses fatores neurotróficos podem estar envolvidos na plasticidade sináptica dependente da atividade (Zafra *et al.*, 1991).

As neurotrofinas parecem ter um papel chave na plasticidade sináptica relacionada à epilepsia, podendo agir tanto na promoção da epileptogênese quanto na inibição da mesma (Gall, 1993). Alguns estudos relacionam o BDNF à fisiopatologia da epilepsia em humanos (Chen *et al.*, 2016; Hong, 2014; LaFrance *et al.*, 2010). Essa relação surgiu a partir da ideia de que nas crises límbicas o NGF encontra-se aumentado (Gall e Isackson, 1989). Desde então, vários estudos têm demonstrado a relação entre a expressão das neurotrofinas e as alterações na plasticidade dos circuitos neuronais que ocorrem após danos cerebrais, tais como na epilepsia (Dinocourt *et al.*, 2006; Ullal *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2004).

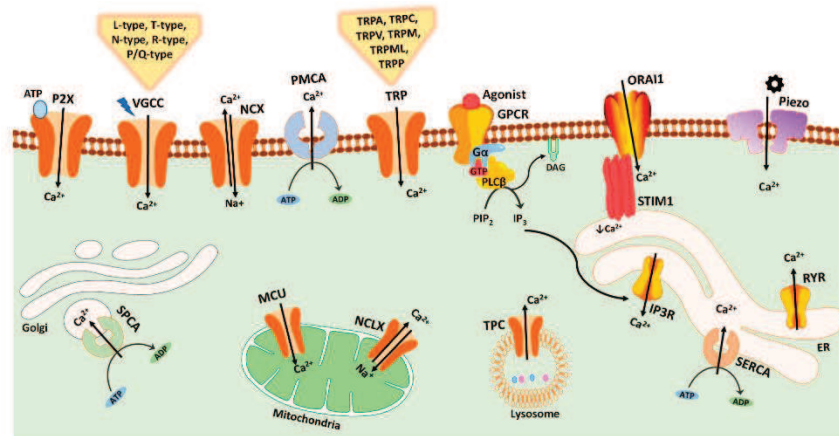
Trabalhos associando BDNF à fisiopatologia da epilepsia mostraram que tanto os níveis de RNAm quanto os de proteína de BDNF estavam aumentados no hipocampo em modelos animais de crises epiléticas (Isackson *et al.*, 1991; Nibuya *et al.*, 1995) e também no córtex entorrinal (Lindvall *et al.*, 1994). Um estudo utilizando o modelo de ELT mesial induzido por injeção intra-hipocampal de ácido caínico, mostrou que um aumento da sinalização da quinase B relacionada à tropomiosina (TrkB), mediado por uma maior expressão de BDNF no hipocampo, facilitou o processo de epileptogênese (Heinrich *et al.*, 2011). Outros estudos foram

publicados no contexto dos efeitos do BDNF relacionados à epilepsia em humanos. Existem trabalhos nos quais os níveis séricos de BDNF em pacientes com epilepsia estavam aumentados (Hong *et al.*, 2014; Ismail *et al.*, 2015; Zhand *et al.*, 2018), enquanto em outros, os níveis séricos de BDNF eram inferiores quando comparados ao grupo controle saudável (Chen *et al.*, 2016; 2018).

### **1.5 Envolvimento do cálcio em crises epiléticas**

O  $\text{Ca}^{2+}$  é um cátion bivalente essencial para todas as formas de vida conhecidas. Os diversos papéis biológicos do  $\text{Ca}^{2+}$  vão desde a mediação do disparo do potencial de ação, facilitando a sinalização intracelular, até a liberação de neurotransmissores. Além disso, regulam a contração, a secreção, a atividade enzimática, a fosforilação / desfosforilação de proteínas, a expressão gênica e o controle de funções, incluindo sobrevivência e morte celular, o metabolismo e a função mitocondrial (Catterall, 2011; Catterall e Few, 2008; Clapham, 2007; Rajakulendran e Hanna, 2016; Simms e Zamponi, 2014). As células dispõem de diversos mecanismos para manter a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ . ATPases de transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana plasmática, trocadores de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e o retículo sarco/endoplasmático  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mantêm a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  20.000 vezes menor que no meio extracelular (Islam, 2020).

As principais fontes de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular incluem canais para  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem, receptores de glutamato dependentes de ligantes, como o NMDA, canais de  $\text{Ca}^{2+}$  operados por reserva e a liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  dos estoques intracelulares, incluindo o retículo endoplasmático, mitocôndrias, lisossomos, vesículas de Golgi e grânulos secretores (Clapham, 2007; Liu e Zhang, 2000; Prakriya and Lewis, 2015). Os receptores potenciais transitórios (TRP), canais para cátions não seletivos com alta permeabilidade ao  $\text{Ca}^{2+}$ , também contribuem para o influxo desse íon para o citoplasma (Clapham, 2003). Os principais mecanismos pelos quais o  $\text{Ca}^{2+}$  pode entrar nas células estão representados na figura 2.



**Figura 2:** Representação esquemática dos principais mecanismos de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula. Maklad *et al.*, 2019.

Dentro das células, os íons  $\text{Ca}^{2+}$  podem atuar como segundos mensageiros, sendo relevantes em diversas vias de sinalização. Eles podem se ligar diretamente aos canais iônicos e modular sua atividade ou agir indiretamente, através da ligação à calmodulina, por exemplo, alterando a atividade das enzimas ativadas pela proteína G (Steinlein, 2014). Um aumento na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  resultante de despolarização da membrana ou de um potencial de ação, leva à ativação de cascatas de sinalização intracelulares. O receptor NMDA e os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem respondem pela sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  como resultado à despolarização da membrana (Berridge *et al.*, 2000; Islam, 2020).

As vias de sinalização dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  interagem com a atividade dos neurônios de várias maneiras e são considerados um fator importante na geração da epileptogênese e de crises epiléticas (Steinlein, 2014). Grande parte dos estudos relacionando a sinalização de  $\text{Ca}^{2+}$  e a epileptogênese envolve epilepsia causada por trauma cerebral. Foi demonstrado que um aumento dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  pós-trauma estão relacionados a superativação dos receptores NMDA pelo glutamato, que gera influxo excessivo de  $\text{Ca}^{2+}$ , superando os mecanismos regulatórios desse íon (Delorenzo *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 1999).

Alterações duradouras na homeostase do  $\text{Ca}^{2+}$  neuronal foram observadas em células cerebrais epiléticas de animais e em modelos de epileptogênese *in vitro* induzidos pelo SE (Pal *et al.*, 200; Parsons *et al.*, 2001). Buscando avaliar o papel das alterações e nos sistemas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$  na mediação de algumas das alterações de neuroplasticidade associadas à epileptogênese, modelos experimentais que utilizaram a pilocarpina para induzir SE, mostraram um aumento na concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  em neurônios hipocámpais e corticais em uma

fase aguda (Raza *et al.*, 2004) e por até um ano após a indução da epileptogênese (Raza *et al.*, 2001). Utilizando o modelo de epileptogênese induzido por lesão com glutamato para investigar o papel da homeostasia do  $\text{Ca}^{2+}$ , observou-se um aumento nos níveis intracelulares desse íon em neurônios epiléticos quando comparados ao controle (Sun *et al.*, 2004). Assim, é possível sugerir que mecanismos homeostáticos do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular alterados podem se relacionar a aspectos do fenótipo epilético e contribuir para as alterações persistentes da neuroplasticidade associadas à epilepsia (Raza *et al.*, 2001).

Mudanças na concentração do  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico podem afetar funções neuronais, como a transmissão sináptica, a plasticidade e a sobrevivência celular. Em um nível celular, a atividade epilética é caracterizada por uma alta frequência de potenciais de ação, promovendo um influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  através de canais iônicos voltagem dependentes e de canais iônicos dependentes de ligantes - NMDA -, assim como a abertura de canais para sódio (Larkin *et al.*, 1992; Steinlein, 2014).

Tem sido relacionado o papel de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem ao processo patológico da epilepsia. Alterações das propriedades de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem ocorrem em neurônios de pacientes epiléticos com esclerose do corno de Ammon e nas células granulares do GD de modelos animais submetidos à estimulação elétrica hipocampal (Djamshidian *et al.*, 2002; Faas *et al.*, 1996; Hendriksen *et al.*, 1997). Proteínas responsáveis pelo controle da concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$ , como a calmodulina e a calbindina, também foram associadas à geração de crises e epileptogênese. A calmodulina pode se ligar em vários locais de domínios intracelulares do canal de  $\text{Na}^+$  voltagem dependente ( $\text{Na}_v$ ), limitando a corrente desse íon. Mutações em domínios do canal Nav1.2 podem reduzir a ligação à calmodulina e resultar em aumento da corrente de  $\text{Na}^+$  e na ocorrência de epilepsia (Yan *et al.*, 2017). A maioria dos estudos com a calbindina sugerem que sua redução está associada a ocorrência de crises epiléticas, tanto em pacientes (Karadi *et al.*, 2012; Magloczky *et al.*, 1997; Valencia *et al.*, 2006) quanto em animais (Hwang *et al.*, 2004). Entretanto, o aumento de células positivas para calbindina no cérebro epilético também foi relatado por diferentes grupos de pesquisa (Kuchukhidze *et al.*, 2015; Thom *et al.*, 2000).

Nos últimos anos, a sinalização de cálcio tornou-se um alvo promissor para o desenvolvimento de drogas antiepiléticas. Alguns dos medicamentos recentemente introduzidos, como o levetiracetam, já exibem pelo menos parte de sua ação através da modulação do influxo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  (Niespodziany *et al.*, 2001; Ozcan e Ayar 2012; Takahashi *et al.*, 2010).

Considerando as diversas funções dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem em diferentes tecidos e a falta de inibidores específicos das isoformas desses canais, o uso clínico de antagonistas de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  em pacientes com epilepsia foram comprometidos. Dessa forma, torna-se relevante o estudo de outros canais que atuam no controle dos níveis desse íon, uma vez que as vias de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  no citosol podem desencadear eventos epiléticos.

### **1.6 Receptores potenciais transitórios: sinalização e funções gerais**

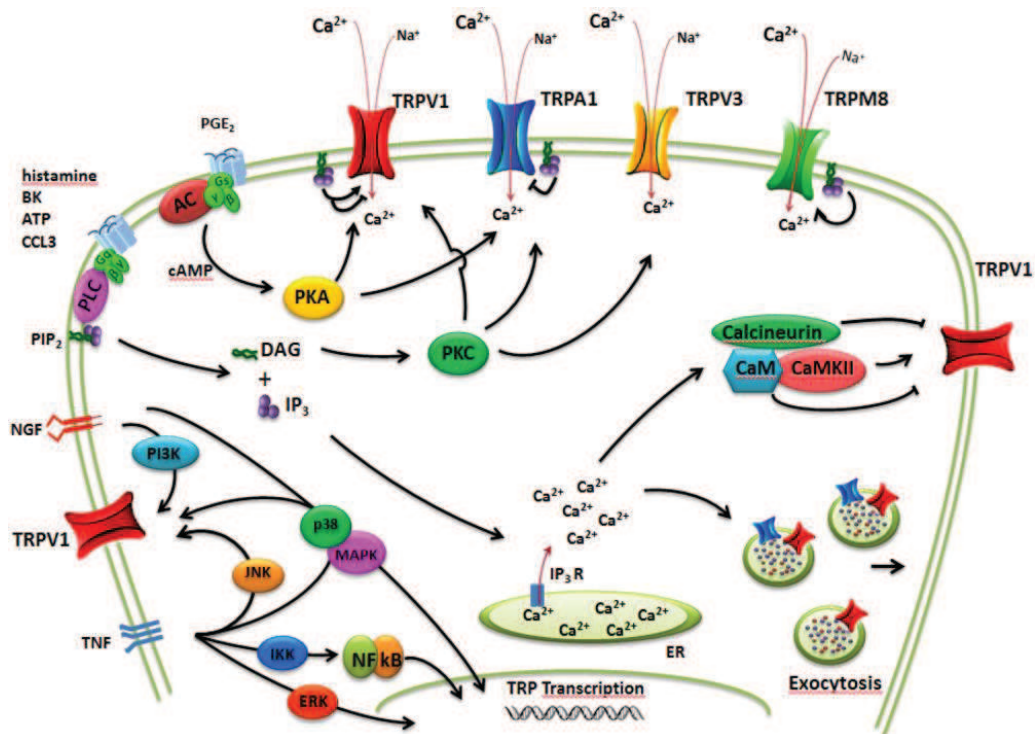
A descoberta dos receptores potenciais transitórios (TRP) ocorreu quando Cosens e Manning descobriram um fenótipo na *Drosófila* que exibia cegueira na presença de luz brilhante constante (Cosens e Manning, 1969; Montell e Rubin, 1989). Os canais TRPs atuam como transdutores de sinal, alterando o potencial da membrana e são importantes para a regulação dos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$ , incluindo nos neurônios (Kumar *et al.*, 2014; Naziroğlu, 2009; Patel, 2004; Samanta *et al.*, 2018).

A família de receptores TRP é um grupo de canais catiônicos altamente conservados encontrados na membrana celular de vários tecidos. A família TRP inclui seis subfamílias: TRPV 1-6 (vaniloide), TRPC 1-7 (canônico), TRPA 1 (anquirina), TRPM 1-8 (melastatina), TRPP (policístico) e TRPML (mucolipina). Estão envolvidos em diferentes processos fisiológicos, como sensações relacionadas a diferentes estímulos (frio nocivo, compostos químicos e pressão osmótica, por exemplo) ou homeostase de íons e respondem a estímulos intracelulares, como as vias de transdução de sinal de cálcio e de fosfatidilinositol. Os canais TRP conduzem cátions e, quando ativados, despolarizam as células. Como resultado, os níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares aumentam, iniciando uma série de respostas celulares (Clapham, 2003; Naziroğlu *et al.*, 2015; Nilius *et al.*, 2005; Nishida *et al.*, 2015; Rosasco e Gordon, 2017; Wu *et al.*, 2010).

A maioria dos canais TRP é permeável ao  $\text{Ca}^{2+}$ , mas as permeabilidades relativas a esse íon ( $\text{PCa} / \text{PNa}$ ) variam: enquanto o TRPV5 e TRPV6 são altamente seletivos ao  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{PCa} / \text{PNa} > 100$ ), outros canais TRP não são seletivos a cátions monovalentes e ao  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{PCa} / \text{PNa}$  0,1-20), e TRPM4 e TRPM5 são praticamente impermeáveis ao cálcio (Gees *et al.*, 2012). Sinais locais de  $\text{Ca}^{2+}$ , associados à abertura dos canais TRP foram descritos para células endoteliais vasculares de humanos e roedores (TRPA1, TRPV3 e TRPV4), células musculares lisas de vasos em camundongos (TRPV3 e TRPV4) e neurônios do gânglio da raiz dorsal de

camundongos (TRPV1) (Mercado *et al.*, 2014; Pires *et al.*, 2015; Senning e Gordon, 2015; Sonkusare *et al.*, 2012; Sullivan *et al.*, 2012; Sullivan *et al.*, 2015).

TRPA1 faz parte de uma complexa rede de sinalização de proteínas. A bradicinina, a histamina, as prostaglandinas e a tripsina, agentes pró-inflamatórios e que causam dor, atuam nos receptores acoplados à proteína G, estimulando via PLC ou a adenilato ciclase (AC) a produção de mediadores intracelulares que irão ativar TRPV1 e TRPA1 (Zygmunt e Högestätt, 2014). TRPV1 é ativado por proteína quinase C (PKC), proteína quinase A (PKA) e monoacilgliceróis, como o 2-araquidonoil glicerol (2-AG) e anandamida, ambos endocanabinoides (Bhave *et al.*, 2003; Premkumar e Ahern, 2000; Premkumar *et al.*, 2004; Rathee *et al.*, 2002; Varga *et al.*, 2006; Vellani *et al.*, 2001). Um aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular através da liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  pela ação de 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) e um influxo através de TRPV1 pode estimular TRPA1 sensível a  $\text{Ca}^{2+}$ , o qual também é dessensibilizado por  $\text{Ca}^{2+}$  (Zygmunt e Högestätt, 2014). A figura 3 mostra algumas vias de sinalização intracelulares decorrentes da ativação de canais TRPA1 e TRPV1.



**Figura 3:** Sinalização intracelular dos canais TRPA1 e TRPV1. Fernández-Carvajal *et al.*, 2012.

Muitas células expressam canais da família TRP, os quais parecem estar envolvidos na patogênese de muitas doenças (Islam, 2020). A abundante expressão dos canais TRP nos rins,

justifica sua relevância em processos fisiológicos no sistema renal (Goel *et al.*, 2006; Kistler *et al.*, 2013; Reiser *et al.*, 2005). Defeitos genéticos nos canais TRPC6, TRPM6 e TRPP2 foram relacionados a canalopatias relevantes de origem renal (Krall *et al.*, 2010; Lainez *et al.*, 2014; Ward *et al.*, 2002; Woudenberg-Vrenken *et al.*, 2011). Também já foi estudado o papel da família TRP no trato gastrointestinal, assim como possíveis alvos para o tratamento de doenças do sistema digestivo. TRPA1, TRPC4, TRPM5, TRPM6, TRPM7, TRPV1, TRPV4 e TRPV6 foram descritos em diversos estudos com relacionados à função digestiva (Brixel *et al.*, 2010; Cenac *et al.*, 2008; Gunthorpe *et al.*, 2008; Kondo *et al.*, 2010; Kym *et al.*, 2009; Nijenhuis *et al.*, 2005; Schlingmann *et al.*, 2007; Tsvilovsky *et al.*, 2009; Vincent *et al.*, 2009; Voets *et al.*, 2004).

Os TRPs são bastante expressos em cardiomiócitos e fibroblastos de diferentes espécies (Sabourin *et al.*, 2011; Yue *et al.*, 2015). Vários estudos descreveram o papel dos canais TRP nas alterações cardiovasculares associadas a diversas subfamílias, incluindo TRPV4, TRPV1, TRPV2, TRPC1 e TRPC4 (Adapala *et al.*, 2018; Buckley and Stokes, 2011; Eder e Molkentin, 2011; Entin-Meer *et al.*, 2014; Guinamard e Bois, 2007; Londoño *et al.*, 2015; Yue *et al.*, 2015). Os canais TRP também estão envolvidos na regulação da função vascular. Diferentes subtipos de canais TRP foram detectados no músculo liso vascular, incluindo a expressão de TRPC1 no cérebro e pulmão de roedores (Guibert e Beech, 1999; Ng *et al.*, 2012), TRPV1 na aorta, no músculo esquelético (Kark *et al.*, 2008; Lizanecz *et al.*, 2006) e TRPA1 e TRPM8 na aorta (Johnson *et al.*, 2009; Yanaga *et al.*, 2006).

O TRPA1 é um canal catiônico não seletivo ativado por frio nocivo, substâncias como  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, formaldeído, extratos de mostarda, alicina (alho) e próton  $H^+$  (Bandell *et al.*, 2004; Clapham, 2009; de la Roche *et al.*, 2013; Jordt *et al.*, 2004; Julius, 2013; McNamara *et al.*, 2007). Íons cálcio e sódio fluindo através de canais TRPA1, causam despolarização da membrana neuronal, o que resulta na ativação de cascatas de sinalização (Zygmunt e Högestätt, 2014). O TRPA1 é amplamente expresso pelo corpo e, no sistema nervoso central, este canal é estudado no hipocampo e no núcleo supra-óptico do hipotálamo (Nilius *et al.*, 2012). Este canal é expresso no plexo coróide e no epitélio do revestimento ventricular (Jo *et al.*, 2013), na glia cortical (Melom e Littleton, 2013), em neurônios aferente sensoriais trigeminais (Kim *et al.*, 2010) e no gânglio da raiz dorsal, estando envolvido na etiologia da dor periférica (Vay *et al.*, 2012). Fora dos neurônios sensoriais, TRPA1 é encontrado em células epiteliais, melanócitos, mastócitos, fibroblastos, odontoblastos e células enterocromafins e células  $\beta$  das ilhotas de

Langerhans e no sistema nervoso central (Andrade *et al.*, 2012; Baraldi *et al.*, 2010; Bellono *et al.*, 2013; Buch *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2012; Earley, 2012; Nilius *et al.*, 2012; Oh *et al.*, 2013; Prasad *et al.*, 2008; Vennekens *et al.*, 2012).

### 1.6.1 Papel de receptores potenciais transitórios nas crises epiléticas

Até o presente ano, um único estudo havia se proposto a estudar o receptor TRPA1 na epilepsia. Foi demonstrado que o uso da eletroacupuntura em ratos submetidos ao modelo de crise epilética induzida por ácido caínico diminuiu as descargas elétricas hipocâmpais em CA1, via sinalização de TRPA1 (Lin e Hsieh, 2014). Entretanto, recentemente um estudo demonstrou um efeito pró-convulsivante do trans-cinamaldeído, um agonista de TRPA1, no modelo de crise induzido por PTZ. O estudo sugeriu que uma ativação a longo prazo de TRPA1 causa uma atividade epilética exacerbada e mostrou um aumento nos níveis de BDNF após repetidas administrações do trans-cinamaldeído (Günaydin *et al.*, 2020).

TRPV1 também é um canal catiônico não seletivo ativado diretamente pelo calor, H<sup>+</sup>, anandamida e capsaicina (Caterina *et al.*, 1997). Alguns estudos mostraram que os canais TRPV1 são expressos no GD do hipocampo, o qual é crítico na epileptogênese (Gonzalez-Reyes *et al.*, 2013; Manna e Umathe, 2012). Bhaskaran e Smith (2010) mostraram que a expressão de TRPV1 estava aumentada em áreas cerebrais epiléticas, como no GD de camundongos com ELT. Naziroğlu e colaboradores (2015) demonstraram que o influxo de cálcio, via canal TRPV1, estava aumentado nos neurônios do hipocampo de ratos no modelo induzido por PTZ. Trabalhos demonstraram um efeito pró-convulsivante em camundongos da anandamida e da OLDA (agonistas TRPV1) (Manna e Umathe, 2012; Shirazi *et al.*, 2014), assim como da piperina (Chen *et al.*, 2013) induzido por PTZ. Ainda com relação ao modelo experimental com PTZ, Vilela e colaboradores (2014) mostraram que a N-araquidonoil serotonina, um bloqueador duplo de TRPV1 e da enzima hidrolase da amida de ácidos graxos (FAAH), melhorou as crises em camundongos e que este efeito é mediado pelo bloqueio do receptor TRPV1. Outro bloqueador deste canal, o  $\alpha$ -spinasterol, apresentou efeito anticonvulsivante não apenas no modelo experimental de PTZ, como também no modelo utilizando eletrochoque e no modelo de crise psicomotora induzido por estimulação a 6 Hz em camundongos (Socala *et al.*, 2015). De forma semelhante, a capsazepina, bloqueador de TRPV1, foi capaz de suprimir a atividade epileptiforme tanto no modelo de 4-aminopiridina (4-AP) *in vitro* quanto no desenvolvimento das crises eletrográficas *in vivo* (Gonzalez-Reyes *et*

*et al.*, 2013). Já a deleção do gene TRPV1 diminuiu a suscetibilidade a crises induzidas por PTZ após os desafios repetidos de hipertermia no início da vida de camundongos (Kong *et al.*, 2014).

Por outro lado, outros estudos sugeriram um papel protetor do receptor TRPV1 na epilepsia (Abdel-Salam *et al.*, 2020; Barrett *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2011). Um efeito pró-convulsivante foi observado pela deleção do receptor TRPV1, promovendo um aumento nas crises hipertérmicas em camundongos (Barrett *et al.*, 2016). O agonista do receptor TRPV1, capsaicina, reduziu as crises comportamentais induzidas por ácido cáínico, além das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  no cérebro e a morte celular por apoptose na região de CA em camundongos (Lee *et al.*, 2011). Mais recentemente, um estudo que utilizou o modelo de *status epilepticus* induzido por PTZ, mostrou que a capsaicina reduziu a gravidade das crises comportamentais e o dano neuronal em ratos (Abdel-Salam *et al.*, 2020).

Outros trabalhos também mostraram o papel de outros membros da família TRP na crise epiléptica. Zheng e Phelan (2014) usando o modelo de SE induzido por pilocarpina estudaram a relação do TRPC na convulsão. Foi demonstrado que os canais TRPC1 / 4 heteroméricos e os canais TRPC5 homoméricos apresentam um papel crítico nas crises agudas induzidas pela pilocarpina e na morte celular neuronal, mas os mecanismos subjacentes ainda não foram elucidados.

Estudos utilizando a ablação genética mostraram a contribuição de membros da subfamília TRPC na susceptibilidade às crises epiléticas no modelo de pilocarpina. Enquanto os estudos com TRPC6, mostraram que sua deleção aumentava as crises (Kim e Kang, 2015), os trabalhos com TRPC3 evidenciaram a redução das crises em animais que não apresentavam este canal (Phelan *et al.*, 2017). Utilizando este mesmo modelo de indução de crises epiléticas, outro estudo mostrou o envolvimento do canal TRPC7 na iniciação de crises epiléticas tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Phelan *et al.*, 2014).

Assim, existem evidências de que os canais TRPV1 e TRPA1 apresentam um papel importante nas crises epiléticas e na epilepsia. Entretanto, pouco se sabe a respeito do papel desses canais nas crises epiléticas e nos eventos pós-ictais. Neste contexto, torna-se importante o estudo desses canais na tentativa de elucidar os mecanismos subjacentes à crise epilética utilizando o modelo experimental induzido por pilocarpina e pentilenotetrazol em camundongos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Testar a hipótese de que os receptores TRPV1 e TRPA1 estão envolvidos no controle das crises epiléticas induzidas por pilocarpina e pentilenotetrazol e dos eventos pós-ictais em camundongos.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores TRPA1 e TRPV1 na distribuição das crises epiléticas induzidas por pilocarpina.
- Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores TRPA1 e TRPV1 no desenvolvimento do *status epilepticus* induzido pela administração intraperitoneal de pentilenotetrazol.
- Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores TRPA1 e TRPV1 no processo de neurodegeneração, na ativação microglial e astrocitária induzidas por pilocarpina.
- Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores TRPA1 e TRPV1 na ativação de vias de sinalização no hipocampo.
- Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores TRPA1 e TRPV1 sobre os níveis de citocinas inflamatórias e do fator neurotrófico no hipocampo.
- Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores TRPA1 e TRPV1 na liberação de glutamato, na concentração de citosólica de cálcio e exocitose em preparações sinaptossomais de córtex.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

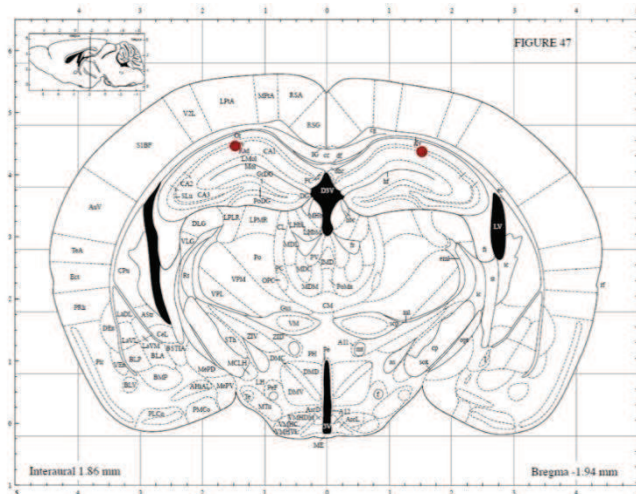
Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57Bl/6, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais, pesando em torno de 20 a 25 gramas e com idade entre 8 e 12 semanas. Os animais tiveram livre acesso a água e comida, sendo mantidos em ciclo claro/escuro a cada 12 horas com temperatura local de 24 °C. Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação com animais, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sendo este projeto aprovado pelo protocolo CEUA nº 380/2018 e nº 380/2019 (Apêndices A e B).

#### 3.2 Drogas

Para a realização do presente estudo, foram usadas as seguintes substâncias: cloridrato de pilocarpina (Sigma Aldrich), 4- (4-clorofenil) -3-metil-3-buten-2-ona oxima (AP18) - bloqueador do receptor TRPA1 - (Tocris Bioscience, Reino Unido), 4-cloro-3-metoxicinamanilida (SB366791) - bloqueador do receptor TRPV1 - (Tocris Bioscience, Reino Unido), 2-(1,3-dimetil-2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-7H-purin-7-il)-N-(4-isopropilfenil)acetamida (HC030031) - bloqueador do receptor TRPA1 – (Sigma Aldrich), pentilenotetrazol (PTZ) (Sigma Aldrich), diazepam (Hipolabor, Brasil), cloridrato de cetamina (Syntec, Brasil), cloridrato de xilazina (Syntec, Brasil), associação de benzilpenicilina e estreptomicina (Pentabiótico® 1.200.000 UI; Zoetis, Brasil) e flunixina meglumina (Banamine®, Intervet, Brasil).

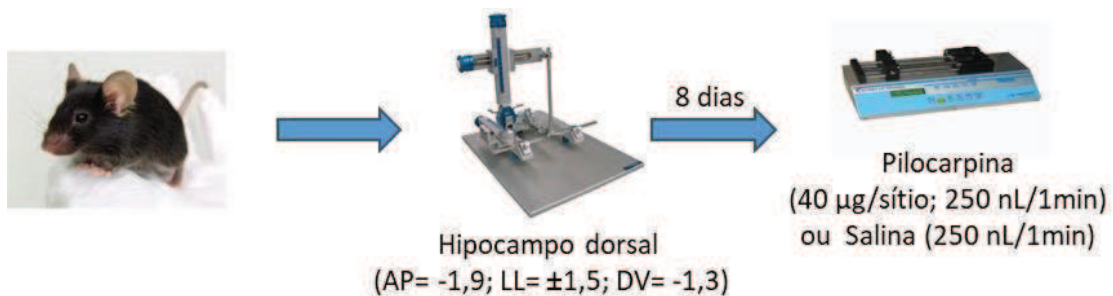
#### 3.3 Cirurgia estereotáxica para implantação de cânulas e microinjeção de pilocarpina

Os animais foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal (*i.p.*) de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (8 mg/kg), sendo, em seguida, submetidos à tricotomia do escalpo e seu crânio fixado a um aparelho estereotáxico (Insight®). Posteriormente, foi realizada a assepsia do escalpo com álcool iodado e uma incisão sagital para exposição e limpeza da calota craniana. Cânulas-guia (7 mm) foram implantadas bilateralmente nos hipocampos (direito e esquerdo), segundo as coordenadas estabelecidas no Atlas Paxinos & Watson (George Paxinos, 2001): ±1,5 mm lateral, +1,3 mm dorso-ventral e -1,9 mm ântero-posterior em relação ao bregma. O local de implantação das cânulas está representado pelos pontos em vermelho (Figura 4).



**Figura 4:** Local de implantação da cânula guia está representado pelos pontos em vermelho.

Ao final da cirurgia os animais receberam pentabiótico (intramuscular) e banamine (subcutâneo) (50 mg/mL). Após o período de recuperação dos animais (8 dias), eles foram submetidos aos procedimentos experimentais. Foi introduzida pela cânula-guia uma agulha odontológica gengival 30 G (8 mm). A agulha foi conectada a um segmento de polietileno (P10) e este a uma seringa Hamilton® de 10 µL. As injeções de pilocarpina (40 µg) foram realizadas por uma bomba de infusão (Insight®, Brasil), sendo o volume por sítio injetado de 0,25 µL, a uma taxa de infusão de 0,25 µL/min (Figura 5).

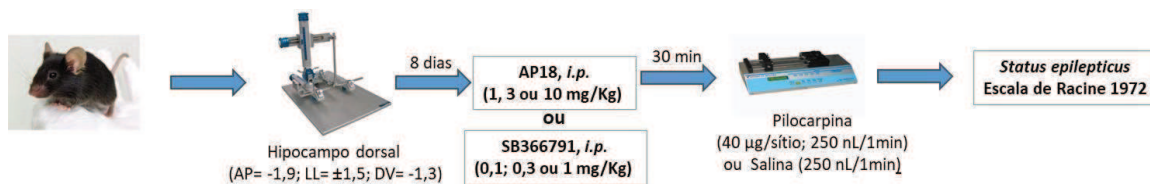


**Figura 5:** Injeção de pilocarpina através de bomba de infusão, após 8 dias da cirurgia estereotáxica.

### 3.4 Protocolo de tratamento farmacológico nos animais

Os animais foram tratados com AP18 (1, 3 ou 10 mg/Kg) ou SB366791 (0,1; 0,3 ou 1 mg/Kg) diluídos em 1 % de dimetilsulfóxido (DMSO), 5% de tween 80 e 94% de salina, por via *i.p.* O tratamento foi iniciado 30 minutos antes da injeção intra-hipocampal de pilocarpina. Os animais foram pesados antes da administração do tratamento. De acordo com a injeção intra-hipocampal

(salina ou pilocarpina) e os tratamentos (AP18, SB366791 ou veículo), os animais foram divididos nos seguintes grupos: 1) Salina + Veículo; 2) Pilocarpina + Veículo; 3) Salina + AP18 1 mg/kg; 4) Salina + AP18 3 mg/kg; 5) Salina + AP18 10 mg/kg; 6) Pilocarpina + AP18 1 mg/Kg; 7) Pilocarpina + AP18 3 mg/Kg; 8) Pilocarpina + AP18 10 mg/Kg e 1) Salina + Veículo; 2) Pilocarpina + Veículo; 3) Salina + SB366791 0,3 mg/kg; 4) Salina + SB366791 1 mg/kg; 5) Pilocarpina + SB366791 0,1 mg/Kg; 6) Pilocarpina + SB366791 0,3 mg/Kg; 7) Pilocarpina + SB366791 1 mg/Kg (Figura 6).



**Figura 6:** Desenho experimental do tratamento com AP18 ou SB366791 e injeção intra-hipocampal de pilocarpina.

### 3.5 Análise comportamental do *status epilepticus* (SE) induzido pela administração de pilocarpina

Após os diferentes pré-tratamentos, a pilocarpina foi administrada por via intra-hipocampal (40 µg/ 0,25 µL/ sítio) e os animais foram colocados em caixas de acrílico individuais e o comportamento dos mesmos foi gravado com auxílio de uma câmera digital (Sony DCR-SR68) durante 90 minutos para avaliação da latência para o início das crises, frequência de crises tônico-clônicas, número de crises e os índices das mesmas. As crises contabilizadas foram aquelas que alcançaram, no mínimo, índice 3, segundo escala de Racine (Racine, 1972). Nesta escala, o índice varia de 1 a 5, dependendo do comportamento do animal durante o período de crise epiléptica:

- Índice 1: comportamento de imobilidade, fechamento dos olhos, abalos musculares da orelha e/ou das vibrissas, clonia facial;
- Índice 2: movimentos de flexão e extensão do pescoço associado com severa clonia facial;
- Índice 3: clonia de um membro anterior;
- Índice 4: clonia de ambos os membros anteriores com presença de “rearing”;

- Índice 5: crise clônica generalizada acompanhada de movimento de “rearing” seguida de queda de costas.

Após 90 minutos, os animais receberam uma injeção *i.p.* de diazepam (5 mg/kg) diluído em 5% tween 80 em salina para a interrupção das crises. O diazepam (5 ou 10 mg/kg) impede o desenvolvimento de alterações comportamentais e do EEG induzidas pela pilocarpina, bem como as alterações neuropatológicas subsequentes em camundongos (Turski *et al.*, 1984).

