



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA-UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS
NÍVEL DOUTORADO**

CYNTHIA GERMOGLIO FARIAS DE MELO

**EFEITO ANTICONVULSIVANTE DO MONOTERPENO SINTÉTICO (1S)-(-)-
VERBENONA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO POR METODOLOGIAS
ESPECÍFICAS COMPORTAMENTAIS**

**JOÃO PESSOA
2017**

CYNTHIA GERMOGLIO FARIAS DE MELO

**EFEITO ANTICONVULSIVANTE DO MONOTERPENÓ SINTÉTICO (1S)-(-)-
VERBENONA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO POR METODOLOGIAS
ESPECÍFICAS COMPORTAMENTAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, na área de concentração de farmacologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba para obtenção do grau de

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Hilzeth de Luna Freire Pessôa

**JOÃO PESSOA
2017**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M528e Melo, Cynthia Germoglio Farias de.

Efeito anticonvulsivante do monoterpene sintético
(1S)-(-)-Verbenona em animais de laboratório por
metodologias específicas comportamentais / Cynthia
Germoglio Farias de Melo. - João Pessoa, 2017.
115 f. : il.

Orientação: Reinaldo Nóbrega de Almeida.

Coorientação: Hilzeth de Luna Freire Pessoa.

Tese (Doutorado) - UFPE/CCS.

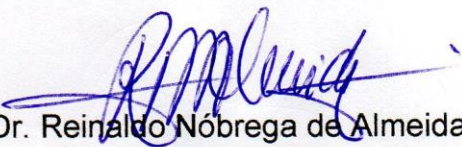
1. Farmacologia - produtos naturais. 2.
Anticonvulsivante. 3. (1S)-(-)-verbenona. 4. Citocinas.
5. COX-2. 6. BDNF. 7. c-fos. I. Almeida, Reinaldo
Nóbrega de. II. Pessoa, Hilzeth de Luna Freire. III.
Título.

UFPE/BC

CYNTHIA GERMOGLIO FARIAS DE MELO

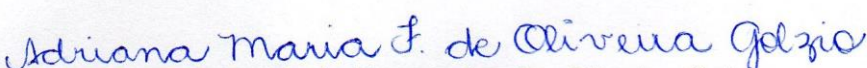
**EFEITO ANTICONVULSIVANTE DO MONOTERPENO SINTÉTICO (1S)-(-)-
VERBENONA EM ANIMAIS DE LABORATÓRIO POR METODOLOGIAS
ESPECÍFICAS COMPORTAMENTAIS**

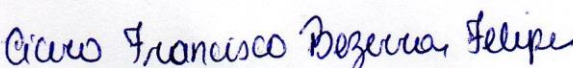
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Orientador – UFPB

Profª. Drª. Marcia Regina Piuvezam
Examinadora interna - UFPB

Profª. Drª. Mirian Graciela da Silva Stiebbe Salvadori
Examinadora externa - UFPB


Profª. Drª. Adriana Maria Fernandes De Oliveira Golzio
Examinadora externa – UFPB


Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe
Examinador externo – UFPB

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro
Examinador interno (SUPLENTE) – UFPB

Profª. Drª. Joelma Rodrigues de Souza
Examinadora externa (SUPLENTE) – UFPB

AGRADECIMENTOS

Esta parte do trabalho foi umas das mais difíceis de escrever. Demonstrar meu carinho através de palavras nunca foi meu forte, mas sim através de atos. Mensurar a participação de cada um de vocês, de forma direta ou indireta, é algo que uma análise estatística não seria capaz.

A primeira pessoa que gostaria de agradecer é alguém que não vejo fisicamente, mas que está presente em cada momento, cada passo e cada decisão que eu tomo na minha vida. Deus, você foi a minha fortaleza durante toda a minha vida acadêmica, não deixando me abalar ou desistir por qualquer motivo que seja. Sei que continuarás guiando o meu caminho e não me deixarás desviar dos seus propósitos para minha vida.

Agradeço ao meu irmão Henrique, aos meus pais Ricardo e Joseane, em especial a minha mãe, pela sua batalha diária para permitir minha formação, sempre acreditando na minha capacidade de conquista e me ajudando na construção da minha vida acadêmica e profissional. Também agradeço aos meus familiares, tios, tias, primos e primas.

Agradeço grandemente ao meu esposo, Bruno, pelo seu amor, dedicação, carinho e compreensão nos meus momentos de dificuldade e *stress* durante o doutorado. Você sempre me apoiou e me apoia cada vez mais. Mesmo gostando de curtir o final de semana comigo, me entendia quando eu não podia estar presente. Te amo.

Aos familiares do meu esposo, em especial a minha sogra, meu muito obrigado pelo apoio e carinho.

Após agradecer aos familiares, uma pessoa que merece toda a minha consideração e respeito, é meu orientador professor Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida. Professor, o senhor é exemplo de dignidade. Quando a professora Hilzeth me passou para sua orientação, fiquei um pouco receosa em trabalhar com algo que nunca havia feito. Mas, acredito que não estaria em melhores mãos. Como todo mundo diz: Há, seu orientador é Reinaldo? Então tenho certeza que seu trabalho deve está excelente. Você me recebeu de braços aberto e acreditou no meu trabalho. Obrigada pela confiança em mim depositada.

Hilzeth, o que dizer dessa mulher de um coração enorme e disposta a ajudar todos. Lembro, juntamente com minha amiga Marcela, no corredor do DBM, que estávamos desesperadas com a avaliação da banca de seleção, e ela calmamente, disse que iria dar tudo certo. E deu! Fico grandemente satisfeita por ter passado um tempo, mesmo que curto, sobre sua orientação. Muito obrigada por tudo!

