

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA**

ALEXSANDRO LUÍS FRANTZ

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ACUPUNTURA MANUAL SOBRE CONVULSÕES
INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL NO MODELO DE *KINDLING* EM
CAMUNDONGOS**

Porto Alegre, dezembro de 2016.

ALEXSANDRO LUÍS FRANTZ

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ACUPUNTURA MANUAL SOBRE CONVULSÕES
INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL NO MODELO DE *KINDLING* EM
CAMUNDONGOS**

Trabalho de conclusão de curso de pós-graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Farmacologia e Terapêutica

Orientador: Prof. Dra. Patrícia Pereira

Porto Alegre, dezembro de 2016

CIP - Catalogação na Publicação

Frantz, Aleksandro Luís
Avaliação do efeito da acupuntura manual sobre
convulsões induzidas por pentilenotetrazol no modelo
de kindling em camundongos / Aleksandro Luís Frantz.
-- 2016.
69 f.

Orientadora: Patrícia Pereira.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas:
Farmacologia e Terapêutica, Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. acupuntura . 2. epilepsia. 3. estresse
oxidativo. 4. pentilenotetrazol. I. Pereira,
Patrícia, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FARMACOLOGIA E TERAPÊUTICA

A Banca examinadora abaixo assinada aprova a dissertação de mestrado intitulada

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ACUPUNTURA MANUAL SOBRE CONVULSÕES
INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL NO MODELO DE *KINDLING* EM
CAMUNDONGOS**

Elaborada por

ALEXSANDRO LUÍS FRANTZ

Como requisito parcial para a obtenção do título de

Mestre em Farmacologia e Terapêutica

Aprovado em: ____ de _____ de ____.

Prof. Dra. Patrícia Pereira (Presidente da banca)

Prof. Dra. Rosane Gomez (UFRGS)

Prof. Dra. Patrícia Grolli Ardenghi (FEEVALE)

Prof. Dr. Rafael Vercelino (UFCSPA)

Resumo

Cerca de 30% dos pacientes com epilepsia continuam refratários ao tratamento medicamentoso e continuam a sofrer crises, mesmo utilizando um ou mais fármacos antiepilépticos. Intervenções não farmacológicas representam uma alternativa aos fármacos antiepilépticos, dentre as quais a acupuntura, uma técnica tradicional chinesa, que é frequentemente utilizada como tratamento complementar na medicina ocidental. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da acupuntura manual sobre as convulsões no modelo de *kindling* induzido por pentilenotetrazol (PTZ) em camundongos, comparar o efeito da acupuntura com diazepam, avaliar a sua utilização em associação a uma dose baixa de diazepam, e avaliar parâmetros de estresse oxidativo, inflamação, genotoxicidade e mutagenicidade. No modelo de *kindling*, os animais dos grupos que receberam acupuntura manual, foram tratados diariamente durante 16 dias com estimulação no acuponto VG20, e a cada três dias os animais receberam o salina ou diazepam (0,15 mg / kg; i.p.) 30 min antes da administração de PTZ (60 mg / kg; s.c.). Nos grupos que não receberam acupuntura manual, os animais receberam salina, diazepam (2 mg / kg; i.p. - controle positivo), diazepam (0,15 mg / kg; i.p.), 30 min antes da administração de PTZ (60 mg / kg; s.c.). O comportamento convulsivo (porcentagem de convulsão e latência para a primeira convulsão) foi observado por 30 min. Após o último tratamento, os animais foram eutanasiados e o córtex, hipocampo, sangue periférico e medula óssea foram coletados para avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo, inflamação, genotoxicidade e mutagenicidade. Os dados de porcentagem (%) de convulsão e latência para a primeira convulsão (LFS) foram analisados pelo Teste de Fisher e GEE respectivamente. MAC e MAC + DZP 0.15mg/Kg não impediram a ocorrência das convulsões, nem aumentaram a LFS, com exceção do terceiro dia de tratamento, no qual observou-se aumento na LFS no grupo MAC + DZP 0.15mg/Kg, comportamento que não se repetiu ao longo do protocolo. Observou-se nos grupos MAC e MAC + DZP 0.15mg/Kg uma redução na formação de espécies reativas de oxigênio e na liberação de óxido nítrico, bem como aumento na atividade de SOD e CAT, sugerindo que a acupuntura oferece proteção contra estresse oxidativo. Além disso, nos mesmos grupos verificou-se a redução na expressão da citocina pró-inflamatória (TNF- α). No grupo MAC + DZP 0.15mg/Kg observou-se uma tendência à proteção do DNA no hipocampo, uma vez que não houve diferença em comparação ao grupo Sal/Sal, contudo não foi observada mutagenicidade em nenhum dos grupos de tratamento. Para concluir, os resultados indicaram que MAC em associação ao DZP 0.15mg/Kg foi capaz de alterar parâmetros associados a convulsões mediada por PTZ no modelo de *kindling* em camundongos, bem como a acupuntura teve um

efeito protetor contra estresse oxidativo, neuroinflamação e danos ao DNA no mesmo modelo.

Palavras-chave: acupuntura, epilepsia, estresse oxidativo, pentilenotetrazol.

Abstract

Around 30% of patients with epilepsy continue refractory to drug treatment and continue to suffer crises, even using one or more anti-epileptic drugs. Nonpharmacological interventions represent an alternative to antiepileptic drugs, among which acupuncture, a traditional Chinese technique, which is often used as a complementary treatment in Western medicine. The aim of this study was to evaluate the effect of manual acupuncture on seizures in the kindling model induced by pentylenetetrazol (PTZ) in mice, comparing the effect of acupuncture with diazepam, to evaluate their use in combination with a low dose of diazepam, and evaluate parameters of oxidative stress, inflammation, genotoxicity and mutagenicity. In the model of kindling, the animal groups receiving manual acupuncture, were treated daily for 16 days with stimulation of the acupoint VG20, and every three days the animals received saline or diazepam (0.15 mg / kg, ip) 30 min before PTZ administration (60 mg / kg, sc). In the groups not receiving manual acupuncture, the animals received saline, diazepam (2 mg / kg, ip - positive control), diazepam (0.15 mg / kg, ip) 30 min before the PTZ administration (60 mg / kg ; sc). The convulsive behavior (percentage of seizure and latency to the first seizure) was observed for 30 min. After the last treatment, the animals were euthanized and the cortex, hippocampus, peripheral blood and bone marrow were collected for evaluation of parameters of oxidative stress, inflammation, genotoxicity and mutagenicity. Percentage of seizure (%) and latency to the first seizure (LFS) were analyzed by Fisher test and GEE respectively. MAC and MAC + DZP 0.15mg / kg did not prevent the occurrence of seizures or increased LFS, except for the third day of treatment, in which there was an increase in LFS in the MAC + DZP 0.15mg / kg group, behavior that was not repeated throughout the protocol. It was observed in the MAC and MAC + DZP 0.15mg / kg groups a reduction in the formation of reactive oxygen species and release of nitric oxide and increase in SOD and CAT activity, suggesting that acupuncture provides protection against oxidative stress. Furthermore, in the same groups there was a reduction in the expression of pro-inflammatory cytokine (TNF- α). In the MAC + DZP 0.15mg / kg group there was a tendency to protect DNA in hippocampus since there was no difference in comparison to Sal/Sal group, however mutagenicity was not observed in any of the treatment groups. In conclusion, the results indicated that MAC in association with DZP 0.15mg / kg was able to change parameters associated with seizures mediated in PTZ kindling model in mice, also suggested that acupuncture had a protective effect against oxidative stress, neuroinflammation and damage DNA in the same model.

Keywords: acupuncture, epilepsy, oxidative stress, pentylentetrazole.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Principais fármacos antiepilépticos utilizados na clínica, respectivos mecanismo de ação e indicações.....	20
--	----

Lista de Figuras

Figura 1. Representação do meridiano Vaso Governador (VG) publicado no <i>Shi si jing fa hui</i> , traduzido como "Rotas dos catorze meridianos e suas funções," de autoria do médico chinês Hua Shou (meados do século XIV).....	14
Figura 2. A transmissão do impulso nervoso dos neurônios transmissores aos neurôniosreceptores e os efeitos do GABA e glutamato.....	18

Lista de Abreviaturas

A.C.	Antes de Cristo
ATP	Adenosina 5' trifosfato
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (Brain derived neurotrophic factor , em inglês)
Ca ²⁺	Cálcio
CAT	Catalase
COX-2	Ciclooxigenase-2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DZP	Diazepam
EA	Eletroacupuntura
ERNS	Espécies reativas de nitrogênio
EROS	Espécies reativas de oxigênio
GABA	Ácido- γ -aminobutírico
GABA _A	Receptor GABA _A
GDNF	Fator neurotrófico derivado da glia (Glial cell-derived neurotrophic factor, em inglês)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IL-1 β	Interleucina -1 β
IL-6	Interleucina -6
K ⁺	Potássio
MAC	Acupuntura manual (Manual acupuncture, em inglês)
MTC	Medicina Tradicional Chinesa

Na ⁺	Sódio
Na ⁺ /K ⁺ ATPASE	Bomba de sódio/potássio
NGF	Fator de crescimento neural (Nerve growth factor, em inglês)
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase
NMDA	N-metil D-Aspartato
OH ⁻	Ânion hidroxil
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
P.EX.	Por exemplo
P38MAPK	Mitogen-activated protein kinase p38, em inglês
PI3 K/Akt	Fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase
PTZ	Pentilenotetrazol
Sal	Solução salina
SNC	Sistema Nervoso Central
SOD	Superóxido dismutase
ST36	Acuponto “ <i>Zusanli</i> ”
TGF-β	Fator de transformação do crescimento-beta (Transforming Growth Factor-beta, em inglês)
TNF-α	Fator de necrose tumoral -alfa (Tumor Necrosis Factor-alpha, em inglês)
VG20	Acuponto “ <i>Baihui</i> ”
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Acupuntura	14
1.2 Epilepsia	17
1.2.1 Fisiopatologia da epilepsia	18
1.2.2 Tratamentos farmacológicos e acupuntura	19
1.3 Estresse oxidativo	22
1.4 Neuroinflamação	23
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo Principal	25
2.2 Objetivos Específicos	25
3 ARTIGO CIENTÍFICO	26
ARTIGO I: Manual acupuncture improves parameters associated to stress oxidative and inflammation after PTZ-induced kindling in mice	27
4 DISCUSSÃO	59
5 CONCLUSÃO	63
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
7 ANEXOS	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 Acupuntura

A acupuntura é um tratamento tradicional chinês que vem sendo usado no Oriente por milhares de anos, e atualmente difundida como tratamento complementar e alternativo na medicina moderna e ocidental, principalmente por sua eficácia inegável para o tratamento da dor e doenças crônicas (Qiu et al., 2016; Standish et al., 2008). Entretanto o seu mecanismo biológico ainda não é bem compreendido e atrai cada vez mais atenção, contudo desde a década de 1970, vários estudos utilizando acupuntura em animais experimentais comprovaram que a integração do sistema nervoso central (SNC) desempenha um papel importante na eficácia de acupuntura (Qiu et al., 2016). Do aspecto neurofisiológico, a acupuntura pode ser considerada como uma estimulação somato-sensorial complexa (Backer et al., 2004). Embora seu efeito clínico seja geralmente aceito para determinados diagnósticos (WHO, 2002) existe controvérsia sobre o efeito específico da mesma, especialmente no que refere-se aos acupontos e os meridianos (Brinkhaus et al., 2006; Linde et al., 2005; Melchart et al., 2005).

O termo acupuntura, utilizado no século XVII por jesuítas, deriva dos radicais latinos *acus* e *pungere*, que significam agulha e puncionar. Originalmente, o vocábulo chinês que a define - *Zhenjiu* - possui sentido mais abrangente: literalmente “agulha-moxabustão”, que inclui outras técnicas de estímulo do ponto (Schoen, 2006; Maciocia, 1996; Xie e Preast, 2007).

Os acupontos (pontos de acupuntura) são considerados portas de entrada e saída de energia de um organismo. São áreas onde é possível a manipulação da energia para restaurar o equilíbrio do organismo. Estão distribuídos através de canais de energia que se interligam e por onde circula um fator principal responsável por associar, regular e controlar as atividades funcionais do corpo denominado *Qi* (Altman, 1997). No transcorrer de anos de prática médica, os pontos foram determinados empiricamente, sendo que seu conhecimento foi transmitido inicialmente pela tradição e, posteriormente, desenhado em papel ou em estátuas (Scognamillo-Szabó e Bechara, 2001). No Oriente os pontos têm nomes chineses tradicionais, que se referem a sua localização e/ou função, mas no Ocidente são identificados por código que especifica o canal sobre o qual está localizado, e o número do acuponto (p.ex., B40 refere-se ao quadragésimo ponto do canal da bexiga), facilitando o aprendizado e a comunicação, além de evitar confusões com a tradução dos nomes orientais (Maciocia, 1996).

Figura 1. Representação do meridiano Vaso Governador (VG) publicado no *Shi si jing fa hui*, traduzido como "Rotas dos catorze meridianos e suas funções," de autoria do médico chinês Hua Shou (meados do século XIV).



Fonte: Adaptado de

https://www.nlm.nih.gov/exhibition/historicalanatomies/Images/1200_pixels/hua_t14.jpg

Acupuntura manual é uma das técnicas terapêuticas orientais que está relacionada à inserção de agulhas finas em específicos acupontos e manipulação manual rápida (por exemplo, rotação, retenção, inserção). O termo significa literalmente a punção com uma agulha (WHO, 2002), no entanto é usado em um sentido mais amplo, incluindo o agulhamento tradicional no corpo, a moxabustão, a eletroacupuntura, o laser acupuntura, a acupuntura em microssistemas (como auricular, rosto, mãos e no couro cabeludo) e a acupressão (aplicação de pressão em locais). Estudos prévios em animais demonstram que a estimulação através da acupuntura pode facilitar a liberação de neuropeptídeos específicos no sistema nervoso central e promover efeitos fisiológicos profundos (Han, 2003). Resultados obtidos em estudos conduzidos por Erthal e colaboradores (2013), demonstraram que a laser-acupuntura – uma modalidade de terapia de luz de baixa intensidade usada como alternativa ao agulhamento – produziu significativo efeito antinociceptivo contra o comportamento doloroso induzido por ácido acético e formalina em ratos, bem como revelaram que este efeito

é mediado pela ativação dos sistemas opióide e serotoninérgico (receptores 5-HT1 and 5-HT2A).