### 3.6 Perfusão transcardíaca

Vinte e quatro horas após a administração de pilocarpina, os animais foram anestesiados e perfundidos por via transcardíaca. Uma agulha hipodérmica foi inserida no ventrículo esquerdo, por onde foi administrada solução de tampão fosfato em salina 0,1 M, pH 7,4 (PBS) com o auxílio de uma bomba peristáltica (Insight®), a uma taxa de perfusão de 4 mL/min. Paralelamente, foi feita uma incisão no arco aórtico para permitir a saída do sangue. Após a completa a perfusão, os animais foram decapitados e os encéfalos foram retirados com o auxílio de uma espátula. O hemisfério esquerdo dos animais foi fixado em paraformaldeído (PFA) 4% fosfatado e tamponado em PBS, enquanto do hemisfério direito foram dissecadas as seguintes regiões: córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e cerebelo. No dia seguinte, os encéfalos fixados foram transferidos para uma solução de sacarose 30% para desidratação das células, até a completa saturação, sendo, em seguida, congelados em isopentano (Vetec) 99% e gelo seco (por 20 segundos) e, estocados a -80°C (Gage *et al.*, 2012). Cortes de 35 µm contendo a formação hipocampal, foram obtidos com o auxílio de um criostato (Leica Biosystems Inc., USA) a -20 °C, mantidos em uma solução crioprotetora [etilenoglicol (Synth) 24%; glicerol (Merck) 24 % NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Dinâmica) 0,1256 %; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Química Moderna) 0,436 % diluídos em PBS] e estocados a -20 °C. As fatias estocadas a -20°C foram posteriormente submetidas à marcação de neurônios em processo de degeneração e a imunofluorescência (Figura 7).



**Figura 7:** Desenho experimental da perfusão cardíaca e obtenção de fatias em criostato para realização de imunofluorescência e determinação de neurônios em processo de degeneração.

### 3.7 Marcação com Fluoro-Jade C<sup>®</sup> para avaliação de neurônios em processo de neurodegeneração

Fluoro-Jade C<sup>®</sup> (FJC) é um derivado aniônico da fluoresceína utilizado para marcar neurônios em processo de degeneração (Schmued *et al.*, 1997). Apesar do mecanismo exato de marcação ser desconhecido, diversos estudos demonstram que o FJC é confiável para a marcação de neurônios em processo de degeneração (Baxter *et al.*, 2015; Crotti *et al.*, 2014; Lima *et al.*, 2015; Schmued *et al.*, 2005; Vitner *et al.*, 2014). Os cortes de hipocampo de 35 µm estocados foram lavados 3 vezes em PBS por 30 min, e montados em lâmina gelatinizada. Uma vez secas, as lâminas foram mergulhadas em solução básica de etanol (EtOH) 80 % em hidróxido de sódio (NaOH) (Química Moderna) 1 % por 5 min, EtOH 70% por 2 min e lavadas com água destilada por 2 min. Ao abrigo da luz, as lâminas foram incubadas em solução de permanganato de potássio (KMnO<sub>4</sub>) (Synth) 0,06 % por 20 min, lavadas com água destilada por 2 min e incubadas em solução de FJC (Merck Millipore, EUA) 0,0001% em ácido acético (Vetec) 0,1% por 20 min. Posteriormente, foram novamente lavadas com água destilada 2 vezes por 1 min e colocadas em estufa a 37 °C. Após completa secagem, foram mergulhadas em xilol (Synth) por 1 min e as lamínulas montadas com DPX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Schmued *et al.*, 2005).

### 3.8 Marcação de células Iba-1<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, GFAP<sup>+</sup> e NeuN por imunofluorescência

Para a imunomarcação de Iba-1 (microglia), CD68 (ativação microglial), GFAP (astrócitos) e NeuN (núcleos de neurônios), os cortes de hipocampo de 35 µm foram incubados por 60 min com tampão citrato a 70 °C para recuperação antigênica. Após este período os cortes foram lavados 3 vezes com TBS. Posteriormente, os cortes foram bloqueados por 1 h em solução de bloqueio (4 % soro fetal bovino e 0,5 % de Triton-X 100 em TBS). Em seguida, foram incubados a 4 °C, por 16 horas, com o anticorpo primário anti-Iba-1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1* - marcador de microglia; coelho 1:500, Wako), anti-CD68 (marcador de microglia ativada, rato 1:500, AbD Serotec), anti-GFAP (marcador de astrócitos, camundongo 1:800, Cell Signaling) e anti-NeuN (1:800). Posteriormente, foram lavados 3 vezes com TBS e incubados com os respectivos anticorpos secundários (1:1000) por 16 horas (cabra anticoelho Alexa Fluor 595, cabra anti-rato Alexa Fluor 488 e cabra anticamundongo Alexa Fluor 488, Life Technologies). Os cortes foram então lavados 3 vezes com TBS, incubados com DAPI 1,75 µg/mL por 30 minutos, lavados com TBS mais 2 vezes e montados em lâmina gelatinizada com auxílio do meio de montagem Fluoromount (Sigma-Aldrich).

### 3.9 Análise das imagens

As lâminas foram observadas ao microscópio de fluorescência (Axio Imager A2, Carl Zeiss, Alemanha), sendo tiradas fotos no aumento de 20x das regiões CA1 e GD do hipocampo, para quantificação de células marcadas. A quantificação foi realizada utilizando o software ImageJ. Os gráficos foram apresentados em relação a área (para AP18) ou intensidade média de fluorescência (para SB366791) na marcação com FJC e de intensidade média para as marcações de Iba-1, CD68, GFAP e NeuN.

### 3.10 Avaliação da ativação de Akt e Erk no hipocampo por *western blotting*

Para a avaliação da ativação de Akt e Erk de animais tratados com AP18 ou SB366791, os hipocampos foram dissecados e lisados em tampão RIPPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 140 mM; P-40 1 %; deoxicolato de sódio 1 % e SDS 0,1 %) contendo inibidor de protease (Sigma) e inibidor de fosfatase (Cell Signaling). Em seguida, realizou-se a centrifugação durante 15 minutos a 4 °C a 15000 rpm. O pellet foi descartado e o sobrenadante utilizado para dosagem de proteínas pelo ensaio de Bradford que é baseado na mudança da cor do corante Coomassie Blue G-250 em solução ácida (cor avermelhada) para cor azulada na presença de proteínas (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) (Bradford, 1976). A absorbância foi lida em leitor de ELISA no comprimento de onda de 595 nm, e os cálculos para concentração das proteínas foram feitos a partir da curva padrão feita com soro albumina bovina, sendo o coeficiente de correlação linear utilizado maior que 0,98.

O volume necessário das amostras para obter as mesmas quantidades de proteínas (calculado pelo ensaio de Bradford) foi tratado com tampão de amostra 6x com  $\beta$ -mercaptoetanol, aquecidas em banho-maria 37 °C por 15 min e aplicadas em gel de SDS-poliacrilamida (SDS Page) (na concentração de acordo com o tamanho da proteína de interesse) para separação das proteínas pela técnica de eletroforese. Em seguida as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose.

Após bloqueio com leite em tampão tris em salina contendo 0,1 % de Tween-20 (TBST) por 2 horas, as membranas foram lavadas três vezes por 10 minutos, e em seguida imunizadas de acordo com o datasheet dos respectivos anticorpos: anti-fosfo-Akt e anti-Akt total (1:1000, Cell Signaling Technology), anti-fosfo-ERK-1,2 e anti-ERK1,2 total (1:1000, Cell Signaling Technology). Posteriormente, as membranas foram lavadas mais três vezes por 10 minutos e

incubadas com o anticorpo secundário adequado, conjugado com peroxidase (anti-coelho 1:3000, Life Technologies). Por fim, as membranas foram incubadas com agente quimioluminescente ECL prime (GE Healthcare). A densidade óptica das bandas detectadas foi quantificada utilizando o software ImageJ. Os resultados foram normalizados pelos níveis de da respectiva proteína total de cada amostra.

### **3.11 Avaliação de citocinas inflamatórias e do fator neurotrófico no hipocampo por ELISA**

Os animais tiveram seus hipocampos dissecados, 24 h após a administração de pilocarpina ou veículo. Essas estruturas foram, então, devidamente acondicionadas e estocadas a -80 °C. Posteriormente, após o descongelamento, as amostras foram homogeneizadas com tampão de lise (Tris-HCl 20 mM – pH 8; NaCl 137 mM; NP40 1 % (Igepal); glicerol 10%; PMSF 1 mM; pepstatina A 1µM; EDTA 10 mM; E-64 10 µM; vanadato de sódio 0,5 mM). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 20 min, a 4 °C, e o sobrenadante foi colhido para análise. Em seguida, realizou-se o ensaio imunoenzimático para detecção da concentração de interleucina 10 (IL-10), TNF- $\alpha$ , fractalkina (CX3CL1) e BDNF, utilizando-se kit específico da R&D Systems (DuoSet). A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda 490 nm. As concentrações foram apresentadas na forma de ng/mL.

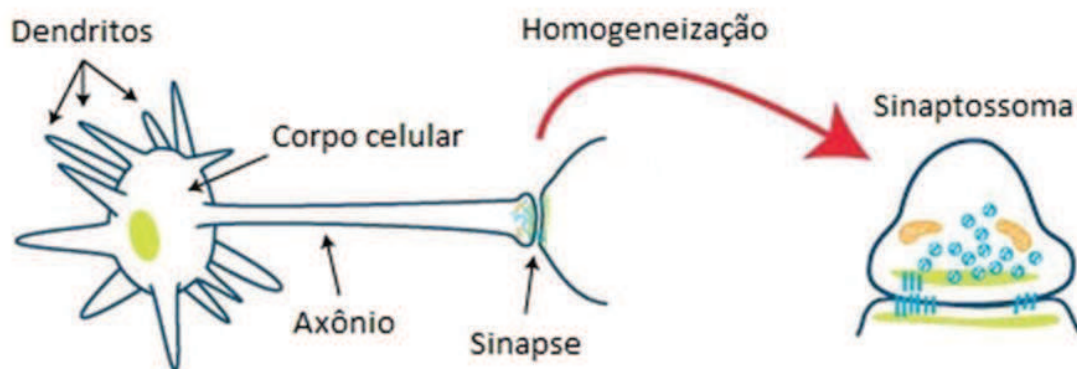
### **3.12 Análise comportamental das crises epilépticas induzidas pela administração intraperitoneal de pentilenotetrazol**

Trinta minutos após a administração de AP18 (3 ou 10 mg/Kg) ou SB366791 (1 mg/Kg), o PTZ foi administrado por via i.p. (60 mg/Kg). Os animais foram então colocados em caixas de acrílico individuais e com auxílio de uma câmera digital (Sony DCR-SR68) foi avaliada a latência para o início das crises.

### **3.13 Preparação dos sinaptossomas corticais**

Após a decapitação dos animais, os córtex foram removidos e transferidos para tubos contendo 3 mL de solução gradiente. O tecido foi homogeneizado e em seguida centrifugado a 3.000 rpm, a 4 °C, por 10 min. O sobrenadante desta centrifugação foi aplicado em um gradiente descontínuo de Percoll<sup>®</sup> (23 %, 15 %, 10 e 3 % v/v em solução gradiente) (Dunkley *et al.*, 1986) e submetido à centrifugação a 18.000 rpm, a 4 °C, por 15 min. As frações P3 e P4 foram recolhidas em conjunto e submetidas à outra centrifugação a 37000 g, 4 °C, por 15 min em:

Krebs-Ringer-Hepes (KRH) sem cálcio, para retirada do excesso de Percoll®. O precipitado resultante dessa centrifugação foi diluído em 1.000  $\mu\text{L}$  de KRH sem cálcio. Todo o volume foi transferido para tubos cônicos de microcentrífuga, centrifugados a 10.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o precipitado novamente ressuspensionado em 1.000  $\mu\text{L}$  de KRH sem cálcio, colocado em banho maria a 35,5°C por 30 minutos. Novamente a solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 1.000  $\mu\text{L}$  de KRH sem cálcio e colocado novamente por 30 minutos em banho maria a 35,5°C. Os passos de centrifugação, descarte e ressuspensão foram repetidos e a amostra final foi mantida no gelo até a realização dos experimentos. A Figura 8 ilustra a obtenção do sinaptossoma a partir do terminal sináptico.



**Figura 8:** Esquema da obtenção do sinaptossoma a partir do terminal nervoso e parte da membrana pós-sináptica durante a homogeneização mecânica. Wu *et al.*, 2012.

### 3.14 Ensaio para liberação de glutamato

A quantidade de glutamato liberada pelo terminal pré-sináptico foi determinada realizando o experimento de liberação contínua de glutamato em sinaptossomas corticais induzida por KCl. Esse ensaio é baseado na reação envolvendo GDH (glutamato desidrogenase),  $\text{NADP}^+$  (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), NADPH e glutamato. Quando o glutamato é liberado pelos sinaptossomas, ele sofre oxidação pela enzima GDH, sendo o  $\text{NADP}^+$  o aceptor dos elétrons provenientes desta oxidação. O NADPH ao ser excitado por luz em comprimento de onda de 360 nm, emite luz no comprimento de onda de 450 nm, que é detectada por um fotomultiplicador no espectrofluorímetro (Nicholls *et al.*, 1987; Romano-Silva *et al.*, 1993). Resumidamente, preparou-se uma reação contendo uma mistura de sinaptossomas (30  $\mu\text{L}$  da solução contendo sinaptossomas por poço),  $\text{CaCl}_2$  (0,1 %),  $\text{NADP}^+$  (1 mM), diluídos em 270

$\mu\text{L}$  de KRH. Essa reação foi transferida para microplacas de 96 poços (300  $\mu\text{L}$ /poço), para serem posteriormente lidas em espectrofluorímetro (Synergy 2, EUA). Após 2 min, foi adicionado AP18 (0,1; 1; 10; 30  $\mu\text{M}$ ) ou SB366791 (0,1; 1; 10; 30  $\mu\text{M}$ ) - 5 min e a leitura foi reiniciada. Subsequentemente, foi adicionado GDH (35 UI por poço-5 min) e/ou KCl (33 mM-10 min), em preparações sinaptossomais obtidas de camundongos. Também foram utilizadas preparações sem sinaptossomas e sem KCl. Os experimentos foram realizados a 37 °C, com um comprimento de onda de excitação de 340 nm e de emissão de 440 nm. Uma amostra de 50  $\mu\text{L}$  foi separada e congelada à -20 °C para posterior quantificação de proteínas (Lowry *et al.*, 1951). Os valores foram representados em relação ao percentual de fluorescência do grupo KCl obtido em cada dia de experimento.

### 3.15 Medida da concentração de cálcio livre intrasinaptossomal

A entrada de cálcio no terminal pré-sináptico foi determinada utilizando-se a preparação de sinaptossomas e a marcação com a sonda fluorescente Fura-2 AM (Sigma-Aldrich, USA). Ao cruzar a membrana citoplasmática, ela é clivada por esterases inespecíficas presentes no citoplasma e se transforma em FURA-2, que é hidrofílico o suficiente para não escapar do interior dos sinaptossomas. O processo de determinação do  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  baseia-se no fato de que o FURA-2 tem sua fluorescência aumentada quando se liga ao  $\text{Ca}^{2+}$ . Cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ , 1 mM) foi adicionado à preparação de sinaptossomas. A preparação foi transferida para uma placa de 96 poços, a 37°C, sendo, em seguida, realizada uma leitura basal por 5 minutos. As drogas foram então adicionadas e a leitura foi realizada por 5 min, seguida pela indução da despolarização da membrana com KCl (33 mM) por 5 minutos. A leitura foi realizada em espectrofluorímetro de placa (Synergy 2, BioTek, EUA), e a temperatura foi mantida a 37 °C. O aumento da  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induzido pela despolarização da membrana é estritamente dependente da presença de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular nestas condições (Romano-Silva *et al.*, 1993). O FURA-2 livre apresenta excitação máxima no comprimento de 380 nm e quando ligado ao cálcio de 340 nm. Portanto, os sinaptossomas foram iluminados alternadamente com luz nos comprimentos de 340 e 380 nm, e a luz emitida, no comprimento de 505 nm. Para calibração, utilizou-se o EGTA para calcular a fluorescência mínima ( $R_{\text{min}}$ ) e o SDS 10% para obtenção da fluorescência máxima ( $R_{\text{max}}$ ). Os pontos foram registrados em intervalos de 23 s. Foram quantificadas a quantidade de cálcio intrasinaptossomal, antes e após o estímulo com KCl. Foram utilizados os mesmos grupos experimentais do ensaio de liberação de glutamato.

### 3.16 Medidas de excitose

A determinação da exocitose nos terminais pré-sinápticos corticais, que foram obtidos conforme item 3.13, foi realizada por meio da molécula FM2-10 (N-(3- trietilamoniopropil) - 4-(4- (dietilamino)stiril)piridinium dibromo). Essa molécula se liga reversivelmente a membranas e emite uma fluorescência relativamente maior quando está ligada do que quando se encontra livre, sendo que após sua entrada na célula, a molécula apenas pode ser liberada quando houver exocitose. Sendo assim, quanto mais exocitose ocorre no sinaptossoma, maior será a queda na fluorescência medida relativa àquele grupo (Gaffield e Betz, 2006).

Após a obtenção dos terminais pré-sinápticos, estes foram transferidos para tubo tipo Eppendorf onde se adicionou a molécula FM2-10 (50  $\mu\text{mol/L}$ ) e  $\text{CaCl}_2$  (5  $\text{mmol/L}$ ). A partir daí os sinaptossomas foram protegidos da luz devido à fotossensibilidade do FM2-10 e dirigidos ao ultrasonicador durante 3 minutos para a marcação pela molécula. Posteriormente, foi adicionado KCl (30  $\text{mmol/L}$ ) por 45 segundos durante agitação constante, pois essa molécula irá favorecer a captura do marcador. O material foi centrifugado a 10.000 rpm por 30 segundos e o sobrenadante foi descartado, visando eliminar o excesso de FM2-10 que não se ligou aos terminais. O pellet formado foi ressuspensionado em KRH contendo BSA, pois a albumina promove uma melhor lavagem do excesso de corante. Os sinaptossomas foram novamente centrifugados a 10.000 rpm por 30 segundos e ressuspensionados em KRH contendo albumina, sendo novamente centrifugados, lavados e ressuspensionados por fim em KRH sem cálcio. A leitura foi realizada no CAPI (Centro de Aquisição e Processamento de Imagens – ICB), no equipamento Cytation 5 (BioTek®) utilizando-se comprimento de onda de excitação a 488 nm e emissão a 570 nm. Inicialmente fez-se a leitura basal da solução contendo sinaptossomas durante 5 minutos, após isso adicionou-se o AP18 (0,1; 1; 10 e 30  $\mu\text{mol/L}$ ) por 5 minutos,  $\text{CaCl}_2$  (1,3  $\text{mmol/L}$ ) por 5 minutos e por fim KCl (33  $\text{mmol/L}$ ) por 5 minutos. Os resultados foram obtidos utilizando-se a seguinte fórmula:  $[(F_0-F)/F_0]$ , onde F é a fluorescência final e  $F_0$  a fluorescência inicial.

### **3.17 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico Prism 6.0 (GraphPad, CA, USA). A avaliação da frequência de indivíduos que desenvolveram SE ou crises tônico-clônicas no modelo de injeção intra-hipocampal de pilocarpina, foi feita utilizando o teste de associação do qui-quadrado ( $X^2$ ).

Os dados foram analisados segundo a normalidade pela análise de Shapiro-Wilk. Quando os valores seguiam uma distribuição normal, o teste paramétrico era aplicado. Os dados comportamentais e histológicos foram analisados através da análise de variância (ANOVA) um critério, para variáveis com distribuição paramétrica. Quando adequado, foi utilizado o pós-teste de Tukey. Quando a análise não paramétrica era apropriada, utilizamos o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn.

Os dados de concentração do fator neurotrófico e das citocinas obtidos foram analisados por ANOVA um critério e, quando adequado, o pós-teste de Tukey foi realizado. Para as avaliações da latência para o desenvolvimento do SE com PTZ, dos níveis das proteínas Akt e Erk, da liberação de glutamato, do conteúdo de cálcio citosólico e da excitose utilizamos o teste de Kruskal-Wallis.

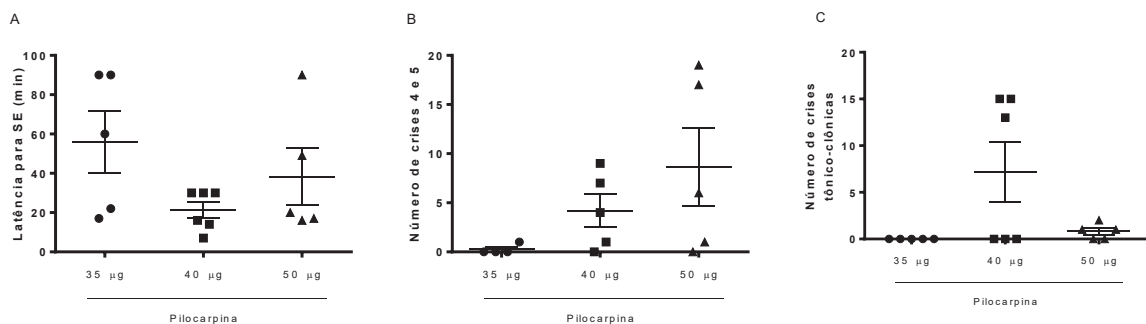
Os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro-padrão da média. Considerou-se diferença estatisticamente significativa sempre que  $p < 0,05$  (nível de significância 5 % e intervalo de confiança de 95 %).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Padronização da dose intra-hipocampal de pilocarpina em animais C57Bl/6

Com a alteração do local de origem dos animais, foi necessária a realização de nova padronização de doses de pilocarpina, uma vez que pequenas alterações podem variar desde a ausência de efeito até uma elevada mortalidade. Os animais receberam as doses de 35  $\mu\text{g}$ , 40  $\mu\text{g}$  e 50  $\mu\text{g}$  de pilocarpina e a latência para o desenvolvimento do SE, o número de crises 4 e 5 e o número de crises tônico-clônicas foram avaliados por 90 minutos. Assim como Turski (1983a) observou em ratos, os camundongos permanecem imóveis durante 5 a 10 minutos após a administração de pilocarpina, seguido de um período no qual exibem movimentos na face, salivação, piscar de olhos e espasmos de vibrissas.

Embora não tenhamos encontrado diferença estatística entre os grupos, observa-se que os animais que receberam a dose de 35  $\mu\text{g}$  apresentaram um número muito reduzido de crises 4, 5 e tônico-clônicas. Os animais que receberam 50  $\mu\text{g}$  de pilocarpina apresentaram cerca de 7 vezes menos crises tônico-clônicas que os animais que receberam 40  $\mu\text{g}$  de pilocarpina. Apesar de não haver diferença estatística entre as doses testadas, a dose de 40  $\mu\text{g}$  foi escolhida, pois os animais atingiram o SE em um tempo menor e apresentaram maior número de crises classificadas como 4, 5 e tônico-clônicas (Figura 9). Foi utilizada a análise de Kruskal-Wallis;  $p = 0,1980$  para latência;  $p = 0,1166$  para número de crises 4 e 5;  $p = 0,1558$  para número de crises tônico-clônicas. A dose de 40  $\mu\text{g}$  de pilocarpina foi utilizada nos experimentos com as drogas moduladoras dos canais TRP.

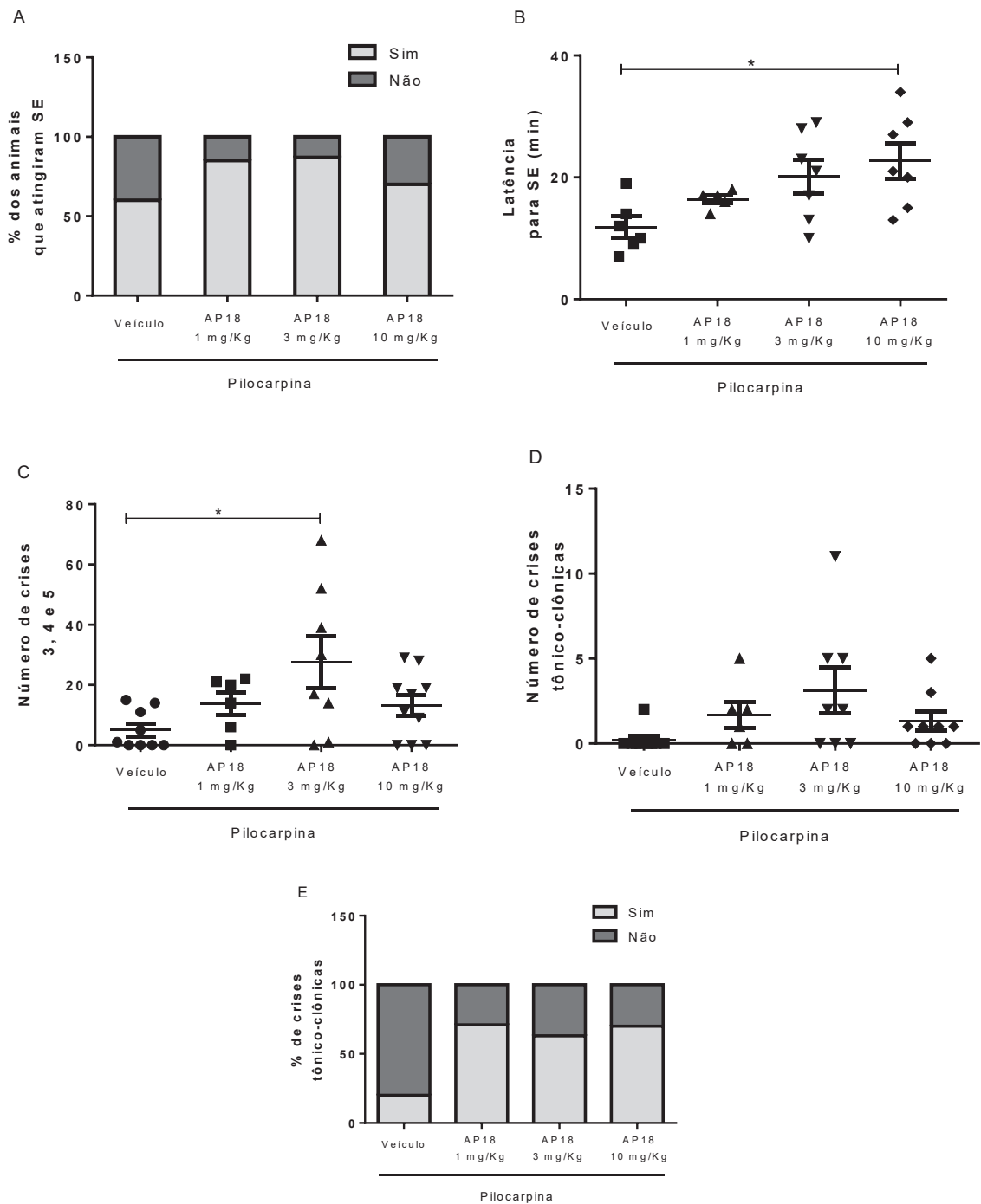


**Figura 9:** Efeito da injeção intra-hipocampal de pilocarpina (35, 40 ou 50  $\mu\text{g}$ ) sobre a latência para atingir o SE (A), o número de crises 4 e 5 (B) e o número de crises tônico-clônicas (C). Kruskal-Wallis,  $n = 5 - 6$ .

## 4.2 Avaliação do efeito do AP18 sobre as crises epilépticas induzidas pela administração intra-hipocampal de pilocarpina

Considerando o papel de diversos canais da família TRP na epilepsia e que o TRPA1 regula o fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$ , o qual pode estar associado ao desenvolvimento de crises epilépticas, avaliamos o efeito do bloqueador do canal TRPA1, AP18, sobre as crises induzidas pela injeção intra-hipocampal de pilocarpina.

Há forte associação entre o AP18 e o desenvolvimento do SE ( $X^2(3)$  para associação entre desenvolvimento do SE e AP18 = 26,65;  $p < 0,0001$ ; Figura 10 A). A frequência de desenvolvimento do SE nos grupos AP18 (1 e 3 mg/Kg) foi cerca de 1,4 vezes maior que no grupo que recebeu pilocarpina. Em comparação a este último grupo, a dose de 10 mg/Kg de AP18 aumentou a frequência de SE em cerca de 1,2 vezes (Figura 10 A). A latência para o desenvolvimento do SE foi de 11,8 min para o grupo pilocarpina, de 16,4 min para o grupo AP18 1 mg/Kg; 20,1 min para AP18 3 mg/Kg, e 22,7 min para AP18 10 mg/Kg (Kruskal-Wallis;  $p = 0,0342$ ; Figura 10 B). O número de crises classificadas como 3, 4 e 5 foram estatisticamente maiores com 3 mg/Kg de AP18 comparado ao grupo veículo (ANOVA um critério,  $F_{(3, 29)} = 3,549$ ;  $p = 0,0265$ ; Figura 10C). Não houve diferença estatística com relação ao número de crises tônico-clônicas entre os grupos (Kruskal-Wallis;  $p = 0,0726$ ) (Figura 10 D). Porém, a frequência com que os camundongos apresentaram crises tônico-clônicas com AP18 foi significativamente maior (aproximadamente 3 vezes) comparado ao grupo pilocarpina. Foi demonstrada uma forte associação entre AP18 e crises tônico-clônicas ( $X^2(3)$  para associação entre presença de crises e AP18 = 71,67;  $p < 0,0001$ ; Figura 10 E). O número de crises 3, 4 e 5 e tônico-clônicas são mostrados na tabela 1.



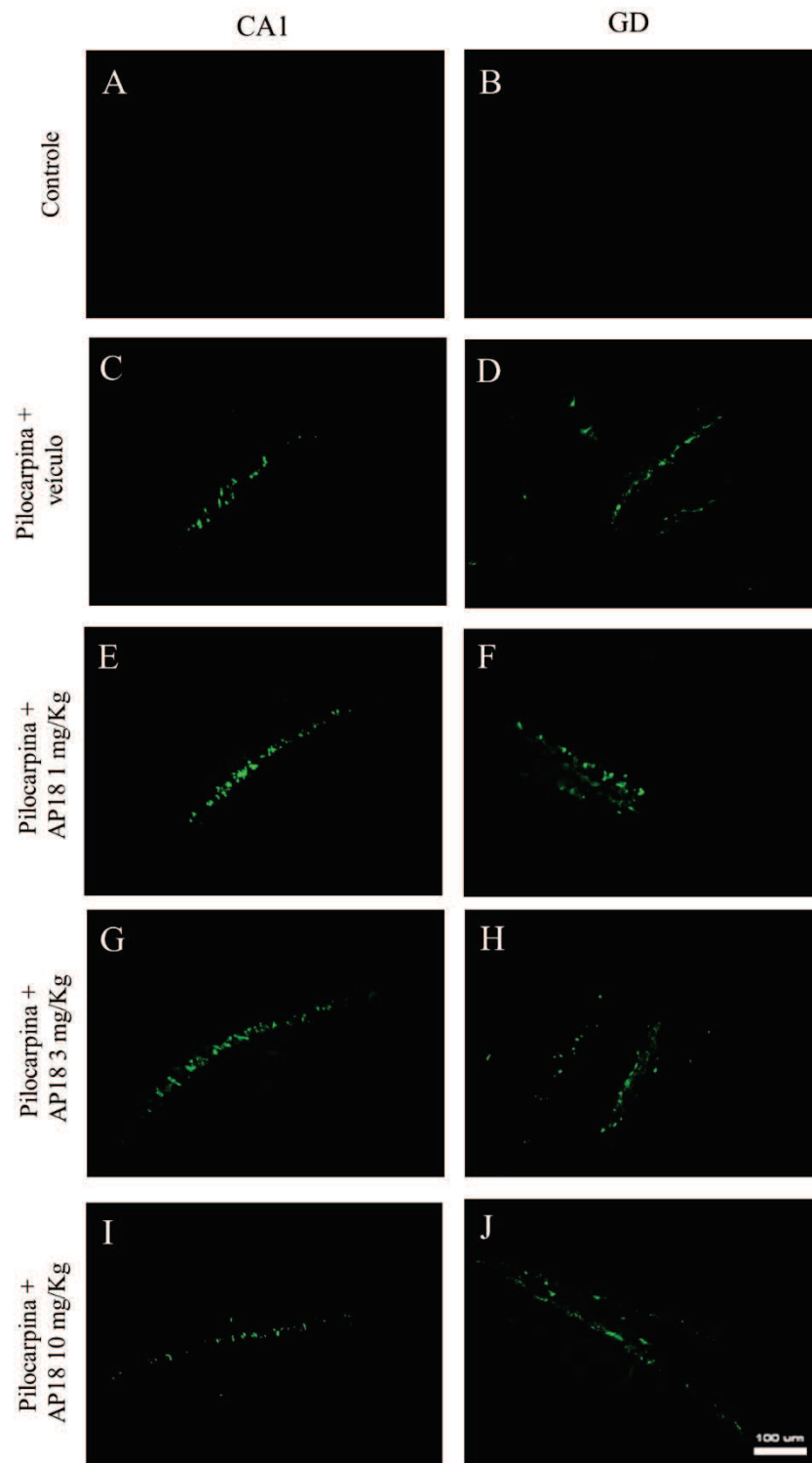
**Figura 10:** Efeito do AP18 em crises epilépticas induzidas por injeção intra-hipocampal de pilocarpina. Foram avaliadas a frequência dos animais que atingiram o SE (A), a latência para atingir o SE (B), o número de crises 3, 4 e 5 (C), o número de crises tônico-clônicas (D) a frequência de crises tônico-clônicas (E). ANOVA um critério seguido do teste de Tukey, Kruskal-Wallis ou teste qui-quadrado,  $n = 6 - 10$ ; \*  $p < 0,05$ , comparados com o grupo veículo.

**Tabela 1:** Média do número de crises 3, 4 e 5 e tônico-clônicas em animais tratados com AP18 ou veículo.

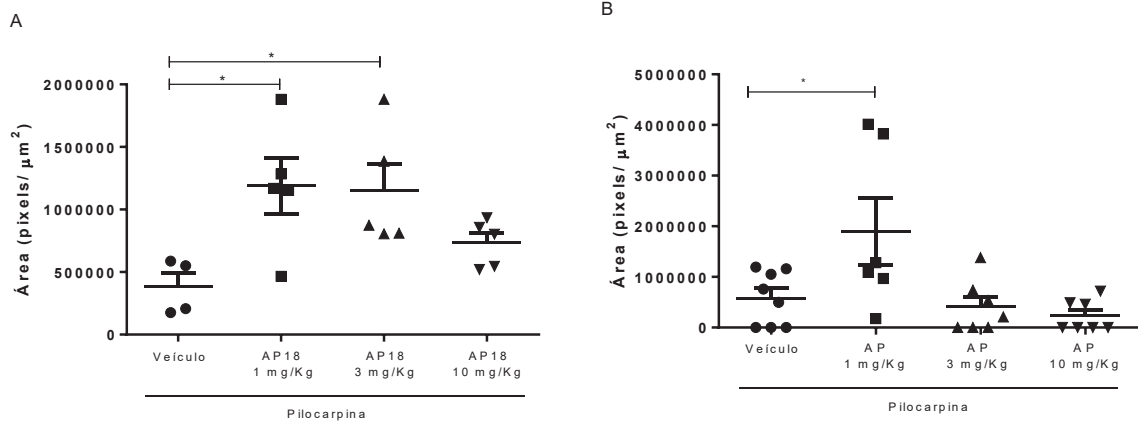
		Crises 3,4 e 5	p	Crises tônico-clônicas	p
<b>Pilocarpina</b>	40 µg	5,11 ± 2,15	-	0,22 ± 0,22	-
	1 mg/Kg	13,83 ± 3,69	0,6600	1,67 ± 0,76	0,3533
<b>AP18</b>	3 mg/kg	27,63 ± 8,59	0,0154	3,13 ± 1,34	0,0890
	10 mg/Kg	13,2 ± 3,49	0,6150	1,33 ± 0,55	0,4491

### 4.3 AP18 aumentou a marcação por FJC no hipocampo e a perda neuronal induzidas pela administração intra-hipocampal de pilocarpina

Tendo em vista que as crises epiléticas podem aumentar a morte de neurônios, avaliamos o impacto do pré-tratamento com AP18 sobre o processo neurodegenerativo no hipocampo. O efeito do bloqueador do canal TRPA1 sobre o processo de degeneração de neurônios hipocampais foi avaliado através da marcação com FJC, conforme imagem representativa (Figura 11). Em CA1, as doses de 1 e 3 mg/Kg de AP18 aumentaram a marcação com FJC (ANOVA um critério  $F_{(3, 15)} = 4,444$ ;  $p = 0,02$ ) (Figura 12A). No GD, houve um aumento na marcação com FJC no grupo de animais que recebeu a dose de 1 mg/Kg em comparação ao grupo pilocarpina (ANOVA um critério;  $F_{(3, 24)} = 4,963$ ;  $p = 0,0081$ ) (Figura 12B).