Também não seria possível finalizar meu doutorado, ou melhor, dizer, nem iniciar as pesquisas, sem o auxílio da uma grade equipe que fez ou faz parte do

laboratório de Psicofarmacologia: Paula, Diogo, Renan, Indrid, Humberto, Terezinha e Marcelo. Principalmente minha amiga Paula, que ajudou nos experimentos, me ensinando com toda paciência. Lembro-me que nunca havia trabalhado com camundongo e tinha pavor de agulha, mas calmamente Renan disse: não tem problema Cynthia, eu faço a administração e você observa. Isto me tranquilizou bastante. Vocês foram não só companheiros de pesquisas, mas amigos.

Ao meu ex, e eterno orientador do mestrado, professor Eleonidas Moura Lima, pela sua parceria e amizade. Obrigada por permitir utilizar o espaço físico do laboratório que o senhor coordena. Os dados obtidos foram importantes para a minha tese que culminaram na publicação do meu artigo. Obrigada!

Um agradecimento especial a professora Dra. Márcia Regina Piuvezam e seus alunos Fagner, Adriano, Raquel e Alysson pela grande contribuição na análise histológica e de citocinas que enriqueceram o meu trabalho.

Ao programa de Pós Graduação e Sintéticos Bioativos, a equipe de professores e a Caroline (secretária), que foram fundamentais para a minha formação.

A banca de qualificação, pela enorme contribuição dada ao meu trabalho, engrateando com suas críticas e sugestões. Tentei acatar todas as sugestões.

Aos membros da banca examinadora, por ter aceitado o convite, mesmo existindo inúmeros afazeres. E, em nome da ciência e docência, prontificaram-se a participar desta fase final da tese. Desde já, minha eterna gratidão.

A equipe do biotério, em especial a José Crispim, por toda ajuda para a realização deste trabalho, se disponibilizado e fazendo o seu possível para disponibilizar os animais. E claro, meu enorme respeito aos animais utilizados nos experimentos.

A Universidade Federal da Paraíba e a CAPES pelo apoio técnico e financeiro.

Por fim, agradeço aqueles que aqui não foram citados, mas, saibam que minha gratidão será eterna. Espero que de uma forma ou de outra, os resultados obtidos neste trabalho e na minha qualificação acadêmica, possam retorna à sociedade.

um dia plantaram uma flor
Em um lindo jardim
Regaram-na, cuidaram-na
E ela ficou assim:
Linda, doce e suave
Como você YASMIN. Te amo filha!

RESUMO

MELO, C.G.F. **Efeito anticonvulsivante do monoterpene sintético (1S)-(-)-verbenona em animais de laboratório por metodologias específicas comportamentais.** 2017. 115p. Tese. (Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) -UFPB/CCS/ João Pessoa – PB.

Verbenona é um composto orgânico natural classificado como um terpeno, sendo naturalmente encontrado numa variedade de plantas. O (1S)-(-)-verbenona (VRB) é um feromônio de ocorrência natural gerada por besouros a partir de um precursor de resina de árvore hospedeira, o α -pineno. Óleos essenciais contendo (1S)-(-)-verbenona possuem atividade antibacteriana, acaricida e anti-inflamatória. No entanto, nenhuma atividade anticonvulsivante foi estudada com este terpeno. Desta forma, este trabalho busca avaliar o potencial efeito anticonvulsivante de VRB através de metodologias específicas comportamentais, realizadas por meio de indução química e elétrica de convulsão em camundongos, bem como quantificar citocinas pró-inflamatórias, a expressão gênica e análise histopatológica dos animais tratados no modelo crônico (kindling). VRB não causou alteração na coordenação motora dos animais. VRB não mostrou efeito sobre a convulsão induzida por pilocarpina e estriquina, sugerindo-se que possivelmente VRB não atua na neurotransmissão colinérgica, bem como nos receptores de glicina. No teste de convulsão induzido por eletrochoque, apenas a dose de 250 mg/kg; i.p. mostrou efeito na duração da convulsão, no entanto, não foi capaz de inibir a presença de convulsões. No teste de convulsões induzidas por PTZ, VRB mostrou atividade anticonvulsivante nas doses de 200 mg/kg i.p. ($733 \pm 109,4$ s) e 250 mg/kg i.p. ($648,8 \pm 124,5$ s) aumentando significativamente a latência para o início da primeira convulsão em comparação com o grupo controle ($51,8 \pm 2,84$ s). O pré-tratamento com flumazenil (FLU) não reverteu o efeito anticonvulsivante de VRB. VRB não reduziu nos níveis das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF α , porém, foi capaz de aumentar a expressão dos genes BDNF e COX-2 e reduzir os níveis de c-fos. VRB não apresentou efeito anticonvulsivante no modelo crônico, mas seu tratamento mostrou uma redução na morte das células neurais hipocâmpais dos camundongos. Os achados sugerem que os efeitos anticonvulsivantes de VRB no teste de PTZ podem estar relacionados a modulações de expressão dos RNA mensageiros de COX-2, BDNF e c-fos.

Palavras-chaves: Anticonvulsivante. (1S)-(-)-verbenona. Citocinas. COX-2. BDNF. c-fos.

ABSTRACT

MELO, C.G.F. **Anticonvulsive effect of synthetic monoterpene (1S)-(-)-verbenone in laboratory animals by specific behavioral methodologies.** 2017. 115p. Thesis. (Post-graduation in Natural and Synthetic Bioactive Products) -UFPB / CCS / João Pessoa - PB.