A acupuntura é considerada também como uma abordagem de tratamento eficaz em vários tipos de doenças neurológicas, incluindo distúrbios do movimento, doença de Parkinson e doença de Alzheimer. Estudos clínicos recentes mostraram benefícios terapêuticos de acupuntura manual ou eletroacupuntura (EA) no sistema nervoso central (SNC). Independentemente do método, as agulhas inseridas em acupontos produzem estimulação física que pode facilitar a homeostase. Outros estudos recentes demonstraram atividades neuroprotetoras da acupuntura. A maioria deles propôs que a acupuntura exerce os seus efeitos terapêuticos por meio de regulação de várias vias de sinalização (Lin et al., 2014). Por exemplo, verificou-se que a neuroproteção mediada por acupuntura pode diminuir os níveis de p38MAPK e reduzir a expressão de citocinas/mediadores pró-inflamatórias e de NGF, que estão envolvidos na morte celular por apoptose de neurônios e oligodendrócitos. Em contraste, existem apenas alguns estudos que implicam o papel das neurotrofinas (p.ex., BDNF, GDNF) em neuroproteção induzida por acupuntura (Lin et al., 2014). O BDNF, uma neurotrofina que regula o desenvolvimento, a regeneração, a sobrevivência e a manutenção dos neurônios, desempenha um papel central em muitos aspectos da função do cerebral (Lin et al., 2014). Os dados mais recentes sobre a correlação entre neurotrofinas e acupuntura têm demonstrado que a EA pode aliviar certos distúrbios neuropatológicos, modulando BDNF e sua via de sinalização. Os efeitos benéficos de acupuntura têm sido relacionados com a liberação de neuropeptídeos das terminações nervosas e a modulação da expressão de neurotrofinas (Lin et al., 2014). Dentre as vantagens do tratamento com acupuntura, podemos destacar: segurança, conveniência e efeitos colaterais mínimos (Standish et al., 2008).

A acupuntura e a EA também tem sido bastante reconhecida por regular os sistemas opióides endógenos no sistema nervoso central (Chao et al., 1999; Liang e Xia, 2012; Xia et al., 1985). Entretanto, os mecanismos básicos desta modulação não estão esclarecidos (Chao e Xia, 2012).

Na medicina tradicional chinesa (MTC), a epilepsia foi descrita pela primeira vez no Clássico de Medicina Interna do Imperador Amarelo (Huang Di Nei Jing), um antigo livro de medicina chinesa, que foi compilado em torno de 770-221 a.C. Sua etiologia, do ponto de vista do MTC, supõe-se resultar principalmente do distúrbio de *qi* e, assim, evoluir para ser o excesso de *yang* devido à deficiência de *yin* (*qi*, *yin* e *yang* são conceitos abstratos na filosofia chinesa antiga para descrever a energia ou essência vital para a homeostase e da função adequada e sua mudança dinâmica dentro do corpo). Uma vez que a MTC considera que o

meridiano *Du Mai* ou Vaso Governador (VG), o qual está localizado na linha média posterior decorrente do períneo para a cabeça, deve gerir todo o *yang* do corpo, por conseguinte, os pontos de acupuntura anticonvulsivantes mais freqüentemente utilizados são selecionados a partir deste meridiano (Chen et al., 2014).

1.2 Epilepsia

A epilepsia é uma das principais desordens neurológicas do cérebro, afetando aproximadamente 0,5-1% da população mundial (Dhir et al., 2005). Segundo dados de 2016 (WHO), em todo o mundo existem cerca de 50 milhões de pessoas com epilepsia.

O tratamento da epilepsia tem sido focado na utilização de anticonvulsivantes para modificar a excitabilidade neuronal. Alguns anticonvulsivantes atuam inativando os canais de Na⁺, como a fenitoína, carbamazepina, oxcarbazepina, lamotrigina, topiramato e felbamato. Alguns trabalham para melhorar a transmissão GABAérgica inibitória, como benzodiazepínicos, barbitúricos, fenobarbital, vigabatrina, tiagabina e gabapentina. Contudo, apesar da introdução de uma variedade de novos fármacos antiepiléticos, muitos pacientes relatam efeitos adversos que impedem o uso continuado dos mesmos - como fenobarbital e trimetadiona, que possuem propriedades sedativas ou hipnóticas, acarretando cansaço, esquecimento e confusão. Muitos pacientes com epilepsia de difícil controle não respondem aos medicamentos anticonvulsivantes (Yang e Cheng, 2010), sendo que dados epidemiológicos indicam que 20-40% dos pacientes com diagnósticos recentes de epilepsia se tornarão refratários ao tratamento (French, 2007; Loscher e Schmidt, 2004). O desenvolvimento de formas novas e eficazes de fármacos ainda é bastante limitado, apesar do rápido crescimento da compreensão dos fatores relacionados à epilepsia (Yang e Cheng, 2010).

Atualmente, a epilepsia tem sido reconhecida como um distúrbio da excitabilidade cerebral caracterizada por crises recorrentes não provocadas que resultam da atividade anormal, excessiva, e sincronizada dos agrupamentos de células nervosas do cérebro. Neste contexto, estudos pré-clínicos e clínicos têm indicado que a acupuntura é eficaz em certos tipos de epilepsia. Em comparação com a convencional medicina ocidental e tratamentos cirúrgicos, as vantagens do tratamento com acupuntura incluem a sua segurança, conveniência e efeitos colaterais mínimos (NIH, 1998). É provável que a acupuntura exerça seu efeito antiepilético através da normalização da excitabilidade neuronal (Chao e Xia, 2012). Alguns

efeitos induzidos pela acupuntura parecem envolver a ativação do sistema opióide, conforme comentado anteriormente (Chao et al., 1999; Chao et al., 2013; Liang e Xia, 2012).

1.2.1 *Fisiopatologia da epilepsia*

Epilepsia é uma desordem paroxística caracterizada por descargas neuronais anormais. Apesar das causas da epilepsia serem diversas, a desordem fundamental é secundária às descargas sincrônicas de uma rede de neurônios. Epilepsia pode ser secundária à anormalidade de membranas neuronais ou desequilíbrio entre influências excitatórias e inibitórias (Browne e Holmes, 2008).

A enzima transmembrana Na^+/K^+ ATPase, a fim de manter o potencial de repouso, libera Na^+ para o meio extracelular e K^+ para o meio intracelular, em uma proporção de $3\text{Na}^+ / 2\text{K}^+$, fazendo com que o interior da membrana fique com uma carga elétrica negativa em relação ao seu exterior (polarizada). Com o estímulo nervoso, ocorre a despolarização (potencial de ação), processo no qual ocorre a abertura de canais de Na^+ , ocasionando a sua entrada para o ambiente intracelular. Em seguida, com a saída de K^+ pela abertura de seus canais e através do transporte ativo de Na^+ para o meio extracelular através da Na^+/K^+ ATPase, ocorre a repolarização da membrana. É chamada de impulso nervoso essa seqüência de ondas de despolarizações/repolarizações que se propagam ao longo do neurônio (Glynn, 1993; Skou & Esmann, 1992; Jorgensen, 1990; Skou, 1990).

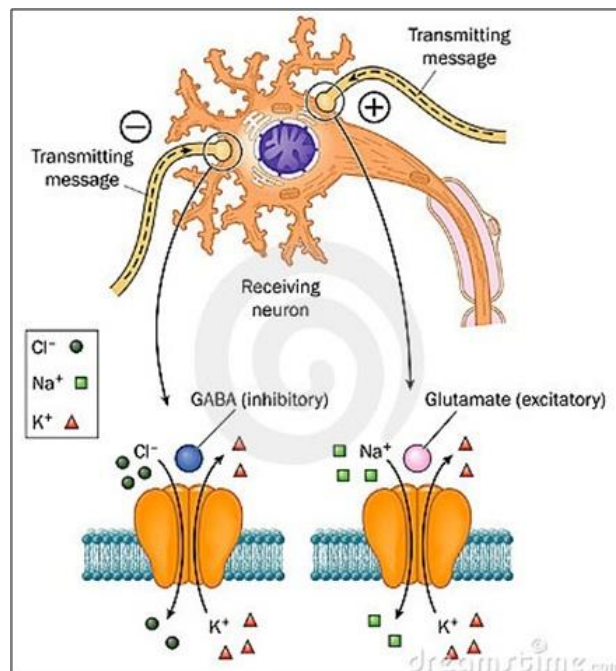
Essa excitabilidade intrínseca do sistema nervoso que é intimamente controlada pela abertura ou bloqueio de canais iônicos operados por voltagem e que são regulados pelo influxo de cátions para o interior do neurônio tem papel importante na deflagração das crises. Os canais de Na^+ dependentes de voltagem são um dos principais responsáveis pela rápida despolarização da membrana neuronal presente amplamente e de forma desordenada nos processos epilépticos, e mutações em algumas das subunidades desses canais no SNC foram descobertas em algumas formas de epilepsias (Porto et al., 2007).

Os canais de K^+ dependentes de voltagem participam da repolarização e hiperpolarização da membrana que segue as alterações paroxísticas da despolarização, evitando a repetição do potencial de ação. Mutações nos genes responsáveis pela formação dos canais de potássio provocam diminuição da repolarização, gerando uma hiperexcitabilidade (Porto et al., 2007).

É interessante observar que as convulsões epilépticas não são simplesmente um resultado direto do excesso de excitação. Elas são o resultado de um desequilíbrio entre

influências inibitórias e excitatórias (Scharfman, 2007). Em alguns casos, é uma perda de inibição, em vez de especificamente um aumento de excitação que pode estar na origem fundamental da perturbação epiléptica (Yu et al., 2006; Ogiwara et al., 2007). Como observado na relação entre epilepsia e alterações em sistemas de neurotransmissores como, por exemplo, a liberação excessiva de glutamato, (neurotransmissor excitatório) como consequência do aumento da permeabilidade ao Na^+ . Com relevante atuação nas alterações despolarizantes capazes de produzir descargas epiléticas está o receptor pós-sináptico de glutamato do tipo NMDA (N-metil-D-aspartato) (França, 1998). Há evidências de que a ineficiência do GABA (neurotransmissor inibitório) pode também produzir maior excitabilidade neuronal. Essas anormalidades na neurotransmissão, como o aumento da transmissão excitatória, diminuição da transmissão inibitória ou ambas situações (Figura 1), acometem alterações na excitabilidade de neurônios e suas conexões sinápticas promovendo crises convulsivas (Meldrum, 1984).

Figura 2. A transmissão do impulso nervoso dos neurônios transmissores aos neurônios receptores e os efeitos do GABA e glutamato.



Fonte: Adaptado de <https://thumbs.dreamstime.com/x/neurotransmitters-involved-epilepsy-12522920.jpg>

1.2.2 Tratamentos farmacológicos e acupuntura

Os fármacos antiepiléticos, também conhecidos como anticonvulsivantes, são usados para tratar a epilepsia, bem como alterações convulsivas não epileptiformes (Rang et al., 2011). Podem ser definidos como substâncias que quando administradas por um determinado período, podem diminuir a incidência ou severidade das crises que acometem pacientes portadores de síndromes epiléticas. Antes do desenvolvimento desta classe de fármacos, várias foram as propostas terapêuticas para o tratamento das epilepsias tais como: oculoterapia, ligadura das artérias vertebrais, compressão testicular, trepanação, aplicação de ventosas, histerectomia e o uso de preparações a base de ervas e extratos animais (Porto et al., 2007).

Com a otimização da terapia com fármacos, a epilepsia é completamente controlada em aproximadamente 75% dos pacientes, porém cerca de 10% permanecem experimentando crises com intervalos de um mês ou menos, o que compromete sua qualidade de vida e atividade laboral (Rang et al., 2011).

Utilizado como primeiro fármaco antiepilético eficaz, o sal de brometo de potássio foi introduzido por Locock (1857), baseado na idéia errônea de que os pacientes com epilepsia tinham hipersexualidade, ele usou esse sal e observou resposta positiva em 14 de 15 mulheres com epilepsia catamenial (Porto et al., 2007).

Dentre o arsenal de antiepiléticos disponível no mercado (Tabela 1), temos os fármacos de primeira geração (fenitoína, carbamazepina, fenobarbital, diazepam e valproato de sódio) que embora apresentem um número significativo de efeitos adversos, continuam sendo amplamente usados (Porto et al., 2007; Rang et al., 2011). Contudo, nas duas últimas décadas, com o surgimento dos antiepiléticos de segunda (lamotrigina, vigabatrina, tiagabine, topiramato, gabapentina e leviracetam) e de terceira gerações, o tratamento da epilepsia tem apresentado muitos avanços. Entretanto, o percentual de pacientes sem controle apropriado continua sem reduções significativas. Além disso, há um número de pacientes epiléticos que sofre mais danos em decorrência do tratamento medicamentoso que da própria condição epilética, justificando a busca por novas alternativas terapêuticas (Porto et al., 2007).

Tabela 1. Principais fármacos antiepilépticos utilizados na clínica, respectivos efeitos adversos, mecanismos de ação e indicações

Droga	Efeitos Adversos	Mecanismo de ação	Indicação Clínica
Barbitúricos (Fenobarbital)	Depressão; acidose respiratória; hipotensão; bradicardia; hipotermia; erupção; sonolência; letargia; ataxia.	Modulação alostérica de GABA _A	Convulsões tônico-clônicas generalizadas e parciais
Benzodiazepínicos (Diazepam)	Sedação, tolerância	Aumento da ação de GABA	Ausência; convulsões parciais e febris
Carbamazepina	Sedação, ataxia, retenção hídrica, pode haver graves reações de hipersensibilidade	Bloqueio de canais de Na ⁺ dependentes de voltagem	Convulsões tônico-clônicas generalizadas, parciais e da epilepsia do lobo temporal
Etossuximida	Náusea e anorexia	Bloqueio de canais de Ca ⁺² dependentes de voltagem tipo T	Convulsões parciais e crises de ausência
Felbamato	Visão dupla, tontura, náuseas, dor de cabeça, exantema e leucopenia	Bloqueio de canais de Na ⁺ dependentes de voltagem e bloqueando os canais de Ca ⁺² do tipo T	Convulsões parciais e generalizadas
Gabapentina	Sedação leve, náuseas, efeitos no comportamento, distúrbios de movimento, ganho de peso	Agonismo GABAérgico	Convulsões parciais
Hidantoínas (Fenitoína)	Sedação e anemia megaloblástica	Bloqueio de canais de Na ⁺ dependentes de voltagem	Convulsões tônico-clônicas generalizadas e parciais
Lamotrigina	Rash, diplopia, sedação, síndrome de Stevens-Johnson, necrólise epidérmica tóxica	Bloqueio de canais de Na ⁺ dependentes de voltagem e o bloqueio indireto da liberação do glutamato	Coadjuvante para convulsões parciais em adultos; síndrome de Lennox-Gastaut; epilepsia generalizada
Leviracetam	–	Mecanismo desconhecido	Convulsões parciais e generalizadas
Oxcarbazepina	Sonolência, fadiga, cefaléia, tontura, ataxia e vômito	Mecanismo desconhecido	Convulsões parciais
Primidona	Anemia megaloblástica, interações farmacológicas por indução enzimática	Metabolização a barbituratos	Convulsões parciais e generalizadas
Topiramato	Alterações do pensamento, dificuldade de encontrar as palavras, perda de peso, parestesias, nefrolitíase	Bloqueio de canais de Na ⁺ dependentes de voltagem e antagonismo do receptor do glutamato	Coadjuvante no tratamento de crises parciais em adultos e crianças; epilepsia generalizada
Tiagabina	nervosismo, tonteiras, perda de peso	Inibição seletiva da recaptção de GABA	Coadjuvante de crises parciais em adultos
Valproatos	Hepatotoxicidade, perda de pêlos, mal formações fetais	Interfere com a excitação mediada pelo glutamato e bloqueio de canais de Na ⁺ dependentes de voltagem	Epilepsias generalizadas idiopáticas, mioclônicas e crises de ausência
Vigabatrina	Sedação, náuseas, ganho de peso, depressão, psicose, diminuição do campo visual	Aumento dos níveis de GABA, pela inibição da GABA transaminase	Crises parciais e generalizadas

Fonte: Porto et al., 2007

Uma vez que um percentual dos pacientes com epilepsia é refratária aos tratamentos farmacológicos, há um crescente interesse em terapias alternativas como a acupuntura (Cheuk & Wong, 2008). Um grande número de estudos clínicos tem demonstrado que a acupuntura produz efeitos favoráveis sobre variados tipos de epilepsia, tais como crise de ausência, convulsão febril, convulsão tônico-clônica generalizada, e até mesmo estado de mal epiléptico. Os benefícios terapêuticos gerais incluem a melhoria do electroencefalograma (p. ex., a redução de onda de pico, dessincronização, etc.) e os sintomas epilépticos (diminuição

da frequência de convulsões, ausência de episódios de ataque, etc.), o alívio da gravidade do estado de mal epiléptico, a recuperação funcional e melhoria da qualidade de vida (Chen et al., 2014).