**Figura 11:** Imagens representativas do efeito do tratamento com AP18 no processo de neurodegeneração hipocampal no aumento de 20x das regiões CA1 e GD do hipocampo. (A e B) veículo + veículo, (C e D) veículo + pilocarpina, (E e F) AP18 1 mg/Kg + pilocarpina, (G e H) AP18 3 mg/Kg + pilocarpina e (I e J) AP18 10 mg/Kg + pilocarpina. Escala=100  $\mu$ m.

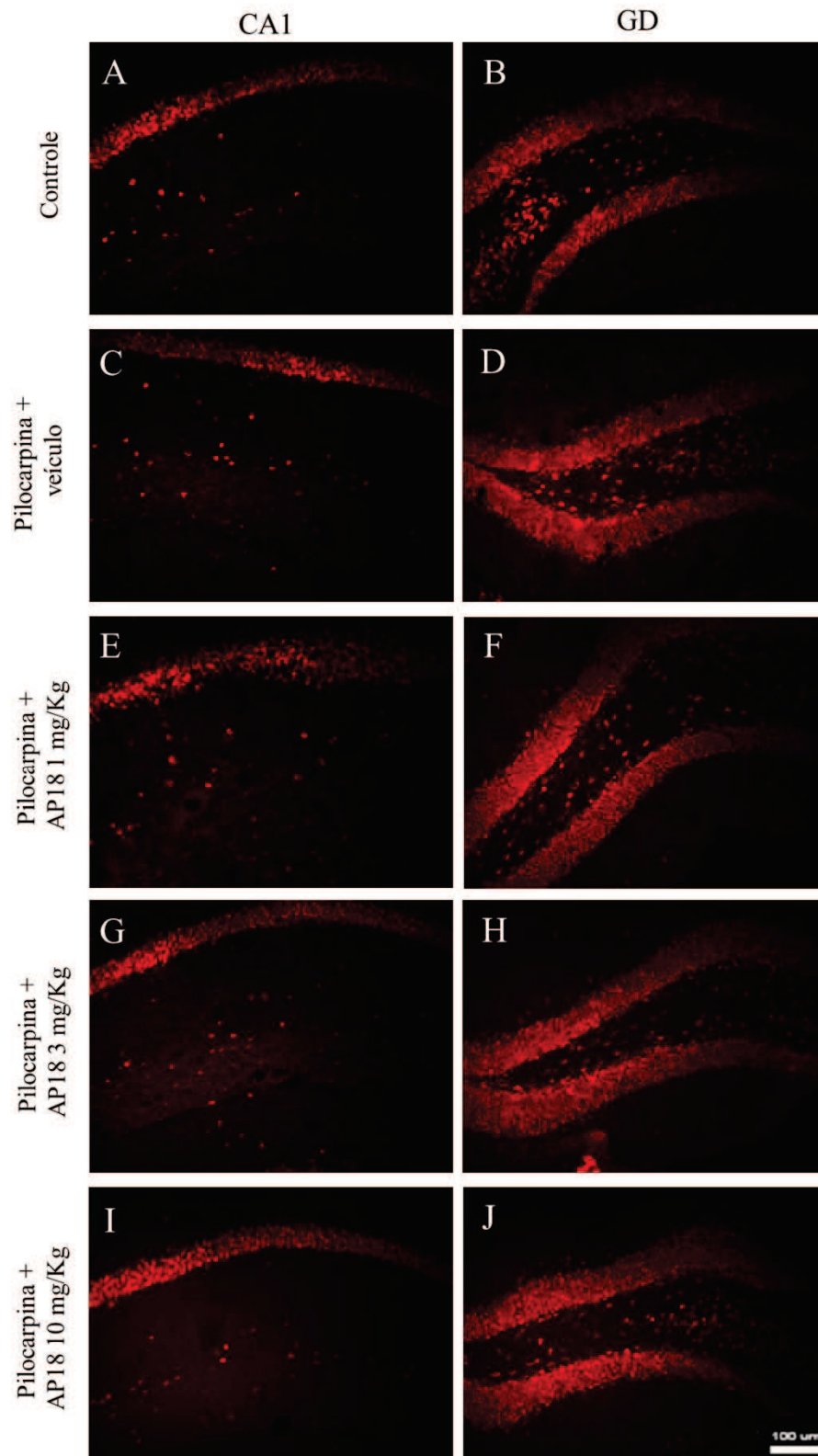


**Figura 12:** Efeito do tratamento com AP18 no processo de neurodegeneração hipocampal. Cortes cerebrais foram submetidos à coloração com fluoro jade C para avaliação da neurodegeneração nas regiões (A) CA1, n = 4 - 5 e (B) GD, n = 6 - 8. ANOVA um critério seguido do teste de Tukey. \*  $p < 0,05$ , comparados com o grupo veículo.

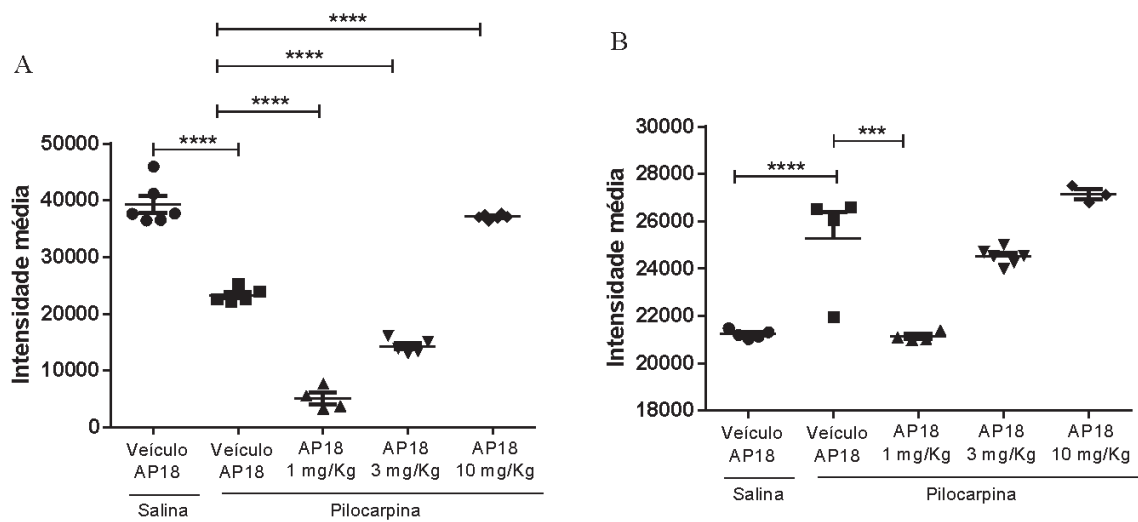
#### 4.4 AP18 alterou a marcação de neurônios no hipocampo de animais após a administração intra-hipocampal de pilocarpina

Baseado no fato que AP18 aumentou a neurodegeneração no hipocampo, avaliamos o efeito desse bloqueador sobre as consequências induzidas pela pilocarpina sobre a marcação de corpos de neurônios por NeuN, conforme imagem representativa (Figura 13). A pilocarpina reduziu a intensidade média de fluorescência em comparação ao grupo controle em CA1. AP18 nas doses de 1 e 3 mg/Kg reduziram a marcação de NeuN em CA1, enquanto a maior dose de AP18 aumentou essa marcação em comparação ao grupo pilocarpina (ANOVA um critério,  $F_{(4, 21)} = 236,0$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 14 A).

No GD, enquanto a pilocarpina aumentou a marcação de NeuN, AP18 na dose de 1 mg/Kg reduziu a marcação de neurônios (ANOVA um critério,  $F_{(4, 17)} = 28,23$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 14 B). Em CA1, AP18 3 mg/Kg reduziu a imunomarcação de NeuN, enquanto no GD, todas as doses aumentaram essa marcação sem o estímulo da pilocarpina (Apêndice C).



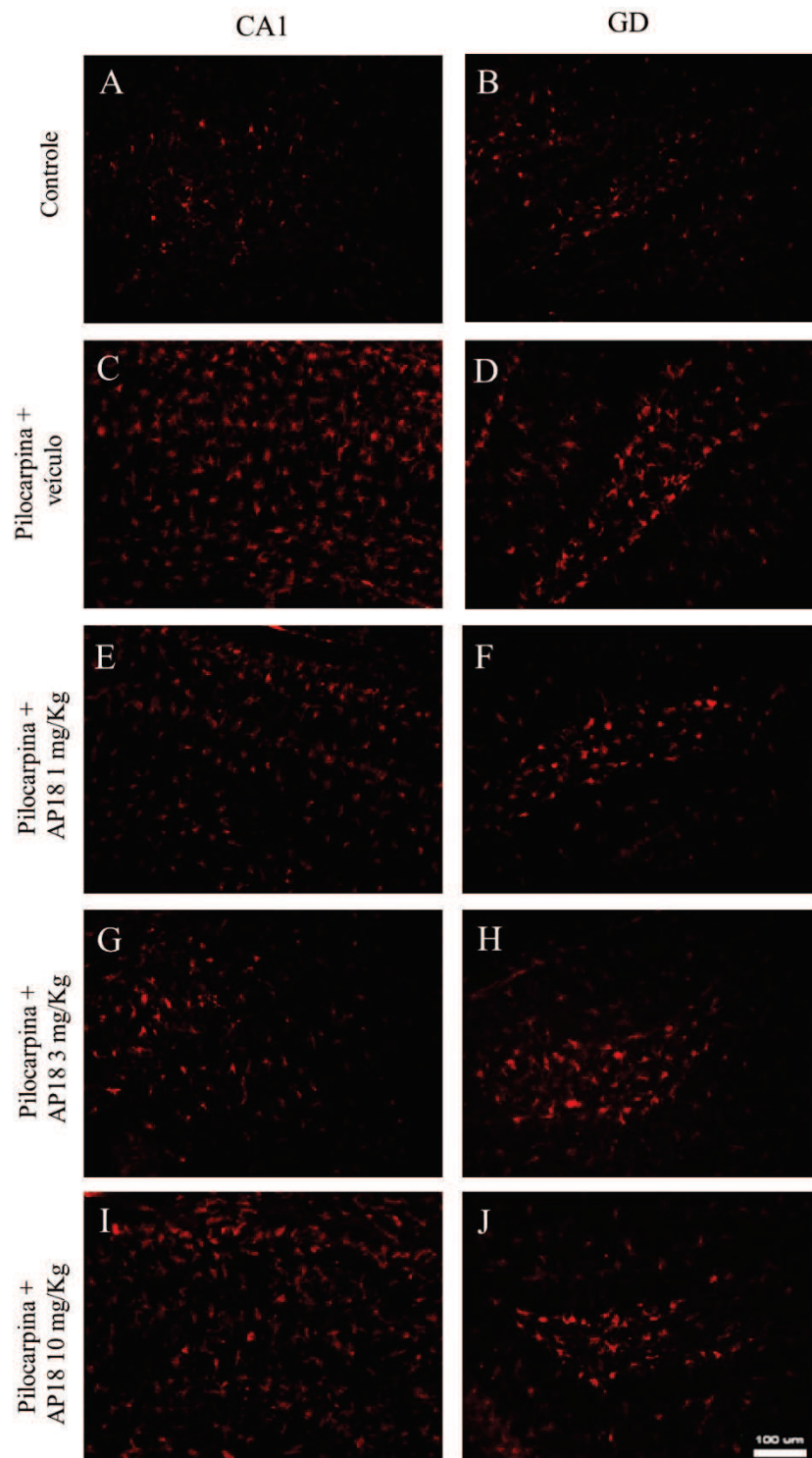
**Figura 13:** Imagens representativas do efeito do tratamento com AP18 na marcação de neurônios com NeuN no aumento de 20x das regiões CA1 e GD do hipocampo. (A e B) veículo + veículo, (C e D) veículo + pilocarpina, (E e F) AP18 1 mg/Kg + pilocarpina, (G e H) AP18 3 mg/Kg + pilocarpina e (I e J) AP18 10 mg/Kg + pilocarpina. Escala = 100  $\mu$ m.



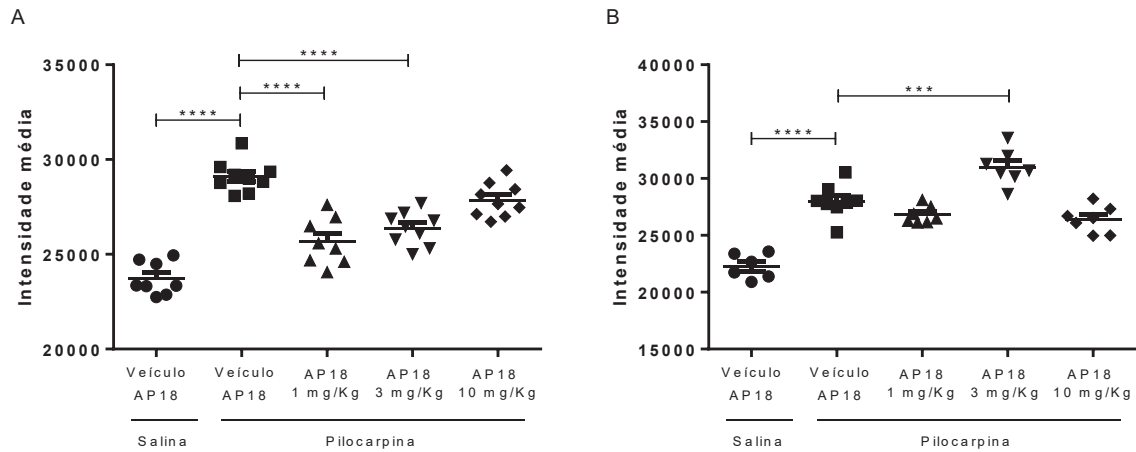
**Figura 14:** Efeito do AP18 sobre a marcação de neurônios com NeuN. Cortes cerebrais foram submetidos à marcação com NeuN para avaliação das regiões (A) CA1 e (B) GD do hipocampo. ANOVA um critério seguido do pós-teste de Tukey,  $n = 3 - 6$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , comparados com o grupo veículo.

#### 4.5 AP18 induz efeitos antagonísticos sobre a microgliose no GD e em CA1 e induz a ativação microglial em CA1 após a administração intra-hipocampal de pilocarpina

No intuito de testar o efeito do pré-tratamento com AP18 sobre o perfil da micróglia no hipocampo, vinte quatro horas após a análise comportamental, avaliamos o efeito do bloqueador de TRPA1 sobre a marcação microglial (células Iba-1<sup>+</sup>) e da ativação dessas células (células CD68<sup>+</sup>) pela técnica de imunofluorescência, conforme imagem representativa (Figura 15 e 17, respectivamente). A pilocarpina aumentou a marcação com Iba-1 nas regiões CA1 e GD do hipocampo (Figura 16). Comparando-se com o grupo pilocarpina, foi observada uma diminuição da marcação de células Iba-1<sup>+</sup> na região CA1 do hipocampo, nos grupos que receberam 1 e 3 mg/Kg de AP18 (ANOVA um critério,  $F_{(4, 38)} = 39,91$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 16 A), enquanto no GD ocorreu um aumento no grupo que recebeu 3 mg/Kg (ANOVA um critério,  $F_{(4, 30)} = 40,21$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 16 B). AP18 na dose de 10 mg/Kg foi capaz de aumentar a marcação para Iba-1 no hipocampo na ausência de pilocarpina (Apêndice D).

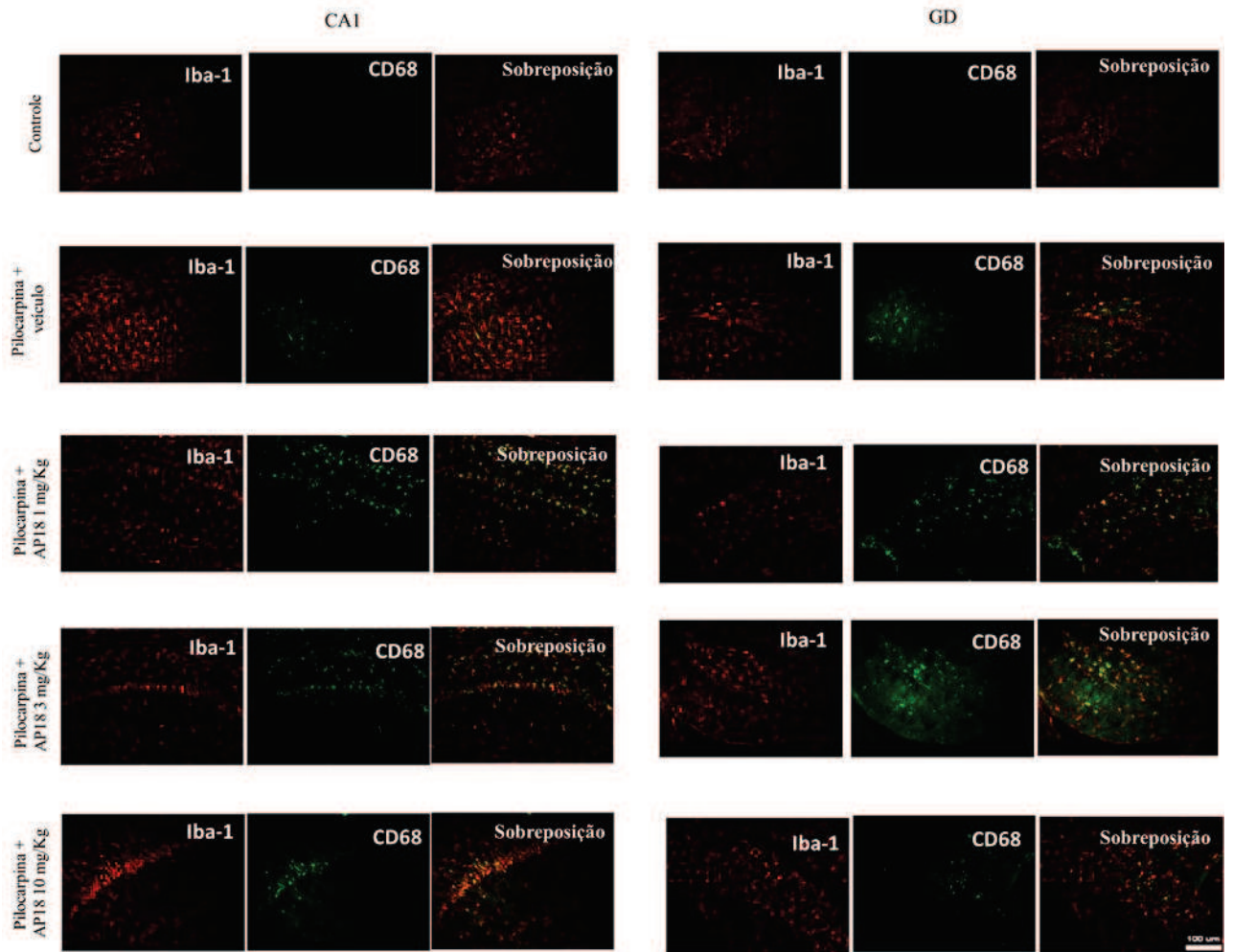


**Figura 15:** Imagens representativas do efeito do tratamento com AP18 na marcação microglial com Iba-1<sup>+</sup> no aumento de 20x das regiões CA1 e GD do hipocampo. (A e B) veículo + veículo, (C e D) veículo + pilocarpina, (E e F) AP18 1 mg/Kg + pilocarpina, (G e H) AP18 3 mg/Kg + pilocarpina e (I e J) AP18 10 mg/Kg + pilocarpina. Escala = 100 μm.

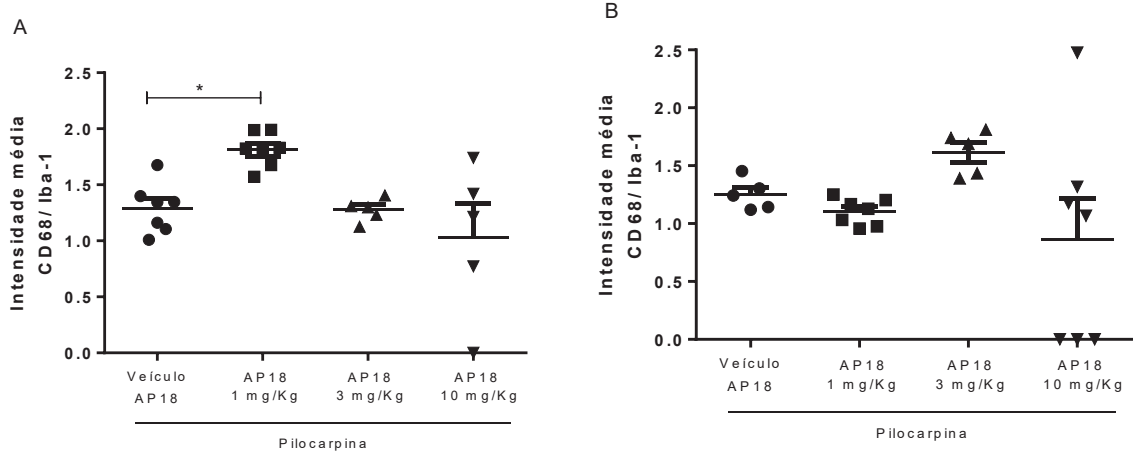


**Figura 16:** Efeito do AP18 sobre a marcação microglial com Iba-1. Cortes cerebrais foram submetidos à marcação com Iba-1 para avaliação das regiões (A) CA1, n = 8 - 10 e (B) GD do hipocampo, n = 6 - 7. ANOVA um critério seguido do teste de Tukey. \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,0001 comparados com o grupo veículo.

Com relação a ativação microglial, as imagens representativas estão mostradas na figura 17. Como esperado, observamos um aumento na marcação com CD68 pela pilocarpina, entretanto, não notamos qualquer diferença nos grupos controles. Foi observada diferença na marcação por CD68 apenas no grupo AP 1 mg/Kg em relação ao grupo pilocarpina na região CA1 (Kruskal-Wallis, p = 0,006; Figura 18 A). No GD não houve diferença quanto à ativação microglial em nenhuma das doses testadas (Kruskal-Wallis, p = 0,021; Figura 18 B).



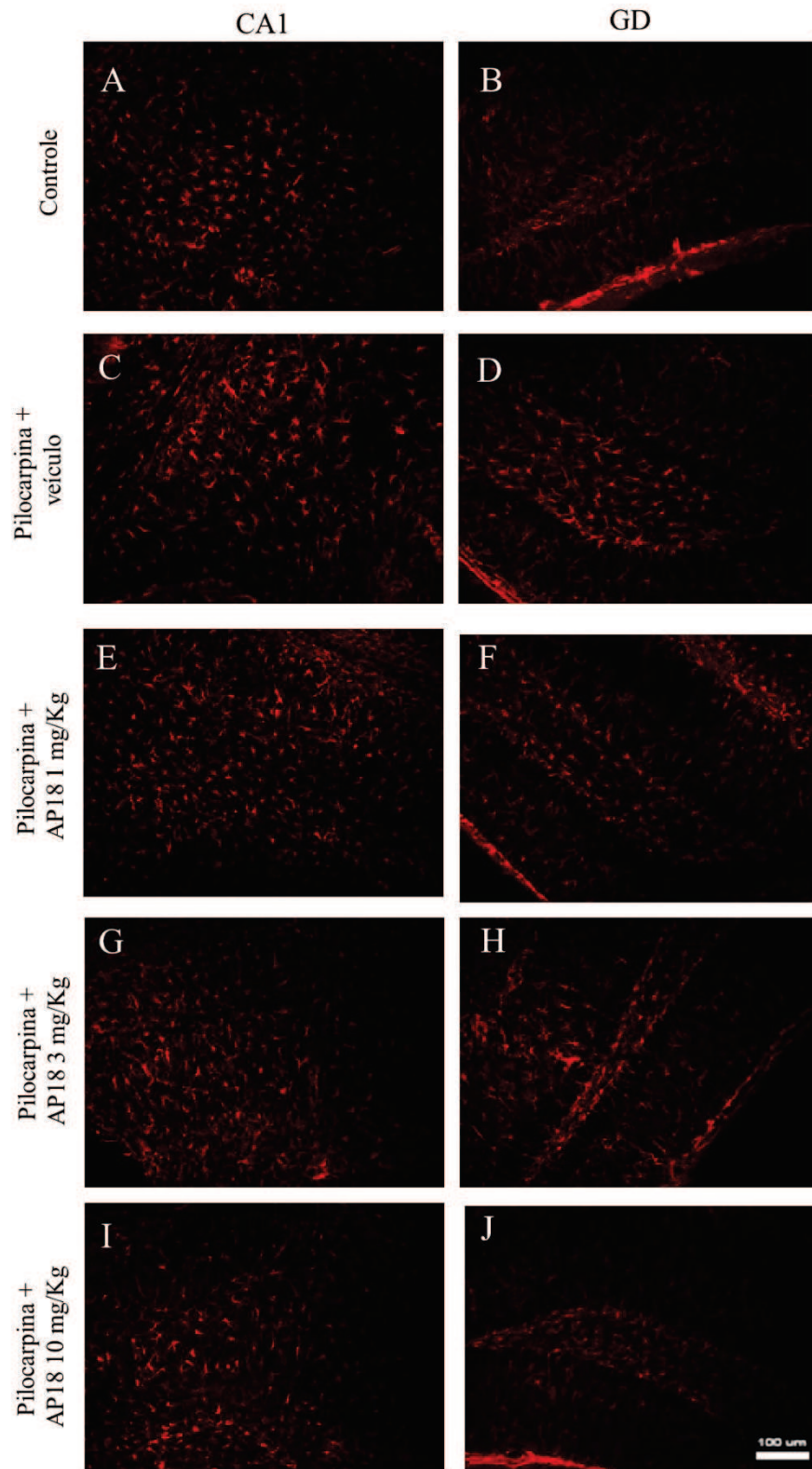
**Figura 17:** Imagens representativas do efeito do tratamento com AP18 na marcação da ativação microglial com CD68 no aumento de 20x das regiões CA1 e GD do hipocampo. A sobreposição representa a dupla marcação de Iba-1 e CD68. (A e B) veículo + veículo, (C e D) veículo + pilocarpina, (E e F) AP18 1 mg/Kg + pilocarpina, (G e H) AP18 3 mg/Kg + pilocarpina e (I e J) AP18 10 mg/Kg + pilocarpina. Escala = 100  $\mu$ m.



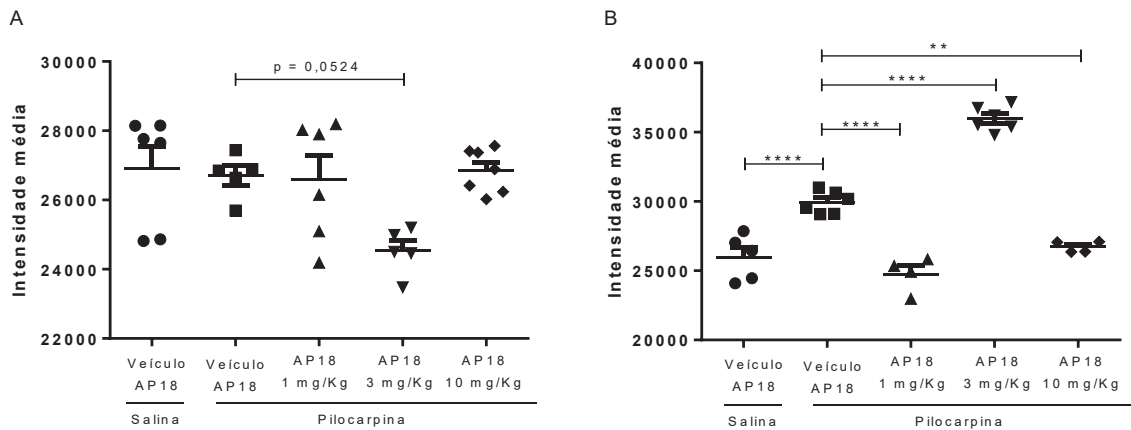
**Figura 18:** Efeito do AP18 sobre a marcação da ativação microglial com CD68. Cortes cerebrais foram submetidos à marcação com CD68 para avaliação das regiões (A) CA1 e (B) GD do hipocampo,  $n = 5 - 8$ . Kruskal-Wallis. \*  $p < 0,05$ , comparados com o grupo veículo.

#### 4.6 AP18 alterou a marcação de astrócitos no GD, mas não em CA1 após a administração intra-hipocampal de pilocarpina

Uma vez que foi observada uma alteração no perfil microglial, investigamos se o bloqueador de TRPA1 alteraria o perfil astrocitário após o estímulo com pilocarpina. Assim, vinte quatro horas após a análise comportamental, foi avaliado o efeito do AP18 sobre a marcação de astrócitos (GFAP) pela técnica de imunofluorescência, conforme imagem representativa (Figura 19). Não foi observada alteração da intensidade média de marcação com GFAP na região CA1, embora haja uma tendência de redução ( $p = 0,0524$ ) dessa marcação no grupo AP18 3 mg/Kg em comparação ao grupo pilocarpina (ANOVA um critério,  $F_{(4, 24)} = 3,805$ ;  $p = 0,0156$ ; Figura 20 A). Por outro lado, no GD houve um aumento da intensidade média no grupo pilocarpina comparado ao grupo veículo, e no grupo pilocarpina em relação ao grupo AP18 3 mg/Kg. Entretanto, os grupos que receberam as doses de 1 e 10 mg/Kg apresentaram uma redução da marcação em comparação ao grupo pilocarpina (ANOVA um critério,  $F_{(4, 20)} = 93,77$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 20 B). A análise dos grupos sem o estímulo da pilocarpina mostrou uma redução da reatividade astrocitária com AP18 1 mg/Kg em CA1 e um aumento da marcação com GFAP com AP18 1 e 3 mg/Kg no GD (Apêndice E).



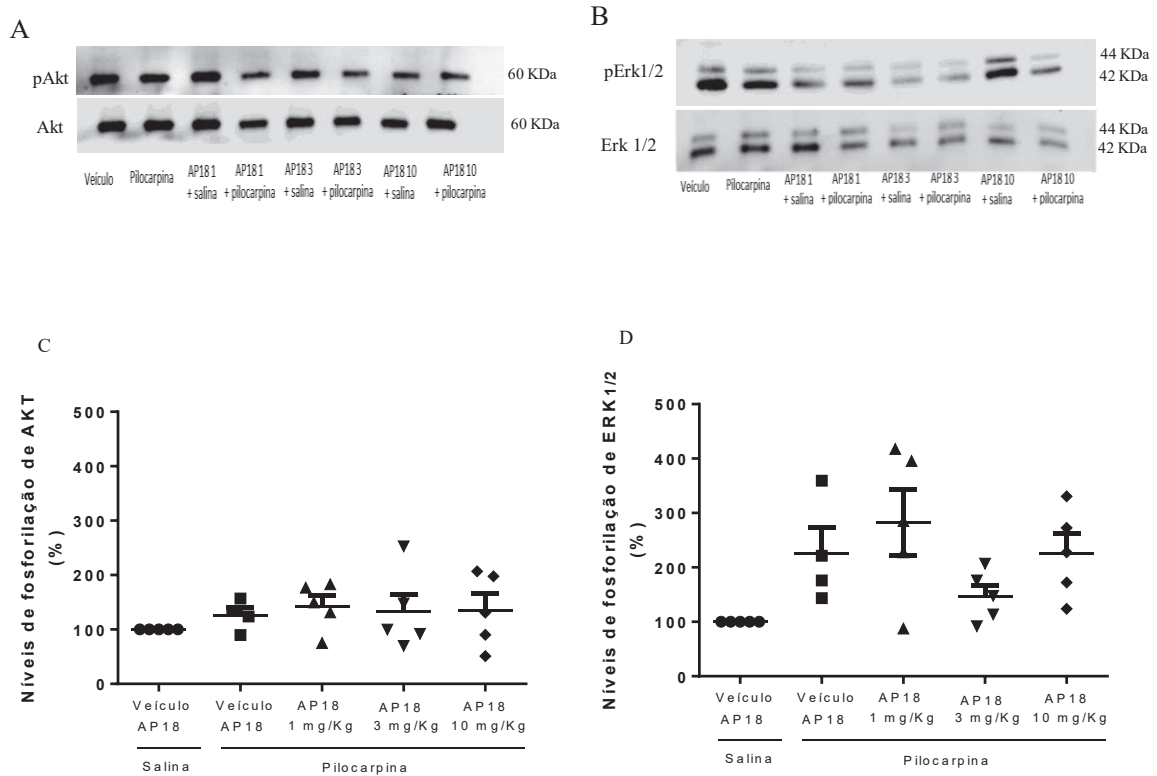
**Figura 19:** Imagens representativas do efeito do tratamento com AP18 na marcação astrocitária com GFAP no aumento de 20x das regiões CA1 e GD do hipocampo. (A e B) veículo + veículo, (C e D) veículo + pilocarpina, (E e F) AP18 1 mg/Kg + pilocarpina, (G e H) AP18 3 mg/Kg + pilocarpina e (I e J) AP18 10 mg/Kg + pilocarpina. Escala = 100  $\mu$ m.



**Figura 20:** Efeito do AP18 sobre a marcação de astrócitos com GFAP. Cortes cerebrais foram submetidos à marcação com GFAP para avaliação das regiões. (A) CA1,  $n = 5 - 7$  e (B) GD,  $n = 4 - 6$ , ANOVA um critério, seguido do pós-teste de Tukey. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , comparados com o grupo veículo.

#### 4.7 AP18 não alterou a fosforilação de Akt e Erk no hipocampo 24 h após a injeção intrahipocampal de pilocarpina

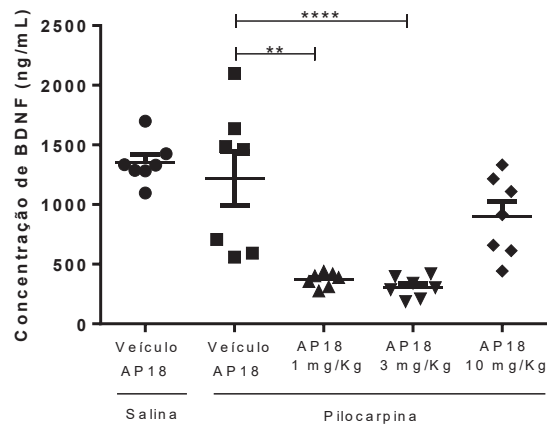
Considerando a efeito pró-convulsivante apresentado pelo AP18 no modelo de crise epiléptica induzido pela pilocarpina, avaliamos o envolvimento de vias relacionadas à sobrevivência celular. Nenhum efeito relacionado aos níveis de fosforilação das proteínas Akt foi notado com o estímulo da pilocarpina ou pelo tratamento com AP18 (Kruskal-Wallis,  $p = 0,7917$ ; Figura 21 A e C). Embora não tenhamos observado diferença estatística entre os grupos avaliados, houve uma tendência de aumento nos níveis de fosforilação de Erk<sub>1/2</sub> no grupo pilocarpina comparado ao controle e uma tendência de diminuição nos níveis de fosforilação no grupo AP18 3 mg/Kg comparado ao grupo pilocarpina (Kruskal-Wallis,  $p = 0,036$ ; Figura 21 B e D). A análise estatística dos grupos AP18 na ausência do estímulo pilocarpina não mostrou diferença dos níveis de fosforilação de Akt e Erk (Apêndice F).