Verbenone is a natural organic compound classified as a terpene, being naturally found in a variety of plants. The (1S) - (-) - verbenone (VRB) is a naturally occurring pheromone generated by beetles from a host tree resin precursor, α -pinene. Essential oils containing (1S) - (-) - verbenone have antibacterial, acaricidal and anti-inflammatory activity. However, no anticonvulsant activity was studied with this terpene. Thus, this work aims to evaluate the potential anticonvulsant effect of VRB through specific behavioral methodologies, performed through chemical and electrical induction of convulsion in mice, as well as quantify proinflammatory cytokines, gene expression and histopathological analysis of the animals treated in the chronical model (kindling). VRB did not cause any alteration in the motor coordination of the animals. VRB showed no effect on the pilocarpine-induced convulsion test and strychnine, suggesting that VRB may not act on cholinergic neurotransmission as well as glycine receptors. In the electroshock-induced seizure test, only the dose of 250 mg / kg; i.p. showed effect, however, was not able to inhibit the presence of seizures. In the PTZ-induced seizure test, VRB showed anticonvulsive activity at doses of 200 mg / kg i.p. (733 ± 109.4 s) and 250 mg / kg i.p. (648.8 ± 124.5 s) significantly increasing the latency for the onset of the first seizure compared to the vehicle group (51.8 ± 2.84 s). Pretreatment with flumazenil (FLU) did not reverse the anticonvulsant effect of VRB. VRB showed no reduction in IL-1 β , IL-6 and TNF α cytokines, but was able to increase BDNF and COX-2 gene expression and reduce c-fos levels. VRB did not present an anticonvulsive effect in the chronic model, but its treatment showed a reduction in the death of the neural cells in the hippocampus of the mice. The findings suggest that the anticonvulsive effects of VRB in the PTZ test may be related to modulation of COX-2, BDNF and c-fos messenger RNA expression.

Key-words: Anticonvulsant. (1S)-(-)-verbenone. Cytokines. COX-2. BDNF. c-fos.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Canais envolvidos na epilepsia.....	28
Figura 2 -	Recepto GABA _A	33
Figura 3 -	Neurotransmissão glicinérgica.....	34
Figura 4 -	Esquema dos possíveis determinantes da resistência as DAEs em humanos e pesquisas experimentais.....	39
Figura 5 -	Estruturas químicas dos monoterpenos (S)-(+)- carvona (A) e (R)-(-)-carvona (B).....	43
Figura 6 -	Estrutura química do monoterpeno (1S)-(-)-verbenona.....	43
Figura 7 -	Resumo esquemático das metodologias anticonvulsivantes utilizadas para avaliar o potencial anticonvulsivante de (1S)-(-)-verbenona.....	49
Figura 8 -	Cronograma de administração do PTZ no teste do “kindling”.....	59
Figura 9 -	Análise da curva de melting do gene ACT (beta-actina).....	74
Figura 10 -	Análise da curva de melting do gene c-fos.....	74
Figura 11 -	Análise da curva de melting do gene BDNF.....	75
Figura 12 -	Análise da curva de melting do gene COX-2.....	75
Figura 13 -	Histologia dos hipocampus dos camundongos submetidos ao modelo crônico (aumento 40X).....	82
Figura 14 -	Histologia dos hipocampus dos camundongos submetidos ao modelo crônico (aumento 100X).....	83
Figura 15 -	Corte histológico do hipocampo referente ao grupo VRB 60.....	84
Figura 16 -	Corte histológico do hipocampo referente ao grupo salina (PTZ).	84

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Avaliação da atividade locomotora de (1S)-(-)-verbenona no teste da barra giratória.....	63
Gráfico 2 -	Efeito de (1S)-(-)-verbenona na latência para início das convulsões induzidas pela pilocarpina em camundongos.....	64
Gráfico 3 -	Efeito de (1S)-(-)-verbenona na latência para morte dos animais no teste das convulsões induzidas pela pilocarpina em camundongos.....	65
Gráfico 4 -	Efeito de (1S)-(-)-verbenona na latência para início das convulsões induzidas pela estricnina em camundongos.....	66
Gráfico 5 -	Efeito de (1S)-(-)-verbenona na latência para morte dos animais no teste das convulsões induzidas pela estricnina em camundongos.....	67
Gráfico 6 -	Efeito de (1S)-(-)-verbenona na duração das convulsões no teste do eletrochoque auricular máximo em camundongos.....	68
Gráfico 7 -	Efeito de (1S)-(-)-verbenona na latência da convulsão induzida por pentilenotetrazol.....	70
Gráfico 8 -	Efeito de (1S)-(-)-verbenona na latência da convulsão induzida por pentilenotetrazol após a administração de flumazenil.....	70
Gráfico 9 -	Efeito de (1S)-(-)-verbenona nos níveis de IL-1 β no teste de convulsão induzidos por PTZ.....	72
Gráfico 10 -	Efeito de (1S)-(-)-verbenona nos níveis de IL-6 no teste de convulsão induzidos por PTZ.....	72
Gráfico 11 -	Efeito de (1S)-(-)-verbenona nos níveis de TNF- α no teste de convulsão induzidos por PTZ.....	73
Gráfico 12 -	Análise da expressão gênica de BDNF nos animais tratados com (1S)-(-)-verbenona.....	76
Gráfico 13 -	Análise da expressão gênica de COX-2 nos animais tratados com (1S)-(-)-verbenona.....	77
Gráfico 14 -	Análise da expressão gênica de c-fos nos animais tratados com (1S)-(-)-verbenona.....	78
Gráfico 15 -	Efeito de (1S)-(-)-verbenona na media dos escores no teste de “kindling” induzido pelo PTZ em camundongos.....	79
Gráfico 16 -	Efeito de (1S)-(-)-verbenona sobre a média dos escores das alterações histológicas observados no hipocampo dos animais submetidos ao teste do “kindling” induzido pelo PTZ.....	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Classificação internacional das crises epiléticas conforme a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) de 1981.....	22
Quadro 2 -	Nova classificação Classificação internacional das crises epiléticas conforme a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) de 2017.....	24
Quadro 3 -	Características dos DAEs clinicamente aprovadas.....	36
Quadro 4 -	Espécies e respectivos óleos essenciais que apresentaram atividade anticonvulsivante.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Iniciadores utilizados na amplificação da PCR em tempo real.....	57
Tabela 2 -	Efeito de (1S)-(-)-verbenona no teste de convulsão induzido por pilocarpina.....	65
Tabela 3 -	Efeito de (1S)-(-)-verbenona no teste das convulsões induzidas pela estriknina.....	67
Tabela 4 -	Efeito de (1S)-(-)-verbenona no teste das convulsões induzidas pelo eletrochoque auricular máximo.....	69
Tabela 5 -	Efeito de (1S)-(-)-verbenona no teste de convulsão induzida por pentilenotetrazol.....	71
Tabela 6 -	Expressão relativa dos RNAs mensageiros dos genes BDNF, COX-2 e c-fos extraídos de hipocampus de camundongos submetidos ao teste de convulsão induzido po PTZ l.....	78
Tabela 7 -	Efeito de (1S)-(-)-verbenona no teste de “kindling” induzido pelo PTZ em camundongos.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