Estudos em animais demonstraram os efeitos anticonvulsivantes da acupuntura em modelos animais diversos. Eletroacupuntura tem demonstrado deprimir as descargas epiléticas corticais e amigdalóides e melhorar a eletroencefalografia epilética, além de atenuar os comportamentos convulsivos em convulsões experimentais quimicamente induzidas. Descoberta recente sugere que os efeitos induzidos por EA são dependentes de acupontos e outros parâmetros, e geralmente aparecem entre 1-1,5 horas após o término da estimulação por EA. Evidências a partir de cães com epilepsia idiopática que não respondem à terapia anticonvulsivante, revelaram que a acupuntura modifica o padrão de convulsões e há uma redução das mesmas (Chen et al., 2014). Chen e colaboradores observaram que a EA produz uma redução de aproximadamente 27% da atividade neuronal epileptiforme induzida por pentilenotetrazol (PTZ) do tálamo lateral ventro posterior de ratos.

Outros resultados obtidos em estudo conduzido por He et al. (2013) ainda demonstram que, aliando técnicas de acupuntura, em complementação ao regime medicamentoso, pode-se reduzir a frequência de convulsões em até 54,21%, não sendo reportados efeitos adversos durante o tratamento.

1.3 Estresse oxidativo

Estresse oxidativo é a condição que ocorre quando o estado de equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes é deslocado na direção do primeiro, gerando potencial para danos orgânicos. Pró-oxidantes são, por definição, radicais livres, átomos ou grupos de átomos com um único elétron desemparelhado. Inicialmente, o estresse oxidativo foi descrito como um desequilíbrio entre geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERNS). Estas espécies reativas foram consideradas exclusivamente prejudiciais às células, mas agora é considerado que a regulação redox envolvendo EROS é essencial para a modulação de funções críticas celulares (principalmente em astrócitos e microglia), tais como ativação da cascata da MAP quinase (proteína-quinase ativada por mitógeno), transporte de íons, a mobilização de cálcio e ativação da apoptose (Aguiar et al., 2012).

Espécies reativas de oxigênio (EROS) – ânion hidroxil (OH⁻), ânion superóxido (O₂⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) – fazem parte do metabolismo humano normal. Quando

produzidos em excesso, EROS podem causar dano tecidual incluindo lipoperoxidação, dano ao DNA e inativação de enzimas. EROS tem sido relacionado a uma variedade de condições neurológicas agudas e crônicas, incluindo convulsões (Dal-Pizzol et al., 2000).

Os estresses oxidativo e nitrosativo são considerados possíveis mecanismos na patogênese da epilepsia. Estudos demonstraram que *status epilepticus* promove mudanças no potencial redox e diminui os níveis de ATP, podendo levar a um colapso na produção e oferta de energia no cérebro. Liang e Patel relataram o dano oxidativo a alvos suscetíveis (proteínas, lipídios e DNA) causado por crises persistentes (*status epilepticus*) (Aguiar et al., 2012).

Dados experimentais têm demonstrado a relação intrínseca entre epilepsia, estresse oxidativo e inflamação, e revelaram que moléculas inflamatórias específicas como radicais livres, gerados pelo estresse oxidativo, estão envolvidos com uma significativa perda de células neuronais após insultos cerebrais a partir de convulsões (Pflüger et al., 2016).

Os danos ao DNA, principalmente na forma de dano oxidativo e danos citogenéticos, significam qualquer modificação ao DNA que gera alterações das suas propriedades de codificação e funções. As lesões podem ser de vários tipos, desde uma pequena alteração química de base, lesões de distorção de hélice, quebra de cadeia simples, até a ruptura de fita dupla, os quais podem interferir na transcrição normal ou replicação e incorrer em um desafio para os processos de reparação. Os danos ao DNA desencadeiam uma série de respostas celulares, incluindo a ativação de checkpoints que retardam a progressão do ciclo celular, a fim de facilitar a reparação do DNA ou eliminar células danificadas através de apoptose (Raza et al., 2016).

1.4 Neuroinflamação

Neuroinflamação é caracterizada pela ativação da microglia, astrócitos e células endoteliais da barreira hematoencefálica, assim como pela infiltração de proteínas plasmáticas e células imunológicas. Os membros mais conhecidos dentre as moléculas inflamatórias podem ser classificados em enzimas pró-inflamatórias, incluindo ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), e NADPH oxidase (NOX); citocinas como IL-1 β , IL-6, e TNF- α ; e fatores de crescimento incluindo TGF- β e BDNF. O aumento nos níveis destas moléculas inflamatórias são comumente observadas em amostras de cérebro de pacientes com epilepsia e em tecidos cerebrais de animais com epilepsia experimental. Além disso, estudos recentes demonstram que convulsões também podem aumentar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, que pode intensificar e perpetuar a neuroinflamação via extravasamento de

leucócitos e moléculas inflamatórias de vasos sanguíneos no parênquima cerebral (Dey et al., 2016). Podem também contribuir para a excitotoxicidade neuronal no hipocampo, uma região especialmente suscetível aos danos causados pelo *status epilepticus*. De fato, os dados publicados na literatura demonstram que o aumento de citocinas e ativação da glia contribuem para o desenvolvimento de alterações hipocampais relacionadas a convulsões, como por exemplo, a morte neuronal (Jankowsky & Patterson, 2001). Em geral, convulsões prolongadas iniciais podem provocar respostas imunológicas e inflamatórias agudas no cérebro, enquanto as convulsões espontâneas e recorrentes subsequentes sustentam a neuroinflamação crônica (Dey et al., 2016).

As crises convulsivas podem induzir uma série de alterações bioquímicas em diferentes regiões do cérebro, afetando a liberação de neurotransmissores, as sinalizações intracelulares e a expressão gênica de diversas proteínas. Os mecanismos responsáveis pelas alterações celulares que ocorrem durante a epilepsia podem levar a alterações nos canais iônicos, neurogênese, alteração das propriedades sinápticas e à morte celular. Como consequência, danos neuronais severos podem ocorrer ao longo do tempo (Simonic et al., 2000).

O envolvimento da inflamação na fisiopatologia de insultos cerebrais agudos e na posterior epileptogênese, tem sido evidenciado nas últimas décadas através de um crescente número de evidências clínicas e pré-clínicas, em um processo em que um cérebro normal torna-se epiléptico. Quando os danos são severos e progressivos, a atividade neuroinflamatória pode levar ao desenvolvimento de doenças neurológicas. Esse fato fica evidente em estudos que mostram que o tratamento com anti-inflamatórios reduz o dano cerebral em diversos modelos animais (Wallenstein, 1987; Vezzani & Granata, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Principal

Avaliar o efeito da acupuntura manual em animais submetidos ao modelo de *Kindling* químico induzido por PTZ em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- avaliar o efeito da acupuntura manual em camundongos submetidos ao modelo de *Kindling* por PTZ;
- comparar o efeito da acupuntura manual com DZP;
- avaliar o uso paralelo de acupuntura e tratamento com DZP no modelo de *Kindling* por PTZ;
- avaliar o efeito da acupuntura manual sobre parâmetros bioquímicos após o tratamento de *Kindling*;
- avaliar o efeito da acupuntura manual sobre parâmetros genotóxicos e mutagênicos após o tratamento de *Kindling*.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

ARTIGO I: Manual acupuncture improves parameters associated to stress oxidative and inflammation after PTZ-induced kindling in mice

Status: a ser submetido ao
periódico Brain Research

Manual acupuncture improves parameters associated to stress oxidative and inflammation after PTZ-induced kindling in mice

Alexsandro Luís Frantz¹, Gabriela Gregory Regner¹, Pricila Pflüger¹, Vanessa Rodrigues Coelho¹, Lucas Lima da Silva¹, Cassiana Macagnan Viau¹, Marcele Silva de Souza², Juliana Bondan da Silva³, Jaqueline Nascimento Picada³, Jenifer Saffi², Patrícia Pereira^{1*}

¹Laboratory of Neuropharmacology and Preclinical Toxicology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

²Department of Basic Health Science, Laboratory of Genetic Toxicology, UFCSPA, Porto Alegre, RS, Brazil

³Postgraduate Program in Cell and Molecular Biology Applied to Health, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil,

*Corresponding author: Dra. Patrícia Pereira

¹Laboratory of Neuropharmacology and Preclinical Toxicology, Department of Pharmacology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Sarmiento Leite 500/305, Porto Alegre, RS, CEP: 90.050-170, Brazil Tel/Fax: +55 51 33083121.

e-mail address: patipere@yahoo.com.br

Abstract

Several evidences have grounded the use of acupuncture for the treatment of intractable epilepsy. The present study aimed to explore the effect of manual acupuncture (MAC) on the chemical kindling development and associate oxidative stress and its role in the neuronal damage in mice. The role of MAC on oxidative stress and inflammation after PTZ-induced kindling was investigated by measuring ROS production, superoxide dismutase and catalase activities, nitrite content, and DNA damage in cerebral cortex. Mice received PTZ (60 mg/kg s.c) once every third day, in a total of six treatments (16 days). MAC was applied daily during the experimental protocol. Diazepam (DZP) (2 mg/kg) was used as positive control. Also, we evaluated the effect of the MAC associated to DZP in low dose (0.15 mg/Kg). The results demonstrated that MAC or MAC DZP were not able to reduce significantly the seizure occurrence or to increase the latency to first seizure during the treatment. Only in the third day MAC DZP 0.15 mg/kg produced difference from the control group. PTZ-induced kindling produced a significant neuronal injury, oxidative stress, increased DNA damage, nitric oxide production, and expression of pro-inflammatory factors (e.g. TNF- α). These effects were reversed by treatment with MAC or MAC DZP low dose association. Our study suggests that MAC had no potential antiepileptogenic in the PTZ-induced kindling but it provided neuroprotection against the increase of oxidative stress and inflammation induce by PTZ.

Keywords: pentylenetetrazole, kindling, manual acupuncture, oxidative stress, TNF- α , DNA damage

1. Introduction

Epilepsy is a chronic neurological disorder characterized by recurrent seizures and is estimated to affect approximately 50 million people worldwide. Globally, an estimated 2.4 million people are diagnosed with epilepsy each year (WHO, 2016). Epilepsy is not only associated with detrimental effects on the health and quality of life of the individual patient, but also places a huge psychological and economic burden on the family members of the sufferers (Harden et al., 2016). The introduction of a large number of newer antiepileptic drugs (AEDs) with more attractive pharmacokinetic, safety, and tolerability profiles over the past 20 years has, indeed, increased the treatment options to clinicians, but has not had a substantial effect on the seizure remission for patients with drug-resistant epilepsy (French and Gazzola, 2011; Kwan and Brodie, 2001; Schmitz et al., 2010).

Nowadays, complementary and alternative medicine such as acupuncture has been gaining interest for the treatment of diverse diseases including epilepsy (Da Silva et al., 2016). Despite the widespread use of acupuncture (AC) for pain management, explaining the relationship between acupuncture's clinical effects and its neurobiological mechanisms is still a challenge to modern science (Han, 2009; Han, 2011; Han and Ho, 2011). Several studies have shown that AC modulates the endogenous analgesic pathways by activating the opioid, serotonergic, and noradrenergic systems (Pu et al., 2012; Zhao et al., 2008).

Oxidative stress in the brain is caused by the imbalance between the generation and detoxification of reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) that attack brain cells, and thus play important roles in brain inflammation, aging, and degeneration (Uttara et al., 2009). The free radicals production in excess is associated with damage caused to cell structures, including lipid peroxidation, DNA damage, and enzyme inactivation. The central nervous system (CNS) becomes highly sensitive due to its high oxygen consumption and the low

antioxidant defenses activity, resulting in increased susceptibility to oxidative stress that is associated with several CNS disorders including epilepsy (Dey et al., 2016).

Thus, the goal of this study was to determine the influence of manual acupuncture (MAC) on convulsive behavior using a pentylenetetrazole-induced kindling development model in mice. In addition, the modulation of MAC on oxidative stress parameters, nitric oxide (NO) production, and DNA damage was evaluated. Also, the association of MAC and **DZP**, a therapeutically useful anticonvulsant, was evaluated in this animal model.

2. Results

This work aimed to evaluate the effect of MAC alone or associated to DZP low dose (0.15 mg/kg) on PTZ-induced kindling. After the last treatment, 100% of animals in the Sal/PTZ group (negative control) showed seizure behavior of at least 3 s. These **results** confirm that the subconvulsive PTZ dose used here (60 mg/kg) was able to induce a “kindling state” in mice after six treatments (Figure 2A).

The development of PTZ-kindling was only prevented by pretreatment with DZP 2 mg/kg ($P \leq 0.001$). MAC was not able to change the convulsive behavior of the animals (occurrence of seizure or latency to first seizure; Figure 2A and B), and the association MAC DZP 0.15 mg/kg increased the latency to first seizure only on the third day of treatment (Figure 2B).

There is evidence that greater formation of free radicals can occur in processes of PTZ-induced seizures. Therefore, we assessed intracellular ROS induced by PTZ seizure by monitoring the changes in fluorescence intensity. The results indicated the suppressive effect of MAC and MAC DZP low dose on reactive oxygen species (ROS) production showing a significant difference from the control group ($P \leq 0.05$; Figure 3).

In order to investigate whether the antioxidant properties of MAC were mediated by an increase in antioxidant enzymes, SOD and CAT activities were measured (Figure 4 and 5).

The treatment with MAC and MAC DZP low dose increased SOD and CAT activities ($P \leq 0.05$) after PTZ-induced kindling in cerebral cortex when compared to the Sal/PTZ group.

As shown in Figure 6, MAC and MAC DZP 0.15 mg/Kg inhibited NO production ($P \leq 0.05$).

The levels of TNF- α were increased by PTZ as shown in Figure 7A-B. The present results have shown that MAC significantly inhibited the pro-inflammatory factor ($P \leq 0.05$), as well as MAC DZP low dose ($P \leq 0.01$), suggesting its capacity to change inflammatory parameters.