**Figura 21:** Efeito do AP18 na expressão de Akt e Erk<sub>1/2</sub> após a injeção intra-hipocampal de pilocarpina. Imagens do western blotting de Akt (A) e Erk<sub>1/2</sub> (B) e gráficos que ilustram a análise densitométrica de Akt (C) e Erk<sub>1/2</sub> (D) dos hipocampos dos diferentes grupos de tratamento. Kruskal-Wallis, n = 5.

#### 4.8 AP18 reduziu os níveis de BDNF no hipocampo 24 h após a injeção intra-hipocampal de pilocarpina

Buscando avaliar as possíveis alterações no perfil de liberação do fator neurotrófico BDNF no hipocampo de animais após o insulto com pilocarpina e o possível efeito do tratamento com AP18 sobre esse perfil, avaliamos a concentração dessa neurotrófina por ELISA. Foi observada uma redução nos níveis de BDNF nos grupos AP18 1 e 3 mg/Kg + pilocarpina quando comparado ao grupo pilocarpina (ANOVA um critério,  $F_{(4, 30)} = 15,39$ ;  $p < 0,0001$ ; pós-teste de Tukey; Figura 22 e Apêndice G).



**Figura 22:** Efeito do AP18 na concentração de BDNF no hipocampo de animais após a injeção de pilocarpina. ANOVA um critério, seguido do pós-teste de Tukey,  $n = 7$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , comparados com o grupo veículo.

#### 4.9 AP18 alterou a concentração de citocinas inflamatórias no hipocampo 24 h após a injeção intra-hipocampal de pilocarpina

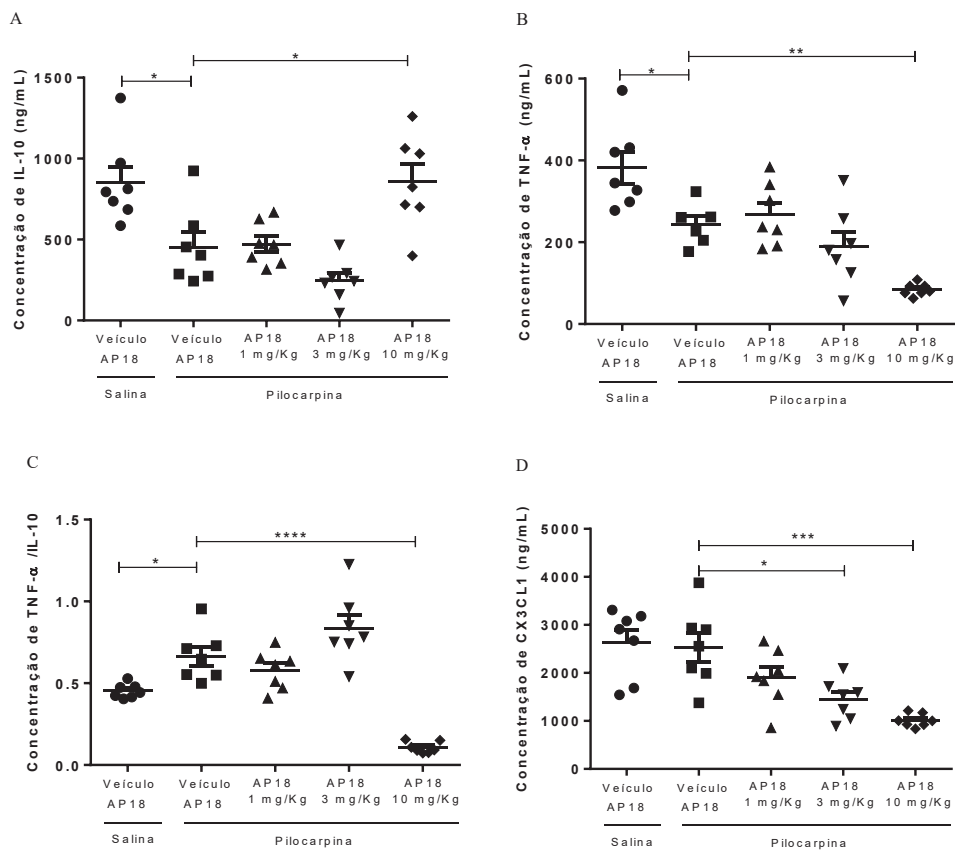
A fim de verificar o efeito do AP18 sobre os níveis de citocinas no hipocampo de animais após um insulto epileptogênico, os animais tiveram seus hipocampus dissecados 24 h após o SE induzido pela administração intra-hipocampal de pilocarpina. Foram dosadas as citocinas IL-10 e TNF- $\alpha$  e a quimiocina CX3CL1.

A administração de pilocarpina promoveu uma redução dos níveis de IL-10 quando comparados aos do grupo controle. O grupo AP18 10 mg/Kg + pilocarpina apresentou uma diminuição nos níveis de IL-10 em comparação ao grupo pilocarpina (ANOVA um critério,  $F_{(4,30)} = 10,56$ ,  $p < 0,0001$ ; pós-teste de Tukey; Figura 23 A). De forma semelhante, os grupos que receberam AP18 + salina apresentaram uma redução nos níveis de IL-10 quando comparados ao grupo controle (Apêndice H).

A pilocarpina reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  no hipocampo comparado ao grupo veículo. O grupo de animais que recebeu AP18 10 mg/Kg apresentaram uma diminuição nos níveis de esta citocina quando comparado ao grupo pilocarpina (ANOVA um critério,  $F_{(4,29)} = 14,55$ ,  $p < 0,0001$ ; pós-teste de Tukey; Figura 23 B). O grupo AP 3 mg/Kg + salina por si só reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  no hipocampo comparado ao grupo controle (Apêndice H).

Através da razão entre as concentrações das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10 foi possível avaliar a relação entre o perfil inflamatório com relação ao tratamento com AP18 em hipocampus de animais que receberam pilocarpina. A pilocarpina aumentou a razão entre as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-10, caracterizando um perfil pró-inflamatório da pilocarpina. Por outro lado, AP18 10 mg/Kg reduziu a razão entre TNF- $\alpha$  e IL-10, o que pode demonstrar um potencial efeito anti-inflamatório deste bloqueador (ANOVA um critério,  $F_{(4,30)} = 30,13$ ,  $p < 0,0001$ ; pós-teste de Tukey; Figura 23 C).

Uma redução na concentração da quimiocina CX3CL1 foi observada nos grupos AP18 3 e 10 mg/Kg em comparação ao grupo pilocarpina (ANOVA um critério;  $F_{(4,30)} = 9,760$ ,  $p < 0,0001$ ; pós-teste de Tukey; Figura 23 D). O grupo AP18 3 mg/Kg + salina, por sua vez também reduziu a concentração de CX3CL1 em comparação ao grupo controle (Apêndice H).

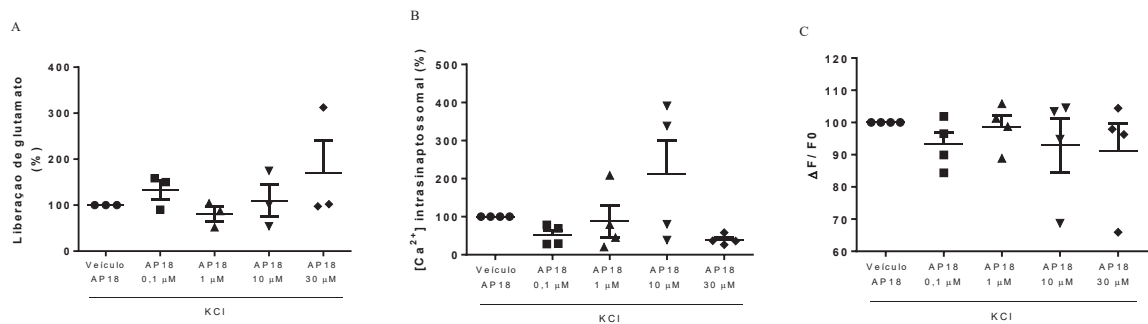


**Figura 23:** Efeito do AP18 na concentração das citocinas no hipocampo de animais após a injeção de pilocarpina. Concentração de (A) IL-10, (B) TNF- $\alpha$ , (C) Razão entre TNF- $\alpha$  e IL-10, (D) CX3CL1. ANOVA um critério, seguido do pós-teste de Tukey,  $n = 7$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; comparados com o grupo veículo.

#### 4.10 AP18 não alterou a liberação de glutamato, o conteúdo de cálcio citosólico e a exocitose nos terminais pré-sinápticos corticais

Diante dos resultados obtidos através das marcações por FJC e NeuN, avaliamos se o AP18 poderia alterar a transmissão glutamatérgica, sem o insulto epileptogênico. A liberação de glutamato, o conteúdo de cálcio citosólico e a exocitose foram avaliados no córtex utilizando terminações pré-sinápticas isoladas. AP18 não alterou a liberação de glutamato nos terminais pré-sinápticos estimulados com KCl (Kruskal-Wallis,  $p = 0,6858$ ; Figura 24 A), assim como a exocitose (Kruskal-Wallis,  $p = 0,7515$ ; Figura 24 C). Embora o bloqueador de TRPA1 não tenha alterado de forma estatisticamente significativa, houve uma tendência em aumentar a concentração de cálcio intrasinaptossomal (Kruskal-Wallis,  $p = 0,0537$ ; Figura 24 B).

Foram realizados grupos sem sinaptossomas e para estes, não foi observada diferença quanto a liberação de glutamato ou a concentração de cálcio citosólico, assim como para os grupos que não sofreram estímulo do KCl (Apêndice I).

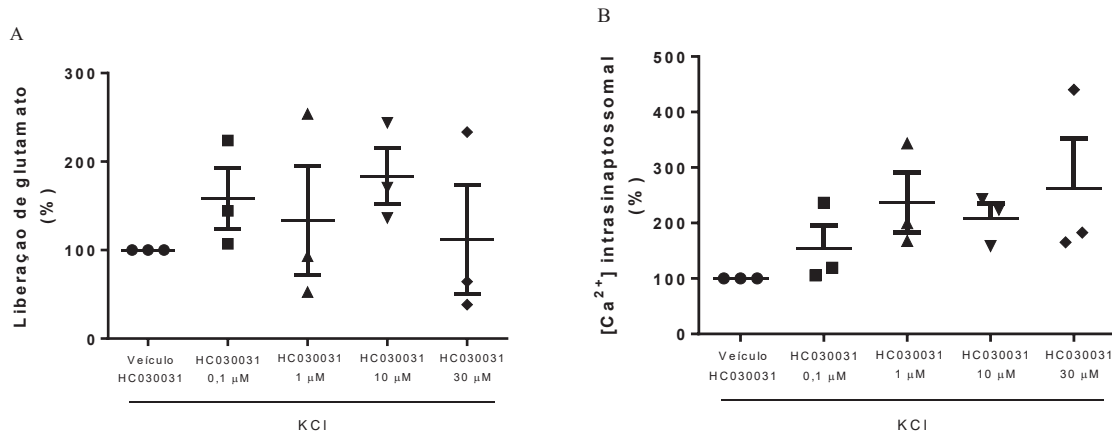


**Figura 24:** Análise da liberação de glutamato (A), do conteúdo de cálcio citosólico (B) e exocitose (C) de preparações de sinaptossomas obtidas do córtex de animais C57Bl/6 pré-tratadas com o AP18 (0,1; 1; 10 ou 30 μM) e estimuladas com KCl. Kruskal-Wallis,  $n = 3 - 4$ .

#### 4.11 HC030031 não altera a liberação de glutamato e o conteúdo de cálcio citosólico nos terminais pré-sinápticos corticais

A fim de corroborar os dados obtidos através da técnica de sinaptossoma, avaliamos a liberação de glutamato e a concentração e cálcio citosólico utilizando um outro bloqueador de TRPA1, o HC030031. Não foram observadas diferenças estatísticas com relação aos parâmetros avaliados para esse bloqueador (Kruskal-Wallis,  $p = 0,4713$ ; Figura 25 A e  $p = 0,0602$ ; Figura 25 B).

Preparações sem sinaptossomas não apresentaram diferença com relação a liberação de glutamato ou a concentração de cálcio citosólico (dados não mostrados). Os dados obtidos a partir das preparações de sinaptossomas corticais não mostraram uma diferença estatística dos parâmetros avaliados na ausência de KCl (Apêndice J).

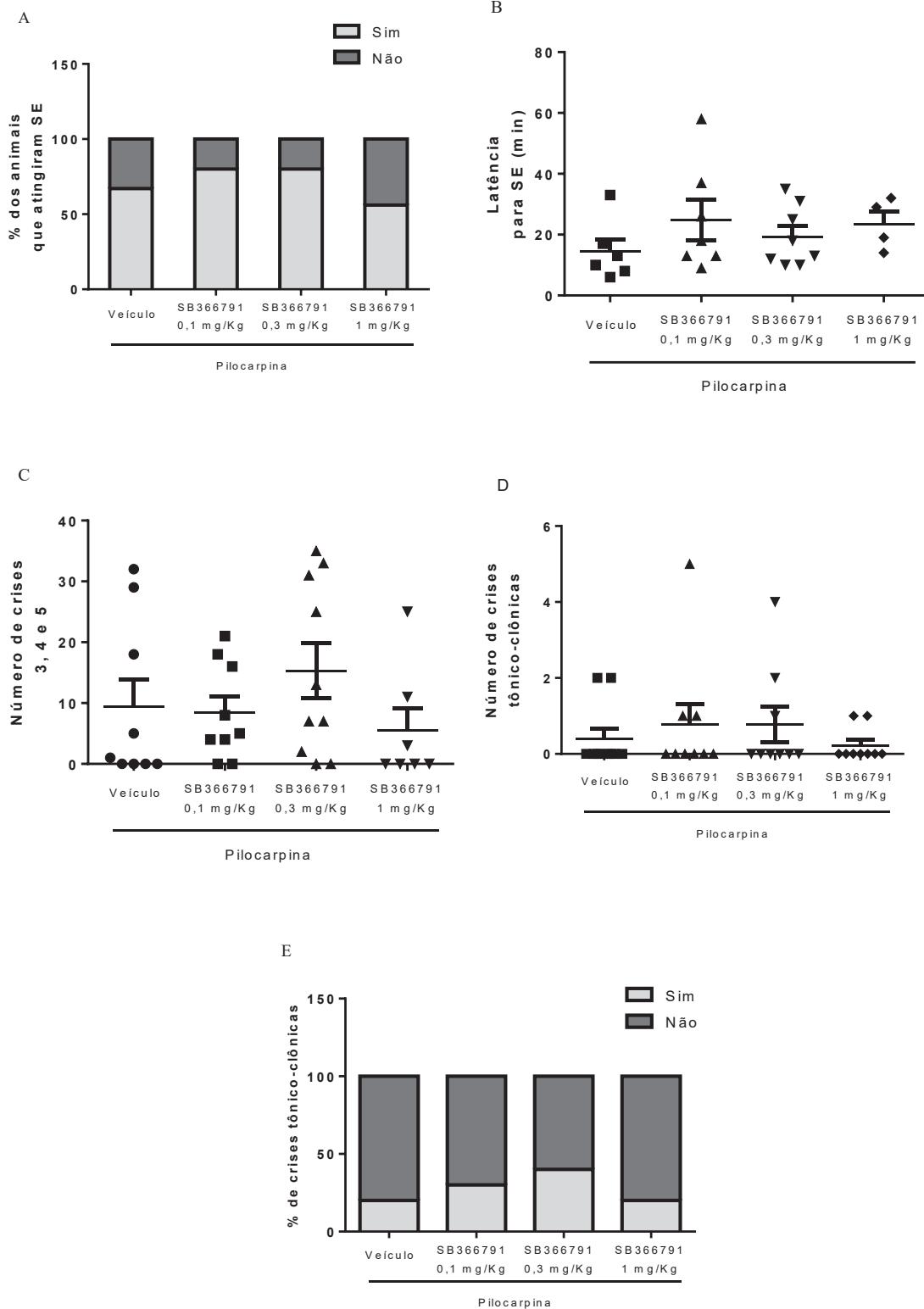


**Figura 25:** Análise da liberação de glutamato (A) e do conteúdo de cálcio citosólico (B) de preparações de sinaptossomas obtidas do córtex de animais C57Bl/6 pré-tratadas com o HC030031 (0,1; 1; 10 ou 30 μM) e estimuladas com KCl. Kruskal-Wallis, n = 3 - 4.

#### 4.12 Avaliação do efeito do SB366791 sobre as crises epilépticas induzidas pela administração intra-hipocampal de pilocarpina

Considerando os resultados obtidos com o bloqueador de TRPA1, somado ao fato de que outros receptores da família TRP também já demonstraram um papel na crise epiléptica e que ainda é controverso se TRPV1 tem papel neuroprotetor, seguimos avaliando os efeitos deste canal, utilizando o SB366791. A análise estatística de qui-quadrado revelou forte associação entre a administração de SB366791 e o desenvolvimento do SE ( $X^2(3)$  para associação entre desenvolvimento do SE e SB366791 = 19,46;  $p = 0,0002$ ). A frequência do SE nos grupos SB366791 0,1 e 0,3 mg/Kg foi maior que o grupo pilocarpina, entretanto isso não ocorreu com o grupo que recebeu SB366791 1 mg/Kg (Figura 26 A). Não houve diferença estatística em relação ao tempo que os animais levaram para atingir o SE. O grupo pilocarpina demorou, em média, 14,5 min, enquanto os grupos SB366791 0,1; 0,3 e 1 mg/Kg levaram 24,84; 19,25 e 23,5 min para atingir o SE, respectivamente (Kruskal-Wallis;  $p = 0,3035$ ; Figura 26 B). Não foi observada diferença estatística com relação ao somatório do número de crises 3, 4 e 5 (Kruskal-Wallis;  $p = 0,3175$ ; Figura 26 C). Os resultados referentes ao número de crises 3, 4 e 5 e tônico-

clônicas estão representados na tabela 2. Não houve diferença estatística entre os grupos com relação ao número de crises tônico-clônicas (Kruskal-Wallis;  $p = 0,8441$ ; Figura 26 D). A frequência de crises tônico-clônicas de camundongos que receberam 0,1 e 0,3 mg/Kg de SB366791 foi significativamente maior do que aqueles que receberam pilocarpina, cerca de 1,5 vezes maior ( $X^2 (3)$  para associação entre crises tônico-clônicas e SB366791 = 13,79;  $p = 0,0032$ ). O grupo SB366791 1 mg/Kg não foi estatisticamente diferente do grupo pilocarpina (Figura 26 E).



**Figura 26:** Efeito do SB366791 em crises epiléticas induzidas por injeção intra-hipocampal de pilocarpina. Foram avaliadas a frequência dos animais que atingiram o SE (A); a latência para atingir o SE,  $n = 5 - 8$  (B); o número de crises 3, 4 e 5,  $n = 9 - 10$  (C); o número de crises tônico-clônicas,  $n = 9 - 10$  (D); a frequência de crises tônico-clônicas (E). Kruskal-Wallis ou teste qui-quadrado.

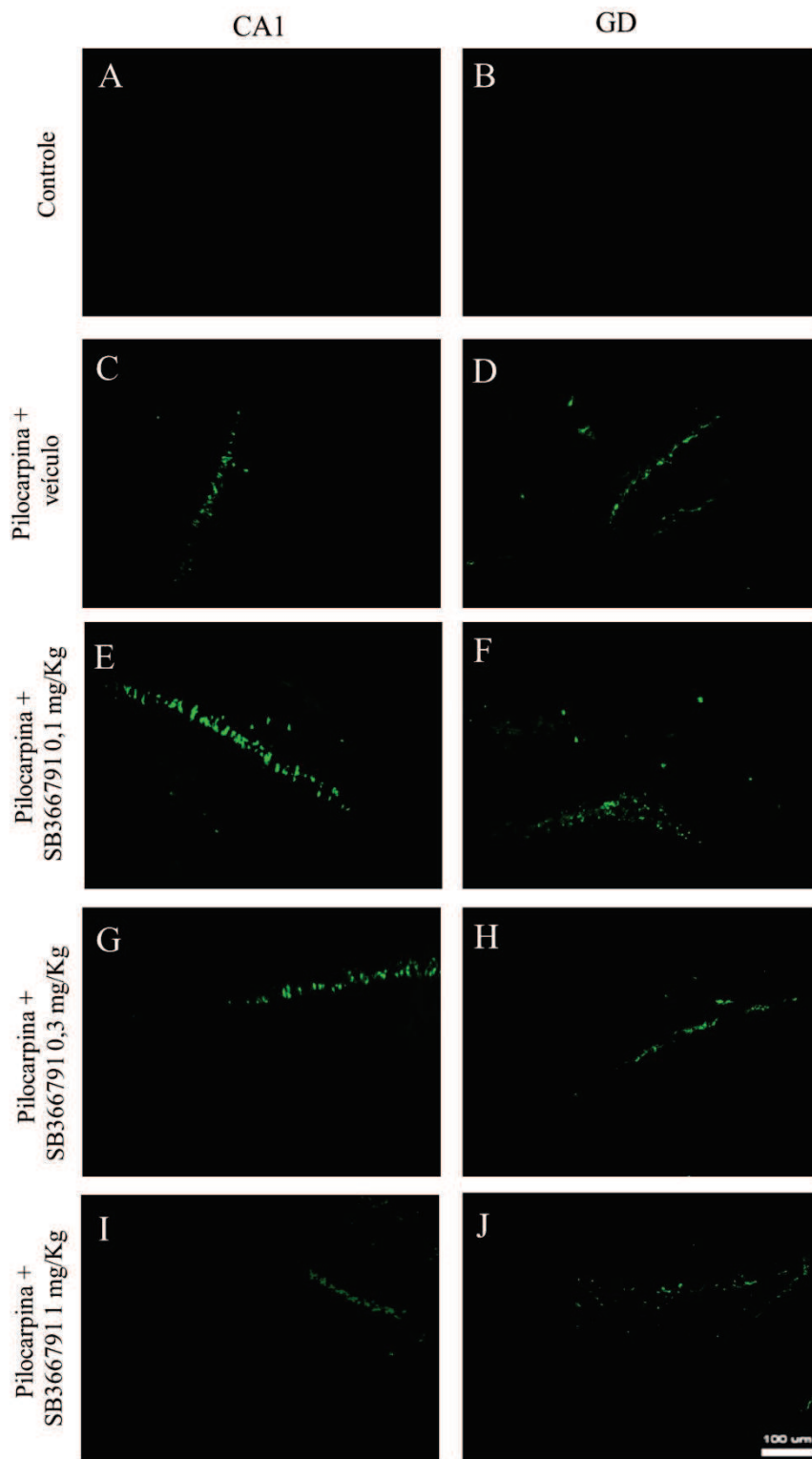
**Tabela 2:** Média do número de crises 3, 4 e 5 e tônico-clônicas em animais tratados com SB366791 ou veículo.

		<b>Crises 3, 4 e 5</b>	<b>p</b>	<b>Crises tônico-clônicas</b>	<b>p</b>
<b>Pilocarpina</b>	40 µg	9,444 ± 4,429	-	0,4000 ± 0,2667	-
	0,1 mg/Kg	8,444 ± 2,636	> 0,999	0,7778 ± 0,5472	> 0,999
<b>SB366791</b>	0,3 mg/kg	15,30 ± 4,509	> 0,999	0,7778 ± 0,4648	> 0,999
	1 mg/Kg	5,571 ± 3,578	> 0,999	0,2222 ± 0,1470	> 0,999

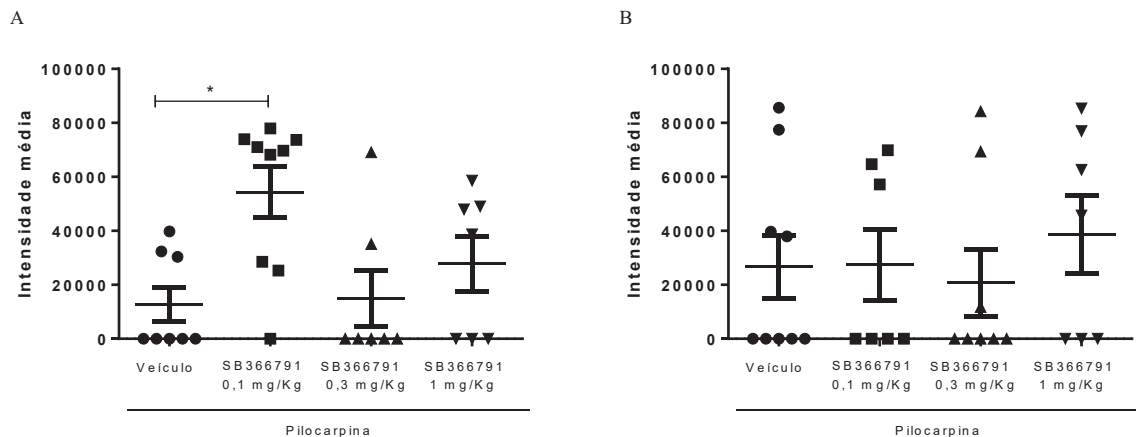
#### **4.13 SB366791 aumentou o processo de degeneração de neurônios na região CA1, mas não no GD do hipocampo**

Baseado nos resultados comportamentais observados com a injeção intra-hipocampal de pilocarpina, avaliamos o impacto do pré-tratamento com SB366791 sobre o processo neurodegenerativo no hipocampo. O efeito do bloqueador do canal TRPV1 sobre o processo de degeneração de neurônios hipocampais foi avaliado através da marcação com FJC, conforme imagem representativa (Figura 27).

Ao avaliar o processo de neurodegeneração hipocampal, observamos que SB366791 na dose de 0,1 mg/Kg aumentou a marcação com FJC em CA1 (Kruskal-Wallis;  $p = 0,0204$ ; Figura 28 A). SB366791 não alterou o processo de neurodegeneração no GD do hipocampo (Kruskal-Wallis;  $p = 0,8535$ ; Figura 28 B).



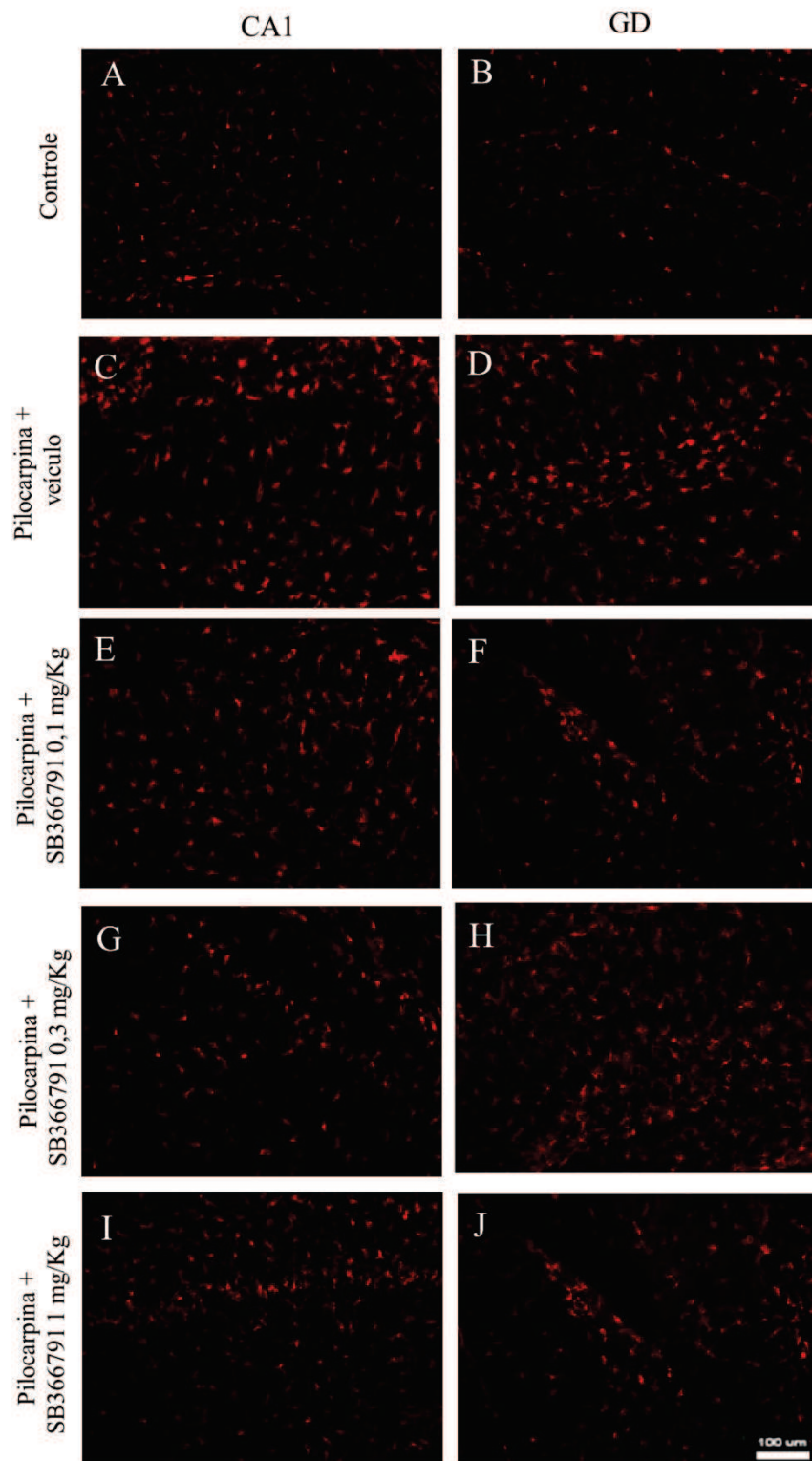
**Figura 27:** Imagens representativas do efeito do tratamento com SB366791 no processo de neurodegeneração hipocampal no aumento de 20x das regiões CA1 e GD do hipocampo. (A e B) veículo + veículo, (C e D) veículo + pilocarpina, (E e F) SB366791 0,1 mg/Kg + pilocarpina, (G e H) SB366791 0,3 mg/Kg + pilocarpina e (I e J) SB366791 1 mg/Kg + pilocarpina. Escala=100 µm.



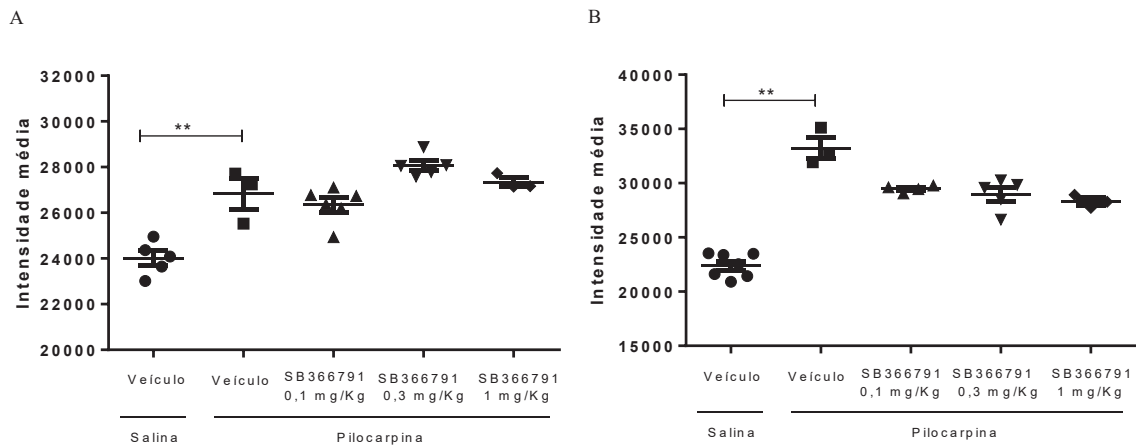
**Figura 28:** Efeito do tratamento com SB366791 na neurodegeneração hipocampal. Cortes cerebrais foram submetidos à coloração com fluoro jade C para avaliação da neurodegeneração nas regiões (A) CA1 e (B) GD do hipocampo. Kruskal-Wallis,  $n = 7 - 9$ ; \*  $p < 0,05$ , comparados com o grupo veículo.

#### 4.14 O estímulo com pilocarpina aumentou a microgliose, mas não o pré-tratamento com SB366791

A imagem representativa para a marcação de células Iba-1<sup>+</sup> é mostrada na Figura 29. Observou-se um aumento significativo da marcação de células Iba-1 positivas no grupo que recebeu pilocarpina quando comparado ao grupo veículo nas regiões CA1 (Kruskal-Wallis;  $p = 0,0014$ ; Figura 30 A) e GD do hipocampo (Kruskal-Wallis;  $p = 0,0013$ ; Figura 30 B). O pré-tratamento com SB366791 não alterou a marcação microglial nas duas regiões avaliadas (Figura 30).



**Figura 29:** Imagens representativas do efeito do tratamento com AP18 na marcação microglial com Iba-1 no aumento de 20x das regiões CA1 e GD do hipocampo. (A e B) veículo + veículo, (C e D) veículo + pilocarpina, (E e F) SB366791 0,1 mg/Kg + pilocarpina, (G e H) SB366791 0,3 mg/Kg + pilocarpina e (I e J) SB366791 1 mg/Kg + pilocarpina. Escala=100 µm.

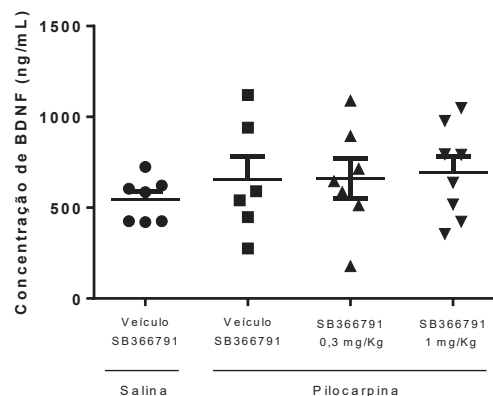


**Figura 30:** Efeito do SB366791 sobre a marcação microglial com Iba-1. Cortes cerebrais foram submetidos à coloração com Iba-1 para avaliação da micróglia nas regiões (A) CA1,  $n = 3 - 6$  e (B) GD,  $n = 3 - 8$ . Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. \*\*  $p < 0,01$ , comparados com o grupo veículo.

#### 4.15 SB366791 não alterou a concentração do fator neurotrófico BDNF no hipocampo 24 h após a injeção intra-hipocampal de pilocarpina

Para verificar o efeito do pré-tratamento com SB366791 sobre os níveis hipocampais de fatores neurotróficos após um insulto epileptogênico, os animais tiveram seus hipocampus dissecados 24 h após o SE induzido pela administração intra-hipocampal de pilocarpina, para posterior análise dos níveis do fator neurotrófico BDNF.

Não foi observada diferença estatística com relação à concentração de BDNF no hipocampo (ANOVA um critério,  $F_{(3, 24)} = 0,4727$ ;  $p = 0,7041$ ; Figura 31; Apêndice K).