μL	Microlitro
μm	Micrômetro
$-2\Delta\Delta\text{CT}$	Expressão relativa
a.C	Antes de Cristo
ACT	Actina
AK	Ácido kaínico
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
Ca^{2+}	Cálcio
CAT	Catalase
cDNA	DNA complementar
c-FOS	Fos proto-oncogene
COX-2	Cicloxigenase-2
CT	<i>Cycle Threshold</i>
d.C	Depois de Cristo
DAES	Drogas antiepiléptica
DEPEC	Dietil pirocarbonato
DL50	Dose letal para 50% dos animais
DNA	Ácido ribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DTT	Dithiothreitol
DZP	Diazepam
EAAT1	Transportador de aminoácidos excitatório 1
EAAT2	Transportador de aminoácidos excitatório 2
EAAT3	Transportador de aminoácidos excitatório 3
EAM	Eletrochoque auricular máximo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF2	Fator de crescimento fibroblástico 2
FLU	Flumazenil
GABA _A	Receptor do ácido γ -aminobutírico tipo A
GAD65	Decarboxilase de ácido glutâmico 65
GAD67	Decarboxilase de ácido glutâmico 67
GLUT1	Transportador de glicose 1
GlyR	Receptor de glicina
GSH	Glutathione
HE	Hematoxilina e eosina
i.p.	Intraperitoneal
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
K^{+}	Ions potássio
M	Molaridade
M	Mol

mA	Miliampére
MC	Mioclônica
mg/kg	Miligrama por quilograma
mL	Mililitros
Na ⁺	Ions sódio
NGF	Fator de crescimento neuronal
nm	Nanômetro
NMDA	N-metil-D-aspartato
°C	Graus Celcius
p	Probabilidade de significância
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato de sódio
PBST	Tampão fosfato de sódio com adição de tween 20
PCR	Reação de cadeia polimerase
Pg/mL	Picograma por mililitro
PGD2	Prostagladina D2
PGF2alfa	Prostagladina F2 alfa
pH	Potencial de hidrogênio
PHE	Fenitoína
PILO	Pilocarpina
PTZ	Pentilenotetrazol
r.p.m	Rotação por minuto
RNA	Ácido desoxirribonucleico
RT	Transcriptase reversa
rt-PCR	Transcrição reversa da reação de cadeia polimerase
s	Segundo
s.c.	Subcutânea
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema nervoso central
SOD	Superóxido dismutase
TC	Tônico-clônica
Tm	Temperatura de anelamento
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
TrK-A	Tropomyosin receptor kinase A
TrK-B	Tropomyosin receptor kinase B
VRB	(1S)-(-)-verbenona
α	Alfa
β	Beta
Δ CT	Δ CT alvo – Δ CT referência
$\Delta\Delta$ CT	Δ CT amostra – Δ CT controle

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1 EPILEPSIA	21
2.2 PROCESSOS ENVOLVIDOS NA EPILEPTOGÊNESE	27
2.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA	32
2.4 DROGAS ANTIPELÉPTICAS E PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE	35
2.5 MONOTERPENO (1S)-(-)-verbenona	42
3 OBJETIVOS	47
3.1 OBJETIVO GERAL	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 MATERIAL	48
4.1.1 Substâncias	48
4.1.2 Animais	48
4.2 MÉTODOS	48
4.2.1 Estudo da Toxicidade Aguda (DL50)	49
4.2.2 Avaliação da coordenação motora (teste do Rotarod)	50
4.2.3 Teste das convulsões induzidas pela pilocarpina	50
4.2.4 Teste das convulsões induzidas pela estricnina	51
4.2.5 Teste das convulsões induzidas pelo Eletrochoque Auricular Máximo (MES)	51
4.2.6 Teste das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ)	52
4.2.7 Avaliação da possível participação do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA _A	52
4.2.8 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF α) do hipocampo dos camundongos submetidos ao teste de PTZ	53
4.2.9 Análise da expressão gênica dos genes BDNF, COX-2 e c-fos	54
4.2.9a Extração do RNA	54
4.2.9b Tratamento do RNA com DNase	55
4.2.9c Reação de Transcriptase Reversa (RT) para obtenção de cDNA	56
4.2.9d Reação em Cadeia da Polimerização (PCR) em Tempo Real	56
4.2.10 Modelo crônico de epilepsia: abrasamento ("kindling")	58
4.2.11 Análise histopatológica de hipocampo a partir do teste do "kindling"	59
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA	61
5 RESULTADOS	63
5.1 TOXICIDADE E AVALIAÇÃO DA COORDENAÇÃO MOTORA (TESTE DO ROTAROD) DE (1S)-(-)-VERBENONA	63
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DE (1S)-(-)-VERBENONA	64
5.2.1 Teste das convulsões induzidas pela pilocarpina	64
5.2.2 Teste das convulsões induzidas pela estricnina	66
5.2.3 Teste das convulsões induzidas pelo Eletrochoque Auricular Máximo (MES)	68