The alkaline comet assay detects DNA strand breaks and alkali-labile sites. Our results showed that PTZ-induced seizure promoted significant DNA damage measured in cerebral cortex, hippocampus and peripheral blood (Table 1). Damage Index (DI) and Damage Frequency (DF) values from MAC Sal/Sal group were not statistically different from Sal/Sal group. Similarly, Sham Sal/PTZ and Sal/PTZ groups also did not show statistical differences in DI and DF. Thus, the results were compared to the Sal/Sal and Sal/PTZ groups.

In hippocampus, DI value of MAC DZP 0.15 mg/kg/PTZ group did not statistically decrease in comparison to Sal/PTZ group. However, differently to other groups that received PTZ increasing DI, MAC DZP 0.15 mg/kg/PTZ did not show statistical difference in comparison to Sal/Sal group, suggesting a tendency of MAC in association with DZP to protect DNA in hippocampus (Table 1).

In cerebral cortex, DZP 0.15 mg/kg/PTZ and DZP 2 mg/kg/PTZ groups showed DI decreased in comparison to SAL/PTZ, indicating protective effect of DZP. In blood, there was an increase in the DI and DF values only in the groups SAL/PTZ and Sham Sal/PTZ in comparison to Sal/Sal group. The PTZ groups treated with MAC, DZP (0.15 and 2 mg/kg) or the association were not able to decrease significantly DNA damage in comparison to Sal/PTZ (Table 1).

There was no statistical difference in the ratio of PCE/NCE and micronucleus frequency among the groups. Only the cyclophosphamide positive control group showed micronucleus frequency increased ($P \leq 0.001$) in comparison with the Sal/Sal group (Table 2).

3. Discussion

Characterized by the spontaneous recurrent of seizures, epilepsy is a chronic neurological disorder, which is being associated with an alteration in oxidative stress parameters. Prior studies indicated the protective effect of antioxidant molecules against the seizures, as a treatment, since the alterations in oxidative stress parameters during epilepsy include the interconnection between the free radical generations and changes in neurochemical milieu (Kaur et al., 2016). With an important role in the regulation of biological function, production of free radicals is involved in damaging cell structures, as well as in pathogenesis of central nervous system neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease, stroke, and dementias. Those diseases may develop characteristics of epilepsy with time. Oxidative and nitrosative stress is regarded as possible mechanisms in the pathogenesis of epilepsy (Aguiar et al., 2012). Researchers have found that *status epilepticus* (SE) can lead to changes in redox potential and decreases the level of ATP, resulting in a collapse in brain energy production and its supply (Wasterlain et al., 1993). Our findings demonstrated that MAC alone did not produce a less convulsive behavior but it was able to reduce the ROS production, increased SOD and CAT activities and improving the measured parameter inflammatory after the PTZ-induced kindling. Indeed, studies have provided evidence that AC reduces oxidative stress and free radical formation in Parkinson's disease rodent models (Xiao, 2015), reversed the overproduction of reactive oxygen species in vascular dementia model in rats, even suggesting an antioxidant property of AC (Li et al., 2016). Contributing to this evidence, researchers showed that acupuncture increased the activities of catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase in the hippocampus of alcoholic rats (Phunchago et al.,

2015) as well as increased the serum level of superoxide dismutase on ischemic hypoxic neonate rats with cerebral palsy (Li et al., 2015).

This is the first attempt to evaluate the protective effect of MAC on the PTZ-induced kindling model and the associated oxidative stress and neuroinflammation parameters.

Some studies have demonstrated oxidative damage to macromolecules (protein, lipids and DNA) caused by persistent seizures (Liang and Patel, 2006), as well as an increase in mitochondrial oxidative and nitrosative stress and subsequent cell damage after SE (Chuang, 2010; Liang and Patel, 2006). Involved in pathogenesis of several biological disorders, imbalanced redox processes and oxidative stress can damage vital macromolecules like DNA. The increased DNA damage in groups PTZ-induced kindling in brain tissues might be associated to imbalance of redox state caused by the seizures. So that groups DZP, almost totally protected of the PTZ-induced seizures, showed DNA damage significantly lower. However, there was an increase in DNA damage in peripheral blood in two kindling group, Sal/PTZ and Sham/Sal/PTZ in comparison to Sal/Sal, suggesting a systemic injury. All together, the findings showed that MAC improved the antioxidant status, however it was not sufficient to decrease DNA damage in brain tissues and prevent seizures.

DNA repair can be free of errors, or subject to these events, when it may lead to mutations. In order to evaluate possible induction of mutagenicity, the micronucleus test was performed at the end of the experimental procedures to detect clastogenic/ aneugenic activities, which lead to increasing micronucleus frequency, and suggests mutagenic effects at chromosomal level (Coelho et al., 2016). As shown in Table 2, PTZ was not able to increase the micronucleus frequency in bone marrow, suggesting that this drug does not present mutagenic effects in kindling model.

Recent studies have shown that inflammatory cytokine expressions were distinctively induced under various damaging conditions (Iori et al., 2016). Contributing to neuronal cell death

through a sustained inflammatory response, microglial cells are specialized macrophages in the central nervous system that are capable of immune defense, and astrocytes are the most numerous glia cells in central nervous system, when activated they induce inflammatory mediators such as interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) (Kim et al., 2012). In the present work, PTZ administration elevated cortical TNF- α in the kindled animals. The proinflammatory protein, TNF- α , is known to participate in the induction and maintenance of epilepsy as proven in other epileptic models, where demonstrated that the overexpression of TNF- α , among other inflammatory cytokines in mice brains, is linked to sporadic spontaneous seizures pointing out to its pivotal role in epilepsy, regardless of the animal model. Hence, elevated levels of brain TNF- α in PTZ-kindled mice may signify a proepileptogenic potential and may lower the threshold for seizure induction, thus setting the basis for the onset of epilepsy (Abdallah, 2010). Our results have shown that MAC significantly inhibited this pro-inflammatory factor.

The effect of most of antiepileptic agents (such as DZP) is to enhance the response to GABA_A by facilitating the opening of GABA-activated chloride channels. Benzodiazepines increase the frequency of channel opening events, which leads to an increase in chloride ion conductance and inhibition of the action potential of the receptor results in an increase in GABA_A (Ataee et al., 2016). However, the clinical uses of benzodiazepines are limited by their side effects such as psychomotor impairment, sedation, myorelaxation, ataxia, amnesia, potentiation of other central depressant drugs and dependence liability (Doukkali et al., 2015), so there is a need of an alternative which can improve their efficacy, decrease undesirable effects, thereafter reducing tolerance and dependence.

Several studies have proposed different mechanisms underlying AC effects, including a large number of clinical studies demonstrating that AC produces favorable effects on varied types of epilepsy such as absence seizure, febrile convulsion, generalized clonic-tonic seizure, and

even SE. The overall therapeutic benefits include the improvement of electroencephalogram (e.g., the reduction of spike wave, desynchronization) and the epileptic symptoms (decrease of the seizure frequency, shortness of attack episodes) (Deng et al., 2001; Ma et al., 2001; Song et al., 2006), alleviation of the severity of SE (Yang, 1990), functional recovery, and life quality improvement. Animal studies have demonstrated the antiepileptic effects by AC in varied models. Chen et al. (2014) observed that electroacupuncture (EA) produces nearly 27% reduction of pentylenetetrazol (PTZ) induced epileptiform neuronal activities of ventroposterior lateral thalamus of rat. EA has an obvious anti-epileptic effect, which is related to its effect in downregulating the increased hippocampal Ca^{2+} level in PTZ-kindled epilepsy rats (Yang et al., 2009). AC intervention has a protective effect on pyramidal cells of hippocampal CA 1 and CA 3 regions in epilepsy rats, which is associated with the normal function of intracellular PI 3 K/Akt signaling pathway (Yang et al., 2013). EA at head acupoints (e.g. GV20) prevents atrophy of some limbic structures and improves cognitive deficits in pilocarpine-epileptic rats and that this effect is dependent on the serotonergic system (Dos Santos et al., 2005).

In addition, AC facilitates the release of neuropeptides, modulating gene expression in neuronal cells in the central nervous system (CNS), eliciting profound physiological effects, and activating self healing mechanisms. AC also enhances neurogenesis in several diseases through stimulation at ST36 and GV20 together, which improve hippocampus related neuropathologies such as epilepsy and ischemia, inducing cell proliferation and neuroblast differentiation (Hwang et al., 2010).

We showed that pretreatment with the combination of MAC and diazepam at low dose decreased the occurrence of seizures and it increased the latency for the first seizure, but not significantly. Even so this result can be important if considering the use of a lower dose of DZP, which could determine less intense effects of sedation or immobility. Combined

treatment with MAC and DZP also decreases free radical levels and NO production, as well as increases SOD and CAT activities. Diazepam has distinct actions as positive allosteric modulator of GABA_A receptors, although the mechanism underlying MAC effects must be elucidated. This combination mitigates neuroinflammation following PTZ-induced kindling model, as demonstrated by inhibition of TNF- α expression, maybe without the adverse side effects associated with high dose benzodiazepines. Then, it is possible that the combination therapy with MAC and a benzodiazepine drug could represent a novel therapeutic strategy in attenuation of neurological symptoms in epileptogenesis.

4. Conclusions

MAC did not decrease seizures induced by PTZ in the kindling model. But its association with DZP low dose was able to improve the animal's behavior. Also, MAC and MAC DZP low dose altered brain antioxidant defenses, inflammation parameters and DNA damage after PTZ-induced kindling. Further studies with other biological models are currently being performed in our laboratory and should provide a better understanding of the mechanisms underlying these effects.

5. Experimental procedures

5.1. Animals

Seventy two male CF-1 mice (2-3 months of age, 30-40 g) obtained from the biotery of the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) were used in this work. Animals were housed in plastic cages (5 per cage), with water and food *ad libitum*, under a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 AM), and at a constant temperature of $23 \pm 2^\circ\text{C}$. All experimental procedures were carried out in accordance to the national and international legislation (Guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and EU Directive 2010/63/EU for animal experiments), with the approval of the Committee on the Ethical Use of Animals of UFRGS (authorization number 28514). All protocols were designed aiming to

reduce the number of animals used to a minimum, as well as to minimize their suffering. Mice were assigned randomly into groups according to the experimental model.

5.2. Drugs and pharmacological procedures

Pentylentetrazole (PTZ) was purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, U.S.A.). Diazepam (DZP) (Compaz®) was purchased from Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos Ltda and was used as the reference anticonvulsant drug for comparison (positive control). PTZ and DZP were dissolved in saline solution/NaCl 0.9% (SAL) and administered subcutaneously (s.c.) and intraperitoneally (i.p.) respectively at a volume of 10 mL/kg body weight. Primary antibodies (anti-TNF- α [Sc52746] and anti- β -actin [Sc69879]), and secondary antibodies were obtained from Santa Cruz Biotechnology (California, USA).

5.3. PTZ-induced kindling model and MAC treatment

Kindling induction was carried out as described by De Oliveira et al. (2008) with minor modifications. The PTZ dose used was 60 mg/kg s.c., obtained through a pilot test. This convulsant agent was administered once every third day, in a total of six treatments (16 days). Mice were allocated into eight groups that received the application of MAC or not. Animals that received MAC treatment were divided in three groups and called MAC Sal/Sal, MAC Sal/PTZ, MAC DZP 0.15 mg/kg/PTZ. Animals that did not receive MAC application were divided in four groups and received Sal/Sal, Sal/PTZ, DZP 2 mg/kg/PTZ or DZP 0.15 mg/kg/PTZ. One group was called Sham Sal/PTZ.

Animals treated with MAC received the application daily during all experimental protocol (in a total of 16 days). Acupuncture needles (Dong Bang Acupuncture Inc., Republic of Korea) were inserted to a depth of 3 mm at GV 20 acupoint (Baihui) (Yang et al., 2013), located at the midmost point of parietal bone, and turned at a rate of two spins per second for 15 s, during 10 minutes. Right after MAC treatment, animals were given intraperitoneal injections of DZP (0.15 mg/kg) or saline, 30 min prior the PTZ administration. It was also used the

“nonacu” to control the non-specific effects of acupuncture stimulation (sham group). This point was set at a point that was approximately 3 mm to the lateral side of the tail on the gluteus muscle, and was simulated at the same time and duration of application on the acupoint. Injections were given between 7 and 11 a.m.

DZP, a GABA_A receptors agonist, was used in this study as a positive control (2 mg/kg) or it was used in low dose (0.15 mg/kg) to assessment of its association with MAC in the PTZ-induced kindling.

In groups not submitted to MAC or sham treatment, animals were given intraperitoneal injections of DZP (0.15 mg/kg), DZP (2 mg/kg) or saline, 30 min before the subconvulsive stimuli (PTZ 60 mg/kg). Immediately after PTZ injection, mice were placed individually in acrylic observation chambers for 30 min. and behavioral seizure was observed. The occurrence of clonic forelimb seizures as long as or lasting longer than 3 s and the latency to the first seizure was also observed at each PTZ administration day.

5.4. Tissue homogenization

Frozen cortex from each treated mice was homogenized in ice-cold phosphate buffer (KCl 140 mmol/L, phosphate (20 mmol/L, pH 7.4) and centrifuged at 12,000 rpm for 10 min, the supernatant was used. Protein concentration was measured according to the method of Lowry et al. (1951) using serum bovine albumin as standard.

5.5. Free radical levels

Homogenates were overlaid with 100 μ L of 25 μ M Dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) and were placed back in the incubator for an additional 30 min at 37°C. At the end of the incubation period, plates were removed, and fluorescence of the homogenates were measured on a SpectraMax M2e Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California). The excitation/emission wavelengths for DCFDA were 480/520 nm.

Values of relative fluorescence (RFU) were expressed as RFU mg⁻¹ protein (Mattiello et al., 2015).

5.6. Superoxide dismutase (SOD) activity

SOD activity was evaluated by quantifying the inhibition of superoxide-dependent autoxidation of epinephrine, verifying the absorbance of the samples at 480 nm (Misra and Fridovich, 1972). Briefly, to 20 µL of homogenate was added 170 µL of a mixture containing 50 mM Glycine buffer pH 10.2 and 10 mM Catalase. After that, 10 µL of epinephrine were added and the absorbance was immediately recorded every 30 s for 12 min at 480 nm in SpectraMax M2e Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California). The inhibition of epinephrine autoxidation occurs in the presence of SOD, whose activity can be then indirectly assayed spectrophotometrically. One SOD unit is defined as the amount of SOD necessary to inhibit 50% of epinephrine autoxidation and the specific activity is reported as SOD Units/mg protein.

5.7. Catalase (CAT) activity

CAT activity was assayed according to the method described by Chance and Machley (1954), based on the disappearance of H₂O₂ at 240 nm. Briefly, 10 µL of homogenate was added to 180 µL of 20 mM Potassium phosphate buffer pH 7.2. Subsequently, 10 µL of 5 mM H₂O₂ were added and the absorbance was immediately recorded every 30 s for 10 min, using SpectraMax M2e Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California). One CAT unit was defined as one µmol of hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity was calculated as CAT Units/mg protein.