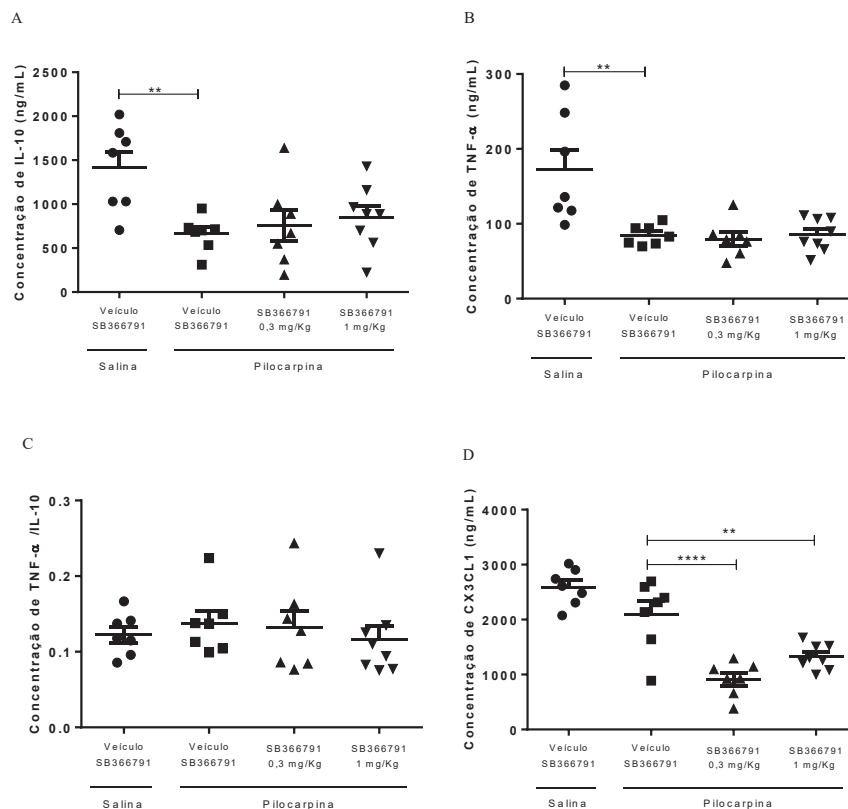


**Figura 31:** Efeito do SB366791 na concentração de BDNF no hipocampo de animais após a injeção de pilocarpina. ANOVA um critério,  $n = 7$ .

#### 4.16 SB366791 reduziu a concentração da quimiocina CX3CL1 no hipocampo 24 h após a injeção intra-hipocampal de pilocarpina

SB366791 não alterou a concentração das citocinas IL-10 (ANOVA um critério,  $F_{(3, 25)} = 5,001$ ;  $p = 0,0075$ ; Figura 32 A), TNF- $\alpha$  (ANOVA um critério,  $F_{(3, 25)} = 8,839$ ;  $p = 0,0004$ ; Figura 32 B), assim como a razão TNF- $\alpha$ / IL-10 (ANOVA um critério,  $F_{(3,25)} = 0,3116$ ;  $p = 0,8168$ ; Figura 32 C).

Por outro lado, SB366791 nas doses de 0,3 e 1 mg/Kg reduziram a concentração da quimiocina CX3CL1 em relação ao grupo pilocarpina (ANOVA um critério,  $F_{(3, 25)} = 25,02$ ;  $p < 0,0001$ ; Figura 32 F). SB366791 (0,3 mg/Kg) e SB366791 (0,1 e 0,3 mg/Kg) reduziram a concentração de TNF- $\alpha$  e de CX3CL1, respectivamente no hipocampo na ausência de pilocarpina (Apêndice L).

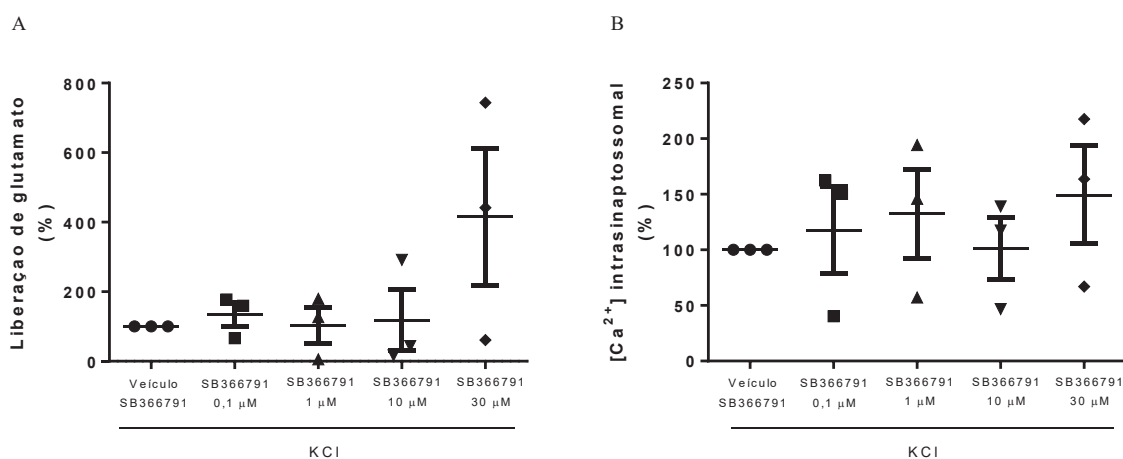


**Figura 32:** Efeito do SB366791 na concentração das citocinas no hipocampo de animais após a injeção de pilocarpina. Concentração de (A) IL-10, (B) TNF- $\alpha$ , (C) Razão entre TNF- $\alpha$  e IL-10, (D) CX3CL1. ANOVA um critério, seguido do pós-teste de Tukey,  $n = 7$ . \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; comparados com o grupo veículo.

#### 4.17 SB366791 não alterou a liberação de glutamato e o conteúdo de cálcio citosólico em preparações de sinaptossomas corticais

Considerando os resultados obtidos sobre a morte neuronal, avaliamos se o SB366791 poderia alterar a transmissão glutamatérgica. Nenhuma das doses de SB366791 utilizadas alteraram a liberação de glutamato em preparações sinaptossomais na presença de KCl (Kruskal-Wallis,  $p = 0,7399$ ; Figura 33 A). SB366791 em nenhuma das doses avaliadas foi capaz de alterar a concentração de cálcio intrasinaptossomal (Kruskal-Wallis;  $p = 0,7385$ ) (Figura 33 B).

Foram utilizadas preparações sem sinaptossomas as quais não apresentaram liberação de glutamato (dados não mostrados). Na ausência de KCl não há diferença estatística na liberação de glutamato e no conteúdo de cálcio citosólico quando comparada aos grupos que foram estimulados com KCl (Apêndice M).

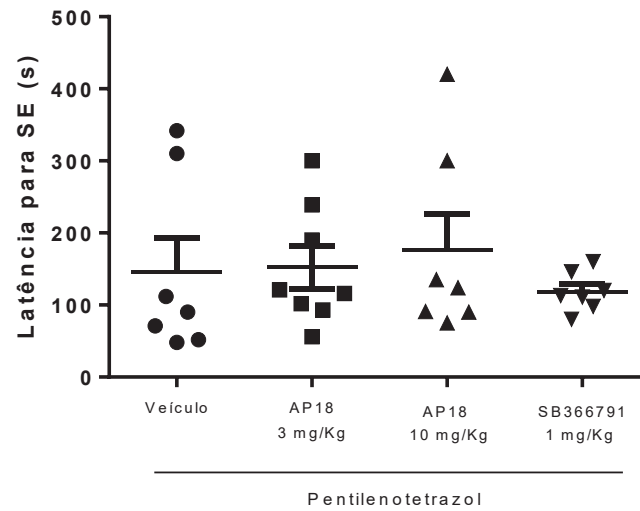


**Figura 33:** Análise da liberação de glutamato (A) e do conteúdo de cálcio citosólico (B) de preparações de sinaptossomas obtidas do córtex de animais C57Bl/6 pré-tratadas com o SB366791 (0,1; 1; 10 ou 30 μM), estimuladas com KCl. Kruskal-Wallis,  $n = 3$ .

#### 4.18 AP18 e SB366791 não alteraram a latência para o desenvolvimento do SE pela administração intraperitoneal de pentilenotetrazol

Com o objetivo de avaliar o efeito dos bloqueadores em um outro modelo de crise epiléptica, utilizamos como estímulo químico o PTZ, que induz crises epiléticas diminuindo a transmissão GABAérgica. Utilizando o PTZ por via intraperitoneal, avaliamos a latência para atingir o SE com os dois bloqueadores: AP18, nas doses de 3 e 10 mg/Kg e SB366791 na dose

de 1 mg/Kg. Não foi observada diferença na latência para SE dos animais que receberam AP18 ou SB366791 quando comparada à latência dos animais que receberam PTZ (Kruskal-Wallis,  $p = 0,7205$ ; Figura 34).



**Figura 34:** Efeito do AP18 (A) e do SB366791 (B) na latência para a primeira crise tônico-clônica no modelo de crises epiléticas induzidas por PTZ. Kruskal-Wallis,  $n = 7 - 8$ .

## 5 DISCUSSÃO

No presente trabalho investigamos o papel dos receptores TRPA1 e TRPV1 em dois modelos experimentais de crise epiléptica. Avaliamos também alguns eventos subsequentes às crises induzidas pela pilocarpina: o processo de neurodegeneração, a ativação microglial e astrocitária, os níveis de BDNF e de citocinas, assim como a expressão de Akt e Erk no hipocampo. Além disso, investigamos o efeito do bloqueio dos canais TRPV1 e TRPA1 na liberação de glutamato, na concentração citosólica de cálcio e na excitose no córtex de animais C57Bl/6.

O pré-tratamento com as menores doses de AP18 aumentou a quantidade das crises induzidas pela pilocarpina, que foi acompanhada pelo aumento da morte neuronal, microgliose, astrogliose e redução na liberação de citocinas pró-inflamatórias. A maior dose de AP18, entretanto, parece exercer um efeito protetor ao aumentar a latência para o desenvolvimento do SE. Esse efeito foi acompanhado pela redução da astrogliose, aumento da liberação da citocina pró-inflamatória IL-10 e, ainda essa dose foi capaz de impedir a redução de NeuN induzida pela pilocarpina. Por fim, o SB366791 também apresentou um efeito pró-convulsivante e foi capaz de aumentar o processo de neurodegeneração em CA1.

### 5.1 Efeito do bloqueador de TRPA1 em modelos de crises epilépticas induzidas por pilocarpina ou pentilenotetrazol

Crises epilépticas podem ocorrer como resultado do desequilíbrio entre a inibição e a excitação neuronal, levando à hiperexcitabilidade das populações neuronais (McNamara, 1999). Para entender melhor os mecanismos relacionados às crises epilépticas, modelos animais experimentais que mimetizam essas crises tornam-se úteis. No presente estudo, utilizamos o modelo de indução de crises epilépticas através da administração intra-hipocampal bilateral de pilocarpina em camundongos C57Bl/6, já utilizado por nosso grupo de pesquisa. Esse modelo mimetiza vários aspectos do tipo mais comum de epilepsia em adultos, a ELT humana: localização do foco das crises no sistema límbico, presença de um evento precipitante e esclerose hipocampal (Becker, 2018; Engel *et al.*, 2008). A pilocarpina é um estímulo químico comumente utilizado para investigar propriedades de potenciais drogas antiepilépticas e os mecanismos da epileptogênese (Curia *et al.*, 2008; Klitgaard *et al.*, 2003). No modelo de crises epilépticas induzidas por injeção intra-hipocampal pilocarpina, a ativação do sistema

colinérgico, via receptores muscarínicos M1, é responsável pelo início das crises enquanto a manutenção das crises ocorre através da ativação do receptor NMDA (Hamilton *et al.*, 1997).

Estudos têm mostrado que membros da família de receptores TRP estão envolvidas na patogênese das crises epiléticas, contribuindo para o início e a progressão das crises epiléticas em modelos animais (Sawamura *et al.*, 2017). Vilela e colaboradores (2017) mostraram que o efeito anticonvulsivante do canabidiol estava relacionado à ativação do canal TRPV1 no modelo de crise epilética induzida por PTZ. Outros estudos também mostraram o papel de receptores da família TRP na indução de crises epiléticas, incluindo o TRPA1 (Lin e Hsieh, 2014; Melom e Littleton, 2013), o TRPM7 (Aarts e Tymianski, 2005; Chen *et al.*, 2010; Heinemann *et al.*, 1977), o TRPC4 (von Spiczak *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2007) e o TRPC5 (Tai *et al.*, 2010). Além disso, já foi demonstrado que TRPA1 é expresso no hipocampo (Kheradpezhohu *et al.*, 2017; Koch *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2016; Shigetomi *et al.*, 2012), região crítica na epileptogênese (Huberfeld *et al.*, 2015).

No presente trabalho, observamos um aumento da latência para o SE com a maior dose de AP18, a qual foi acompanhada por uma tendência em reduzir as crises epiléticas, sugerindo um potencial efeito protetor. Por outro lado, também observamos que as menores doses de AP18 apresentaram um efeito pró-convulsivante, uma vez que aumentaram o número de crises epiléticas e a frequência de crises tônico-clônicas nos animais submetidos a injeção intra-hipocampal de pilocarpina. Entretanto, os dois estudos encontrados na literatura que relacionam o TRPA1 e as crises epiléticas relatam resultados opostos. Lin e Hsieh (2014) mostraram que os níveis da proteína TRPA1 aumentaram após a injeção de ácido caínico. Mais recentemente, foi demonstrado o efeito pró-convulsivante do trans-cinamaldeído, um agonista de TRPA1, que aumentou o número total de disparos no modelo de abrasamento induzido por PTZ. Ainda, mostraram que a dose do agonista de TRPA1 capaz de aumentar o número de disparos reduziu a latência para o primeiro espasmo mioclônico no modelo de PTZ (Günaydin *et al.*, 2020). O potencial efeito protetor de AP18 (10 mg/Kg) sobre as crises epiléticas induzidas por pilocarpina pode estar relacionada a outros mecanismos, como ação em outros tipos de receptores, que não incluem o canal TRPA1.

Utilizamos também um outro modelo de crises epiléticas induzido pelo PTZ. Não observamos nenhum efeito com relação à latência para o SE com as doses utilizadas de AP18, apesar de já ter sido mostrado o papel do canal TRPA1 em crises induzidas por PTZ (Günaydin *et al.*, 2020). Diferentemente desse artigo, nós avaliamos a latência após uma única dose do AP18 ser

administrada seguida de uma injeção de PTZ. No estudo de Günaydin e colaboradores (2020) os animais foram tratados por 14 dias, além do modelo de indução de crises utilizado ser diferente do presente trabalho.

Vários estudos já relataram a perda neuronal no hipocampo como uma das alterações pós-ictais (Pitkänen e Sutula, 2002), tanto em modelos que utilizaram ácido caínico (Nadler *et al.*, 1978; Shin *et al.*, 2007) quanto pilocarpina (Cavalheiro *et al.*, 1991; do Nascimento *et al.*, 2012; Lima *et al.*, 2016). O processo de neurodegeneração hipocampal foi observado após o pré-tratamento com as menores doses do AP18, as quais aumentaram a área marcada por FJC nas regiões avaliadas. Somado a isso, notamos que o AP18 reduziu a expressão de NeuN no hipocampo de camundongos em relação ao grupo pilocarpina. O aumento da marcação com FJC no hipocampo acompanhou essa redução na marcação com NeuN, sugerindo uma perda neuronal nesta região. Este fato pode estar relacionado à maior gravidade das crises epiléticas durante o SE apresentadas pelos animais que receberam as menores doses. Além disso, a maior perda neuronal em CA1 pode ser explicada pelo fato dessa região ser o local de implantação das cânulas e da injeção da pilocarpina.

Embora em nosso estudo o bloqueio de TRPA1 com AP18 tenha aumentado o processo de neurodegeneração e reduzido a viabilidade neuronal, Koch e colaboradores (2011) mostraram que o HC030031, um bloqueador de TRPA1, aumentou o efeito neuroprotetor de um canabinoide sintético sobre os neurônios em degeneração em culturas hipocampais organotípicas incubadas com NMDA. Outro trabalho mostrou que a deleção do receptor TRPA1 atenuou a neurotoxicidade induzida por amiloide beta (Payrits *et al.*, 2020).

Paradoxalmente aos resultados com as menores doses de AP18, observamos um aumento na marcação com NeuN com a maior dose desse bloqueador, o que pode estar relacionado a uma alteração na regulação da expressão da proteína NeuN. Pode ser que o AP18 tenha alterado a fosforilação dessa proteína, modificando a imunorreatividade de NeuN. A complexa regulação dessa proteína já foi relatada por

Buscando entender por que mecanismo o AP18 aumenta a morte de neurônios hipocampais, investigamos a fosforilação das proteínas Akt e Erk<sub>1/2</sub> 24 h após o estímulo com pilocarpina. As vias de sinalização da Akt e Erk<sub>1/2</sub> estão associadas à sobrevivência neuronal (Brunet *et al.*, 2001; Subramaniam e Unsicker, 2010; Zhu *et al.*, 2013). Além disso, já foi demonstrado que essa via pode ser regulada por TRPA1. Lee e colaboradores (2016) mostraram que a deleção

do canal TRPA1 aumentou a fosforilação de Akt em tecidos cerebrais de animais transgênicos em um modelo para a doença de Alzheimer. De forma semelhante, a ausência desse receptor aumentou a fosforilação de Erk<sub>1/2</sub> no modelo de desmielinização induzida por cuprizona (Bölcskei *et al.*, 2018; Sághy *et al.*, 2016). A proteína Akt está presente no citoplasma e uma vez ativada através de fosforilação, essa proteína migra para o núcleo, ativando vias de sobrevivência que previnem a apoptose (Brazil e Hemmings, 2001). As Erk são expressas abundantemente no sistema nervoso central e são ativadas em resposta a vários estímulos fisiológicos associados à atividade sináptica e plasticidade, e também durante eventos patológicos, como na epilepsia (Berkeley *et al.*, 2002; Merlo *et al.*, 2004; Nateri *et al.*, 2007; Otani *et al.*, 2003). Ainda, foi demonstrado que a via da Akt está inibida nas crises epiléticas e que sua ativação auxilia na sobrevivência neuronal (Chung *et al.*, 2007; Xue *et al.*, 2011). Apesar da associação dessas proteínas com as crises epiléticas em modelos animais induzidas por estímulos químicos (Otani *et al.*, 2003; Xue *et al.*, 2011), em nosso trabalho a pilocarpina e o pré-tratamento com AP18 não alteraram os níveis de fosforilação de Akt e Erk<sub>1/2</sub>. Alguns pontos relacionados a esses resultados podem estar associados ao modelo utilizado neste trabalho ou ainda, ao momento em que essas vias de sobrevivência foram avaliadas. Não sabemos em que momento essas vias são ativadas e, talvez no tempo avaliado de 24 h elas não estejam mais alteradas. Nesse contexto, estudos que utilizaram o modelo de pilocarpina, mostraram que a ativação da Akt no hipocampo ocorreu 5 dias após a indução do SE pela injeção intraperitoneal desse estímulo (Goto *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2012). Outro trabalho mostrou um aumento na ativação de Erk<sub>1/2</sub> no hipocampo 15 minutos e 1 hora após a injeção intraperitoneal de pilocarpina (Berkeley *et al.*, 2002). Esses trabalhos nos ajudam a explicar parcialmente nossos resultados, uma vez que não sabemos qual a relação temporal na ativação dessas vias pelo AP18.

Já é bem descrito na literatura que o BDNF, um membro bem conhecido da família das neurotrofinas, também desempenha um papel na sobrevivência e morte celular (Jiao *et al.*, 2014). Fatores de crescimento medeiam os eventos patológicos subsequentes à crise epilética, uma vez que têm papéis bem conhecidos na regulação da neurogênese, morte e reorganização da conectividade (Jankowsky e Patterson, 2001). Alguns trabalhos já mostraram a relação entre BDNF e crises epiléticas em animais e humanos (LaFrance *et al.*, 2010; Scharfman *et al.*, 2002). No presente trabalho, observamos uma redução dos níveis de BDNF em animais que receberam AP18 (1 e 3 mg/Kg) em comparação ao grupo pilocarpina.

Por outro lado, Günaydin e colaboradores (2020) observaram um aumento na expressão de BDNF no modelo de abrasamento induzido por PTZ, o qual foi potencializado na presença de um agonista de TRPA1, o trans-cinamaldeído. Foi demonstrado também que o BDNF liberado continuamente no hipocampo após insulto com pilocarpina reduz a frequência de crises generalizadas e reverte muitas alterações histológicas associadas à epilepsia crônica (Falcicchia *et al.*, 2018). Outras avaliações poderiam ser realizadas procurando explicar os mecanismos associados à morte neuronal, como avaliação de caspases ou outras proteínas envolvidas na sobrevivência celular.

Alguns trabalhos já relacionaram o importante papel do receptor TRPA1 na patogênese de doenças inflamatórias. Lee e colaboradores (2016) mostraram que o TRPA1 e a sinalização de cálcio têm papel crítico na regulação da inflamação desencadeada por amiloide beta e na progressão da doença de Alzheimer. Também foi demonstrado que o TRPA1 expresso em células de Schwann, mantêm a infiltração de macrófagos em nervo lesionado, sendo responsável em mediar a neuroinflamação na dor neuropática induzida em camundongos (De Logu *et al.*, 2017).

Uma característica importante que segue a morte neuronal é a ativação glial (Curia *et al.*, 2014). O Iba-1 é um marcador específico expresso em linhagem de células monocíticas e micróglia (Imai *et al.*, 1996). Sua localização e função, fazem com que seja considerado um marcador relevante de ativação microglial. Assim, avaliamos a microgliose no hipocampo após SE através da marcação com Iba-1. Foi observado um aumento na marcação microglial em CA1 e no GD do hipocampo nos animais que receberam pilocarpina. O aumento da microgliose em CA1 foi acompanhada por uma ativação microglial, revelada pelo aumento da marcação por CD68. Já foi demonstrado que a indução de SE pela pilocarpina é capaz de ativar a micróglia (Lima *et al.*, 2016; Schartz *et al.*, 2016; Shapiro *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2018).

Embora uma exacerbação da marcação microglial tenha sido observada com a dose de 3 mg/Kg de AP18 no GD, paradoxalmente os grupos que receberam as menores doses desse bloqueador apresentaram uma redução da intensidade média de fluorescência em CA1. Em consonância com os nossos achados em CA1, Meotti e colaboradores (2017) demonstraram que a deleção genética do receptor TRPA1 previne a ativação microglial no modelo de hiperalgia mecânica induzida pela bradicinina. Outro trabalho com animais knockouts para TRPA1 mostrou uma atenuação no acúmulo de micróglia no modelo de desmielinização induzido por cuprizona (Bölskei *et al.*, 2018). Normalmente, o aumento do processo de neurodegeneração está

associado a um aumento da marcação microglial, como ocorreu no GD. Entretanto, a redução da marcação microglial observada em CA1, pode estar relacionada a um papel do TRPA1 sobre o controle da ativação da micróglia (Böleskei *et al.*, 2018; Meotti *et al.*, 2017).

Ainda, apesar de não termos quantificado as alterações morfológicas da micróglia em nosso trabalho, é possível notar que essas células apresentam morfologia semelhantes àquela de células ativadas (Brockhaus *et al.*, 1996; Parakalan *et al.*, 2012), o que pode ser evidenciado pelo aspecto ameboide das células. Wyatt-Johnson e colaboradores (2017) mostraram que o SE induzido pela pilocarpina altera a morfologia das células microgliais no hipocampo de forma tempo-dependente. Células microgliais correspondem de 5 a 10% da composição celular do sistema nervoso central, sendo responsáveis pela resposta imune do cérebro, além de desempenharem importante papel na sobrevivência neuronal (Amor *et al.*, 2010; Frost e Schafer, 2016; Lawson *et al.*, 1990; Nayak *et al.*, 2014). Situações como estresse, estímulos químicos ou a presença de patógenos podem ativar a micróglia, alterando sua morfologia para um aspecto ameboide. Mudanças morfológicas na micróglia podem representar sua função específica, como fagocitose, vigilância sináptica no cérebro epiléptico e sua capacidade de liberar citocinas inflamatórias (Frank *et al.*, 2007; Nayak *et al.*, 2014).

De forma semelhante aos resultados obtidos com a análise de micróglia, também observamos uma exacerbação na intensidade média de fluorescência de astrócitos no GD de animais que receberam AP18 (3 mg/Kg) seguido de pilocarpina. Evidências fornecidas através de eletrofisiologia, silenciamento de RNA, sonda que detecta  $Ca^{2+}$  próximo à membrana e ferramentas farmacológicas sugeriram a expressão de TRPA1 em astrócitos (Shigetomi *et al.*, 2012).

O GFAP, um marcador de astrócitos, pode ser regulado positivamente em doenças associadas a um estado inflamatório reativo astrocitário (Siracusa *et al.*, 2019). Essas células têm papel importante na excitabilidade neuronal e na transmissão sináptica, uma vez que regulam íons extracelulares (Kofuji e Newman 2004; Olsen e Sontheimer 2008) e fornecem glutamina para os neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos, precursora indispensável para a produção e liberação de neurotransmissores (Hertz *et al.*, 1999). A reatividade está associada a alterações morfológicas e funcionais dos astrócitos, como na epilepsia, em que essas células perdem a capacidade de desempenhar funções importantes de homeostase (Robel *et al.*, 2015). Altas concentrações extracelulares de  $K^+$  e glutamato resultantes de uma falha nas funções homeostáticas astrocitárias, pode ser consequência da regulação negativa de transportadores e

canais iônicos, atividade reduzida de glutamina sintetase, enzima que limita a captação de glutamato e afeta a produção de GABA, resultando em uma perda de inibição e aumento do impulso excitatório (Eid *et al.*, 2004; Robel e Sontheimer, 2016; Schousboe *et al.*, 2014).

Enquanto a dose intermediária aumentou a astrogliose no GD, AP18 (1 e 10 mg/Kg) reduziram a reatividade astrocitária nesta região. Em CA1, não observamos uma diferença estatística com relação a reatividade de astrócitos, embora haja uma clara tendência à redução com AP18 (3 mg/Kg) comparado com o grupo pilocarpina. Algumas diferenças observadas neste trabalho com relação à ativação diferencial das células da glia em regiões hipocâmpais avaliadas pode ser explicada pelas diferentes funções apresentadas pelas células de CA1 e do GD. A explicação mais lógica pode estar relacionada à importante função neurogênica das células granulares do GD na formação hipocâmpal. O GD é uma das poucas áreas do cérebro com capacidade ativa de neurogênese na idade adulta (Alkadhi, 2019; Lee *et al.*, 2009; Yamashima *et al.*, 2004). De forma semelhante aos nossos achados, Bosson e colaboradores (2017) mostraram que a maior reatividade astrocitária induzida por oligômeros de amiloide beta foi restaurada aos níveis basais em CA1 do hipocampo, na presença de HC030031 (bloqueador de TRPA1). Shigetomi e colaboradores (2012) mostraram que na região CA1 do hipocampo de camundongos, TRPA1 foi detectado apenas em astrócitos e que esse canal é a fonte de  $Ca^{2+}$  que regula as sinapses inibitórias. O bloqueio de TRPA1 reduziu as concentrações de  $Ca^{2+}$  nos astrócitos e, conseqüentemente diminuiu o transporte de GABA, resultando em conteúdo extracelular elevado desse neurotransmissor, que dessensibiliza os receptores  $GABA_A$  e diminui as correntes sinápticas inibitórias (Shigetomi *et al.*, 2012). Pode-se inferir que a maior concentração de GABA na fenda sináptica, pelo bloqueio de TRPA1, leva a uma dessensibilização dos receptores  $GABA_A$ , que por fim leva a um aumento dos disparos no neurônio pós-sináptico. Assim, a possível alteração funcional associada à reatividade astrocitária observada no hipocampo de animais que receberam AP18 pode estar relacionada às alterações pós-ictais, como a morte neuronal. Kang e colaboradores (2006) mostraram que as respostas dos astrócitos e da micróglia às crises induzidas pela pilocarpina no GD precedem o dano neuronal e estão relacionadas à neurotransmissão anormal. Assim, os diferentes padrões de resposta de células da glia após as crises induzidas por pilocarpina podem estar relacionados ao seu papel prejudicial na neuroinflamação pós- crise (Shapiro *et al.*, 2008).

A reatividade exacerbada da glia pode causar inflamação excessiva, morte neuronal e danos aos tecidos. Sugere-se que os astrócitos reativos possam assumir fenótipos neuroprotetores ou

neurotóxicos distintos, explicando o papel dual da glia reativa na fisiopatologia do sistema nervoso central (Liddelow *et al.*, 2017). Após uma crise epiléptica, os astrócitos e também a micróglia se tornam mais reativos, secretando quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento, tanto em humanos quanto em modelos animais (Robel e Sontheimer, 2016; Roseti *et al.*, 2013; Shapiro *et al.*, 2008). Uma técnica que é rotineiramente usada na detecção e na quantificação desses mediadores é o ensaio imunoenzimático indireto- ELISA (Chiswick *et al.*, 2012). Assim, em nosso trabalho utilizamos essa técnica para avaliar as citocinas IL-10, TNF- $\alpha$  e a quimiocina CX3CL1.

Descobertas originalmente no sistema imunológico, as citocinas são proteínas expressas por neurônios e glia. As citocinas são ativadas durante o desenvolvimento neural, bem como no sistema nervoso adulto, tanto durante a função normal quanto em condições patológicas (Mehler e Kessler, 1999; Rothwell, 1999). Além disso, um trabalho relacionou uma série de citocinas à patologia hipocampal relacionada a crises epiléticas (Jankowsky e Patterson, 2001).

A IL-10, uma das principais citocinas anti-inflamatórias, apresenta receptores em todas as populações de células gliais cerebrais (Mizuno *et al.*, 1994; Molina-Holgado *et al.*, 2001), enquanto a estimulação desses receptores por IL-10 promove a sobrevivência tanto de células gliais (Molina-Holgado *et al.*, 2001; Strle *et al.*, 2001; 2002) quanto de neurônios (Bachis *et al.*, 2001). Poucos dados relacionam os efeitos da IL-10 nos mecanismos de atividade epilética no cérebro, o que pode estar relacionado ao fato de que essa citocina pode ativar ou inibir diferentes sistemas de sinalização que regulam a resposta imune, a reação inflamatória e a proliferação ou sobrevivência celular (Strle *et al.*, 2001). Assim, dependendo de sua concentração e do estado funcional do tecido, a IL-10 pode ter efeitos protetores ou patológicos na função cerebral. No presente trabalho o pré-tratamento com AP18 (10 mg/Kg) aumentou os níveis de IL-10 em comparação ao grupo pilocarpina. Pode-se sugerir um papel neuroprotetor dessa citocina, uma vez que o AP18 (10 mg/Kg) impediu o processo neurodegenerativo em CA1 e no GD.

Citocinas inflamatórias clássicas, como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, ao ativar seus receptores nas células-alvo, induzem respostas que diferem dependendo do tipo de célula, e frequentemente geram resultados fisiopatológicos divergentes. No sistema nervoso, as citocinas têm funções fisiológicas que incluem neurogênese, sobrevivência neuronal, além de regular a

transmissão e a plasticidade sináptica (Marin e Kipnis, 2013). Mas, a superprodução e liberação exagerada de citocinas, ou sua presença prolongada no tecido, está associada com disfunções neuronais, conforme já descrito para a epilepsia (Devinsky *et al.*, 2013; Vezzani *et al.*, 2001).

Várias linhas de pesquisa evidenciam um papel do TNF- $\alpha$  em crises epiléticas (Billeter *et al.*, 2015; de Bock *et al.*, 1996; Zheng *et al.*, 2015). Essa citocina tem atraído atenção no campo da neurociência pela sua contribuição na perda celular em várias condições neuropatológicas, como isquemia, trauma e excitotoxicidade (Lenzlinger *et al.*, 2001; Sriram e O'Callaghan, 2007). Além dos efeitos sobre a viabilidade celular, o TNF- $\alpha$  possui propriedades neuromodulatórias, promovendo, assim, mudanças rápidas na excitabilidade neuronal (Pickering e O'Connor, 2007).

No presente trabalho, os níveis de TNF- $\alpha$  apresentaram-se reduzidos no grupo pilocarpina comparado ao grupo controle. Já foi mostrada uma diminuição da concentração dessa citocina no córtex piriforme e hipocampo 24 h após SE e um aumento significativo da concentração no hipocampo 5 dias após SE induzido pelo mesmo estímulo (Arisi *et al.*, 2015). Por outro lado, Gouveia e colaboradores (2014) notaram um aumento na expressão de TNF- $\alpha$  com pilocarpina. Uma diferença com relação ao nosso trabalho é que administramos a pilocarpina no hipocampo, enquanto os trabalhos descritos utilizaram esse estímulo por via sistêmica. O AP18 (10 mg/Kg) reduziu os níveis de TNF- $\alpha$  no hipocampo em relação ao grupo pilocarpina. Apesar da principal fonte dessa citocina ser a micróglia, a marcação dessas células não se alterou com AP18 (10 mg/Kg) em relação ao grupo pilocarpina. Entretanto, a redução dos níveis de TNF- $\alpha$  no hipocampo pode estar relacionada ao aumento de IL-10 observado. Essas alterações podem ter ajudado a evitar o processo neurodegenerativo induzido pela pilocarpina.

A quimiocina fractalquina / CX3CL1 tem importante função na modulação da excitabilidade neuronal: sua sinalização afeta as correntes glutamatérgicas mediadas por AMPA (Limatola *et al.*, 2005; Ragozzino *et al.*, 2006), e modula eventos de plasticidade sináptica de longo prazo (Bertollini *et al.*, 2006; Maggi *et al.*, 2009) e também modula as correntes GABAérgicas, mediando um aumento na atividade pós-sináptica do GABA (Heinisch & Kirby, 2009). Estudos recentes indicam que as quimiocinas e seus receptores também são produzidos por células cerebrais e estão envolvidos em vários distúrbios neurológicos, incluindo epilepsia (Cerri *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2012). Rosetti e colaboradores (2013) mostraram que CX3CL1 modula as correntes GABAérgicas no cérebro de pacientes com epilepsia e que a expressão do receptor dessa quimiocina estava aumentada na micróglia no hipocampo de pacientes com ELT.

Também foi demonstrado uma regulação positiva da expressão de CX3CL1 no neocórtex temporal de pacientes com ELT (Xu *et al.*, 2012). Entretanto, observamos uma redução nos níveis de CX3CL1 no hipocampo com AP18. No sistema nervoso central, essa quimiocina é expressa nas células neuronais, e se liga e ativa o seu receptor, CX3CR1, expresso predominante na micróglia (Hatori *et al.*, 2002; Limatola e Ransohoff, 2014; Sheridan e Murphy, 2013). Assim, o aumento dos neurônios em processo de degeneração observado em nosso trabalho pode explicar a redução da concentração da quimiocina CX3CL1 no hipocampo.

## **5.2 Efeitos do bloqueador de TRPV1 em modelos de crises epiléticas induzidas por pilocarpina ou pentilenotetrazol**

Além de possuírem semelhanças estruturais, TRPA1 e TRPV1 são ambos expressos em muitos locais neuronais e não neuronais (Fernandes *et al.*, 2012). TRPV1 tem importante função para vários processos fundamentais, incluindo a modulação da transmissão sináptica e sua plasticidade, comunicação micróglia-neurônio e desenvolvimento. Assim, é fácil entender que o TRPV1 esteja envolvido em vários transtornos neurológicos, como na epilepsia (Edwards, 2014). Além disso, já foi demonstrado que a expressão de TRPV1 estava aumentada no GD de camundongos após SE induzido por pilocarpina (Bhaskaran e Smith, 2010) e no córtex e hipocampo de pacientes com ELT mesial (Sun *et al.*, 2013). Dessa forma, após a avaliação dos efeitos do bloqueador de TRPA1, partimos para os estudos com o SB366791, bloqueador do canal TRPV1.