5.2.4	Teste das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ) e avaliação da participação do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA _A	69
5.2.4a	Citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF α	71
5.2.4b	Análise da expressão gênica de mRNA BDNF, COX-2 e c-fos.....	73
5.2.5	Modelo crônico de epilepsia: abasamento (“kindling”).....	79
5.2.5a	Análise histopatológica de hipocampo a partir do teste do “ <i>kindling</i> ”	80
6	DISCUSSÃO	86
7	CONCLUSÕES	100
	REFERÊNCIAS	101
	ANEXOS	114
	Certidão	114
	Artigo publicado (Anticonvulsive activity of (1S)-(-)-verbenone involving RNA expression of BDNF, COX-2, and c-fos).....	115



Introdução

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a epilepsia é uma doença crônica do cérebro que afeta pessoas em todo o mundo. Caracteriza-se por convulsões recorrentes, que são episódios breves de movimentos involuntários que podem envolver parte do corpo (parcial) ou todo o corpo (generalizado) e às vezes são acompanhados por perda de consciência e controle da função intestinal ou da bexiga. Estima-se que 50 milhões de pessoas no mundo tenham epilepsia, uma das doenças neurológicas mais comuns e complexas conhecidas. (WHO, 2017)

Dependendo da área cerebral onde a epilepsia está envolvida, ela pode manifestar-se por distúrbios de cognição ou consciência, movimentos involuntários, automatismos de comportamento ou manifestações autonômicas, sensoriais e psíquicas. (SHNEKER, FOUNTAIN, 2003) Esta condição clínica diversificada apresenta mais de 15 tipos de crises, mais de 30 síndromes epiléticas. (RAIO; LOWENSTEIN, 2015)

Quase 80% das pessoas com epilepsia vivem em países de baixa e média renda. (WHO, 2017) O tratamento da epilepsia e de seus sintomas resulta em custos econômicos significativos, não apenas devido à sua alta incidência e prevalência, mas também por se tratar de uma doença crônica. Nos países em desenvolvimento, 60 a 90% das pessoas com epilepsia não recebem tratamento, devido às deficiências do sistema de saúde e ao próprio estigma social, prejudicando seriamente a qualidade de vida do epilético e suas atividades profissionais. (GILLIAM et al., 2004)

Desta forma, busca-se a descoberta de novas drogas que tenham capacidade de reduzir ou minimizar os sintomas provocados pela epilepsia. Os produtos de origem natural ou sintética vêm cada vez mais sendo alvos de pesquisas das indústrias farmacêuticas, uma vez que apresentam diversas propriedades farmacológicas. Os óleos essenciais extraídos de várias partes das plantas como flores, frutos, raízes, caules estão sendo bastante estudados para avaliar as suas propriedades farmacológicas, sendo extraídos novos compostos químicos, e desta forma, a produção de novos produtos sintéticos.

Muitos estudos têm mostrado que os produtos naturais como os óleos essenciais, e seus constituintes, apresentam várias atividades farmacológicas, como: atividade antibacteriana, fungicida, antitumoral, cardiovascular, antinoceptiva, antioxidante, dentre outras. As ações desses óleos essenciais na atividade anticonvulsivante também estão sendo estudadas por vários pesquisadores. (DE SOUSA et al., 2006^a, ALMEIDA et al. 2011, JU et al, 2013)

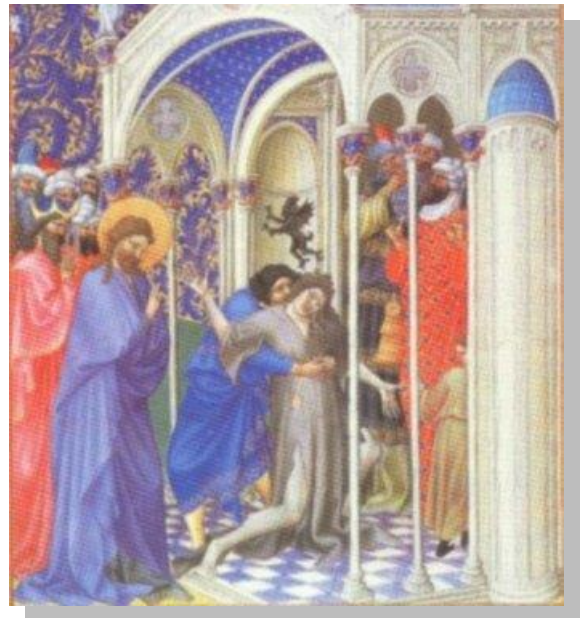
Estes diferentes efeitos são provavelmente devido à elevada diversidade estrutural dos constituintes de óleos essenciais. Os principais constituintes químicos dos óleos essenciais são divididos dentro de duas classes: terpenos e fenilpropanoides. Muitos óleos voláteis consistem basicamente de monoterpenos, formado por duas unidades de isopreno. (CRAVEIRO et al. 1981) Desta forma, é importante o estudo de cada componente químico individualmente dos óleos essenciais, para a compreensão do seu mecanismo de ação, incluindo efeitos clínicos potencialmente benéficos e/ou maléficos para a saúde humana.

Verbenona é um composto orgânico natural, classificado como um terpeno, encontrado em várias espécies de plantas. Tem sido observado como um componente do óleo essencial de espécies de alecrim tais como *Rosmarinus officinalis* L., *Verbena triphylla* e *Eucalyptus globulus* que é usada para chá de ervas, perfumaria, aromaterapia, entre outras, devido ao seu aroma agradável. (ATTI-SANTOS et al., 2005; MIYAZAWA et al., 2003) Verbenona, presente no óleo essencial de *Piper aleyreanum*, tem demonstrado atividades farmacológicas tais como antinoceptiva, anti-inflamatória e também inibindo a formação de úlcera. (LIMA et al, 2012)

O (1S)-(-)-verbenona (VRB) é uma cetona monoterpênica bicíclica ocorrendo naturalmente como feromonas de insetos e em óleos essenciais de algumas plantas. Alguns estudos tem associado o uso de (1S)-(-)-verbenona como estratégias no combate a insetos (Coleoptera), sendo estes o principal vetor de doenças causadas por fungos em espécies de pinheiro como *Pinus radiata*, doença esta conhecida por “cancro do campo”. (LOPEZ et al, 2013)

Óleos essenciais que contém (1S)-(-)-verbenona têm apresentado atividades antibacteriana, acaricida, anti-inflamatória e anti-isquêmica. (JU et al, 2013) No entanto, nenhuma atividade anticonvulsivante de (1S)-(-)-verbenona foi elucidada. Considerando que a estrutura de VRB assemelha-se a da carvona, um monortepeno

monocíclico que mostrou atividade anticonvulsivante em estudos prévios (ALMEIDA et al, 2008), e da necessidade de descoberta de novos fármacos anti-epilépticos, o presente estudo investigou a atividade anticonvulsivante de VRB utilizando metodologias específicas comportamentais.