5.8. Alkaline Comet assay

The alkaline comet assay was performed as described in Tice et al. (2000) with minor modifications (Pereira et al., 2006). Samples of peripheral blood, cortex and hippocampus were collected for analysis. Briefly, the total cortex and hippocampus were dissected and

placed in 0.5 mL cold phosphate-buffered saline (PBS) and finely minced in order to obtain a cellular suspension. Blood samples were placed in 15 mL anticoagulant (heparin sodium 25,000 IU- Liquemine). These suspension cells from cortex, hippocampus and peripheral blood were embedded in 95 μ L 0.75% low melting point agarose (Gibco BRL). The mixture (cell/agarose) was spread on a fully frosted microscope slide coated with a layer of 300 μ L normal melting agarose (1%) (Gibco BRL). After solidification, slides were placed in lysis buffer (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA and 10 mM Tris, freshly added 1% Triton X-100 (Sigma) and 10% DMSO, pH 10.0) for 48 h at 4 °C. Subsequently, the slides were incubated in freshly made alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) for 20 min, at 4 °C. An electric current of 300 mA and 25 V (0.90 V/cm) was applied for 15 min to induce DNA electrophoresis. The slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5), stained with silver, and analyzed using a microscope. Images of 100 randomly selected cells from each animal (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed. Cells were scored visually according to tail size into five classes, ranging from undamaged (0), to maximally damaged (4), resulting in a single DNA damage score for each animal, and consequently each group studied. The damage index (DI) can range from 0 (completely undamaged, 100 cells \times 0) to 400 (with maximum damage, 100 \times 4). The damage frequency (DF) was calculated based on number of cells with tail versus those with no tails (Coelho et al., 2015).

5.9. Micronucleus test

The micronucleus test was performed according to the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program (Mavournin et al., 1990). Bone marrow extracted from both femurs of the mice was suspended in fetal calf serum and smeared on clean glass slides. Slides were air-dried, fixed in methanol, stained in 10% Giemsa and coded for a blind analysis. To avoid false negative results and to obtain a measure of toxicity on bone marrow, the polychromatic

erythrocyte: normocromatic erythrocyte (PCE:NCE) ratio was scored in 1000 cells. The incidence of a micronucleus (MN) was observed in 2,000 PCEs for each animal.

5.10. Measurement of NO production

The production of NO was estimated by measuring the amount of nitrite, a stable metabolite of NO (Freitas et al., 2005). Briefly, 100 μ L of homogenate was mixed with 100 μ L of the Griess reagent (1% sulfanilamide; 0.1% naphthylethylenediamine; 2.5% H_3PO_4) at ambient temperature. After 20 min, absorbance was measured at 540 nm using SpectraMax M2e Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California). A nitrite calibration curve was used to convert absorbance to μ M nitrite.

5.11. TNF-Alpha Expression by western blotting

Frozen cortex from each treated mice was homogenized in ice-cold (Tris/acetate 20 mM, pH 7.5, sucrose, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 1%, ortovanadate 1 mM, sodium glycerophosphate 1 mM, sodium fluoride 5 mM, sodium pyrophosphate 1 mM, β -mercaptoethanol 5 mM, bezamidine 1 mM, PMSF 35 μ g/mL, leupeptine 5 μ g/mL). The samples were homogenized and incubated on ice for 20 min before being centrifuged at 12,000 g for 15 min. The supernatants were assayed for protein concentration.

For the western-blot analysis, a 30 μ g sample of total proteins was separated on SDS-polyacrylamide gel 15% and transferred to a polyvinylidene difluoride membrane. The membranes were blocked by incubation in TBS buffer containing Tween-20 0.1%, and dried milk 5% for 1 h at room temperature, and then washed with TBS buffer containing Tween-20 0.1%. Next, membranes were blotted overnight at 4 °C with the primary antibodies (1/1,000) mentioned above. The blots were washed three times with TBS 0.1% Tween and developed with peroxidase-linked secondary antibodies (1/3,000). All blots were developed by ECL Western Blotting Detection Kit Reagent and detected using a ChemiDoc (Bio-Rad) imaging system (Pflüger et al., 2016).

5.12. Statistical analysis

The results from PTZ-induced kindling, occurrence of clonic seizures and the latency time to its onset, were analyzed for Fisher's exact probability test and the generalized estimating equations (GEE) followed by the posthoc Bonferroni test, respectively. All experiments with homogenized were independently repeated at least three times, with triplicate samples for each treatment. Results are expressed as means \pm standard deviation (SD). Data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA), and means were compared using Tukey's test, and the *P* value of ≤ 0.05 considered as statistically significant. Data were analyzed using GraphPad Prism v.5 program (Intuitive Software for Science, San Diego, CA, U.S.A.) and Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Chicago, USA) v.18.0.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; N. 307064/2013-1) and Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS, N. 28514).

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Abdallah, D.M., 2010. Anticonvulsant potential of the peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist pioglitazone in pentylenetetrazole-induced acute seizures and kindling in mice. *Brain Res.* 1351, 246-253.
2. Aguiar, C.C., Almeida, A.B., Araújo, P.V., De Abreu, R.N., Chaves, E.M., Do Vale, O.C., Macêdo, D.S., Woods, D.J., Fonteles, M.M., Vasconcelos, S.M., 2012.

- Oxidative stress and epilepsy: literature review. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 795259.
3. Ataee, R., Falahati, A., Ebrahimzadeh, M.A., Shokrzadeh, M., 2016. Anticonvulsant activities of *Sambucus nigra*. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 20 (14), 3123-3126.
 4. Chance, B., Machley, A.L., 1954. Assays of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology* 2, 764-775.
 5. Chen, S., Wang, S., Rong, P., Liu, J., Zhang, H., Zhang, J., 2014. Acupuncture for refractory epilepsy: role of thalamus. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2014, 950631.
 6. Chuang, Y.C., 2010. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in seizure-induced neuronal cell death. *Acta Neurologica Taiwanica* 19 (1), 3-15.
 7. Coelho, V.R., Sousa, K., Pires, T.R., Papke, D., Vieira, C.G., De Souza, L.P., Leal, M.B., Schunck, R., Picada, J.N., Pereira, P., 2016. Genotoxic and mutagenic effects of vigabatrin, a γ -aminobutyric acid transaminase inhibitor, in Wistar rats submitted to rotarod task. *Hum. Exp. Toxicol.* 35 (9), 958-965.
 8. Coelho, V.R., Vieira, C.G., De Souza, L.P., Moysés, F., Basso, C., Papke, D.K., Pires, T.R., Siqueira, I.R., Picada, J.N., Pereira, P., 2015. Antiepileptogenic, antioxidant and genotoxic evaluation of rosmarinic acid and its metabolite caffeic acid in mice. *Life Sci.* 122, 65-71.
 9. Da Silva, M.D., Bobinski, F., Sato, K.L., Kolker, S.J., Sluka, K.A., Santos, A.R., 2016. IL-10 cytokine released from M2 macrophages is crucial for analgesic and anti-inflammatory effects of acupuncture in a model of inflammatory muscle pain. *Mol. Neurobiol.* 51, 19-31.

10. De Oliveira, P.A., Lino, F.L., Cappelari, S.E., Da Silva Brum, L.F., Picada, J.N., Pereira, P., 2008. Effects of gamma-decanolactone on seizures induced by PTZ-kindling in mice. *Exp. Brain Res.* 187 (1), 161-166.
11. Deng, Y.J., Wang, J.J., Lin, Y.P., Liu, W.Y., Wang, L.H., 2001. Clinical observation on treatment of epilepsy general tonic-clonic attack with catgut implantation at acupoint plus antiepileptic Western Medicine of small dose. *Zhongguo Zhen Jiu* 21, 271-273.
12. Dey, A., Kang, X., Qiu, J., Du, Y., Jiang, J., 2016. Anti-Inflammatory Small Molecules To Treat Seizures and Epilepsy: From Bench to Bedside. *Trends Pharmacol. Sci.* 37, 463-484.
13. Dos Santos, J.G. Jr, Tabosa, A., Do Monte, F.H., Blanco, M.M., De Oliveira Freire, A., Mello, L.E., 2005. Electroacupuncture prevents cognitive deficits in pilocarpine-epileptic rats. *Neurosci. Lett.* 384 (3), 234-238.
14. Doukkali, Z., Taghzouti, K., Boudida, E.L., Nadjmouddine, M., Cherrah, Y., Alaoui, K., 2015. Evaluation of anxiolytic activity of methanolic extract of *Urtica urens* in a mice model. *Behav. Brain Funct.* 11, 19.
15. Freitas, R.M., Vasconcelos, S.M., Souza, F.C., Viana, G.S., Fonteles, M.M., 2005. Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats. *FEBS J.* 272, 1307-1312.
16. French, J.A., Gazzola, D.M., 2011. New generation antiepileptic drugs: what do they offer in terms of improved tolerability and safety? *Ther. Adv. Drug Saf.* 2, 141-158.
17. Han, J.S., 2009. Acupuncture research is part of my life. *Pain Med.* 10, 611-608.
18. Han, J.S., 2011. Acupuncture analgesia: areas of consensus and controversy. *Pain* 152, S41-S48.

19. Han, J.S., Ho, Y.S., 2011. Global trends and performances of acupuncture research. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 680-687.
20. Harden, J., Black, R., Chin, R.F., 2016. Families' experiences of living with pediatric epilepsy: A qualitative systematic review. *Epilepsy Behav.* 60, 225-237.
21. Hwang, I.K., Chung, J.Y., Yoo, D.Y., Yi, S.S., Youn, H.Y., Seong, J.K., Yoon, Y.S., 2010. Comparing the effects of acupuncture and electroacupuncture at Zusanli and Baihui on cell proliferation and neuroblast differentiation in the rat hippocampus. *J. Vet. Med. Sci.* 72 (3), 279-284.
22. Iori, V., Frigerio, F., Vezzani, A., 2016. Modulation of neuronal excitability by immune mediators in epilepsy. *Curr. Opin. Pharmacol.* 26, 118-123.
23. Kaur, D., Pahwa, P., Goel, R.K., 2016. Protective effect of nerolidol against pentylenetetrazol-induced kindling, oxidative stress and associated behavioral comorbidities in mice. *Neurochem. Res.* DOI: 10.1155/2014/950631.
24. Kim, S.T., Doo, A.R., Kim, S.N., Kim, S.Y., Kim, Y.Y., Kim, J.H., Lee, H., Yin, C.S., Park, H.J., 2012. Acupuncture suppresses kainic acid-induced neuronal death and inflammatory events in mouse hippocampus. *J. Physiol. Sci.* 62 (5), 377-383.
25. Kwan, P., Brodie, M.J., 2001. Effectiveness of first antiepileptic drug. *Epilepsia* 42, 1255-1260.
26. Li, H., Liu, Y., Lin, L.T., Wang, X.R., Du, S.Q., Yan, C.Q., He, T., Yang, J.W., Liu, C.Z., 2016. Acupuncture reversed hippocampal mitochondrial dysfunction in vascular dementia rats. *Neurochem. Int.* 92, 35-42.
27. Li, S.H., Sun, H.T., Wang, Y.M., Wei, Z.J., 2015. Therapeutic effect of acupuncture treatment on ischemic hypoxic neonate rats with cerebral palsy. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi* 31 (5), 473-476.

28. Liang, L.P. and Patel, M., 2006. Seizure-induced changes in mitochondrial redox status. *Free Radical Biology and Medicine* 40 (2), 316-322.
29. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
30. Ma, R., Zhang, X., Liu, Y., Li, X., Yang, C., Xiong, J., 2001. Clinical observation on treatment of tonoclonic attack of infantile epilepsy with acupuncture plus Xi Feng capsule. *Journal of Traditional Chinese Medicine* 42, 276–278.
31. Mattiello, A., Filippi, A., Pošćić, F., Musetti, R., Salvatici, M.C., Giordano, C., Vischi, M., Bertolini, A., Marchiol, L., 2015. Evidence of Phytotoxicity and Genotoxicity in *Hordeum vulgare* L. Exposed to CeO₂ and TiO₂ Nanoparticles. *Front. Plant. Sci.* 6, 1043.
32. Mavournin, K.H., Blakey, D.H., Cimino, M.C., Salamone, M.F., Heddle, J.A., 1990. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood: a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 239, 29-80.
33. Misra, H.P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 247, 3170-3175.
34. Pereira, P., Oliveira, P.A., Ardenghi, P., Rotta, L., Henriques, J.A., Picada, J.N., 2006. Neuropharmacological analysis of caffeic acid in rats. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 99, 374–378.
35. Pflüger, P., Viau, C.M., Coelho, V.R., Berwig, N.A., Staub, R.B., Pereira, P., Saffi, J., 2016. Gamma-decanolactone inhibits iNOS and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia in N9 cells. *Eur. J. Pharmacol.* 780, 38-45.

36. Phunchago, N., Wattanathorn, J., Chaisiwamongkol, K., Muchimapura, S., Thukham-Mee, W., 2015. Acupuncture reduces memory impairment and oxidative stress and enhances cholinergic function in an animal model of alcoholism. *J. Acupunct. Meridian Stud.* 8 (1), 23-29.
37. Pu, L., Xu, N., Xia, P., Gu, Q., Ren, S., Fucke, T., Pei, G., Schwarz, W., 2012. Inhibition of Activity of GABA Transporter GAT1 by δ -Opioid Receptor. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2012, 818451.
38. Schmitz, B., Montouris, G., Schäuble, B., Caleo, S., 2010. Assessing the unmet treatment need in partial-onset epilepsy: looking beyond seizure control. *Epilepsia* 51, 2231-2240.
39. Song, Y.P., Yang, W., Guo, H.M., Han, Y.Y., 2006. Clinical observation on acupuncture combined with medicine for treatment of infantile febrile convulsion. *Zhongguo Zhen Jiu* 26, 561–562.
40. Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221.
41. Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P., Mahajan, R.T., 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr. Neuropharmacol.* 7, 65-74.
42. Wasterlain, C.G., Fujikawa, D.G., Penix, L., Sankar, R., 1993. Pathophysiological mechanisms of brain damage from status epilepticus. *Epilepsia* 34 (1), S37-S53.
43. World Health Organization, 2016. Epilepsy. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/> (accessed 10.06.16).

44. Xiao, D., 2015. Acupuncture for Parkinson's disease: a review of clinical, animal, and functional magnetic resonance imaging studies. *J. Tradit. Chin. Med.* 35 (6), 709-717.
45. Yang, F., Ang, W.P., Shen, D.K., Liu, X.G., Yang, Y.Q., Ma, Y., 2013. PI 3 K/Akt signaling pathway contributed to the protective effect of acupuncture intervention on epileptic seizure-induced injury of hippocampal pyramidal cells in epilepsy rats. *Zhen Ci Yan Jiu* 38 (1), 20-25.
46. Yang, F., Xu, G.L., Yang, Y.Q., Shen, D.K., Feng, P.Z., Wang, P., Liu, X.G., 2009. Effect of electroacupuncture on epileptic EEG and intracellular Ca²⁺ content in the hippocampus in epilepsy rats. *Zhen Ci Yan Jiu* 34 (3), 163-166.
47. Yang, J., 1990. Treatment of status epilepticus with acupuncture. *Journal of Traditional Chinese Medicine* 10, 101–102.
48. Zhao, Z.Q., 2008. Neural mechanism underlying acupuncture analgesia. *Prog. Neurobiol.* 85, 355-375.