O bloqueador de TRPV1 aumentou o percentual dos animais que desenvolveram crises epiléticas no modelo de pilocarpina. Utilizamos também o modelo de crise epilética induzido por outro estímulo químico, o PTZ. Entretanto, não observamos nenhum efeito com relação à latência para o SE com as doses utilizadas de SB366791, apesar de outros estudos terem mostrado o papel desses canais em crises induzidas por PTZ (Günaydın *et al.*, 2020; Manna e Umathe, 2012; Vilela *et al.*, 2017).

Grande parte dos estudos publicados mostraram um efeito anticonvulsivante relacionado ao bloqueio de TRPV1, com a capsazepina e a piperina, em modelos utilizando eletrochoque e PTZ (Chen *et al.*, 2013; Jia *et al.*, 2015; Manna e Umathe, 2012), e em modelos genéticos de epilepsia (Cho *et al.*, 2018). O efeito pró-convulsivante já foi demonstrado com um agonista de TRPV1, OLDA, o qual acelerou a incidência de todos os estágios de crises induzidas pelo abrasamento com PTZ (Shirazi *et al.*, 2014). Entretanto, Suemaru e colaboradores (2018)

demonstraram, uma ação anticonvulsivante do acetaminofeno, um ativador de TRPV1, no modelo de crise induzida por PTZ, sendo que esse efeito foi revertido pela capsazepina e pelo AMG9810, dois bloqueadores de TRPV1. De modo semelhante, a capsaicina, um agonista do TRPV1, suprimiu as crises induzidas pelo ácido cáinico e por PTZ (Abdel-Salam *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2011). Nesse sentido, é possível que o efeito do SB366791 possa ser explicado através da atuação em outros receptores e não somente via TRPV1. Ainda, enquanto os artigos citados administraram as drogas por via intracerebroventricular, em nosso trabalho utilizamos a via sistêmica. As doses que utilizamos neste experimento foram baseadas nos experimentos com pilocarpina, o que pode explicar também a não concordância com os nossos achados com os dados da literatura.

Vários estudos têm relacionado o papel de TRPV1 na neurodegeneração. A capsaicina, um agonista de TRPV1, induz apoptose em culturas neuronais mesencefálicas (Kim *et al.*, 2005) e em células ganglionares da retina (Sappington *et al.*, 2009). A morte de neurônios dopaminérgicos causada pela capsaicina, um agonista de TRPV1, pode ser reduzida por injeções de capsazepina, um antagonista deste receptor (Kim *et al.*, 2005). No presente trabalho, todos os grupos que receberam pilocarpina apresentaram marcação para FJC, evidenciando um processo de neurodegeneração em curso, apesar de não termos observado diferença estatística no GD do hipocampo. Em CA1, apenas a menor dose do SB366791 aumentou a marcação por FJC. Considerando que a pilocarpina é injetada em CA1, é razoável inferir que o aumento no processo de neurodegeneração com SB366791 (0,1 mg/Kg) seja mais evidente nesta região. Ainda, pode-se sugerir que esse aumento está de acordo com a tendência apresentada por essa dose em aumentar as crises tipo 5.

O canal TRPV1 também é expresso em áreas como o córtex cerebral, hipocampo e substância negra em corpos celulares neuronais e dendritos, na micróglia e nos astrócitos (Annunziato *et al.*, 2013; Mezey *et al.*, 2000; Starowicz *et al.*, 2008; Steenland *et al.*, 2006). Embora a pilocarpina tenha aumentado a microgliose no hipocampo, o pré-tratamento com SB366791 não alterou esse parâmetro. O papel do canal TRPV1 já foi associado à inflamação. Marrone e colaboradores (2017) mostraram que o TRPV1 expresso na micróglia tem papel na detecção de estímulos nocivos e na comunicação neuronal no modelo de dor neuropática em camundongos. A ativação do canal TRPV1 na micróglia com capsaicina na substância negra aumentou a concentração de cálcio intracelular e resultou no aumento da imunorreatividade à caspase-3 clivada, induzindo a morte da micróglia por apoptose ou autofagia (Kim *et al.*, 2006). O TRPV1

também está envolvido na geração de espécies reativas de oxigênio mediada pela NADPH oxidase na micróglia (Schilling e Eder, 2009, 2010). A ativação de TRPV1 aumentou a expressão de citocinas pró-inflamatórias na micróglia em camundongos com crise febril (Huang *et al.*, 2015). Alguns trabalhos com cultura de micróglia e linhagens de células microgliais mostraram que o TRPV1 é funcionalmente expresso nesse tipo celular e, quando ativado, provoca morte da micróglia, fagocitose, migração celular, produção de citocinas e geração de espécies reativas de oxigênio (Hassan *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2006; Miyake *et al.*, 2015; Sappington e Calkins, 2008; Schilling e Eder, 2009). Apesar do volume de trabalhos relacionando à importância de TRPV1 no sistema imune e na epilepsia, o SB366791 não alterou a marcação de micróglia com Iba-1. Embora esse bloqueador tenha aumentado o processo neurodegenerativo em CA1, ele parece controlar a ativação microglial.

A ativação do TRPV1 na micróglia promove a liberação de fatores pró-inflamatórios, que têm função relevante na etiologia das crises epiléticas (Marrone *et al.*, 2017; Robel e Sontheimer, 2016). A glia reativa libera citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e outras moléculas para atenuar ou prevenir o dano cerebral devido ao insulto, controlando a inflamação, removendo detritos e induzindo a plasticidade sináptica e a remodelação do tecido (Liddelow *et al.*, 2017; Patel *et al.*, 2019).

Não observamos qualquer alteração nos níveis de BDNF em nossa avaliação. Entretanto, Amada e colaboradores (2013) mostraram que o estímulo com PTZ aumentou a expressão do RNAm de BDNF no hipocampo, a qual foi suprimida pela canabidivarina, que ativa TRPV1. Anandamida, em altas concentrações, ativa TRPV1 e foi capaz de aumentar a fosforilação do receptor de BDNF, que foi bloqueada pelo pré-tratamento com o antagonista capsazepina (Diniz *et al.*, 2019).

Com relação à citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  e a citocina anti-inflamatória, IL-10, não foi observada diferença em seus níveis através do pré-tratamento com SB366791, embora a pilocarpina tenha reduzido os níveis de ambas em relação ao grupo controle. Alguns estudos já relacionaram TRPV1 à liberação de citocinas inflamatórias, mas nenhum relacionando a crises epiléticas induzidas por pilocarpina ou ao bloqueador SB366791. A ativação de TRPV1 resultou em uma elevação significativa na expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) no hipocampo e córtex em modelo de crise epilética febril (Huang *et al.*, 2015). Em modelos de isquemia, o TRPV1 promoveu a ativação de astrócitos, os quais aumentaram a liberação de IL-1 $\beta$  (Yang *et al.*, 2019). Já a deleção do receptor TRPV1 reduziu a produção das

citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  em um modelo de isquemia privação de oxigênio e glicose (Wang *et al.*, 2019). Com relação à citocina IL-10, sua liberação por monócitos foi suprimida após 24 h através da ativação de TRPV1 (Billeter *et al.*, 2015). Talvez se nós tivéssemos avaliado outras citocinas em nosso modelo, poderíamos ter observado alguma alteração, como foi já descrito em outros trabalhos.

SB366791, nas doses de 0,3 e 1 mg/Kg, entretanto, reduziu os níveis da quimiocina CX3CL1 no hipocampo após 24 h do estímulo com pilocarpina. Até o momento, nenhum estudo relacionou o papel de TRPV1 com essa quimiocina. Considerando o papel de CX3CL1 na excitabilidade neuronal e sua produção por células neuronais, é provável que a diminuição dos níveis dessa quimiocina estejam relacionadas ao aumento do processo de neurodegeneração observado com o SB366791.

### **5.3 Efeitos dos bloqueadores de TRPA1 e TRPV1 na liberação de glutamato, na concentração de cálcio citosólico e na excitose em sinaptossomas corticais**

O nosso interesse em explorar os mecanismos pelos quais os bloqueadores aumentam as crises e a morte neuronal nos motivou a investigar o efeito dessas drogas sobre processos relacionados a neurotransmissão em preparações de sinaptossomas. Essas terminações nervosas isoladas têm sido um modelo utilizado para estudar os mecanismos moleculares da função sináptica no cérebro. O uso de ferramentas farmacológicas para manipular canais iônicos e receptores através da utilização de sinaptossomas ajudam a definir as vias de sinalização que regulam a neurotransmissão (Evans, 2015).

Estudos já mostraram que um aumento da transmissão glutamatérgica está associada às crises epiléticas e à epilepsia (Barker-Haliski e White 2015; Eid *et al.*, 2016). Klafke e colaboradores (2012) já mostraram a participação de TRPA1 na neurotransmissão glutamatérgica. Utilizando sinaptossomas obtidos da medula espinhal de ratos, foi observada uma rápida liberação de glutamato na presença do agonista de TRPA1, cinamaldeído. Por outro lado, um estudo mostrou que a capsaicina inibiu a liberação de glutamato através da ativação de TRPV1 em preparações de sinaptossomas hipocampais (Lu *et al.*, 2017).

A liberação de glutamato pelas vesículas sinápticas é dependente de despolarização da membrana plasmática e de aumento de cálcio intracelular (Nicholls, 1989). Rossato e colaboradores (2011) mostraram que os bloqueadores do TRPV1, incluindo o SB366791 e a

capsazepina, inibiram o influxo de cálcio gerado pela capsaicina em preparações de sinaptossomas da medula espinhal de ratos. De maneira semelhante, a ativação do TRPA1 aumentou o influxo de cálcio em preparações sinaptossomais de medula espinhal de camundongos, o qual foi reduzido por HC030031, um bloqueador desse canal (Fialho *et al.*, 2020).

Uma vez que o AP18, o HC030031 e o SB366791 não alteraram a liberação de glutamato, fica evidente que a concentração de cálcio intrasinaptossomal também não seja alterada. E como os níveis de cálcio citosólico permaneceram inalterados na presença de AP18, a excitose também não sofreu modificação. Apesar dos estudos existentes e das diferentes concentrações utilizadas, pode ser que outros canais sejam mais relevantes neste contexto, sobrepondo os efeitos desses bloqueadores. Assim, é possível sugerir que os canais TRPA1 e TRPV1 tenham papéis distintos sobre os parâmetros avaliados em diferentes modelos e em regiões do sistema nervoso central.

## 6 CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou que os receptores TRPA1 e TRPV1 estão envolvidos no controle das crises epiléticas e nos eventos pós-ictais induzidos pela pilocarpina em camundongos. Um efeito pró-convulsivante foi associado ao SB366791 e às menores doses do AP18, sendo o bloqueio dos canais TRPA1 e TRPV1 críticos no desenvolvimento da crise epilética. Por outro lado, a maior dose de AP18 aumentou a latência dos animais para atingir o *status epilepticus*, sugerindo um potencial efeito anticonvulsivante. A avaliação dos bloqueadores de TRPA1 e TRPV1 também foi realizada utilizando um outro modelo de crise epilética, induzido por pentilenotetrazol. Esses receptores parecem não estar envolvidos nas crises induzidas por esse estímulo químico.

Apesar dos estudos envolvendo os receptores TRPV1 e TRPA1 nas crises epiléticas e das contribuições do presente trabalho, ainda existem controvérsias sobre os papéis desses canais nessas condições. Dessa forma, faz-se necessário a realização de novos estudos para buscar mecanismos pelos quais os bloqueadores dos canais TRPV1 e TRPA1 facilitam as crises epiléticas nos animais utilizando o modelo de pilocarpina, além de investigar o papel desses receptores nos eventos pós-ictais, na epilepsia, bem como avaliar a neurodegeneração e a ativação de células da glia em outras regiões cerebrais.

## REFERÊNCIAS

- Aarts MM, Tymianski M. TRPMs and neuronal cell death. *Pflugers Arch*. 2005, 451 (1): 243-249.
- Abdel-Salam OME, Sleem AA, Sayed MAEBM, Youness ER, Shaffie N. capsaicin exerts anti-convulsant and neuroprotective effects in pentylenetetrazole-induced seizures. *Neurochem Res*. 2020, 45: 1062-1063.
- Adapala R, Minasyan A, Kanugula AK, Cappelli HC, Paruchuri S, Meszaros GJ, Thodeti CK. Targeting TRPV4 channels protects heart from pathological remodeling following myocardial infarction. *Circulation*. 2018, 136: A24061.
- Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol*. 2005, 5: 629-640.
- Ali I, Chugh D, Ekdahl CT. Role of fractalkine-CX3CR1 pathway in seizure-induced microglial activation, neurodegeneration, and neuroblast production in the adult rat brain. *Neurobiol Dis*. 2015, 74: 194-203.
- Alkadhi KA. Cellular and molecular differences between area CA1 and the dentate gyrus of the hippocampus. *Mol Neurobiol*. 2019, 56(9): 6566-6580.
- Allone C, Lo Buono V, Corallo F, Pisani L, Pollicino P, Bramanti P, Marino S. *J Neurol Sci*. 2017, 381: 7-15.
- Alyu F, Dikmen M. Inflammatory aspects of epileptogenesis: contribution of molecular inflammatory mechanisms. *Acta Neuropsychiatr*. 2017, 29(1): 1-16.
- Amada N, Yamasaki Y, Williams CM, Whalley BJ. Cannabidiol (CBD) suppresses pentylenetetrazole (PTZ)-induced increases in epilepsy-related gene expression. *PeerJ*. 2013, 1: e214.
- Amor S, Puentes F, Baker D, Van Der Valk P. Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology*. 2010, 129(2): 154-169.
- Andrade EL, Meotti FC, Calixto JB. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. *Pharmacol Ther*. 2012, 133:189-204.
- Andrei SR, Ghosh M, Sinharoy P, Damron DS. Stimulation of TRPA1 attenuates cell death induced by cardiomyocyte ischemia through a mechanism mediated by eNOS. *Canais (Austin)*. 2019, 13 (1): 192-206.
- Annunziato L, Boscia F, Pignataro G. Ionic transporter activity in astrocytes, microglia, and oligodendrocytes during brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2013, 33(7): 969-982.
- Arain FM, Boyd KL, Gallagher MJ. Decreased viability and absence-like epilepsy in mice lacking or deficient in the GABA<sub>A</sub> receptor alpha1 subunit. *Epilepsia*. 2012; 53: e161-165.

Arisi GM, Foresti ML, Katki K, Shapiro LA. Increased CCL2, CCL3, CCL5, and IL-1 $\beta$  cytokine concentration in piriform cortex, hippocampus, and neocortex after pilocarpine-induced seizures. *J Neuroinflammation*. 2015, 12: 129.

Arsov T, Mullen SA, Rogers S, et al. Glucose transporter 1 deficiency in the idiopathic generalized epilepsies. *Ann Neurol*. 2012; 72: 807-815.

Avoli M, de Curtis M. GABAergic synchronization in the limbic system and its role in the generation of epileptiform activity. *Prog Neurobiol*. 2011, 95: 104-132.

Ashton AC, Volynski KE, Lelianova VG, Orlova EV, Van Renterghem C, Canepari M, Seagar M, Ushkaryov YA. alpha-Latrotoxin, acting via two Ca<sup>2+</sup>-dependent pathways, triggers exocytosis of two pools of synaptic vesicles. *J Biol Chem*. 2001, 276(48): 44695-44703.

Babb TLB WJ. Pathological findings in epilepsy. In: Engel JJ, editor. *Surgical treatment of the epilepsy*. New York: Raven Press; 1987: 511-514.

Bachis A, Colangelo AM, Vicini S, Doe PP, De Bernardi MA, Brooker G, and Mocchetti I. Interleukin-10 prevents glutamate mediated cerebellar granule cell death by blocking caspase-3-like activity. *J Neurosci*. 2001, 21: 3104-3112.

Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*. 2004, 41(6): 849-857.

Baraldi PG, Preti D, Materazzi S, Geppetti P. Transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) channel as emerging target for novel analgesics and anti-inflammatory agents. *J Med Chem*. 2010, 53:5085-5107.

Barker-Haliski M, White HS. Glutamatergic Mechanisms Associated with Seizures and Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015, 22;5(8): a022863.

Barrett KT, Wilson RJA, Scantlebury MH. TRPV1 deletion exacerbates hyperthermic seizures in an age-dependent manner in mice. *Epilepsy Res*. 2016, 128: 27-34.

Baxter PS, Bell KF, Hasel P, Kaindl AM, Fricker M, Thomson D, Cregan SP, Gillingwater TH and Hardingham GE. Synaptic NMDA receptor activity is coupled to the transcriptional control of the glutathione system. *Nat Commun*. 2015, 6: 6761.

Beach TG, Woodhurst WB, MacDonald DB, Jones MW. Reactive microglia in hippocampal sclerosis associated with human temporal lobe epilepsy. *Neurosci Lett*. 1995, 19; 191(1-2): 27-30.

Becker, AJ. Review: Animal models of acquired epilepsy: insights into mechanisms of human epileptogenesis. *Neuropath Appl Neuro*. 2018, 44: 112-129.

Bellono NW, Kammel LG, Zimmerman AL, Oancea E. UV light phototransduction activates transient receptor potential A1 ion channels in human melanocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013, 110: 2383-2388.

- Benson MJ, Manzanero S, Borges K. Complex alterations in microglial M1/M2 markers during the development of epilepsy in two mouse models. *Epilepsia*. 2015, 56(6): 895-905.
- Berkeley JL, Decker MJ, Levey AI. The role of muscarinic acetylcholine receptor mediated activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 in pilocarpine induced seizures. *J Neurochem*. 2002, 82:192-201.
- Bernardino L, Xapelli S, Silva AP, Jakobsen B, Poulsen FR, Oliveira CR, Vezzani A, Malva JO, Zimmer J. Modulator effects of interleukin 1beta and tumor necrosis factor-alpha on AMPA-induced excitotoxicity in mouse organotypic hippocampal slice cultures. *J Neurosci*. 2005, 25: 6734-6744.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000, 1(1): 11-21.
- Bertollini C, Ragozzino D, Gross C, Limatola C, Eusebi F. Fractalkine/CX3CL1 depresses central synaptic transmission in mouse hippocampal slices. *Neuropharmacology*. 2006, 51: 816-821.
- Bhaskaran MD, Smith BN. Effects of TRPV1 activation on synaptic excitation in the dentate gyrus of a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Exp Neurol*. 2010, 223(2):529-536.
- Bhave G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, Oxford GS, Gereau RWT. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003, 100 (21): 12480-12485.
- Billeter AT, Galbraith N, Walker S, Lawson C, Gardner SA, Sarojini H, Polk HC. TRPA1 mediates the effects of hypothermia on the monocyte inflammatory response. *Surgery*. 2015, 158(3): 646-654.
- Blümcke I, Thom M, Wiestler OD. Ammon's horn sclerosis: a maldevelopmental disorder associated with temporal lobe epilepsy. *Brain Pathol*. 2002, 12: 199-211.
- Blümcke I, et al. International Consensus Classification of Hippocampal Sclerosis in Temporal Lobe Epilepsy: A Task Force Report From the ILAE Commission on Diagnostic Methods. *Epilepsia*. 2013, 54 (7): 1315-1329.
- Bölcskei K, Kriszta G, Sággy É, Payrits M, Sipos E, Vranesics A, Berente Z, Ábrahám H, Ács P, Komoly S, Pintér E. Behavioural alterations and morphological changes are attenuated by the lack of TRPA1 receptors in the cuprizone-induced demyelination model in mice. *J Neuroimmunol*. 2018, 320: 1-10.
- Bosco DB, Zheng J, Xu Z, Peng J, Eyo UB, Tang K, Yan C, Huang J, Feng L, Wu G, Richardson JR, Wang H, Wu LJ. RNAseq analysis of hippocampal microglia after kainic acid-induced seizures. *Mol Brain*. 2018, 11(1): 34.
- Bosson A, Paumier A, Boisseau S, Jacquier-Sarlin M, Buisson A, e Albrieux M. TRPA1 channels promote astrocytic Ca<sup>2+</sup> hyperactivity and synaptic dysfunction mediated by oligomeric forms of amyloid-β peptide. *Mol Neurodegener*. 2017, 12: 53.

- Bouron A. Modulation of spontaneous quantal release of neurotransmitters in the hippocampus. *Prog Neurobiol.* 2001, 63(6): 613-635.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976, 72: 248-254.
- Brazil DP, Hemmings BA. Ten years of protein kinase B signalling: A hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci.* 2001, 26(11): 657-664.
- Brixel LR, Monteilh-Zoller MK, Ingenbrandt CS, Fleig A, Penner R, Enklaar T, Zabel BU, Prawitt D. TRPM5 regulates glucose-stimulated insulin secretion. *Pflügers Arch.* 2010, 460 (1): 69-76.
- Brockhaus J, Möller T, Kettenmann H: Phagocytosing ameboid microglial cells studied in a mouse corpus callosum slice preparation. *Glia.* 1996, 16 (1): 81-90.
- Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and -independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway. *Curr Opin in Neurobiol.* 2001, 11(3): 297-305.
- Buckley CL and Stokes AJ. Mice lacking functional TRPV1 are protected from pressure overload cardiac hypertrophy. *Channels.* 2011, 5, 367-374.
- Buch TR, Schafer EA, Demmel MT, Boekhoff I, Thiermann H, Gudermann T, Steinritz D, Schmidt A. Functional expression of the transient receptor potential channel TRPA1, a sensor for toxic lung inhalants, in pulmonary epithelial cells. *Chem Biol Interact.* 2013, 206(3): 462-471.
- Cao DS, Zhong L, Hsieh TH, Abooj M, Bishnoi M, Hughes L, Premkumar LS. Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) and its role in insulin release from rat pancreatic beta cells. *PLoS One.* 2012, 7: e38005.
- Carriero G, Arcieri S, Cattalini A, Corsi L, Gnatkovsky V, and de Curtis M. A guinea pig model of mesial temporal lobe epilepsy following nonconvulsive status epilepticus induced by unilateral intrahippocampal injection of kainic acid. *Epilepsia.* 2012, 53: 1917-1927.
- Catterall WA, Few AP. Calcium channel regulation and presynaptic plasticity. *Neuron.* 2008, 59, 882-901.
- Catterall WA. Voltage-gated calcium channels. *Cold Spring Harbor Perspect Biol.* 2011, 3(8): a003947.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature.* 1997, 389(6653): 816-824.
- Cavalheiro E.A., Leite J.P., Bortolotto Z.A., Turski W.A., Ikonomidou C., Turski L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. *Epilepsia.* 1991, 32: 778-782.

- Cavanagh JB, Meyer A. Aetiological aspects of Ammon's horn sclerosis associated with temporal lobe epilepsy. *Br Med J*. 1956, 2: 1403-1407.
- Cenac N, Altier C, Chapman K, Liedtke W, Zamponi G, Vergnolle N. Transient receptor potential vanilloid-4 has a major role in visceral hypersensitivity symptoms. *Gastroenterology*. 2008, 135 (3): 937-946.
- Cerri C, Caleo M, Bozzi Y. Chemokines as new inflammatory players in the pathogenesis of epilepsy. *Epilepsy Res*. 2017, 136: 77-83.
- Cesare P, Dekker LV, Sardini A, Parker PJ, McNaughton PA. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron*. 1999, 23 (3), 617-624.
- Chakravarty, DN, Babb, TL, Chung, CK, Mikuni, N Bilateral kainic acid lesions in the rat hilus induce non-linear additive mossy fiber neoinnervation. *Neurosci Lett*. 1997, 230(3): 175-178.
- Chen CY, Li W, Qu KP, Chen CR. Piperine exerts anti-seizure effects via the TRPV1 receptor in mice. *Eur J Pharmacol*. 2013, 15;714(1-3): 288-294.
- Chen NC, Chuang YC, Huang CW, Lui CC, Lee CC, Hsu SW, Lin PH, Lu YT, Chang YT, Hsu CW, Chang CC. Interictal serum brain-derived neurotrophic factor level reflects white matter integrity, epilepsy severity, and cognitive dysfunction in chronic temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2016, 59: 147-154.
- Chen X, Numata T, Li M, Mori Y, Orser BA, Jackson MF, Xiong ZG, MacDonald JF. The modulation of TRPM7 currents by nafamostat mesilate depends directly upon extracellular concentrations of divalent cations. *Mol Brain*. 2010, 3: 38-50.
- Chen SF, Jou SB, Chen NC, Chuang HY, Huang CR, Tsai MH, Tan TY, Tsai WC, Chang CC, Chuang YC. Serum levels of brain-derived neurotrophic factor and insulin-like growth factor 1 are associated with autonomic dysfunction and impaired cerebral autoregulation in patients with epilepsy. *Front Neurol*. 2018. 20; 9:969.
- Chiswick EL, Duffy E, and Remick D. Detection and quantification of cytokines and other biomarkers. *Methods Mol Biol*. 2012, 844: 15-30.
- Cho SJ, Vaca MA, Miranda CJ, N'Gouemo P. Inhibition of transient potential receptor vanilloid type 1 suppresses seizure susceptibility in the genetically epilepsy-prone rat. *CNS Neurosci Ther*. 2018, 24(1):18-28.
- Chung H, Kim E, Lee DH, Seo S, Ju S, Lee D, et al. Ghrelin inhibits apoptosis in hypothalamic neuronal cells during oxygen-glucose deprivation. *Endocrinology*. 2007, 148: 148-159.
- Chung SY, Han SH. Melatonin attenuates kainic acid induced hippocampal neurodegeneration and oxidative stress through microglial inhibition. *J Pineal Res*. 2003, 34: 95-102.
- Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature*. 2003, 426(6966): 517-524.
- Clapham DE. Calcium signaling. *Cell*. 2007, 131(6): 1047-1058.

Clapham DE. Transient receptor potential (TRP) channels. In: Squire LR (ed.) *Encyclopedia of Neuroscience*, vol. 9, 1109-1133. *Oxford: Academic Press*, 2009.

Corda MG, Orlandi M, Lecca D, Giorgi O. Decrease in GABAergic function induced by pentylentetrazol kindling in rats: antagonism by MK-801. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992, 262 (2): 792-800.

Cosens DJ, Manning A. Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature.* 1969, 224(5216): 285-287.

Coulter DA, and Eid T. Astrocytic regulation of glutamate homeostasis in epilepsy. *Glia.* 2012, 60: 1215-1226.

Crotti AC, Benner BE, Kerman D, Gosselin C, Lagier-Tourenne C, Zuccato E, Cattaneo FH, Gage DW, Cleveland and CK Glass. Mutant Huntingtin promotes autonomous microglia activation via myeloid lineage-determining factors. *Nat Neurosci.* 2014, 17(4): 513-521.

Curia G, Longo D, Biagini G, Jones RSG, Avoli M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci Methods.* 2008, 172 (2-4): 143-157.

Curia G, Lucchi C, Vinet J, Gualtieri F, Marinelli C, Torsello A, Costantino L, Biagini G. Pathophysiology of mesial temporal lobe epilepsy: Is prevention of damage anti-epileptogenic? *Curr. Med. Chem.* 2014, 21: 663-688.

de Bock F, Dornand J, Rondouin G. Release of TNF $\alpha$  in the rat hippocampus following epileptic seizures and excitotoxic neuronal damage. *Neuro Report.* 1996, 7 (6): 1125-1129.

de la Roche J, Eberhardt MJ, Klinger AB, Stanslowsky N, Wegner F, Koppert W, Reeh PW, Lampert A, Fischer MJ, Leffler A. The molecular basis for species-specific activation of human TRPA1 protein by protons involves poorly conserved residues within transmembrane domains 5 and 6. *J Biol Chem.* 2013, 288: 20280-20292.

De Logu F, Nassini R, Materazzi S, Carvalho Gonçalves M, Nosi D, Rossi Degl'Innocenti D, Marone IM, Ferreira J, Li Puma S, Benemei S, Trevisan G, Souza Monteiro de Araújo D, Patacchini R, Bunnett NW, Geppetti P. Schwann cell TRPA1 mediates neuroinflammation that sustains macrophage-dependent neuropathic pain in mice. *Nat Commun.* 2017, 8(1): 1887.

Delorenzo RJ, Sun DA, Deshpande LS. Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacol Ther.* 2005, 105(3): 229-266.

Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci.* 2010, 11 (5): 339-350.

De, Pollak MR. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet.* 2005, 37(7): 739-744.

De Simoni MG, Perego C, Ravizza T, Moneta D, Conti M, Marchesi F, De Luigi A, Garattini S, Vezzani A. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci.* 2000, 12: 2623-2633.

- Devinsky O, Vezzani A, Najjar S, De Lanerolle NC, Rogawski MA. Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci.* 2013, 36 (3): 174-184.
- Dhir A. Pentylenetetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. *Curr Protoc Neurosci.* 2012, 9 (9.37).
- Dichter MA and Ayala GF. Cellular mechanisms of epilepsy: a status report. *Science.* 1987, 237:157-164.
- Diniz CRAF, Biojone C, Joca SRL, Rantamäki T, Castrén E, Guimarães FS, Casarotto PC. Dual mechanism of TRKB activation by anandamide through CB1 and TRPV1 receptors. *PeerJ.* 2019, 7: e6493.
- Dinocourt C, Gallagher SE, Thompson SM. Injury-induced axonal sprouting in the hippocampus is initiated by activation of trkB receptors. *Eur J Neurosci.* 2006, 24: 1857-1866.
- DiNuzzo M, Mangia S, Maraviglia B, and Giove F. Physiological bases of the K<sup>+</sup> and the glutamate/GABA hypotheses of epilepsy. *Epilepsy Res.* 2014, 108(6): 995-1012.
- Djamshidian A, Grassl R, Seltenhammer M, Czech T, Baumgartner C, Schmidbauer M, Ulrich W, Zimprich F. Altered expression of voltage-dependent calcium channel 1 subunits in temporal lobe epilepsy with Ammon's horn sclerosis. *Neuroscience.* 2002, 111: 57-69.
- Drage MG, Holmes GL, Seyfried TN. Hippocampal neurons and glia in epileptic EL mice. *J Neurocytol.* 2002, 31(8-9):681-92.
- do Nascimento AL, Dos Santos NF, Campos Pelágio F, Aparecida Teixeira S, de Moraes Ferrari EA, Langone F. Neuronal degeneration and gliosis time-course in the mouse hippocampal formation after pilocarpine-induced status epilepticus. *Brain Res.* 2012, 1470: 98-110.
- Dube C, Chen K, Eghbal-Ahmadi M, Brunson K, Soltesz I, and Baram TZ. Prolonged febrile seizures in the immature rat model enhance hippocampal excitability long term. *Ann Neurol.* 2000, 47: 336-344.
- Dubé C, Vezzani A, Behrens M, Bartfai T, Baram TZ. Interleukin-1beta contributes to the generation of experimental febrile seizures. *Ann Neurol.* 2005, 57: 152-155.
- Dunkley, PR. et al. A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. *Brain Res.* 1986, 372 (1): 115-129.
- Earley S. TRPA1 channels in the vasculature. *Br J Pharmacol.* 2012, 167: 13-22.
- Eder P and Molkenkin JD. TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 2011, 21; 108(2): 265-272.
- Edwards JG. TRPV1 in the central nervous system: synaptic plasticity, function, and pharmacological implications. *Prog Drug Res.* 2014, 68: 77-104.
- Eid T, Gruenbaum SE, Dhaher R, Lee TW, Zhou Y, Danbolt NC. The Glutamate-Glutamine Cycle in Epilepsy. *Adv Neurobiol.* 2016, 13: 351-400.

Eid T, Thomas MJ, Spencer D, Rundén-Pran E, Lai JCK, Malthankar GV, Kim JH, Danbolt NC, Ottersen OP, de Lanerolle NC. Loss of glutamine synthetase in the human epileptogenic hippocampus: possible mechanism for raised extracellular glutamate in mesial temporal lobe epilepsy. *Lancet*. 2004, 363 (9402): 28-37.

Engel J. A Proposed Diagnostic Scheme for People with Epileptic Seizures and with Epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2001, 42 (6): 796-803.

Engel JJ, Dichter MA, Schwartzkroin PA. Basic mechanisms of human epilepsy. In: Engel JJ, Pedley TA, editors. *Epilepsy: a comprehensive textbook*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008. p. 495-507.

Entin-Meer M, Levy R., Goryainov P, Landa N, Barshack I, Avivi C, Semo J, Keren G. The transient receptor potential vanilloid 2 cation channel is abundant in macrophages accumulating at the peri-infarct zone and may enhance their migration capacity towards injured cardiomyocytes following myocardial infarction. *PLoS One*. 2014, 9:e105055.

Erta M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci*. 2012, 8(9): 1254-1266.

Evans GJO. The synaptosome as a model system for studying synaptic physiology. *Cold Spring Harb Protoc*. 2015, 2015(5): 421-424.

Faas GC, Vreugdenhil M, Wadman WJ. Calcium currents in pyramidal CA1 neurons in vitro after kindling epileptogenesis in the hippocampus of the rat. *Neuroscience*. 1996, 75 (1): 57-67.

Falcicchia C, Paolone G, Emerich DF, Simonato M. Seizure-suppressant and neuroprotective effects of encapsulated bdnf-producing cells in a rat model of temporal lobe epilepsy. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018, 9: 211-224.

Fernandes ES, Fernandes MA, Keeble JE. The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves. *Br J Pharmacol*. 2012, 166: 510-521.

Fernández-Carvajal A, Fernández-Ballester G, Devesa I, González-Ros JM, Ferrer-Montiel A. New strategies to develop novel pain therapies: addressing thermoreceptors from different points of view. *Pharmaceuticals*. 2012, 5(1): 16-48.

Fialho MFP, Brum EDS, Pegoraro NS, Couto ACG, Trevisan G, Cruz L, Oliveira SM. Topical transient receptor potential ankyrin 1 antagonist treatment attenuates nociception and inflammation in an ultraviolet B radiation-induced burn model in mice. *J Dermatol Sci*. 2020, 97(2): 135-142.

Fisher RS, Boas WV, Blume W, et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 2005, 46: 470-472.

Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J Jr, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer

IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*. 2014, 55(4):475-82.

Frank MG, Baratta MV, Sprunger DB, Watkins LR, Maier SF. Microglia serve as a neuroimmune substrate for stress-induced potentiation of CNS pro-inflammatory cytokine responses. *Brain Behav Immun*. 2007, 21(1): 47-59.

Frost JL e Schafer DP. Microglia: architects of the developing nervous system. Microglia: architects of the developing nervous system. *Trends Cell Biol*. 2016, 26(8): 587-597.

Fryer AD, Christopoulos A, Nathanson NM. Handbook of experimental pharmacology. *Berlin; New York: Springer*; 2012. Muscarinic receptors. pp. 1 online resource (xiii, 499 p.).

Furtado MA, Braga GK, Oliveira JAC, Del Vecchio F, Garcia-Cairasco N. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia*. 2002, 43 (5): 37-39.

Gaffield MA, Betz WJ. Imaging synaptic vesicle exocytosis and endocytosis with FM dyes. *Nat Protoc*. 2006, 1 (6): 2916-21.

Gage GJ, Kipke DR, Shain W. Whole animal perfusion fixation for rodents. *J Vis Exp*. 2012, n. 65.

Gaillard WD, Chiron C, Cross JH, et al. Guidelines for imaging infants and children with recent-onset epilepsy. *Epilepsia*. 2009, 50:2147- 2153.

Galic MA, Riazi K, Pittman QJ. Cytokines and brain excitability. *Front Neuroendocrinol*. 2012, 33(1): 116-125.

Gall CM. Seizure-induced changes in neurotrophin expression: implications for epilepsy. *Exp Neurol*. 1993, 124:150-166.