Fundamentação teórica

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 EPILEPSIA

Caracteriza-se por convulsões recorrentes através de sinais transitórios, bem como sintomas de atividade neuronal anormal, excessiva ou sincrônica cerebral. Esta condição clínica diversificada apresenta mais de 15 tipos de crises, mais de 30 síndromes epiléticas. No desenvolvimento de alguns tipos de crises, vê-se o evento conhecido como convulsão, que consiste em uma alteração do comportamento resultante da atividade hipersincrônica, excessiva e repetitiva de neurônios do córtex cerebral. A natureza da crise pode ser apontada de acordo com a duração do evento e localização cerebral do mesmo. (RAO; LOWENSTEIN, 2015)

Relatos de epilepsia datam de 2000 a.C. em textos de origem babilônica. No entanto, o termo “epilepsia” foi referido pela primeira vez na Grécia antiga, com o significado de “ser tomado, atacado, possuído”, provavelmente fazendo acepção ao que ocorre durante uma crise epilética. A epilepsia era tida por estes povos antigos como sinônimo de possessão por entidades espirituais, ficando este estigma perdurado por muito tempo. Os primeiros a relatarem que a epilepsia seria decorrente a alterações cerebrais foram Hipócrates (400 a.C.) e Galeno (175 d.C.), no entanto, suas explicações não foram capazes de alterar o pensamento popular daquela época. (MOREIRA 2004) A santa inquisição, durante a idade média, perseguiu e condenou à morte muitos epiléticos considerados loucos e hereges. (LONGRIGG, 2000)

A partir do século XIX, os conhecimentos da neurofisiologia foram importantes para a mudança deste paradigma. Epilepsia passou então a ser encarada pela comunidade científica como uma doença relacionada a um distúrbio neuronal. A partir do século XX, os avanços neurofisiológicos tornaram cada vez mais claros aos cientistas que a epilepsia tinha origem cerebral, devendo ser tratada como uma doença. Nos séculos XVIII e XIX, com a descoberta do neurônio e dos mecanismos de transmissão neuronal, foi fundamental para que a epilepsia pudesse ser compreendida. (MOREIRA, 2004)

Avanços tecnológicos contribuíram para o crescente conhecimento sobre os mecanismos envolvidos com a geração de crises. Hoje, sabe-se que a epilepsia é uma doença heterogênea, englobando alterações cognitivas, emocionais e

comportamentais. Já foram descritos genes relacionados à epilepsia e os mecanismos celulares e moleculares da sua gênese. (JACOBS et al., 2009)

Em 1981 uma Comissão da ILAE (Liga Internacional Contra a Epilepsia), avaliou centenas de registros de vídeo-eletroencefalograma para desenvolver recomendações que dividiram as crises epiléticas entre as de início parcial e generalizado, crises parciais simples e complexas e vários tipos específicos de crises generalizadas. Essa classificação ainda é amplamente utilizada nos dias de hoje, com revisões na terminologia e classificação das crises e epilepsia pela ILAE e com sugestões, modificações e críticas (quadro 1). (DREIFUSS et al. 1981)

Quadro 1 - Classificação internacional das crises epiléticas conforme a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) de 1981.

(continua)

I. CRISES PARCIAIS
Crises parciais simples (CPS)
• com sintomas motores • com sintomas somatosensoriais ou sensoriais especiais • com sintomas autonômicos • com sinais psíquicos • com ilusões • com alucinações estruturadas
Crises parciais complexas (CPC)
• início de CPS com progressão ao embotamento da consciência • com alteração do estado de consciência desde o início
Crises parciais secundariamente generalizadas
• CPS evoluindo para crise tônico-clônica generalizada • CPC evoluindo para crise tônico-clônica generalizada • CPS evoluindo para CPC que evolui para a crise tônico-clônica generalizada
II. CRISES GENERALIZADAS
A. crises de ausência típicas e atípicas

Quadro 1 - Classificação internacional das crises epiléticas conforme a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) de 1981.

(conclusão)

B. crises mioclônicas

C. crises clônicas

D. crises tônicas

E. crisesônico-clônicas

F. crises atônicas

III. CRISES EPILEPTICAS NÃO CLASSIFICÁVEIS

Fone: (Dreifuss et al. 1981)

Recentemente a ILAE desenvolveu uma nova classificação baseada não apenas nas observações do comportamento, mas uma que refletisse a prática clínica (quadro 2). Algumas considerações motivaram a uma revisão da classificação da epilepsia (FISHER et al., 2017):

- Alguns tipos de crises, por exemplo, crises tônicas ou espasmos epiléticos, podem ter início focal ou generalizado.
- Falta de conhecimento sobre o início torna a crise inclassificável e difícil de classificar no sistema de 1981.
- Descrições retrospectivas de crises frequentemente não especificam o nível de consciência e alteração da consciência, o qual, embora central em muitas crises, é um conceito confuso.
- Alguns termos em uso não têm altos níveis de aceitação pela comunidade ou compreensão pública, como “psíquica”, “parcial”, “parcial simples”, “parcial complexa” e “discognitiva”.
- Alguns tipos importantes de crises não estão incluídos.