Figure legends

Figure 1. The timeline of PTZ-induced kindling model in mice.

Figure 2. The MAC effect on PTZ-induced kindling in mice. (A) Percentage of animals presenting seizures (clonic forelimb convulsions lasting more than 3 s) in the Sal/PTZ, DZP 2.0 mg/Kg/PTZ, DZP 0.15 mg/Kg/PTZ, MAC sal/PTZ, MAC DZP 0.15 mg/Kg/PTZ, Sham sal/PTZ groups during repeated PTZ administration (60 mg/kg, s.c.). N = 09 animals per group (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.001$; Fisher's Exact Test, compared to Sal/PTZ group). (B) Latency for the 1st clonic forelimb convulsion as long as or longer than 3 s in mice submitted to PTZ-kindling. Diazepam (DZP) was used as positive control. N = 09 animals per group (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.001$, compared to the Sal/PTZ group). The comparisons between the six groups, according to the number of treatments were analyzed by using Generalized Estimation Equation (GEE). Bonferroni multiple comparisons were used to complete the evaluation Statistical calculations.

Figure 3. The MAC effect on oxidative stress promoted by pentylenetetrazole (PTZ) induced kindling model in the cerebral cortex of mice. DCF was used to determine ROS generation in cells homogenates. More oxidizing extracellular conditions demonstrated an increase in DCF fluorescence and are indicative of an increase in intracellular ROS generation. Values represent the mean \pm SD of N = 3 animals per group. * $P \leq 0.05$, *** $P \leq 0.001$ compared to the saline/PTZ group; # $P \leq 0.001$ compared to the saline/saline group.

Figure 4. The MAC effect on the activity of the antioxidant enzyme Superoxide dismutase (SOD) in the mice cerebral cortex. Values represent the mean \pm SD of N = 3 animals per

group. $*P \leq 0.05$, $***P \leq 0.001$ compared to the saline/PTZ group; $\#P \leq 0.05$ compared to the saline/saline group.

Figure 5. The MAC effect on the activity of the antioxidant enzyme Catalase (CAT) in the mice cerebral cortex. Values represent the mean \pm SD of N = 3 animals per group. $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$ and $***P \leq 0.001$ compared to the saline/PTZ group; $\#P \leq 0.01$ compared to the saline/saline group.

Figure 6. The MAC effect on NO production promoted by PTZ-induced kindling model in the cerebral cortex of mice. Values represent the mean \pm SD of N = 3 animals per group. $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$ compared to the saline/PTZ group; $\#P \leq 0.05$, compared to the saline/saline group.

Figure 7 (A-B). The MAC effect on the expression of TNF- α protein in the cerebral cortex of mice. The TNF- α protein was examined by western blot analysis. Values represent the mean \pm SD of N = 3 animals per group. $*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$ compared to the saline/PTZ group; $\#P \leq 0.01$ compared to the saline/saline group.