Gebicke-Haerter PJ. Microglia in neurodegeneration: molecular aspects. *Microsc Res Tech*. 2001, 54: 47-58.

Gees M, Owsianik G, Nilius B, Voets T. TRP channels. *Compr Physiol*. 2012, 2 (1): 563-608.

Goel M, Sinkins WG, Zuo CD, Estacion M, Schilling WP. Identification and localization of TRPC channels in the rat kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2006, 290(5): F1241-52.

Goffin, K., Nissinen, J., Van Laere, K., and Pitkanen, A. Cyclicity of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat. *Exp Neurol*. 2007, 205: 501-505.

Goldberg EM. and Coulter DA. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. *Nat Rev Neurosci*. 2013, 14(5): 337-349.

Gonzalez-Reyes LE, Ladas TP, Chiang CC, Durand DM. TRPV1 antagonist capsazepine suppresses 4-AP-induced 685 epileptiform activity in vitro and electrographic seizures in vivo. *Exp Neurol*. 2013, 250:321-332.

- Goto, EM, Silva MdeP, Perosa SR, Argañaraz GA, Pesquero JB, Cavalheiro ÉA, Silva JA. Akt pathway activation and increased neuropeptide Y mRNA expression in the rat hippocampus: Implications for seizure blockade. *Neuropeptides*. 2010, 44(2): 169-176.
- Gouveia, TLF, Scorza FA, Iha HA, Frangiotti MIB, Perosa SR, Cavalheiro EA, Naffah-Mazzacoratti MG. Lovastatin decreases the synthesis of inflammatory mediators during epileptogenesis in the hippocampus of rats submitted to pilocarpine-induced epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2014, 36: 68-73.
- Gruol DL. IL-6 regulation of synaptic function in the CNS. *Neuropharmacology*. 2015, 96 (00): 42-54.
- Guibert C and Beech DJ. Positive and negative coupling of the endothelin ETA receptor to  $Ca^{2+}$ -permeable channels in rabbit cerebral cortex arterioles. *J Physiol*. 1999, 514: 843-856.
- Guinamard R and Bois P. Involvement of transient receptor potential proteins in cardiac hypertrophy. *Biochim Biophys Acta*. 2007, 1772(8): 885-894.
- Günaydin C, Arslanb G, Bilge SS. Proconvulsant effect of trans-cinnamaldehyde in pentylenetetrazole-induced kindling model of epilepsy: The role of TRPA1 channels. *Neurosci Lett*. 2020, 721: 134823.
- Gunthorpe MJ, Rami HK, Jerman JC, Smart D, Gill CH, Soffin EM, Luis Hannan S, Lappin SC, Egerton J, Smith GD, Worby A, Howett L, Owen D, Nasir S, Davies CH, Thompson M, Wyman PA, Randall AD, Davis JB. Identification and characterisation of SB-366791, a potent and selective vanilloid receptor (VR1/TRPV1) antagonist. *Neuropharmacology*. 2004, 46(1): 133-49.
- Gunthorpe MJ, Szallasi A. Peripheral TRPV1 receptors as targets for drug development: new molecules and mechanisms. *Curr Pharm Des*. 2008, 14 (1): 32-41.
- Haglid KG, Wang S, Qiner Y, and Hamberger A. Excitotoxicity. Exp. correlates to human epilepsy. *Mol Neurobiol*. 1994, 9: 259-263.
- Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, Idzerda RL, and Nathanson NM. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997, 94: 13311-13316.
- Hassan S, Eldeeb K, Millns PJ, Bennett AJ, Alexander SP, Kendall DA. Cannabidiol enhances microglial phagocytosis via transient receptor potential (TRP) channel activation. *Br J Pharmacol*. 2014, 171(9): 2426-39.
- Hatori K, Nagai A, Heisel R, Ryu JK, Kim SU. Fractalkine and fractalkine receptors in human neurons and glial cells. *J Neurosci Res*. 2002, 69: 418-426.
- Heida JG, Pittman QJ. Causal links between brain cytokines and experimental febrile convulsions in the rat. *Epilepsia*. 2005, 46: 1906-1913.
- Heinemann U, Lux HD, Gutnick MJ. Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Exp. Brain Res*. 1977, 27: 237-243.

- Heinrich C, Lähteinen S, Suzuki F, Anne-Marie L, Huber S, Häussler U, Haas C, Larmet Y, Castren E, Depaulis A. Increase in BDNF-mediated TrkB signaling promotes epileptogenesis in a mouse model of mesial temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2011, 42 (1): 35-47.
- Heinisch S, Kirby LG. Fractalkine/CX3CL1 enhances GABA synaptic activity at serotonin neurons in the rat dorsal raphe nucleus. *Neuroscience.* 2009, 164: 1210-1223.
- Hendriksen H, Kamphuis W, da Silva FHL. Changes in voltage-dependent calcium channel alpha1-subunit mRNA levels in the kindling model of epileptogenesis. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997, 50: 257-266.
- Henshall DC. Apoptosis signalling pathways in seizure-induced neuronal death and epilepsy. *Biochem Soc Trans.* 2007, 35: 421-423.
- Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res.* 1999, 57: 417-428.
- Hjerling-Leffler J, Alqatari M, Ernfors P, Koltzenburg M. Emergence of functional sensory subtypes as defined by transient receptor potential channel expression. *J Neurosci.* 2007, 27: 2435-2443.
- Hong Z, Li W, Qu B, Zou X, Chen J, Sander JW, Zhou D. Serum brain-derived neurotrophic factor levels in epilepsy. *Eur J Neurol.* 2014, 21: 57-64.
- Huang WX, Yu F, Sanchez RM, Liu Y-Q, Min J-W, Hu J-J, Bsoul NB, Han S, Yin J, Liu W-H, He X-H, Peng B-W. TRPV1 promotes repetitive febrile seizures by pro-inflammatory cytokines in immature brain. *Brain Behav Immun.* 2015, 48: 68-77.
- Huberfeld G, Blauwblomme T, Miles R. Hippocampus and epilepsy: findings from human tissues. *Rev Neurol (Paris).* 2015, 171(3): 236-251.
- Hwang, I.K.; Lee, H.Y.; Seong, N.S.; Chung, H.G.; Kim, J.H.; Lee, H.J.; Kim, J.D.; Kang, T.C.; Won, M.H. Changes of calbindin D-28k immunoreactivity in the hippocampus after adrenalectomy in the seizure sensitive gerbil. *Anat Histol Embryol.* 2004, 33 (5), 299-303.
- Ichiyama T, Nishikawa M, Yoshitomi T, Hayashi T, Furukawa S. Tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1, and interleukin-6 in cerebrospinal fluid from children with prolonged febrile seizures comparison with acute encephalitis/encephalopathy. *Neurology.* 1998, 50(2): 407-11.
- ILAE. Proposal for Revised Clinical and Electroencephalographic Classification of Epileptic Seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. *Epilepsia.* 1981, 22 (4): 489-501.
- Imai y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S. A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996, 224: 855-862.
- Isackson PJ, Huntsman MM, Murray KD, Gall CM. BDNF mRNA expression is increased in adult rat forebrain after limbic seizures: temporal patterns of induction distinct from NGF. *Neuron.* 1991, 6: 937-948.

Islam MS. Calcium Signaling. In: Calcium Signaling: From Basic to Bedside. (org.). *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2th. 2020.

Ismail AM, Babers GM, El Rehany MA. Brain-derived neurotrophic factor in sera of breastfed epileptic infants and in breastmilk of their mothers. *Breastfeed Med*. 2015, 10: 277-282.

Jackson GD, Berkovic SF, Duncan JS, Connelly A. Optimizing the diagnosis of hippocampal sclerosis using MR imaging. *Am J Neuroradiol*. 1993, 14: 753-762.

Jackson GD, Berkovic SF, Tress BM, Kalnins RM, Fabinyi GC, Bladin PF. Hippocampal sclerosis can be reliably detected by magnetic resonance imaging. *Neurology*. 1990, 40:1869-1875.

Jankowsky JL, Patterson PH. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobiol*. 2001, 63: 125-149.

Jia Y-F, Li Ying-Chao, Tang Y-P, Cao J, Wang L-P, Yang Y-X, Xu L, Mao, R-R. Interference of TRPV1 function altered the susceptibility of PTZ-induced seizures. *Front Cell Neurosci*. 2015, 9: 20.

Jiao Y, Palmgren B, Novozhilova E, Johansson UE, Spieles- Engemann AL, Kale A, et al. BDNF increases survival and neuronal differentiation of human neural precursor cells cotransplanted with a nanofiber gel to the auditory nerve in a rat model of neuronal damage. *Biomed Res Int*. 2014, 2014: 356415.

Jo KD, Lee KS, Lee WT, Hur MS, Kim HJ. Expression of transient receptor potential channels in the ependymal cells of the developing rat brain. *Anat Cell Biol*. 2013, 46(1): 68-78.

Johnson CD, Melanaphy D, Purse A, Stokesberry SA, Dickson P, Zholos AV. Transient receptor potential melastatin 8 channel involvement in the regulation of vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009, 296: H1868-H1877.

Jordt, SE, Bautista DM, Chuang HH, McKemy DD, Zygmunt PM, Högestätt ED, Meng ID, Julius D. Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*. 2004, 427(6971): 260-265.

Julius D. TRP channels and pain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2013, 29, 355-384.

Kang TC, Kim DS, Kwak SE, Kim JE, Won MH, Kim DW, Choi SY, Kwon OS. Epileptogenic roles of astroglial death and regeneration in the dentate gyrus of experimental temporal lobe epilepsy. *Glia*. 2006, 54: 25-271.

Karadi, K.; Janszky, J.; Gyimesi, C.; Horvath, Z.; Lucza, T.; Doczi, T.; Kallai, J.; Abraham, H. Correlation between calbindin expression in granule cells of the resected hippocampal dentate gyrus and verbal memory in temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Behav*. 2012, 25 (1), 110-119.

Kark T, Bagi Z, Lizanecz E, Pasztor ET, Erdei N, Czikora A, Papp Z, Edes I, Porszasz R, Toth A. Tissue-specific regulation of microvascular diameter: opposite functional roles of neuronal and smooth muscle located vanilloid receptor-1. *Mol Pharmacol*. 2008, 73: 1405-1412.

Kheradpezhohu E, Choy JMC, Daria VR and Arabzadeh E. TRPA1 expression and its functional activation in rodent cortex. *Open Biol.* 2017, 7: 160314.

Khurgel M, Ivy GO. Astrocytes in kindling: relevance to epileptogenesis. *Epilepsy Res.* 1996, 26 (1), 163-175.

Kim SR, Lee DY, Chung ES, Oh UT, Kim SU, Jin BK. Transient receptor potential vanilloid subtype 1 mediates cell death of mesencephalic dopaminergic neurons in vivo and in vitro. *J Neurosci.* 2005, 25(3): 662-71.

Kim YJ, Kang TC. The role of TRPC6 in seizure susceptibility and seizure-related neuronal damage in the rat dentate gyrus. *Neuroscience.* 2015, 307: 215-30.

Kim YS, Son JY, Kim TH, Paik SK, Dai Y, Noguchi K, Ahn DK, Bae YC. Expression of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in the rat trigeminal sensory afferents and spinal dorsal horn. *J Comp Neurol.* 2010, 518:687-698.

Kistler AD, Singh G, Altintas MM, Yu H, Fernandez IC, Gu C, Wilson C, Srivastava SK, Dietrich A, Walz K, Kerjaschki D, Ruiz P, Dryer S, Sever S, Dinda AK, Faul C, Reiser J. Transient receptor potential channel 6 (TRPC6) protects podocytes during complement-mediated glomerular disease. *J Biol Chem.* 2013, 288(51): 36598-36609.

Klafke JZ, da Silva MA, Trevisan G, Rossato MF, da Silva CR, Guerra GP, Villarinho JG, Rigo FK, Dalmolin GD, Gomez MV, Rubin MA, Ferreira J. Involvement of the glutamatergic system in the nociception induced intrathecally for a TRPA1 agonist in rats. *Neuroscience.* 2012, 222: 136-46.

Klitgaard H, Matagne A, Grimee R, Vanneste-Goemaere J, Margineanu DG. Electrophysiological, neurochemical and regional effects of levetiracetam in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Seizure.* 2003, 12, 92-100.

Koch M, Kreutz S, Böttger C, Grabiec U, Ghadban C, Korf HW, Dehghani F. The cannabinoid WIN 55,212-2-mediated protection of dentate gyrus granule cells is driven by CB1 receptors and modulated by TRPA1 and Cav 2.2 channels. *Hippocampus.* 2011, 21(5): 554-64.

Kondo T, Oshima T, Obata K, Sakurai J, Knowles CH, Matsumoto T, Noguchi K, Miwa H. Role of transient receptor potential A1 in gastric nociception. *Digestion.* 2010, 82 (3): 150-155.

Kong WL, Min JW, Liu YL, Li JX, He XH, Peng BW. Role of TRPV1 in Susceptibility to PTZ-induced Seizure Following Repeated Hyperthermia Challenges in Neonatal Mice. *Epilepsy Behav.* 2014, 31: 276-280.

Krall P, Canales CP, Kairath P, Carmona-Mora P, Molina J, Carpio JD, Ruiz P, Mezzano SA, Li J, Wei C, Reiser J, Young JJ, Walz K. Podocyte-specific overexpression of wild type or mutant *trpc6* in mice is sufficient to cause glomerular disease. *PLoS One.* 2010, 5(9): e12859.

Kuchukhidze, G.; Wieselthaler-Holzl, A.; Drexel, M.; Unterberger, I.; Luef, G.; Ortler, M.; Becker, A.J.; Trinkka, E.; Sperk, G. Calcium-binding proteins in focal cortical dysplasia. *Epilepsia.* 2015, 56 (8), 1207-1216.

Kumar VS, Gopalakrishnan A, Naziroğlu M, Rajanikant GK. Calcium ion--the key player in cerebral ischemia. *Curr Med Chem*. 2014, 21(18): 2065-2075.

Kym PR, Kort ME, Hutchins CW. Analgesic potential of TRPV1 antagonists. *Biochem Pharmacol*. 2009, 78 (3): 211-216.

Lado FA, Moshe SL. How do seizures stop? *Epilepsia*. 2008, 49: 1651-64.

LaFrance WC Jr, Leaver K, Stopa EG, Papandonatos GD, Blum AS. Decreased serum BDNF levels in patients with epileptic and psychogenic nonepileptic seizures. *Neurology*. 2010, 75:1285-1291.

Lainez S, Schlingmann KP, van der Wijst J, Dworniczak B, van Zeeland F, Konrad M, Bindels RJ, Hoenderop JG. New TRPM6 missense mutations linked to hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Eur J Hum Genet*. 2014, 22(4): 497-504.

Lallement G, Carpentier P, Collet A, Pernot-Marino I, Baubichon D, Blanchet G. Effects of soman-induced seizures on different extracellular amino acid levels and on glutamate uptake in rat hippocampus. *Brain Res*. 1991, 563: 234-240.

Larkin JG, Besag FM, Cox A, Williams J, Brodie MJ. Nifedipine for epilepsy? A double-blind, placebo-controlled trial. *Epilepsia*. 1992, 33: 346-352.

Laschet JJ, Kurcewicz I, Minier F, Trottier S, Khallou-Laschet J, Louvel J, Gigout S, Turak B, Biraben A, Scarabin JM, Devaux B, Chauvel P, Pumain R. Dysfunction of GABAA receptor glycolysis-dependent modulation in human partial epilepsy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, 104: 3472-3477.

Lawrence JJ, Statland JM, Grinspan ZM, McBain CJ. Cell type-specific dependence of muscarinic signalling in mouse hippocampal stratum oriens interneurons. *J Physiol*. 2006, 1; 570(Pt 3): 595-610.

Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*. 1990, 39(1): 151-170.

Laxer K, Trinkka E, Hirsch L, et al. The consequences of refractory epilepsy and its treatment. *Epilepsy Behav*. 2014, 37: 59-70.

Leal B, Chaves J, Carvalho C, Rangel R, Santos A, Bettencourt A, Lopes J, Ramalheira J, Silva BM, da Silva AM, Costa PP. Brain expression of inflammatory mediators in Mesial Temporal Lobe Epilepsy patients. *J Neuroimmunol*. 2017, 313: 82-88.

Lee E, Son H. Adult hippocampal neurogenesis and related neurotrophic factors. *BMB Rep*. 2009, 42: 239-244.

Lenzlinger PM, Morganti-Kossmann MC, Laurer HL, McIntosh TK. The duality of the inflammatory response to traumatic brain injury. *Mol Neurobiol*. 2001, 24: 169-181.

Lee KI, Lee HT, Lin HC, Tsay HJ, Tsai FC, Shyue SK, Lee TS. Role of transient receptor potential ankyrin 1 channels in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 2016, 13(1): 92.

Lee TH, Lee JG, Yon JM, Oh KW, Baek IJ, Nahm SS, Lee BJ, Yun YW, Nam SW. Capsaicin prevents kainic acid-induced epileptogenesis in mice. *Neurochem Int.* 2011, 58(6): 634-640.

Leite JP, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev.* 1990, 14: 511-517.

Leite JP, Cavalheiro EA. Neurobiologia da esclerose medial temporal. In Costa JC, Palmieri A, Yacubian EMT, Cavalheiro EA (eds) Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos: São Paulo: Lemos Editorial, 1998, 129-136.

Leite JP, Garcia-Cairasco N, Cavalheiro EA. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Res.* 2002, 50: 93-103.

Lemeshchenko VV, Pekun TG, Waseem TV, and Fedorovich SV. Y-27632 Induces Calcium-Independent Glutamate Release in Rat Brain Synaptosomes by a Mechanism Distinct from Exocytosis. *Biophysics.* 2012, 57, 3: 332-335.

Lévesque M and Avoli M. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. *Neurosci Biobehav Rev.* 2013, 37: 2887-2899.

Lévesque M, Avoli M and Bernard C. Animal models of temporal lobe epilepsy following systemic chemoconvulsant administration. *J Neurosci Methods.* 2016, 15; 260: 45-52.

Levey AI. Muscarinic acetylcholine receptor expression in memory circuits: implications for treatment of Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996, 26; 93(24):13541-13546.

Li R, Liu R, Yan F, Zhuang X, Shi H, Gao X. Inhibition of TRPA1 promotes cardiac repair in mice after myocardial infarction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2020, 75 (3): 240-249.

Liddelow SA, Guttenplan KA, Clarke LE, et al. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature.* 2017, 541: 481-487.

Lima IVA, Campos AC, Bellozi PMQ, Doria JG, Ribeiro FM, Moraes MFD, de Oliveira ACP. Postictal alterations induced by intrahippocampal injection of pilocarpine in C57BL/6 mice. *Epilepsy Behav.* 2016, 64: 83-89.

Lima IV, Campos AC, Miranda AS, Vieira ÉL, Amaral-Martins F, Vago JP, Santos RP, Sousa LP, Vieira LB, Teixeira MM, Fiebich BL, Moraes MF, Teixeira AL, de Oliveira AC. PI3Kgamma deficiency enhances seizures severity and associated outcomes in a mouse model of convulsions induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. *Exp Neurol.* 2015, 267: 123-134.

Limatola C, Lauro C, Catalano M, Ciotti MT, Bertollini C, Di Angelantonio S, Ragozzino D, Eusebi F. Chemokine CX3CL1 protects rat hippocampal neurons against glutamate-mediated excitotoxicity. *J Neuroimmunol.* 2005, 166: 19-28.

Limatola C e Ransohoff RM. Modulating neurotoxicity through CX3CL1/CX3CR1 signaling. *Front Cell Neurosci.* 2014, 8: 229.

- Lin YW, Hsieh CL. Auricular electroacupuncture reduced inflammation-related epilepsy accompanied by altered TRPA1, pPKC $\alpha$ , pPKC $\epsilon$ , and pERk1/2 signaling pathways in kainic acid-treated rats. *Mediators Inflamm.* 2014, 2014: 493480.
- Lind D, Franken S, Kappler J, Jankowski J, Schilling K. Characterization of the neuronal marker NeuN as a multiply phosphorylated antigen with discrete subcellular localization. *J Neurosci Res.* 2005, 79(3): 295-302.
- Lindvall O, Kokaia Z, Bengzon J, Elmér E, Kokaia M. Neurotrophins and brain insults. *Trends Neurosci.* 1994, 17: 490-496.
- Liu Y and Zhang J. Recent development in NMDA receptors. *Chin Med J (Engl).* 2000, 113(10): 948-956.
- Lizanecz E, Bagi Z, Pasztor ET, Papp Z, Edes I, Kedei N, Blumberg PM, Toth A. Phosphorylation-dependent desensitization by anandamide of vanilloid receptor-1 (TRPV1) function in rat skeletal muscle arterioles and in Chinese hamster ovary cells expressing TRPV1. *Mol Pharmacol.* 2006, 69: 1015-1023.
- Londoño JEC, Tian Q, Hammer K, Schröder L, Londoño JC, Reil JC, et al. A background Ca<sup>2+</sup> entry pathway mediated by TRPC1/TRPC4 is critical for development of pathological cardiac remodelling. *Eur Heart J.* 2015, 36: 2257-2266.
- Lopes MW, Soares FM, de Mello N, Nunes JC, de Cordova FM, Walz R, Leal RB. Time-dependent modulation of mitogen activated protein kinases and AKT in rat hippocampus and cortex in the pilocarpine model of epilepsy. *Neurochem Res.* 2012, 37(9): 1868-78.
- Löscher W and Köhling R. Functional, metabolic, and synaptic changes after seizures as potential targets for antiepileptic therapy. *Epilepsy Behav.* 2010, 19(2): 105-13.
- Lowry OH. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951, 193: 265-275.
- Lu CW, Lin TY, Hsie TY, Huang SK, Wang SJ. Capsaicin presynaptically inhibits glutamate release through the activation of TRPV1 and calcineurin in the hippocampus of rats. *Food Funct.* 2017, 8(5): 1859-1868.
- Lukasiuk K and Pitkänen A. Seizure-induced gene expression. In: Encyclopedia of basic epilepsy research. *Oxford: Academic Press.* 2009, 1302-1309.
- Maggi L, Trettel F, Scianni M, Bertollini C, Eusebi F, Fredholm BB, Limatola C. LTP impairment by fractalkine/CX3CL1 in mouse hippocampus is mediated through the activity of adenosine receptor type 3 (A3R). *J Neuroimmunol.* 2009, 215: 36-42.
- Magloczky Z, Halasz P, Vajda J, Czirjak S, Freund TF. Loss of Calbindin-D28K immunoreactivity from dentate granule cells in human temporal lobe epilepsy. *Neuroscience.* 1997, 76 (2): 377-385.
- Manford M, Hart YM, Sander JW, et al. National General Practice Study of Epilepsy (NGPSE): partial seizures patterns in a general population. *Neurology.* 1992, 42:1911-1917.

Manna SS, Umathe SN. Involvement of transient receptor potential vanilloid type 1 channels in the pro-convulsant effect of anandamide in pentylenetetrazole-induced seizures. *Epilepsy*. 2012, 100: 113-124.

Marin I e Kipnis J. Learning and memory ... and the immune system. *Learn Mem*. 2013, 20 (10): 601-606.

Marrone MC, Morabito A, Giustizieri M, Chiurchiù V, Leuti A, Mattioli M, Marinelli S, Riganti L, Lombardi M, Murana E, Totaro A, Piomelli D, Ragozzino D, Oddi S, Maccarrone M, Verderio C, Marinelli S. TRPV1 channels are critical brain inflammation detectors and neuropathic pain biomarkers in mice. *Nat Commun*. 2017, 8: 15292.

McIntosh WC, Das JM. Temporal Seizure. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.

McNamara JO. Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature*. 1999, A15-A22.

McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007, 104(33): 13525-13530.

Mehler M, Kessler J. Cytokines in brain development and function. *Cytokines*. 1999, 52: 223-251.

Mello LE e Covolan L. Spontaneous seizures preferentially injure interneurons in the pilocarpine model of chronic spontaneous seizures. *Epilepsy Res*. 1996, 26: 123-129.

Mello LE, Cavalheiro EA, Tan AM, et al. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. *Epilepsia*. 1993, 34: 985-995.

Melom JE, Littleton JT. Mutation of a NCKX eliminates glial microdomain calcium oscillations and enhances seizure susceptibility. *J Neurosci*. 2013, 33(3): 1169-1178.

Meotti FC, Figueiredo CP, Manjavachi M, Calixto JB. The transient receptor potential ankyrin-1 mediates mechanical hyperalgesia induced by the activation of B1 receptor in mice. *Biochem Pharmacol*. 2017, 125: 75-83.

Mercado J, Baylie R, Navedo MF, Yuan C, Scott JD, Nelson MT, Brayden JE, Santana LF. Local control of TRPV4 channels by AKAP150-targeted PKC in arterial smooth muscle. *J Gen Physiol*. 2014, 143 (5): 559-575.

Merlo D, Cifelli P, Cicconi S, Tancredi V, Avoli M. 4-Aminopyridine-induced epileptogenesis depends on activation of mitogen-activated protein kinase ERK. *J Neurochem*. 2004, 89: 654-659.

Mezey E, Tóth ZE, Cortright DN, Arzubi MK, Krause JE, Elde R, Guo A, Blumberg BM, Szallasi A. Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000, 97: 3655-3660.

- Miyake T, Shirakawa H, Nakagawa T, Kaneko S. Activation of mitochondrial transient receptor potential vanilloid 1 channel contributes to microglial migration. *Glia*. 2015, 63(10): 1870-1882.
- Mizuno T, Sawada M, Marunouchi T, and Suzumura A. Production of interleukin-10 by mouse glial cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994, 205 (3): 1907-1915.
- Molina-Holgado E, Velda JM, Arevalo-Martin A, and Guaza C. LPS/IFN-gamma cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10. *Eur J Neurosci*. 2001, 13: 493-502.
- Montell C and Rubin GM. Molecular characterization of the *Drosophila* TRP locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron*. 1989, 2(4): 1313-1323.
- Musto A, Rosencrans R, Walker C, et al. Dysfunctional epileptic neuronal circuits and dysmorphic dendritic spines are mitigated by platelet-activating factor receptor antagonism. *Sci Rep*. 2016, 6: 30298.
- Nadler JV, Perry BW, Cotman CW. Intraventricular kainic acid preferentially destroys hippocampal pyramidal cells. *Nature*. 1978, 271: 676-677.
- Nakanishi S. and Masu M. Molecular diversity and functions of glutamate receptors. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 1994, 71: 71-80.
- Nateri AS, Raivich G, Gebhardt C, Da Costa C, Naumann H, Vreugdenhil M, et al. ERK activation causes epilepsy by stimulating NMDA receptor activity. *EMBO J*. 2007, 26 (23): 4891-901.
- Nayak D, Roth TL, McGavern DB. Microglia development and function. *Annu Rev Immunol*. 2014, 32: 367-402.
- Nazıroğlu, M. Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress-induced molecular pathways in epilepsy. *Neurochem Res*. 2009, 34(12): 2181-2191.
- Nazıroğlu M, Özkan FF, Hapil SR, Ghazizadeh V, Çiğ B. Epilepsy but not mobile phone frequency (900 MHz) induces apoptosis and calcium entry in hippocampus of epileptic rat: involvement of TRPV1 channels. *J Membr Biol*. 2015, 248(1): 83-91.
- Ng LC, O'Neill KG, French D, Airey JA, Singer CA, Tian H, Shen XM, Hume JR. TRPC1 and Orai1 interact with STIM1 and mediate capacitative Ca<sup>2+</sup> entry caused by acute hypoxia in mouse pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012, 303: C1156–C1172.
- Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. *J Neurosci*. 1995, 15: 7539-7547.
- Nicholls DG. Release of glutamate, aspartate, and gamma-aminobutyric acid from isolated nerve terminals. *J Neurochem*. 1989, 52: 331-341.

- Nicholls DG, Sihra TS, Sanchez-Prieto J. Calcium-dependent and -independent release of glutamate from synaptosomes monitored by continuous fluorometry. *J Neurochem.* 1987, 49 (1): 50-57.
- Niespodziany I, Klitgaard H, Margineanu DG. Levetiracetam inhibits the high-voltage-activated Ca<sup>2+</sup> current in pyramidal neurones of rat hippocampal slices. *Neurosci Lett.* 2001, 306: 5-8.
- Nijenhuis T, Hoenderop JG, Bindels RJ. TRPV5 and TRPV6 in Ca<sup>2+</sup> (re)absorption: regulating Ca<sup>2+</sup> entry at the gate. *Pflügers Arch.* 2005, 451 (1): 181-192.
- Nilius B, Appendino G, Owsianik G. The transient receptor potential channel TRPA1: from gene to pathophysiology. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* 2012, 464: 425-458.
- Nilius B, Talavera K, Owsianik G, Prenen J, Droogmans G, Voets T. Gating of TRP channels: a voltage connection? *J Physiol.* 2005, 567(Pt 1): 35-44.
- Nirwan N, Vyas P and Vohora D. Animal models of status epilepticus and temporal lobe epilepsy: a narrative review. *Rev Neurosci.* 2018, 25;29(7): 757-770.
- Nishida M, Kuwahara K, Kozai D, Sakaguchi R, Mori Y. TRP Channels: Their Function and Potentiality as Drug Targets. In: Nakao K, Minato N, Uemoto S, Innovative Medicine: Basic Research and Development [Internet]. Tokyo: Springer; 2015.
- Oh MH, Oh SY, Lu J, Lou H, Myers AC, Zhu Z, Zheng T. TRPA1-dependent pruritus in IL-13-induced chronic atopic dermatitis. *J Immunol.* 2013, 191(11):5371-5382.
- Otani N, Nawashiro H, Yano A, et al. Characteristic phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase pathway after kainate-induced seizures in the rat hippocampus. *Acta Neurochir Suppl.* 2003, 86: 571-573.
- Ozcan M, Ayar A. Modulation of action potential and calcium signaling by levetiracetam in rat sensory neurons. *J Recept Signal Transduct Res.* 2012, 32: 156-162.
- Pal S, Limbrick DD, Rafiq A, DeLorenzo RJ. Induction of spontaneous recurrent epileptiform discharges causes long-term changes in intracellular calcium homeostatic mechanisms. *Cell Calcium.* 2000, 28: 181-193.
- Parakalan R, Jiang B, Nimmi B, Janani M, Jayapal M, Lu J, Tay SSW, Ling E-A, Dheen ST. Transcriptome analysis of amoeboid and ramified microglia isolated from the corpus callosum of rat brain. *BMC Neurosci.* 2012, 13: 64.
- Parsons JT, Churn SB, DeLorenzo RJ. Chronic inhibition of cortex microsomal Mg(2+)/Ca(2+) ATPase-mediated Ca(2+) uptake in the rat pilocarpine model following epileptogenesis. *J Neurochem.* 2001, 79: 319-327.
- Patacchini R, Bunnett NW, Geppetti P. Schwann cell TRPA1 mediates neuroinflammation that sustains macrophage-dependent neuropathic pain in mice. *Nat Commun.* 2017, 8(1): 1887.

Patel DC, Tewari BP, Chaunsali L, Sontheimer H. Neuron–glia interactions in the pathophysiology of epilepsy. *Nat Rev*. 2019, 20: 282-297.

Patel M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med*. 2004, 37: 1951-1962.

Payrits M, Borbely E, Godo S, Ernszt D, Kemeny A, Kardos J, Szoke E, Pinter E. Genetic deletion of TRPA1 receptor attenuates amyloid beta- 1-42 (A $\beta$  1-42)-induced neurotoxicity in the mouse basal forebrain in vivo. *Mech Ageing Dev*. 2020, 189: 111268.

Peltola J, Palmio J, Korhonen L, Suhonen J, Miettinen A, Hurme M, Lindholm D, Keranen T. Interleukin-6 and interleukin-1 receptor antagonist in cerebrospinal fluid from patients with recent tonic-clonic seizures. *Epilepsy Res*. 2000, 41: 205-211.

Phelan KD, Shwe UT, Abramowitz J, Birnbaumer L, Zheng F. Critical role of canonical transient receptor potential channel 7 in initiation of seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014, 111(31):11533-8.

Phelan KD, Shwe UT, Cozart MA, Wu H, Mock MM, Abramowitz J, Birnbaumer L, Zheng F. TRPC3 channels play a critical role in the theta component of pilocarpine-induced status epilepticus in mice. *Epilepsia*. 2017, 58(2):247-254.

Pickering M, O'Connor JJ. Pro-inflammatory cytokines and their effects in the dentate gyrus. *Prog Brain Res*. 2007, 163: 339-354.

Pires PW, Sullivan MN, Pritchard HAT, Robinson JJ, Earley S. Unitary TRPV3 channel Ca<sup>2+</sup> influx events elicit endothelium-dependent dilation of cerebral parenchymal arterioles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015, 309 (12): H2031-H2041.

Pitkänen A and Sutula TP. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. *Lancet Neurol*. 2002, 1(3): 173-181.

Pitkänen A, Lukasiuk K, Dudek F and Staley KJ. Epileptogenesis. *Cold Spring Harb Perspect*. 2015, 5(10): a022822.

Pitkänen A, Engel Jr. Past and present definitions of epileptogenesis and its biomarkers. *Neurotherapeutics*. 2014, 11: 231-241.

Pocock JM, Liddle AC. Microglial signalling cascades in neurodegenerative disease. *Prog Brain Res*. 2001, 132: 555-565.

Prakriya M and Lewis RS. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*. 2015, 95(4): 1383-1436.

Prasad P, Yanagihara AA, Small-Howard AL, Turner H, Stokes AJ. Secretogranin III directs secretory vesicle biogenesis in mast cells in a manner dependent upon interaction with chromogranin A. *J Immunol*. 2008, 181: 5024-5034.

Premkumar LS and Ahern GP. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature*. 2000, 408 (6815): 985-990.

- Premkumar LS, Qi ZH, Van Buren J, Raisinghani M. Enhancement of potency and efficacy of NADA by PKC-mediated phosphorylation of vanilloid receptor. *J Neurophysiol.* 2004, 91 (3): 1442-1449.
- Pumain R, Kurcewicz J and Louvel J. Fast extracellular calcium transients: involvement in epileptic processes. *Science.* 1983, 222: 177-179.
- Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin Neurophysiol.* 1972, 32: 281-294.
- Ragozzino D, Di Angelantonio S, Trettel F, Bertollini C, Maggi L, Gross C, Charo IF, Limatola C, Eusebi F. Chemokine fractalkine/ CX3CL1 negatively modulates active glutamatergic synapses in rat hippocampal neurons. *J Neurosci.* 2006, 26: 10488-10498.
- Rajakulendran S and Hanna MG. The Role of Calcium Channels in Epilepsy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016, 6: a022723.
- Rathee PK, Distler C, Obreja O, Neuhuber W, Wang GK, Wang SY, Nau C, Kress M. PKA/AKAP/VR-1 module: A common link of Gs-mediated signaling to thermal hyperalgesia. *J Neurosci.* 2002, 22 (11): 4740-4745.
- Ravizza T, Gagliardi B, Noe F, Boer K, Aronica E, Vezzani A. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. *Neurobiol Dis.* 2008, 29: 142-160.
- Ravizza T, Noe F, Zardoni D, Vaghi V, Sifringer M, Vezzani A. Interleukin Converting Enzyme inhibition impairs kindling epileptogenesis in rats by blocking astrocytic IL-1beta production. *Neurobiol Dis.* 2008, 31:327-333.
- Raza M, Blair RE, Sombati S, Carter DS, Deshpande LS, DeLorenzo RJ. Evidence that injury-induced changes in hippocampal neuronal calcium dynamics during epileptogenesis cause acquired epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004, 101(50): 17522-17527.
- Raza M, Pal S, Rafiq A, DeLorenzo RJ. Long-term alteration of calcium homeostatic mechanisms in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Brain Res.* 2001, 8; 903(1-2): 1-12.
- Reid CA, Kim T, Phillips AM, Low J, Berkovic SF, Luscher B, Petrou S. Multiple molecular mechanisms for a single GABAA mutation in epilepsy. *Neurology.* 2013, 80: 1003-1008.
- Reiser J, Polu KR, Möller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, Faul C, Herbert S, Villegas I, Avila-Casado C, McGee M, Sugimoto H, Brown D, Kalluri R, Mundel P, Smith PL, Clapham DE, Pollak MR. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet.* 2005, 37(7): 739-744.
- Robel S, Buckingham SC, Boni JL, Campbell SL, Danbolt NC, Riedemann T, Sutor B, Sontheimer H. Reactive astrogliosis causes the development of spontaneous seizures. *J Neurosci.* 2015, 35(8): 3330-3345.