Quadro 2 – Nova Classificação internacional das crises epiléticas conforme a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) de 2017.

(continua)

I.INÍCIO FOCAL
Perceptiva/Disperceptica
Início Motor
• Automatismos
• Atônicas
• clônicas
• espasmos epiléticos
• hipercinéticas
• mioclônicas
• tônicas
Início não motor
• autonômicas
• parada comportamental
• cognitivas
• emocionais
• sensoriais
Focal evoluindo para tônico-clônico bilateral
II.INÍCIO GENERALIZADO
Motoras
• tônico-clônicas
• clônicas
• tônicas
• mioclônicas
• mioclono-tônico-clônicas
• mioclono-atônicas
• atônicas

Quadro 2 – Nova Classificação internacional das crises epiléticas conforme a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE) de 2017.

(conclusão)

- espasmos epiléticos

Não motoras (Ausência)

- típicas

- atípicas

- mioclônicas

- mioclonias palpebrais

III. INÍCIO DESCONHECIDO

Motoras

- tônico-clônicas

- espasmos epiléticos

Não Motoras

- parada comportamental

IV. NÃO CLASSIFICADAS

Fonte: ILAE 2017.

Mudanças na Classificação dos Tipos de Crises Epiléticas de 1981 para a de 2017 podem ser resumidas em sete tópicos (ILAE, 2017):

1. Mudança de “parciais” para “focais”;
2. Alguns tipos de crises podem ser de início focal, generalizado ou desconhecido;
3. Crises de início desconhecido podem ter características que ainda podem ser classificadas;
4. Percepção é utilizada como classificador em crises focais;
5. Os termos discognitivo, parcial simples, parcial complexa, psíquica, secundariamente generalizada foram eliminados;
6. Novos tipos de crises focais incluem automatismos, autonômicas, parada comportamental, cognitivas, emocionais, hipercinéticas, sensoriais e focais

evoluindo para crises tônico-clônicas bilaterais. Crises atônicas, clônicas, espasmos epilépticos, mioclônicas e tônicas podem ter início focal ou generalizado;

7. Novos tipos de crises generalizadas são: ausências com mioclonias palpebrais, ausências mioclônicas, mioclono-atônicas, mioclono-tônicoclônicas, espasmos epilépticos.

Estima-se que mais de 50 milhões de pessoas em todo mundo sofre de epilepsia com crises ativas necessitando de tratamentos e que mais de 85% destes casos ocorrem em países de baixa e média renda. (ZHU et al, 2014) No Brasil, a cada 100 mil habitantes, 228,05 casos são relatados apresentando epilepsia. Em João Pessoa, Paraíba no ano de 2013 foram registrados 160,12 casos a cada 100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017)

Epilepsia tem alta prevalência no mundo em pessoas de todas as idades e pode, por vezes, resultar em incapacidade significativa do indivíduo, exclusão social e estigmatização. Pessoas com epilepsia comumente encontram problemas nas seguintes áreas: educação; emprego; condução; desenvolvimento pessoal; aspectos psiquiátricos, psicológicos e sociais. O tratamento da epilepsia e de seus sintomas resulta em custos econômicos significativos não apenas devido à sua alta incidência e prevalência, mas também por se tratar de uma doença crônica. Esta alteração representa 0,6%, do fardo global, uma medida baseada no tempo que combina anos de vida perdidos devido a mortalidade prematura. Apresenta implicações econômicas significativas em termos de necessidades de cuidados de saúde, morte prematura e perda de produtividade no trabalho. (WHO 2017)

Além dos fatores citados como alta incidência e alto custo para tratamento dos pacientes, fatores sociais e aumento de duas a três vezes no risco de morte em pacientes com epilepsia indicam a urgência de se adotar medidas preventivas contra a doença. Vários estudos apontam as consequências psicossociais da epilepsia como mais desvantajosas para os pacientes do que a frequência e a gravidade das crises epilépticas. (BAKER et al., 1996; SALGADO; SOUZA, 2002)

Para o melhor prognóstico do paciente, as crises devem ser avaliadas juntamente com outros dados do paciente, como idade, análise de imagem, exame físico para definir o diagnóstico sindrômico fundamental para elaboração de uma programação terapêutica. (YACUBIAN, 2002) O diagnóstico da doença é baseado em uma descrição detalhada dos acontecimentos antes, durante e depois da

convulsão. Eletroencefalograma, ressonância magnética e tomografia computadorizada são usadas para diagnosticar indivíduos com suspeita de epilepsia. Por ser uma doença de difícil descoberta, muitos equívocos podem acontecer no diagnóstico da epilepsia. (SMITH et al, 1999)

Nos países de baixa e média renda, cerca de três quartos das pessoas com epilepsia podem não receber o tratamento de que necessitam. Em muitos países de baixa e média renda, há baixa disponibilidade de drogas antiepilépticas (DAEs). Um estudo recente descobriu que a disponibilidade média de medicamentos genéricos antiepilépticos no setor público de países de baixa e média renda é inferior a 50%. Isso pode atuar como uma barreira ao acesso ao tratamento. Outro agravante é que 30% dos pacientes não respondem a esta terapêutica, tornando-se refratários ao tratamento. (WHO, 2017) Para estudos e descobertas de novas drogas alguns modelos experimentais de epilepsia vêm sendo desenvolvidos ao longo de muitos anos.