Figures

Figure 1

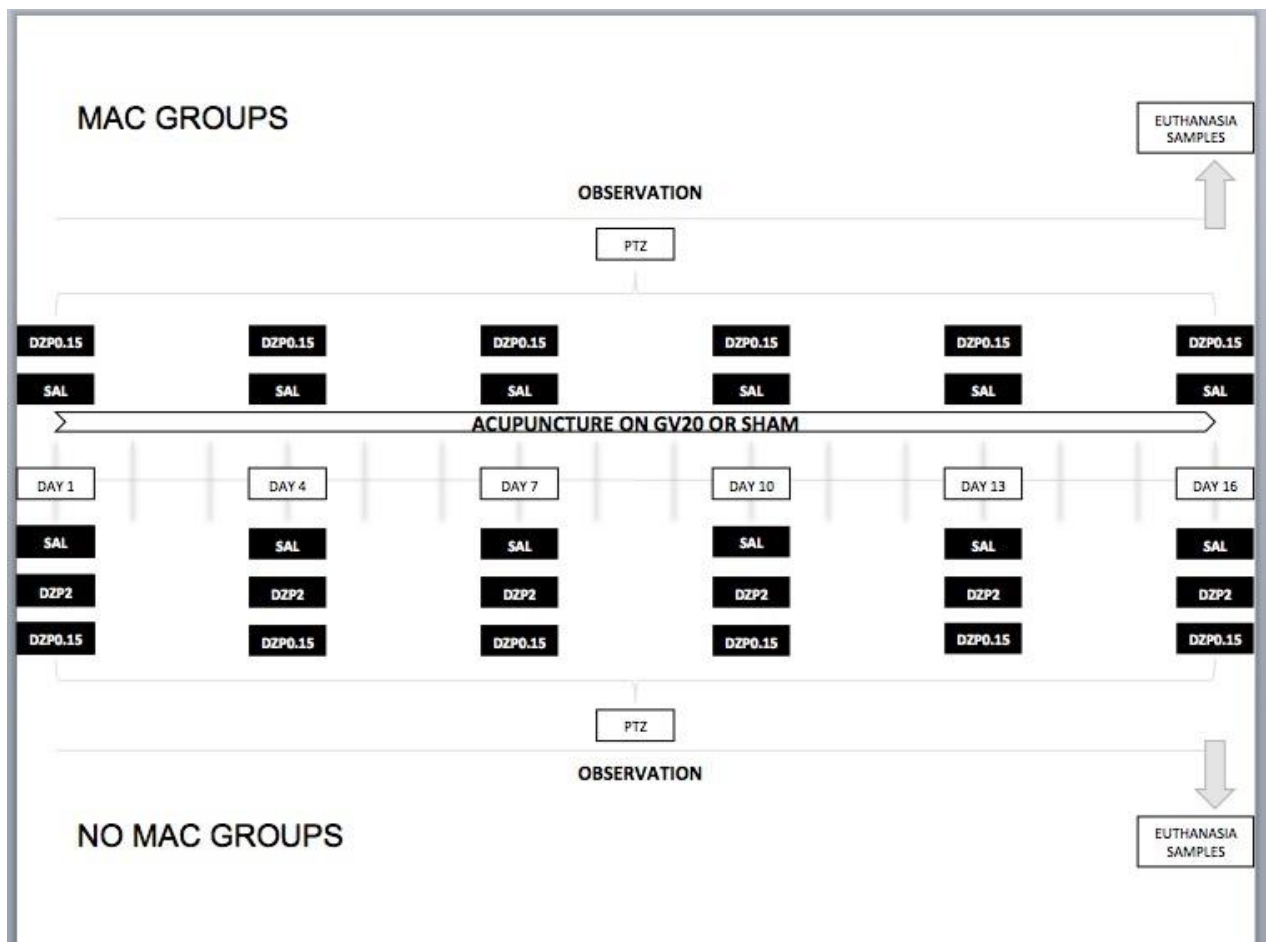


Figure 2A

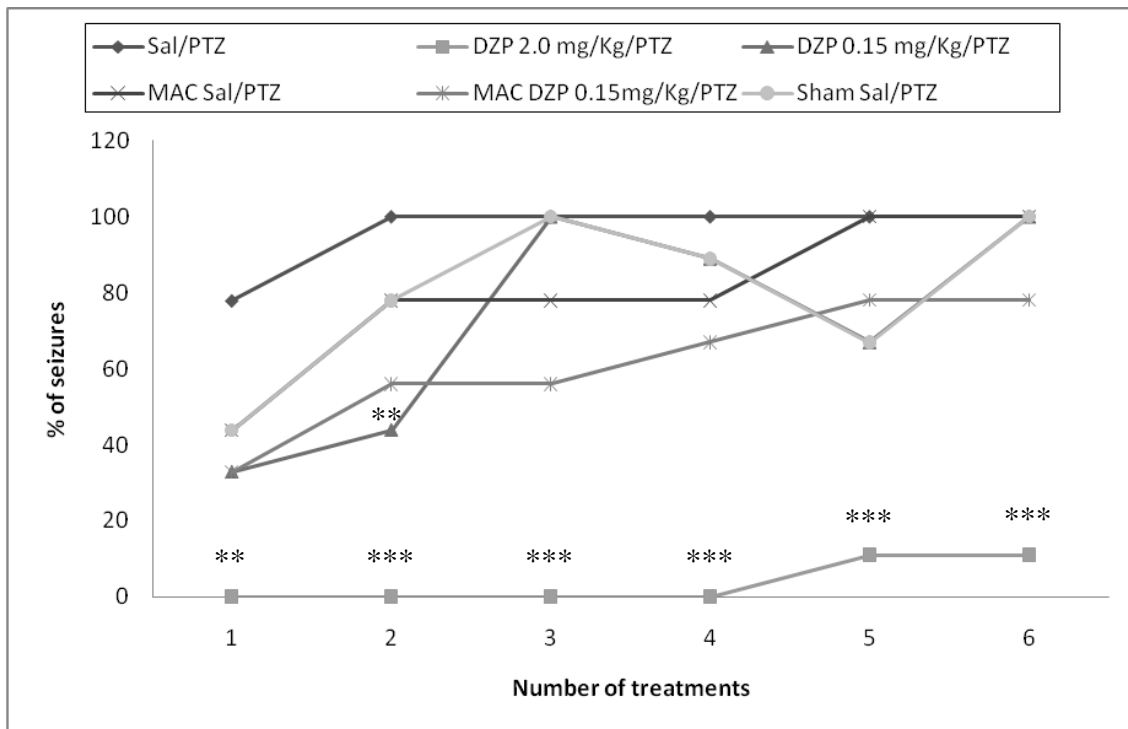


Figure 2B

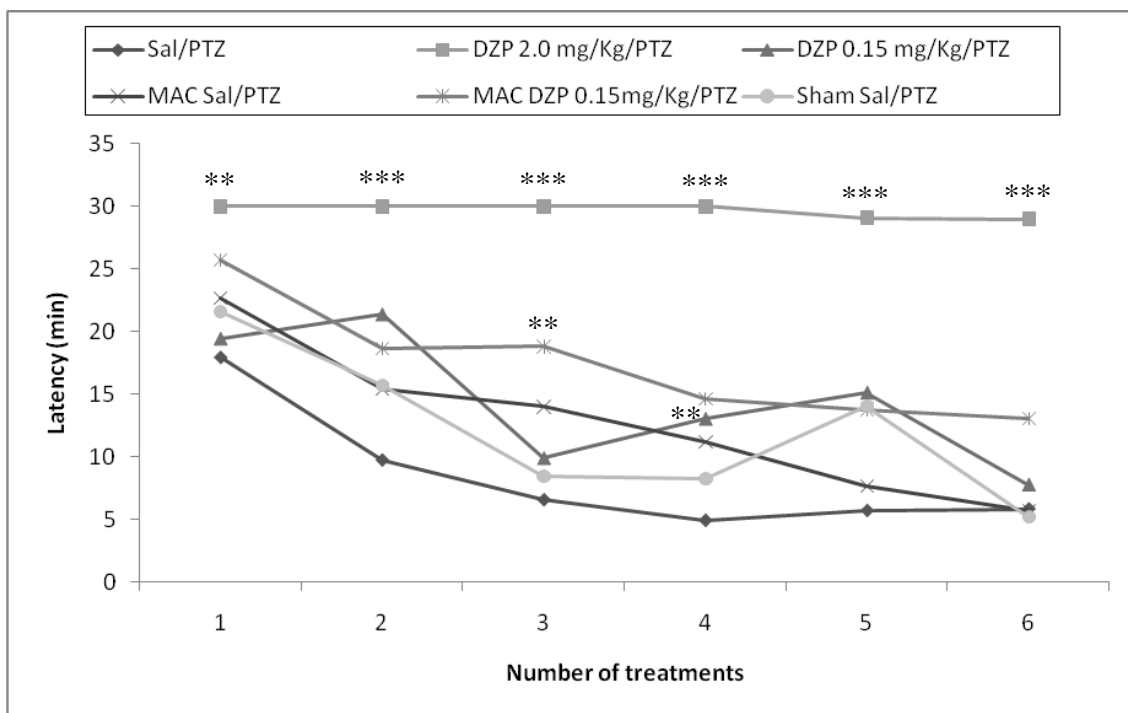


Figure 3

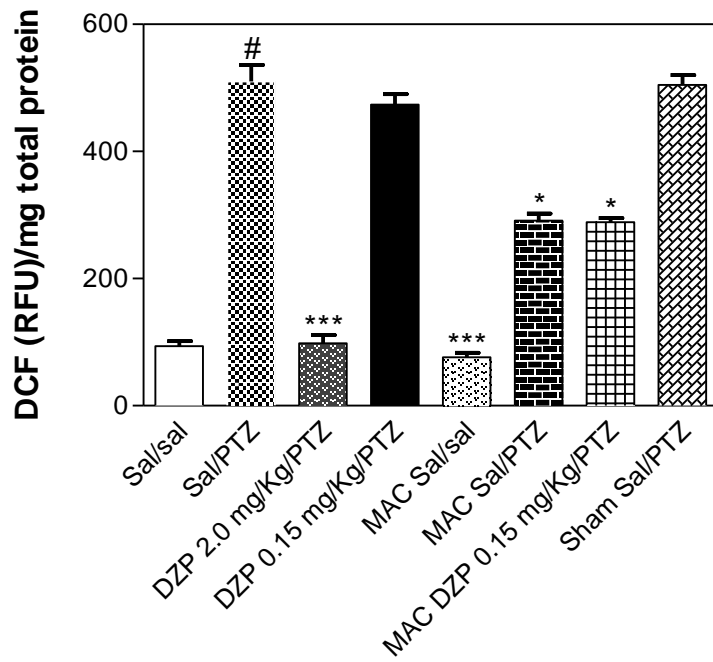


Figure 4

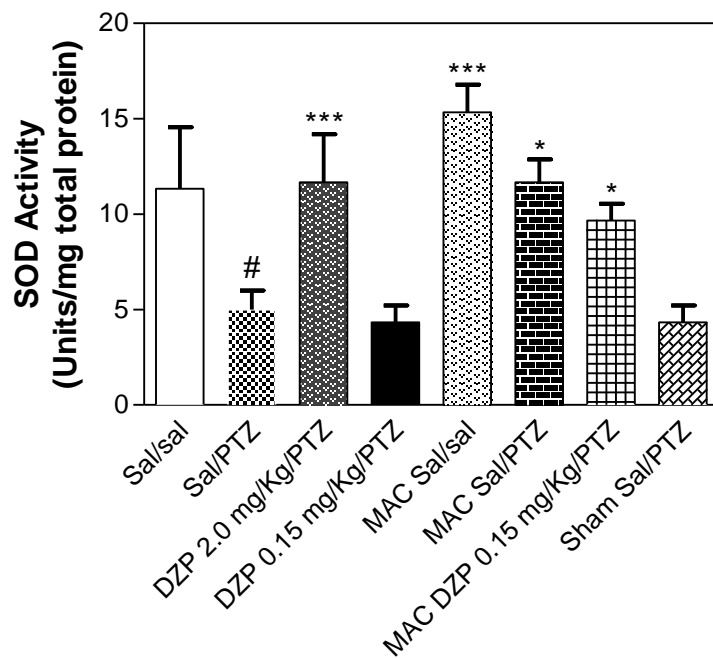


Figure 5

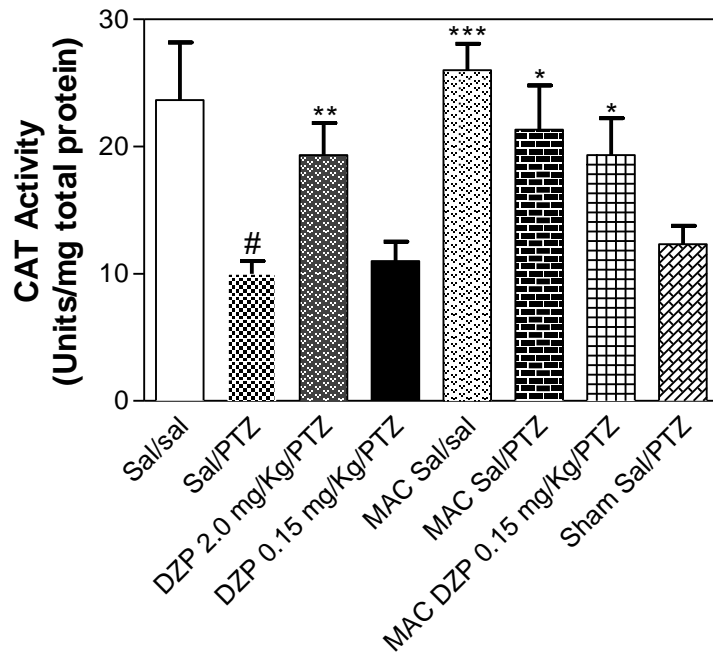


Figure 6

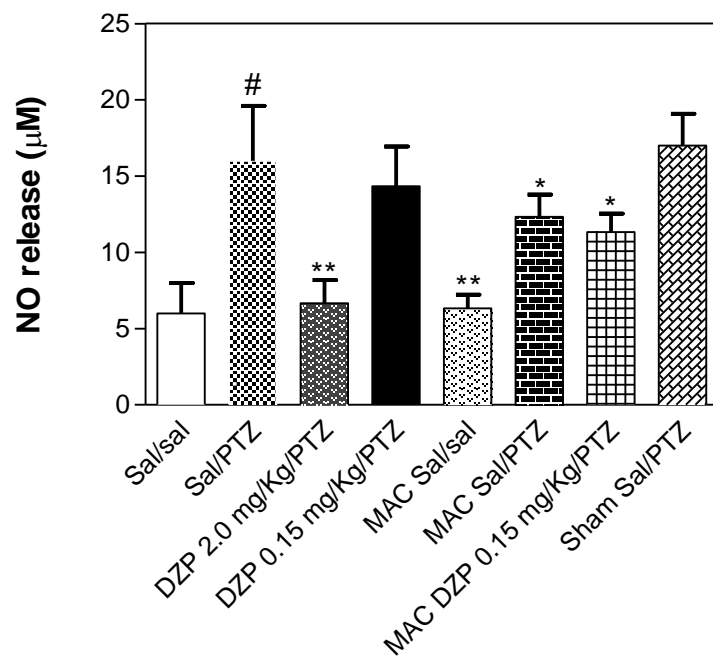


Figure 7A









	Sal/sal	Sal/PTZ	MAC sal/PTZ	MAC DZP 0.15 mg/Kg/PTZ
TNF- α 26 KDa				
β -Actin 43 KDa				

Figure 7B

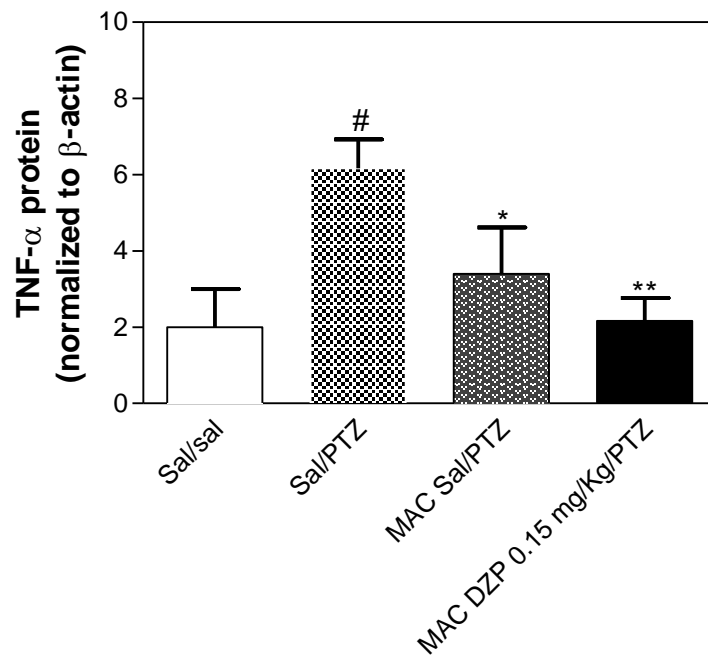


Table 1. Effect of manual acupuncture on DNA damage promoted by pentylenetetrazole (PTZ)-induced kindling model in mice.

Group	Hippocampus		Cortex		Peripheral blood	
	DI ^a	DF ^b	DI ^a	DF ^b	DI ^a	DF ^b
Sal/Sal	66.6 ± 10.8	66.0 ± 10.6	74.8 ± 13.6	73.8 ± 12.9	44.6 ± 6.9	44.6 ± 6.9
MAC Sal/Sal	69.2 ± 16.1	68.0 ± 15.7	50.4 ± 5.8	50.4 ± 5.8	42.4 ± 10.0	42.4 ± 10.0
Sal/PTZ	269.3 ± 46.0 ***	98.3 ± 1.2 ***	213.0 ± 40.8 ***	97.0 ± 2.8 **	85.5 ± 18.9 *	78.5 ± 12.0 **
Sham Sal/PTZ	237.3 ± 11.1 **	98.7 ± 2.3 ***	196.0 ± 26.0 ***	96.0 ± 2.9 *	83.5 ± 11.8 *	78.5 ± 4.4 **
MAC Sal/PTZ	194.5 ± 21.3 *	100.0 ± 0 ***	170.0 ± 17.9 ***	82.3 ± 14.1	56.4 ± 8.6	55.4 ± 9.0
DZP 2.0 mg/Kg/PTZ	183.2 ± 86.7 *	89.6 ± 9.6 **	140.2 ± 39.6 ***	84.8 ± 10.4	79.4 ± 27.8	67.0 ± 15.2
DZP 0.15 mg/Kg/PTZ	235.3 ± 82.7 ***	98.8 ± 1.5 ***	155.2 ± 33.1 ** [#]	89.4 ± 6.5	59.2 ± 25.1	54.0 ± 18.7
MAC DZP 0.15 mg/Kg/PTZ	151.6 ± 39.2	95.8 ± 4.0 ***	186.5 ± 13.8 ***	93.0 ± 8.9	51.8 ± 16.0	51.8 ± 16.0

N = 5 animals per group. ^a DI can range from 0 (completely undamaged, 100 cells × 0) to 400 (with maximum damage, 100 × 4). ^b DF was calculated based on number of cells with tail versus those with no tail. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$ in comparison to Sal/Sal group (ANOVA, Tukey's test). [#] $P \leq 0.05$; ^{##} $P \leq 0.01$ in comparison to Sal/PTZ group (ANOVA, Tukey's test).

Table 2. Mutagenic activity in bone marrow after PTZ-induced kindling model in mice.

Group	MNPCE ^a in 2,000 PCE	Ratio PCE/NCE ^b
	Mean \pm SD	Mean \pm SD
Sal/sal	6.0 \pm 1.2	1.8 \pm 0.1
MAC sal/sal	8.0 \pm 1.9	1.7 \pm 0.2
Sal/PTZ	9.5 \pm 1.0	1.5 \pm 0.3
Sham sal/PTZ	10.8 \pm 2.6	1.5 \pm 0.1
MAC sal/PTZ	8.2 \pm 2.7	1.6 \pm 0.2
DZP 2.0 mg/Kg/PTZ	8.3 \pm 3.3	1.5 \pm 0.5
DZP 0.15 mg/Kg/PTZ	9.2 \pm 2.3	1.4 \pm 0.1
MAC DZP 0.15 mg/Kg/PTZ	7.6 \pm 1.8	1.5 \pm 0.3
Cyclophosphamide ^c	29.2 \pm 5.9 ***	1.3 \pm 0.1

^aMNPCE: micronucleus in polychromatic erythrocytes.

^bRatio PCE/NCE: ratio polychromatic erythrocytes/normochromatic erythrocytes.

^cPositive control (50 mg/kg single dose, i.p.).

N = 5 animals per group.

*** $P \leq 0.001$: significant difference in comparison with the Sal/sal group (ANOVA, Tukey's test).

4 DISCUSSÃO

O presente estudo revelou que o tratamento utilizando acupuntura em associação ao diazepam em doses baixas reduziu a ocorrência de convulsões e aumentou a latência para a primeira convulsão, mas não significativamente, nos animais submetidos ao modelo de *kindling* induzido por PTZ. Nossos resultados revelaram que a acupuntura sozinha não produziu um menor comportamento convulsivo, embora tenha reduzido a produção de ROS, aumentou a atividade das enzimas SOD e CAT, suprimindo a resposta inflamatória central induzida pelo modelo de *kindling*. Todos os resultados foram mais pronunciados nos animais que receberam acupuntura em associação a uma dose baixa de diazepam.

Esta é a primeira tentativa de avaliar o efeito protetor da acupuntura manual no modelo de *kindling* induzido por PTZ, estresse oxidativo associado e neuroinflamação.

Caracterizada pela repetição espontânea de convulsões, a epilepsia é uma doença neurológica crônica, que vem sendo associada a uma alteração nos parâmetros de estresse oxidativo. Estudos anteriores indicaram o efeito protetor de moléculas antioxidantes no tratamento de convulsões, uma vez que as alterações em parâmetros de estresse oxidativo durante a epilepsia incluem a correlação entre as gerações de radicais livres e alterações no ambiente neuroquímico (Kaur et al., 2016).

Com um papel importante na regulação da função biológica, a produção de radicais livres está envolvida no prejuízo de estruturas celulares, assim como na patogênese de diversas doenças neurodegenerativas, tais como acidente vascular cerebral e doença Parkinson. Tais doenças podem desenvolver características de epilepsia com o tempo. O estresse oxidativo e nitrosativo é considerado um dos possíveis mecanismos na patogênese da epilepsia. Alguns estudos verificaram que no *status epilepticus* ocorrem mudanças no potencial redox e diminuição nos níveis de ATP, o que pode levar a um colapso na produção de energia cerebral e sua oferta. Pesquisadores demonstraram que ocorrem danos oxidativos a macromoléculas, que são alvos sensíveis (proteínas, lipídios e DNA), causados por crises persistentes (*status epilepticus*), como também estudos genéticos e pré-clínicos demonstraram um aumento no estresse oxidativo e nitrosativo mitocondrial e subsequente dano celular após convulsões persistentes (Aguilar et al., 2012).

O desequilíbrio nos processos redox e o estresse oxidativo podem danificar componentes celulares importantes, incluindo o DNA e levar ao desenvolvimento e

patogênese de vários distúrbios biológicos. O aumento do dano ao DNA em grupos submetidos ao *kindling* induzido por PTZ nos tecidos cerebrais pode estar associado a um desequilíbrio no estado redox causado pelas convulsões. Desta forma, os grupos que receberam DZP 2mg/kg foram quase que totalmente protegidos das convulsões induzidas pelo PTZ, demonstrando danos ao DNA significativamente inferior. No entanto, houve um aumento de danos ao DNA no sangue periférico em dois grupos, Sal/PTZ e Sham/Sal/PTZ em comparação com Sal/Sal, sugerindo um prejuízo sistêmico.

As células microgliais são macrófagos especializados do SNC – capazes de defesa imunológica – e os astrócitos são as células gliais mais numerosas no SNC, que quando ativados induzem a liberação de mediadores inflamatórios, tais como IL-1 β e TNF- α , contribuindo para a morte de células neuronais através de uma resposta inflamatória sustentada (Kim et al., 2012). No presente trabalho, a administração de PTZ elevou os níveis de TNF- α cortical nos animais submetidos ao modelo de *kindling*. A citocina pró-inflamatória, TNF- α , é conhecida por participar da indução e manutenção da epilepsia como comprovado em outros modelos de epilepsia, em que foi demonstrada a que a super-expressão de TNF- α , entre outras citocinas inflamatórias em cérebros de ratos, está associada a crises espontâneas esporádicas apontando para o seu papel central na epilepsia, independentemente do modelo animal. Assim, níveis corticais elevados de TNF- α em ratos submetidos ao *kindling* por PTZ pode significar um potencial pró-epileptogênico e podem reduzir o limiar para a indução das convulsões, definindo, assim, a base para o princípio da epilepsia (Abdallah et al., 2010).

O efeito da maior parte dos fármacos antiepilépticos (tais como o diazepam) é melhorar a resposta ao GABA, facilitando a abertura de canais de cloreto por ele ativados. Os benzodiazepínicos aumentam a frequência de abertura do canal, o que leva a um aumento na condutância do íon cloreto e a inibição do potencial de ação do receptor resulta em um aumento de GABA_A (Ataee et al., 2016). No entanto, o uso clínico dos benzodiazepínicos está limitado pelos seus efeitos secundários, tais como déficit psicomotor, sedação, miorelaxamento, ataxia, amnésia, potenciação de outros fármacos depressores centrais e risco de dependência (Doukkali et al., 2015). Portanto, há a necessidade de uma alternativa que possa melhorar sua eficácia, diminuir seus efeitos indesejáveis, reduzindo posteriormente, tolerância e dependência.

Vários estudos têm proposto diversos mecanismos de ação aos efeitos da acupuntura, incluindo um grande número de estudos clínicos que demonstram que a técnica produz efeitos favoráveis em vários tipos de epilepsia, tais como crise de ausência, convulsão febril, convulsão tônico-clônica generalizada, e até mesmo *status epilepticus*. Os benefícios terapêuticos gerais incluem a melhoria do eletroencefalograma (p.ex. a redução dos picos de onda e dessincronização) e os sintomas epiléticos (diminuição da frequência de convulsões, ausência de ataques) (Deng et al., 2001; Ma et al., 2001; Song et al., 2006), o alívio da severidade do estado epilético (Yang, 1990), a recuperação funcional, e a melhoria da qualidade de vida. Estudos em animais demonstraram os efeitos antiepiléticos da acupuntura em modelos variados. Chen et al. observou que a EA produz redução de aproximadamente 27% da atividade neuronal epileptiforme induzida por PTZ no tálamo ventroposterior lateral de ratos (Chen S et al., 2014). EA tem um efeito anti-epilético óbvio, que está relacionado com o seu efeito na regulação negativa do aumento de níveis de Ca^{2+} no hipocampo de ratos submetidos ao modelo de *kindling* por PTZ (Yang et al., 2009). Acupuntura tem um efeito protetor nas células piramidais de regiões CA 1 e CA 3 do hipocampo em ratos epiléticos, o que está associado com a função normal da via de sinalização PI3 K/Akt (Yang et al., 2013). EA utilizada em acupontos na região da cabeça (p.ex. VG20) impede a atrofia de algumas estruturas límbicas e melhora os déficits cognitivos em ratos submetidos ao modelo de epilepsia induzido por pilocarpina e que este efeito é dependente do sistema serotoninérgico (Dos Santos et al., 2005).