- Robel S e Sontheimer H. Glia as drivers of abnormal neuronal activity. *Nat Neurosci.* 2016, 19(1): 28-33.
- Romano-Silva, MA. et al. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca<sup>2+</sup> entry linked to rapid glutamate release: studies using the Phoneutria nigriventer toxin PhTX2 and potassium depolarization. *Biochem J.* 1993, 296 (Pt 2): 313-319.
- Roseti C, Fucile S, Lauro C, Martinello K, Bertollini C, Esposito V, Mascia A, Catalano M, Aronica E, Limatola C, and Palma E. Fractalkine/CX3CL1 modulates GABAA currents in human temporal lobe epilepsy. *Epilepsia.* 2013, 54 (10): 1834-1844.
- Roseti C, van Vliet E, Cifelli P, et al. GABAA currents are decreased by IL-1 $\beta$  in epileptogenic tissue of patients with temporal lobe epilepsy: implications for ictogenesis. *Neurobiol Dis.* 2015, 82: 311-20.
- Ross KC. and Coleman JR. Developmental and genetic audiogenic seizure models: behavior and biological substrates. *Neurosci Biobehav Rev.* 2000, 24: 639-653.
- Rosasco MG; Gordon SE. TRP Channels: What Do They Look Like? In: Emir TLR, editor. Source Neurobiology of TRP Channels. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2017. Chapter 1. *Frontiers in Neuroscience.*
- Rossato MF, Trevisan G, Walker CI, Klafke JZ, de Oliveira AP, Villarinho JG, Zanon RB, Royes LF, Athayde ML, Gomez MV, Ferreira J. Eriodictyol: a flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. *Biochem Pharmacol.* 2011, 81(4): 544-551.
- Rowley NM, Madsen KK, Schousboe A, Steve White H. Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. *Neurochem Int.* 2012, 61(4): 546-58.
- Sabourin J, Robin E, Raddatz E. A key role of TRPC channels in the regulation of electromechanical activity of the developing heart. *Cardiovasc Res.* 2011, 92(2): 226-236.
- Sághy É, Sipos É, Ács P, Bölcskei K, Pohóczky K, Kemény Á, Sándor Z, Skóke E, Jr GS, Komoly S, Pintér E. TRPA1 deficiency is protective in cuprizone-induced demyelination-A new target against oligodendrocyte apoptosis. *Glia.* 2016, 64: 2166-2180.
- Samanta A, Hughes TET, Moiseenkova-Bell VY. Transient Receptor Potential (TRP) channels. *Subcell Biochem.* 2018, 87: 141-165.
- Sappington RM, Calkins DJ. Contribution of TRPV1 to microglia-derived IL-6 and NFkappaB translocation with elevated hydrostatic pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008, 49(7): 3004-3017.
- Sappington RM, Sidorova T, Long DJ, Calkins DJ. TRPV1: contribution to retinal ganglion cell apoptosis and increased intracellular Ca<sup>2+</sup> with exposure to hydrostatic pressure. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009, 50(2): 717-728.

Sawamura S, Shirakawa H, Nakagawa T, Mori Y, and Kaneko S. TRP channels in the brain: what are they there for? in: T.L.R. Emir (Ed.), *Neurobiology of TRP Channels*, 2nd edition, *CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL)*, 2017.

Scharfman HE, Goodman JH, Sollas AL, Croll SD. Spontaneous limbic seizures after intrahippocampal infusion of brain-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol*. 2002, 174 (2): 201-214.

Schartz ND, Herr SA, Madsen L, Butts SJ, Torres C, Mendez LB, e Brewster AL. Spatiotemporal profile of Map2 and microglial changes in the hippocampal CA1 region following pilocarpine-induced status epilepticus. *Sci Rep*. 2016, 6: 24988.

Schieber M e Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Curr Biol*. 2014, 24: R453 - R462.

Schlingmann KP, Waldegger S, Konrad M, Chubanov V, Gudermann T. TRPM6 and TRPM7-Gatekeepers of human magnesium metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2007 (8), 1772: 813-821.

Schousboe A, Madsen KK, Barker-Haliski ML, White HS. The GABA synapse as a target for antiepileptic drugs: a historical overview focused on GABA transporters. *Neurochem Res*. 2014, 39 (10): 1980-1987.

Segal M. Synaptic activation of a cholinergic receptor in rat hippocampus. *Brain Res*. 1988, 452: 79-82.

Sharma AK, Reams RY, Jordan WH, Miller MA, Thacker HL, and Snyder PW. Mesial temporal lobe epilepsy: pathogenesis, induced rodent models and lesions. *Toxicol Pathol*. 2007, 35: 984-999.

Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, Connolly MB, French J, Guilhoto L, Hirsch E, Jain S, Mathern GW, Moshe SL, Nordli DR, Perucca E, Tomson T, Wiebe S, Zhang Y, and Zuberi SM. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia*. 2017, 58(4): 512-521.

Sheridan GK, Murphy KJ. Neuron-glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage. *Open Biol*. 2013, 3(12): 130181.

Schilling T, Eder C. Importance of the non-selective cation channel TRPV1 for microglial reactive oxygen species generation. *J Neuroimmunol*. 2009, 216(1-2): 118-121.

Schilling T, Eder C. Stimulus-dependent requirement of ion channels for microglial NADPH oxidase-mediated production of reactive oxygen species. *J Neuroimmunol*. 2010, 225: 190-194.

Shin HJ, Lee JY, Son EY et al. Curcumin attenuates the kainic acid-induced hippocampal cell death in the mice. *Neurosci Lett*. 2007, 416: 49-54.

Schmued LC, Albertson C, Slikker Jr W. Fluoro-Jade: a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 1997, 751(1): 37-46.

Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res.* 2005, 1035(1): 24-31.

Scorza C, Marques M, Gomes da Silva S, Naffah-Mazzacoratti M, Scorza F, Cavalheiro E. Status epilepticus does not induce acute brain inflammatory response in the Amazon rodent *Proechimys*, an animal model resistant to epileptogenesis. *Neurosci Lett.* 2018, 668:169-173.

Scorza FA, Arida RM, Naffah-Mazzacoratti M, da G, Scerni DA, Calderazzo L, Cavalheiro EA. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? *An Acad Bras Cienc.* 2009, 81: 345-365.

Senning EM and Gordon SE. Activity and Ca<sup>2+</sup> regulate the mobility of TRPV1 channels in the plasma membrane of sensory neurons. *Elife.* 2015, 4: e03819.

Shapiro LA, Wang L, Ribak CE. Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats. *Epilepsia.* 2008, 49 Suppl 2:33-41.

Shigetomi E, Tong X, Kwan KY, Corey DP, Khakh BS. TRPA1 channels regulate astrocyte resting calcium and inhibitory synapse efficacy through GAT-3. *Nat Neurosci.* 2012, 15: 70-80.

Shi L, Chen R, Zhang H, Jiang C, Gong J. Cerebrospinal fluid neuron specific enolase, interleukin-1 $\beta$  and erythropoietin concentrations in children after seizures. *Childs Nerv Syst.* 2017, 33(5): 805-811.

Shirazi M, Izadi M, Amin M, Rezvani ME, Roohbakhsh A, Shamsizadeh A. Involvement of central TRPV1 receptors in pentylenetetrazole and amygdala-induced kindling in male rats. *Neurol Sci.* 2014, 35, 1235-1241.

Siracusa, R.; Fusco, R.; Cuzzocrea, S. Astrocytes: role and functions in brain pathologies. *Front Pharmacol.* 2019, 10.

Sloviter RS and Dempster DW. "Epileptic" brain damage is replicated qualitatively in the rat hippocampus by central injection of glutamate or aspartate but not by GABA or acetylcholine. *Brain Res Bull.* 1985, 15: 39-60.

Soc ala K, Nieoczym D, Pier og M, Wla  P.  $\alpha$ -Spinasterol, a TRPV1 receptor antagonist, elevates the seizure threshold in three acute seizure tests in mice. *J Neural Transm (Vienna).* 2015, 122 (9): 1239-1247.

Sommer C, Roth SU, Kiessling M. Kainate-induced epilepsy alters protein expression of AMPA receptor subunits GluR1, GluR2 and AMPA receptor binding protein in the rat hippocampus. *Acta Neuropathol.* 2001, 101(5): 460-468.

Sonkusare SK, Bonev AD, Ledoux J, Liedtke W, Kotlikoff MI, Heppner TJ, Hill-Eubanks DC, Nelson MT. Elementary  $Ca^{2+}$  signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function. *Science*. 2012, 336 (6081): 597-601.

Sriram K, O'Callaghan JP. Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2007, 2: 140-153.

Starowicz K, Cristino L, Di Marzo V. TRPV1 receptors in the central nervous system: potential for previously unforeseen therapeutic applications. *Curr Pharm Des*. 2008, 14(1): 42-54.

Steenland HW, Ko SW, Wu LJ et al. Hot receptors in the brain. *Mol Pain*. 2006, 2:34.

Steinlein OK. Calcium signaling and epilepsy. *Cell Tissue Res*. 2014, 357: 385-393.

Stellwagen D. Differential regulation of AMPA receptor and GABA receptor trafficking by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci*. 2005, 25(12): 3219-3228.

Strle K, Zhou J, Broussard SR, Venters HD, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, and Kelly KW. IL-10 promotes survival of microglia without activating Akt. *J Neuroimmunol*. 2002, 122: 9-19.

Strle K, Zhou J-H, Shen W.-H, Broussard SR, Johnson RW, Freund GG, Dantzer R, and Kelly KW. Interleukin-10 in the brain. *Crit Rev Immunol*. 2001, 21(5): 427-449.

Subramaniam S, Unsicker K. ERK and cell death: ERK1/2 in neuronal death. *FEBS Journal*. 2010, 277: 22-29.

Suemaru K, Yoshikawa M, Aso H, Watanabe M. TRPV1 mediates the anticonvulsant effects of acetaminophen in mice. *Epilepsy Res*. 2018, 145:153-159.

Sullivan MN, Francis M, Pitts NL, Taylor MS, and Earley S. Optical recording reveals novel properties of GSK1016790A-induced vanilloid transient receptor potential channel TRPV4 activity in primary human endothelial cells. *Mol Pharmacol*. 2012, 82 (3): 464-472.

Sullivan MN, Gonzales AL, Pires PW, Bruhl A, Leo MD, Li W, Oulidi A, Boop FA, Feng Y, Jaggar JH, Welsh GD, Earley S. Localized TRPA1 channel  $Ca^{2+}$  signals stimulated by reactive oxygen species promote cerebral artery dilation. *Sci Signal*. 2015, 8 (358) ra2.

Sun DA, Sombati S, Blair RE, DeLorenzo RJ. Long-lasting alterations in neuronal calcium homeostasis in an in vitro model of stroke-induced epilepsy. *Cell Calcium*. 2004, 35(2): 155-163.

Sun F-J, Guo W, Zheng D-H, Zhang C-Q, Li S, Liu S-Y, Yin Q, Yang H, Shu H-F. Increased expression of TRPV1 in the cortex and hippocampus from patients with mesial temporal lobe epilepsy. *J Mol Neurosci*. 2013, 49 (1): 182-193.

Sutula T, He X X, Cavazos J, Scott G. Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science* 1998; 239:1147-1150.

Tai C, Hines DJ, Choi HB, Macvicar BA. Plasma membrane insertion of TRPC5 channels contributes to the cholinergic plateau potential in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Hippocampus*. 2010, 21(9): 958-967.

Takahashi E, Niimi K, Itakura C. Levetiracetam-mediated emotional behavior in heterozygous rolling Nagoya Ca(V)2.1 channel mutant mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2010, 96: 294-300.

Takeuchi H, Jin S, Wang J, et al. Tumor necrosis factor- induces neurotoxicity via glutamate release from Hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem*. 2006, 281(30): 21362-21368.

Temkin NR. Preventing and treating posttraumatic seizures: the human experience. *Epilepsia*. 200, 50 Suppl 2: 10-13.

Thom M, Holton JL, D'Arrigo C, Griffin B, Beckett A, Sisodiya S, Alexiou D, Sander JW. Microdysgenesis with abnormal cortical myelinated fibres in temporal lobe epilepsy: A histopathological study with calbindin D-28-K immunohistochemistry. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2000, 26(3): 251-257.

Thom M. Review: Hippocampal sclerosis in epilepsy: a neuropathology review. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2014; 40: 520-543.

Tian DS, Peng J, Murugan M, Feng LJ, Liu JL, Eyo UB, Zhou LJ, Mogilevsky R, Wang W, Wu LJ. Chemokine CCL2-CCR2 Signaling Induces Neuronal Cell Death via STAT3 Activation and IL-1 $\beta$  Production after Status Epilepticus. *J Neurosci*. 2017, 16; 37(33):7878-7892.

Tikka T, Fiebich BL, Goldsteins G, Keinanen R, Koistinaho J. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *J Neurosci*. 2001, 21(8): 2580-2588.

Trinka E, Cock H, Hesdorffer D, Rossetti AO, Scheffer IE, Shinnar S, Shorvon S, Lowenstein DH. A definition and classification of status epilepticus- Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. *Epilepsia*. 2015, 56(10): 1515-1523.

Tsvilovskyy VV, Zholos AV, Aberle T, Philipp SE, Dietrich A, Zhu MX, Birnbaumer L, Freichel M, Flockerzi V. Deletion of TRPC4 and TRPC6 in mice impairs smooth muscle contraction and intestinal motility in vivo. *Gastroenterology*. 2009, 137 (4): 1415-1424.

Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, and Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res*. 1983a, 9: 315-335.

Turski WA, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, and Turski L. Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. *Experientia*. 1983b, 39: 1408-1411.

Turski WA, Cavalheiro EA, Bortolotto ZA, Mello LM, Schwarz M, Turski L. Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. *Brain Res*. 1984, 32: 237-253.

Ullal GR, Michalski B, Xu B, Racine RJ, Fahnstock M. NT-3 modulates BDNF and proBDNF levels in naive and kindled rat hippocampus. *Neurochem Int.* 2007, 50: 866-871.

Valencia, I.; Legido, A.; Yelin, K.; Khurana, D.; Kothare, S.V.; Katsetos, C.D. Anomalous inhibitory circuits in cortical tubers of human tuberous sclerosis complex associated with refractory epilepsy: Aberrant expression of parvalbumin and calbindin-D28k in dysplastic cortex. *J Child Neurol.* 2006, 21 (12), 1058-1063.

Varga A, Bolcskei K, Szoke E, Almasi R, Czeh G, Szolcsanyi J, Petho G. Relative roles of protein kinase A and protein kinase C in modulation of transient receptor potential vanilloid type 1 receptor responsiveness in rat sensory neurons in vitro and peripheral nociceptors in vivo. *Neuroscience.* 2006,140 (2): 645-657.

Vay L, Gu C, McNaughton PA. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br J Pharmacol.* 2012, 165: 787-801.

Vellani V, Mapplebeck S, Moriondo A, Davis JB, McNaughton PA. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat, and anandamide. *J Physiol.* 2001, 534: 813-825.

Vennekens R, Menigoz A, Nilius B. TRPs in the brain. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2012, 163: 27-64.

Vezzani A, Aronica E, Mazarati A, Pittman QJ. Epilepsy and brain inflammation. *Exp Neurol.* 2013, 244: 11-21.

Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol.* 2011, 7(1): 31-40.

Vezzani A, Fujinami RS, White HS, Preux PM, Blümcke I, Sander JW, Löscher W. Infections, inflammation and epilepsy. *Acta Neuropathol.* 2016, 131: 211-234.

Vezzani A, Granata T. Brain inflammation in epilepsy: experimental and clinical evidence. *Epilepsia.* 2005, 46: 1724-1743.

Vezzani A, Maroso M, Balosso S, Sanchez M-A, Bartfai T. IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures. *Brain Behav Immun.* 2001, 25 (7): 1281-1289.

Vezzani A, Moneta D, Richichi C, Aliprandi M, Burrows SJ, Ravizza T, Perego C, De Simoni MG. Functional role of inflammatory cytokines and antiinflammatory molecules in seizures and epileptogenesis. *Epilepsia.* 2002, 43 5: 30-35.

Vilela LR, Medeiros DC, de Oliveira AC, Moraes MF, Moreira FA. Anticonvulsant effects of N-arachidonoyl-serotonin, a dual fatty acid amide hydrolase enzyme and transient receptor potential vanilloid type-1 (TRPV1) channel blocker, on experimental seizures: the roles of cannabinoid CB1 receptors and TRPV1 channels. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2014, 115(4): 330-334.

Vilela LR, Lima IV, Kunsch ÉB, Pinto HPP, de Miranda AS, Vieira ÉLM, de Oliveira ACP, Moraes MFD, Teixeira AL, Moreira FA. Anticonvulsant effect of cannabidiol in the pentylenetetrazole model: Pharmacological mechanisms, electroencephalographic profile, and brain cytokine levels. *Epilepsy Behav.* 2017, 75:29-35.

Vincent F, Acevedo A, Nguyen MT, Dourado M, DeFalco J, Gustafson A, Spiro P, Emerling DE, Kelly MG, Duncton AJ. Identification and characterization of novel TRPV4 modulators. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009, 389 (3): 490-494.

Vitner EB, Salomon R, Farfel-Becker T, Meshcheriakova A, Ali M, Klein AD, Platt FM, Cox TM and Futerman AH. RIPK3 as a potential therapeutic target for Gaucher's disease. *Nat Med.* 2014, 20(2): 204-208.

Voets T, Nilius B, Hoefs S, van der Kemp AW, Droogmans G, Bindels RJ, Hoenderop JDJ. TRPM6 forms the Mg<sup>2+</sup> influx channel involved in intestinal and renal Mg<sup>2+</sup> absorption. *J Biol Chem.* 2004, 279 (1): 19-25.

von Spiczak S, Muhle H, Helbig I, de Kovel CG, Hampe J, Gaus V, Koeleman BP, Lindhout D, Schreiber S, Sander T, Stephani U. Association study of TRPC4 as a candidate gene for generalized epilepsy with photosensitivity. *Neuromol Med.* 2010, 12(3): 292-299.

Walter AM, Haucke V, Sigrist SJ. Neurotransmission: spontaneous and evoked release filing for divorce. *Curr Biol.* 2014, 24 (5): 192-4.

Wang M, Bianchi R, Chuang SC, Zhao W, Wong RK. Group I metabotropic glutamate receptor-dependent TRPC channel trafficking in hippocampal neurons. *J Neurochem.* 2007, 101(2): 411-421.

Wang X, Yang XL, Kong WL, Zeng M-L, Shao L, Jiang G-T, Cheng J-J, Kong S, He X-H, Liu W-H, Chen T-X, Peng B-W. TRPV1 translocated to astrocytic membrane to promote migration and inflammatory infiltration thus promotes epilepsy after hypoxic ischemia in immature brain. *J Neuroinflammation.* 2019, 16(1): 214.

Wang Y, Yin S, Mei L, Yang Y, Xu S, He X, Wang M, Li M, Zhang Z, He Q. A "cluster pump" with double segmentation of receptors and switchable by size that carries a chemotherapeutic receptor and potential transient inhibitor of ankyrin 1 (TRPA-1) for the treatment of triple negative breast cancer. *J Control release.* 2020, 321: 71-83.

Ward CJ, Hogan MC, Rossetti S, Walker D, Sneddon T, Wang X, Kubly V, Cunningham JM, Bacallao R, Ishibashi M, Milliner DS, Torres VE, Harris PC. The gene mutated in autosomal recessive polycystic kidney disease encodes a large, receptor-like protein. *Nat Genet.* 2002, 30(3): 259-269.

Waseem TV, Rakovich AA, Lavrukevich TV, et al. Calcium regulates the mode of exocytosis induced by hypotonic shock in isolated neuronal presynaptic endings. *Neurochem Int.* 2005, 46: 235-242.

Waseem, TV, Lapatsina LP, & Fedorovich SV. *Neurochem Res.* 2008, 33: 1316.

Weber JT, Rzigalinski BA, Willoughby KA, Moore SF, Ellis EF. Alterations in calcium-mediated signal transduction after traumatic injury of cortical neurons. *Cell Calcium*. 1999, 26: 289-299.

Woermann FG, Barker GJ, Birnie KD, Meencke HJ, Duncan JS. Regional changes in hippocampal T2 relaxation and volume: a quantitative magnetic resonance imaging study of hippocampal sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1998, 65: 656-664.

World Health Organization. Epilepsy. WHO; 2019 [aceso em 24 de março de 2020]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/epilepsy>.

Woudenberg-Vrenken TE, Sukinta A, van der Kemp AW, Bindels RJ, Hoenderop JG. Transient receptor potential melastatin 6 knockout mice are lethal whereas heterozygous deletion results in mild hypomagnesemia. *Nephron Physiol*. 2011, 117(2): p11-9.

Wu LJ, Sweet TB, and Clapham DE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev*. 2010, 62 (3): 381-404.

Wu H-Y, Opperman K, Kaboord B. Enrich neuronal synaptic proteins while maintaining phosphoprotein integrity. *Protein Biology Resource Library*. 2012.

Wyatt-Johnson SK, Herr SA, Brewster AL. Status epilepticus triggers time-dependent alterations in microglia abundance and morphological phenotypes in the hippocampus. *Front Neurol*. 2017, 8: 1-10.

Xue Y, Xie N, Lin Y, Xu J, Han Y, Wang S, et al. Role of PI3K/Akt in diazoxide preconditioning against rat hippocampal neuronal death in pilocarpine induced seizures. *Brain Res*. 2011, 1383:135-140.

Xu B, Michalski B, Racine RJ, Fahnstock M. The effects of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) administration on kindling induction, Trk expression and seizure-related morphological changes. *Neuroscience*. 2004, 126: 521-531.

Xu Y, Zeng K, Han Y, et al. Altered expression of CX3CL1 in patients with epilepsy and in a rat model. *Am J Pathol*. 2012, 180: 1950-1962.

Yamashima T, Tonchev AB, Vachkov IH, Popivanova BK, Seki T, Sawamoto K, Okano H. Vascular adventitia generates neuronal progenitors in the monkey hippocampus after ischemia. *Hippocampus*. 2004, 14: 861-875.

Yanaga A, Goto H, Nakagawa T, Hikiami H, Shibahara N, Shimada Y. Cinnamaldehyde induces endothelium-dependent and -independent vasorelaxant action on isolated rat aorta. *Biol Pharm Bull*. 2006, 29: 2415-2418.

Yan H, Wang C, Marx SO, Pitt GS. Calmodulin limits pathogenic Na<sup>+</sup> channel persistent current. *J Gen Physiol*. 2017, 149 (2): 277-293.

Yang XL, Wang X, Shao L, Jiang G-T, Min J-W, Mei X-Y, He X-H, Liu W-H, Huang W-X, Peng B-W. TRPV1 mediates astrocyte activation and interleukin-1 $\beta$  release induced by hypoxic ischemia (HI). *J Neuroinflammation*. 2019, 16(1): 114.

Yue Z, Xie J, Yu AS, Stock J, Du J, Yue L. Role of TRP channels in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2015, 1; 308(3): H157-82.

Zafra F, Castren E, Thoenen H, Lindholm D. Interplay between glutamate and g-aminobutyric acid transmitter systems in the physiological regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor synthesis in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci (USA)*. 1991, 88, 10037-10041.

Zhand A, Sayad A, Ghafouri-Fard S, Arsang-Jang S, Mazdeh M, Taheri M. Expression analysis of GRIN2B, BDNF, and IL-1 $\beta$  genes in the whole blood of epileptic patients. *Neurol Sci*. 2018, 39: 1945-1953.

Zhao H, Zhu C, Huang D. Microglial activation: an important process in the onset of epilepsy. *Am J Transl Res*. 2018, 10(9): 2877-2889.

Zhao JF, Shyue SK, Kou YR, Lu TM, Lee TS. Transient receptor potential ankyrin 1 channel involved in atherosclerosis and macrophage-foam cell formation. *Int J Biol Sci*. 2016, 12 (7): 812-823.

Zheng, F, Phelan, KD. The role of canonical transient receptor potential channels in seizure and excitotoxicity. *Cells*. 2014, 3 (2): 288-303.

Zheng XY, Amir N, Zhang HL, Azimullah S, Winblad B, Adem A, Zhu J. TNF-A protects of hippocampal neurons from kainic acid induced neurodegeneration is associated with up-regulation of NF $\kappa$ B and AKT as well as down-regulation of p38 MAPK signaling molecules. *Toxicology*. 2015, 2(1): 52-61.

Zhou C, Huang Z, Ding L, Deel ME, Arain FM, Murray CR, Patel RS, Flanagan CD, Gallagher MJ. Altered cortical GABAA receptor composition, physiology, and endocytosis in a mouse model of a human genetic absence epilepsy syndrome. *J Biol Chem*. 2013, 288: 21458-21472.

Zhu, Y. M., Wang, C. C., Chen, L., Qian, L. B., Ma, L. L., Yu, J., Zhu, M. H., Wen, C. Y., Yu, L. N. and Yan, M. Both PI3K/Akt and ERK1/2 pathways participate in the protection by dexmedetomidine against transient focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Brain Res*. 2013. 1494: 1-8.

Zygmunt PM, Högestätt ED. TRPA1. *Handb Exp Pharmacol*. 2014, 222: 583-630.

## APÊNDICES

## Apêndice A: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo 380/2018.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do papel de canabinoides e de canais da família TRP sobre crises convulsivas e suas consequências", protocolo do CEUA: 380/2018 sob a responsabilidade de Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 26/11/2018.

Vigência da Autorização	26/11/2018 a 25/11/2023
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57Bl/6
Nº de animais	64
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57Bl/6
Nº de animais	64
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57Bl/6
Nº de animais	64
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério central
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57Bl/6
Nº de animais	64
Peso/Idade	20g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central

## Considerações posteriores:

26/11/2018	Aprovado COM RECOMENDAÇÕES na reunião do dia
------------	--

26/11/2018. Validade: 26/11/2018 à 25/11/2023  
RECOMENDAÇÕES: 1- Prezado(a) pesquisador(a) o biotério onde sua pesquisa será realizada não está com cadastro e credenciamento finalizado no novo site do CIUCA/CONCEA. Solicitamos informar ao responsável pelo biotério para concluir o cadastro, porque em breve somente poderemos aprovar os que estiverem devidamente cadastrados e credenciados. O e-mail enviado pelo CONCEA se refere ao credenciamento da CEUA, e não dos biotérios. CIAEP é designado para a CEUA. 2- Pedimos que, em submissões futuras, avalie a possibilidade de cadastrar grupos diferentes quando os animais forem submetidos a tratamentos diferentes.

Belo Horizonte, 30/07/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG

[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [ceua@prpq.ufmg.br](mailto:ceua@prpq.ufmg.br)

**Apêndice B: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, protocolo 380/2019.**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto intitulado "Avaliação do papel de canais da família TRP sobre a liberação de glutamato e na concentração de cálcio intrasinaptossomal", protocolo do CEUA: 380/2019 sob a responsabilidade de Antonio Carlos Pinheiro de Oliveira que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 06/07/2020.

Vigência da Autorização	06/07/2020 a 05/07/2025
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / C57Bl/6
Nº de animais	28
Peso/Idade	25g / 8(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG

**Considerações posteriores:**

06/07/2020	Aprovado na reunião "on line" do dia 06/07/2020. Validade: 06/07/2020 à 05/07/2025.
06/07/2020	Aprovado na reunião "on line" do dia 06/07/2020. Validade: 06/07/2020 à 05/07/2025.

Belo Horizonte, 28/08/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

**Apêndice C: Análise estatística por grupo obtida a partir da avaliação do efeito do AP18 sobre a marcação de corpos de neurônios com NeuN.**

Grupo	Média ± erro padrão da média	
	CA1	GD
Salina + veículo AP18	39308 ± 1512	21240 ± 78,7
Salina + AP 1 mg/Kg	42202 ± 226	23393 ± 128,6*
Salina + AP 3 mg/Kg	27210 ± 330*	24267 ± 79,44*
Salina + AP18 10 mg/Kg	38866 ± 362,8	25334 ± 83,24*
<b>P</b>	< 0,0001	< 0,0001

\* diferença com relação ao grupo salina + veículo AP18

**Apêndice D: Análise estatística por grupo obtida a partir da avaliação do efeito do AP18 sobre a marcação de micróglia com IBA-1.**

Grupo	Média ± erro padrão da média	
	CA1	GD
Salina + veículo AP18	23724 ± 304,7	22276 ± 449,4
Salina + AP 1 mg/Kg	24037 ± 327,5	23375 ± 493,8
Salina + AP 3 mg/Kg	24341 ± 443,9	22117 ± 267,2
Salina + AP18 10 mg/Kg	26529 ± 341,4*	26123 ± 427,7*
<b>P</b>	< 0,0001	< 0,0001

\* diferença com relação ao grupo salina + veículo AP18

**Apêndice E: Análise estatística por grupo obtida a partir da avaliação do efeito do AP18 sobre a marcação de astrócitos com GFAP.**

Grupo	Média ± erro padrão da média	
	CA1	GD
Salina + veículo AP18	26898 ± 656,4	25974 ± 731,9
Salina + AP 1 mg/Kg	23975 ± 841,3*	27983 ± 376,9*
Salina + AP 3 mg/Kg	27640 ± 174,9	31360 ± 263,6*
Salina + AP18 10 mg/Kg	26223 ± 114,7	24615 ± 244,1
<b>P</b>	0,0009	< 0,0001

\* diferença com relação ao grupo salina + veículo AP18

**Apêndice F: Análise estatística por grupo obtida a partir da avaliação do efeito do AP18 sobre os níveis de fosforilação de Akt e Erk.**

Grupo	Média ± erro padrão da média	
	Akt	Erk
Salina + veículo AP18	100 ± 0	100 ± 0
Salina + AP 1 mg/Kg	170,7 ± 49,64	424,3 ± 119
Salina + AP 3 mg/Kg	141,7 ± 14,65	118,5 ± 19,05
Salina + AP18 10 mg/Kg	115,3 ± 23,44	311,0 ± 127,5
<b>P</b>	0,3317	0,0691

**Apêndice G: Análise estatística por grupo obtida a partir da avaliação do efeito do AP18 sobre os níveis do fator neurotrófico BDNF.**

Grupo	Média ± erro padrão da média
	BDNF
Salina + veículo AP18	1351 ± 69,12
Salina + AP 1 mg/Kg	371,4 ± 34,45*
Salina + AP 3 mg/Kg	245,4 ± 23,26*
Salina + AP18 10 mg/Kg	365,5 ± 69,31*
<b>p</b>	< 0,0001

\* diferença com relação ao grupo salina + veículo AP18

**Apêndice H: Análise estatística por grupo obtida a partir da avaliação do efeito do AP18 sobre os níveis das citocinas IL-10, TNF- $\alpha$  e da quimiocina CX3CL1.**

Grupo	Média ± erro padrão da média		
	IL-10	TNF- $\alpha$	CX3CL1
Salina + veículo AP18	852,1 ± 98,12	381,6 ± 38,35	2626 ± 272,7
Salina + AP 1 mg/Kg	494,3 ± 88,5*	269,3 ± 45,97	2524 ± 220,7
Salina + AP 3 mg/Kg	382,0 ± 65,52*	228,1 ± 33,41*	1456 ± 53,51*
Salina + AP18 10 mg/Kg	448,6 ± 61,7*	248,0 ± 29,85	2204 ± 352,7
<b>p</b>	0,0015	0,0296	0,0055

\* diferença com relação ao grupo salina + veículo AP18

**Apêndice I: Análise estatística por grupo obtida a partir da avaliação do efeito do AP18 sobre a liberação de glutamato, conteúdo de cálcio citosólico e excitose na ausência do KCl.**

Grupo	Média ± erro padrão da média		
	Liberação de glutamato	Concentração de cálcio citosólico	Excitose
Veículo AP18	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
AP18 0,1 µM	247,3 ± 129,7	125,4 ± 40,05	106,2 ± 4,853
AP18 1 µM	-17,64 ± 365,1	86,72 ± 22,96	105,8 ± 3,882
AP18 10 µM	437,6 ± 411,4	76,18 ± 15,92	99,85 ± 0,6043
AP18 30 µM	969,5 ± 841,7	56,27 ± 25,81	105,4 ± 7,341
<b>P</b>	0,8815	0,4078	0,8603

**Apêndice J: Análise estatística por grupo obtida a partir da avaliação do efeito do HC030031 sobre a liberação de glutamato e conteúdo de cálcio citosólico na ausência do KCl.**

Grupo	Média ± erro padrão da média	
	Liberação de glutamato	Concentração de cálcio citosólico
Veículo HC030031	100 ± 0	100 ± 0
HC030031 0,1 µM	151,0 ± 283,4	78,14 ± 31,71
HC030031 1 µM	-74,34 ± 83,44	84,57 ± 63,32
HC030031 10 µM	-259,5 ± 331,5	1318 ± 830,2
HC030031 30 µM	-168,5 ± 252,9	486,7 ± 413,2
<b>P</b>	0,2311	0,8072

**Apêndice K: Análise estatística por grupo obtida a partir da avaliação do efeito do SB366791 sobre os níveis do fator neurotrófico BDNF.**

Grupo	Média ± erro padrão da média
	BDNF
Salina + veículo SB366791	544,1 ± 45,6
Salina + SB366791 0,3 mg/Kg	435,6 ± 36,55
Salina + SB366791 1 mg/Kg	463,2 ± 54,07
<b>p</b>	0,2488

**Apêndice L: Análise estatística por grupo obtida a partir da avaliação do efeito do SB366791 sobre os níveis das citocinas IL-10, TNF- $\alpha$  e da quimiocina CX3CL1.**

Grupo	Média ± erro padrão da média		
	IL-10	TNF- $\alpha$	CX3CL1
Salina + veículo SB366791	1413 ± 184,8	171,9 ± 27,32	2592 ± 152,7
Salina + SB366791 0,3 mg/Kg	851,3 ± 142,3	82,88 ± 5,3*	1079 ± 89,32*
Salina + SB366791 1 mg/Kg	971,4 ± 144	111,5 ± 13,95	1648 ± 137,9*
<b>p</b>	0,0544	0,0078	< 0,0001

\* diferença com relação ao grupo salina + veículo SB366791

**Apêndice M: Análise estatística por grupo obtida a partir da avaliação do efeito do SB366791 sobre a liberação de glutamato e conteúdo de cálcio citosólico na ausência do KCl.**

Grupo	Média ± erro padrão da média	
	Liberação de glutamato	Concentração de cálcio citosólico
Veículo SB366791	100 ± 0	100 ± 0
SB366791 0,1 µM	362,2 ± 446,1	45,68 ± 16,18
SB366791 1 µM	398,9 ± 355,0	275,5 ± 134,7
SB366791 10 µM	-293,7 ± 189,7	-64,07 ± 281,1
SB366791 30 µM	188,8 ± 155,2	790,9 ± 547,0
<b>P</b>	0,4134	0,1896