O tálamo é considerado como uma porta de entrada e controle na transmissão da informação sensorial ao córtex – exceto informações do olfato. Da mesma forma, o córtex tem ligações íntimas e envia projeções descendentes reciprocamente e de maneira complexa ao tálamo. Os circuitos corticotalamocorticais mediam a geração de oscilações neurais, de modo que as oscilações hipersincronizadas anormais na rede talamocortical - consiste das ligações positivas e negativas de *feedback* entre o córtex e o tálamo - têm sido implicadas como um mecanismo subjacente na geração das descargas de onda de pico, que é uma característica da epilepsia de ausência (Chen et al., 2014). Geralmente, os sinais de ativação dos receptores da pele em pontos de acupuntura e os tecidos circundantes são transportados por fibras A_{β} , A_{δ} e C para o corno dorsal da medula espinhal ou núcleo do trato espinal do trigêmeo. Para os sinais provenientes do corpo e extremidades, especificamente, eles ascendem através do trato espinotalâmico direta ou do trato espino-retículo-talâmico indiretamente e se projetam

para o tálamo, enquanto que para os da cabeça e rosto, que são na sua maioria inervados pelo nervo trigêmeo, os sinais de acupuntura são trazidos para o núcleo trigeminal e, em seguida, para o tálamo através do trato trigeminotalâmico. Eventualmente, a informação é retransmitida do tálamo ao córtex (Chen et al., 2014). Visto que as oscilações hipersincronizadas anormais na rede talamocortical podem estar envolvidas na epilepsia de ausência, como exemplo, e que acupuntura utiliza esta mesma rede na transmissão de sinais, possivelmente pode reorganizar esta sincronização e por conseguinte modular a neurotransmissão.

Além disso, acupuntura facilita a liberação de neuropeptídeos, modulando a expressão de genes em células neuronais do SNC, provocando profundos efeitos fisiológicos, e ativação de mecanismos de auto-cura. Acupuntura também aumenta a neurogênese em várias doenças, através da estimulação de ST36 e VG20 juntos, causando melhoras em neuropatologias relacionadas ao hipocampo, tais como a epilepsia e a isquemia, induzindo a proliferação celular e a diferenciação de neuroblastos (Hwang et al., 2010).

Demonstrou-se que o pré-tratamento com a combinação de acupuntura e diazepam em dose baixa, tende a aumentar a latência para a primeira convulsão. Esta combinação terapêutica tem efeitos insignificantes de sedação ou sobre a mobilidade, como outros estudos que demonstram que a combinação não exhibe a sedação excessiva que limita o tratamento com altas doses de diazepam (Kitajima et al., 2004). O tratamento combinado de acupuntura e diazepam também diminui os níveis de radicais livres e de produção de óxido nítrico, bem como aumenta as atividades de SOD e CAT. O diazepam tem ações distintas como modulador alostérico positivo de receptores GABA_A, embora o mecanismo subjacente aos efeitos da acupuntura ainda deva ser elucidado. Esta combinação reduz a neuroinflamação conseqüente ao modelo de *kindling* induzido por PTZ, demonstrado pela inibição da expressão do TNF- α , além da ausência dos efeitos adversos associados a elevadas doses de benzodiazepínicos.

5 CONCLUSÃO

As alterações bioquímicas observadas nos grupos que receberam acupuntura manual, principalmente naqueles em associação ao diazepam, podem produzir proteção neuronal no córtex cerebral dos animais e indicam que MAC incrementa as defesas antioxidantes corticais, melhorando o perfil inflamatório e genotóxico observados nos animais submetidos ao modelo de *kindling* induzido por PTZ. É precipitado afirmar que a terapia combinada de MAC e um fármaco anticonvulsivante em dose baixa possa ser utilizada na clínica, sem que novos estudos sejam conduzidos, ainda que a utilização de MAC na MTC seja uma prática difundida.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdallah DM (2010) Anticonvulsant potential of the peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist pioglitazone in pentylenetetrazole-induced acute seizures and kindling in mice. **Brain Res** 1351:246-253.

Aguiar CC, Almeida AB, Araújo PV, de Abreu RN, Chaves EM, do Vale OC, Macêdo DS, Woods DJ, Fonteles MM, Vasconcelos SM (2012) Oxidative stress and epilepsy: literature review. **Oxid Med Cell Longev** 2012:795259.

Altman, S. (1997) Acupuncture therapy in small animal practice. **The compendium in continuing education** 19:1233-1245.

Ataee R, Falahati A, Ebrahimzadeh MA, Shokrzadeh M (2016) Anticonvulsant activities of *Sambucus nigra*. **Eur Rev Med Pharmacol Sci** 20(14):3123-3126.

Backer M, Hammes M, Sander D, Funke D, Deppe M, et al. (2004) Changes of cerebrovascular response to visual stimulation in migraineurs after repetitive sessions of somatosensory stimulation (acupuncture): a pilot study. **Headache** 44:95-101.

Brinkhaus BWC, Jena S, Linde K, Streng A, Wagenpfeil S, et al. (2006) Acupuncture in patients with chronic low back pain - A Randomised Controlled Trial. **Arch Intern Med** 166:450-457.

Browne TR, Holmes GL (2008) **Handbook of epilepsy**. 4 ed. Philadelphia: Lippincot, Williams & Wilkins, p. 9.

Chao DM, Shen LL, Tjen-A-Looi S, Pitsillides KF, Li P, Longhurst JC (1999) Naloxone reverses inhibitory effect of electroacupuncture on sympathetic cardiovascular reflex responses. **American Journal of Physiology** 276(6):H2127-H2134.

Chao D, Shen X, Xia Y (2013) From acupuncture to interaction between δ -opioid receptors and Na⁺ channels: a potential pathway to inhibit epileptic hyperexcitability. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 2013:1-17.

Chao D, Xia Y. Acupuncture treatment of epilepsy. In: Xia Y, Ding G, Wu GC. **Current Research in Acupuncture**. Nova Iorque: Springer, 2012. p. 129–214.

Chen S, Wang S, Rong P, Liu J, Zhang H, Zhang J (2014) Acupuncture for refractory epilepsy: role of thalamus. **Evid Based Complement Alternat Med.** 2014:950631.

Cheuk DK, Wong V (2008) Acupuncture for epilepsy. **Cochrane Database Syst Rev** Oct 8;(4):CD005062.

Dal-Pizzol F, Klamt F, Vianna MM, Schröder N, Quevedo J, Benfato MS, Moreira JC, Walz R (2000) Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. **Neurosci Lett** 291(3):179-182.

Dey A, Kang X, Qiu J, Du Y, Jiang J (2016) Anti-Inflammatory Small Molecules To Treat Seizures and Epilepsy: From Bench to Bedside. **Trends Pharmacol Sci pii:** S0165-6147(16)00044-4.

Dhir A, Naidu OS, Kulkarni SK (2005) Effect of naproxen, a non-selective cyclooxygenase inhibitor, on pentylenetetrazol-induced Kindling in mice. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 32:579-584.

Doukkali Z, Taghzouti K, Boudida EL, Nadjmouddine M, Cherrah Y, Alaoui K (2015) Evaluation of anxiolytic activity of methanolic extract of *Urtica urens* in a mice model. **Behav Brain Funct** 11:19.

Erthal V, Silva MD, Cidral-Filho FJ, Santos ARS, Nohama P (2013) ST36 laser acupuncture reduces pain-related behavior in rats: involvement of the opioidergic and serotonergic systems. **Lasers Med Sci** 28:1345-1351.

França GV (1998). Epilepsias. In: **Medicina legal**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 351-353.

French JA (2007) Refractory epilepsy: clinical overview. **Epilepsia** 48:3-7.

Glynn IM (1993) All hands to the sodium pump. **J Physiol** 462:1-30.

Han JS (2003) Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies. **Trends Neurosci** 26:17-22.

He W, Jing X, Wang X, Rong P, Li L, Shi H, Shang H, Wang Y, Zhang J, Zhu B. (2013) Transcutaneous auricular vagus nerve stimulation as a complementary therapy for pediatric epilepsy: A pilot trial. **Epilepsy Behav** 28(3):343-346.

Hwang IK, Chung JY, Yoo DY, Yi SS, Youn HY, Seong JK, Yoon YS (2010) Comparing the effects of acupuncture and electroacupuncture at Zusanli and Baihui on cell proliferation and neuroblast differentiation in the rat hippocampus. **J Vet Med Sci** 72(3):279-284.

Kaur D, Pahwa P, Goel RK (2016) Protective Effect of Nerolidol Against Pentylentetrazol-Induced Kindling, Oxidative Stress and Associated Behavioral Comorbidities in Mice. **Neurochem Res**. Jul 14. [Epub ahead of print]

Kim ST, Doo AR, Kim SN, Kim SY, Kim YY, Kim JH, Lee H, Yin CS, Park HJ (2012) Acupuncture suppresses kainic acid-induced neuronal death and inflammatory events in mouse hippocampus. **J Physiol Sci** 62(5):377-383.

Kitajima T, Kanbayashi T, Saito Y, Takahashi Y, Ogawa Y, Sugiyama T, Kaneko Y, Aizawa R, Shimizu T (2004) Diazepam reduces both arterial blood pressure and muscle sympathetic nerve activity in human. **Neurosci Lett** 355:77–80.

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

Jørgensen PL (1990) Structure and molecular mechanisms of the Na,K-pump. **Monovalent Cat in Biol Syst** 117–154.

Liang J e Xia Y. Acupuncture modulation of central neurotransmitters. In: Xia Y, Ding G, Wu GC. **Current Research in Acupuncture**. Nova Iorque: Springer, 2012. p. 1–36.

Lin D, De La Pena I, Lin L, Zhou SF, Borlongan CV, Cao C (2014) The neuroprotective role of acupuncture and activation of the BDNF signaling pathway. **Int J Mol Sci** 15(2):3234-3252.

Linde KSA, Jürgens S, Hoppe A, Brinkhaus B, Witt C, et al. (2005) Acupuncture for patients with migraine - A Randomized Trial (ART Migraine). **JAMA** 293:2118-2125.

Loscher W, Schmidt D (2004) New horizons in the development of antiepileptic drugs: the search for new targets. **Epilepsy Res** 60:77-159.

Melchart D, Streng A, Hoppe A, Brinkhaus B, Witt C, et al. (2005) Acupuncture in patients with tension-type headache: randomised controlled trial. **BMJ** 331:376-382.

NIH Consensus Development Panel on Acupuncture (1998) “Acupuncture” The Journal of the American Medical Association 280(17):1518-1524.

Meldrum B (1984) Amino acids neurotransmitters in new approaches to anticonvulsant drug action. **Epilepsia** 22:140-149.

Ogiwara I, Miyamoto H, Morita N, Atapour N, Mazaki E, Inoue I, Takeuchi T, Itohara S, Yanagawa Y, Obata K, Furuichi T, Hensch TK, Yamakawa K (2007) Nav1.1 localizes to axons of arylsulfatase-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an *scn1a* gene mutation. **J Neurosci** 27:5903-5914.

Pflüger P, Vial C, Coelho VR, Berwig NA, Staub RB, Pereira P, Saffi J (2016) Gamma-decanolactone inhibits iNOS and TNF- α production by lipopolysaccharide-activated microglia in N9 cells. **Eur J Pharmacol** 780:38-45.

Porto LA, Siqueira JS, Seixas LN, et al. (2007) O papel dos canais iônicos nas epilepsias e considerações sobre as drogas antiepilépticas – uma breve revisão. **J Epilepsy Clin Neurophysiol** 13(4):169-175.

Qiu K, Jing M, Sun R, Yang J, Liu X, He Z, Yin S, Lan Y, Cheng S, Gao F, Liang F, Zeng F (2016) The Status of the Quality Control in Acupuncture-Neuroimaging Studies. **Evid Based Complement Alternat Med** 2016:3685785.

Rang HP, Dale MM, et al. (2007) Farmacologia. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 540-543.

Raza MU, Tufan T, Wang Y, Hill C, Zhu MY (2016) DNA Damage in Major Psychiatric Diseases. **Neurotox Res** 30(2):251-267.

Scognamiglio-Szabó MVR, Bechara GH (2001) Acupuntura: bases científicas e aplicações. **Ciência Rural** 31(6):1091-1099.

Scharfman HE (2007) The neurobiology of epilepsy. **Curr Neurol Neurosci Rep** 7:348-354.

Simonin A, Laginja J, Varljen J, Zupan G, Erakovic V (2000) Lithium plus pilocarpine induced status epilepticus – biochemical changes. **Neurosci Res** 36:157-166.

Skou JC (1990) The energy coupled exchange of Na⁺ for K⁺ across the cell membrane. The Na⁺, K⁽⁺⁾-pump. **FEBS Lett** 268:314-324.

Skou JC, Esmann M (1992) The Na,K-ATPase. **J Bioenerg Biomembr** 24:249-261.

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

Wallenstein MC (1987) Attenuation of penicillin models of epilepsy by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Exp Neurol** 98:152–160.

WHO. Acupuncture: Review and Analysis of Reports on Controlled Clinical Trials: World Health Organization. (2002): p.87.

WHO. Epilepsia. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/es/>. Acesso em 26 de setembro de 2016.

Xia Y, X. Guo XQ, Zhang AZ, Cao XD, Li P (1985) Inhibitory effect of analogous electro-acupuncture on experimental arrhythmia. **Acupuncture and Electro-Therapeutics Research** 10(1-2):13–34.

Xie, H, Preast V. (2007) Xie's Veterinary Acupuncture. Oxford: Blackwell Publishing, 376p.

Yang, R., Cheng, J. Effect of Acupuncture on Epilepsy. In: Xia, Y., Cao, X., Wu, G., Cheng, J. (Eds.). **Acupuncture Therapy for Neurological Diseases: A Neurobiological View**. Londres: Springer, 2010, 326-364.

Yu FH, Mantegazza M, Westenbroek RE, Robbins CA, Kalume F, Burton KA, Spain WJ, McKnight GS, Scheuer T, Catterall WA (2006) Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. **Nat Neurosci** 9:1142-1149.

7 ANEXOS



U F R G S

UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 28514

Título: AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ACUPUNTURA MANUAL SOBRE CONVULSÕES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL NO MODELO DE KINDLING EM CAMUNDONGOS

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

PATRÍCIA PEREIRA - coordenador desde 01/03/2015
Alexsandro Luis Frantz - Aluno de Mestrado desde 01/03/2015

Equipe Externa:

Jenifer Saffi - pesquisador desde 01/03/2015
Cassiana Viau - pesquisador desde 01/03/2015

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 06/04/2015 - Sala 330 do Anexo I do Prédio da Reitoria - Campus Centro- Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 236 camundongos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quarta-Feira, 22 de Abril de 2015

CRISTIANE MATTE
Vice Coordenador da comissão de ética