2.2 PROCESSOS ENVOLVIDOS NA EPILEPTOGÊNESE

Epileptogênese é um processo gradual pelo qual o cérebro normal é convertido para o cérebro epilético. O desequilíbrio entre condutâncias excitatórias e inibitórias leva às convulsões em tecidos cerebrais normais, e esta observação já é estabelecida. Porém, o desafio a essa constatação é compreender o mecanismo da epileptogênese, ou seja, o mecanismo que cria o aumento na probabilidade das crises espontâneas acontecerem. (STALEY, 2015)

Epilepsia apresenta diversas etiologias, incluindo genéticas, estruturais, metabólicas e outras que não são compreendidas. (SCHARFMAN, 2007)

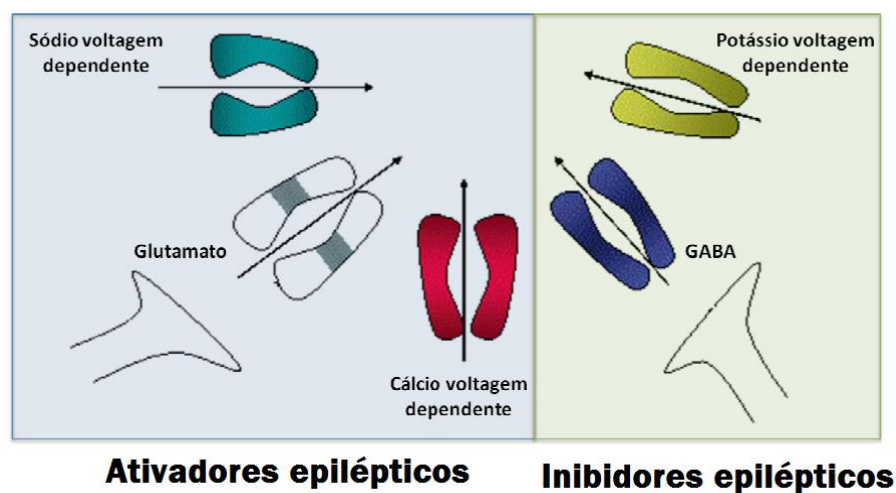
Nesta perspectiva, compreender o mecanismo da epileptogênese é de fundamental importância. Os fármacos mais conhecidos como drogas antiepilépticas atuam com o objetivo de reduzir a frequência das crises ou a sua severidade através da modulação de canais iônicos voltagem-dependentes, reforço dos sistemas de inibição sináptica e controle dos sistemas de excitação sináptica. (SILVA; CABRAL 2008) A figura 3 esquematiza os receptores envolvidos na epilepsia.

A neurotransmissão inibitória é mediada pelo GABA e glicina, enquanto que a neurotransmissão excitatória é mediada principalmente pelo glutamato. A

sinalização GABAérgica, envolvida na via inibitória do sistema nervoso, permite o influxo de íons carregados negativamente, como o cloreto, hiperpolarizando a célula neuronal e inibindo o disparo das crises. (MÉNDEZ; BACCI, 2011) A função inibitória do GABA é exercida por três tipos de receptores: dois ionotrópicos, GABA_A e GABA_C, e um metabotrópico, GABA_B. O receptor GABA_A encontra-se acoplado a canais de íons de cloreto no SNC de vertebrados. (OLSEN; AVOLI, 1997) A ativação de receptores GABA_B ativa indiretamente a canais de K⁺ e Ca⁺⁺, sendo responsável pelo componente tardio do potencial inibitório pós sináptico. (KERR; ONG, 1996; HIGASHIMA et al., 2000) O receptor GABA_C está presente apenas na retina. (BORMANN; FEIGENSPAN, 1995)

Desta forma, a caracterização dos receptores, transportadores e enzimas ligadas à sua síntese e degradação (GABA descarboxilase e GABA transaminase, respectivamente) levou ao desenvolvimento de novos compostos com comprovado potencial farmacológico. (IVERSEN, 2004)

Figura 1 - Canais envolvidos na epilepsia.



Fonte: <http://epilepsiafmdup.webnode.pt/>

O segundo aminoácido inibitório mais abundante no SNC é a glicina. O receptor de glicina (GlyR) é canal iônico pós-sináptico para íons cloreto, onde, uma vez ativado, permitirá o influxo destes íons carregados negativamente, hiperpolarizando a célula e inibindo a ativação neuronal. (CURTIS; HOSLI;

JOHNSTON, 1967) Logo, diminuições nas concentrações extracelulares de glicina favorecem o surgimento de convulsões e comprometem funções cognitivas. (SHEN et al., 2015)

Participando da neurotransmissão excitatória, o glutamato é liberado e liga-se a receptores em outros neurônios promovendo o disparo da crise convulsiva. Atualmente, sabe-se que o aminoácido L-glutamato exerce seu efeito excitatório através da ativação de três tipos de receptores ionotrópicos acoplados a canais de Na^+ e Ca^{++} ; N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionico (AMPA) e ácido caínico, além de oito subtipos de receptores metabotrópicos; m-GluR 1-8. (FONNUM, 1984; WATKINS, 2000)

A excitabilidade do sistema nervoso também é controlada pela abertura ou bloqueio de canais iônicos operados por voltagem, também conhecido por canais do tipo T. Os canais de Na^+ dependentes de voltagem são um dos principais responsáveis pela rápida despolarização da membrana neuronal presente nos processos epiléticos. Além dos canais de sódio, os canais de cálcio dependentes de voltagem tem papel importante nos processos funcionais do sistema nervoso. Sabe-se que o aumento agudo do influxo de Ca^{+2} é importante para manutenção da hiperexcitabilidade reflexa que ocorre em processos convulsivos. (KWAN et al 2001) O bloqueio farmacológico de canais iônicos voltagem-dependentes inibe as descargas epiléticas, a sincronização e a propagação das crises. (SILVA; CABRAL 2008)

As epilepsias sintomáticas são epilepsias geneticamente complexas e geralmente estão associadas a lesões adquiridas ou congênitas. Fatores genéticos estão diretamente relacionados a epilepsia. Aproximadamente 30.000 genes humanos podem estar associados à epilepsia. (OTTMAN, 2005) De um lado estão as alterações que ocorrem na estrutura física dos genes, tais como as mutações ou polimorfismos, por outro podemos observar alterações no controle da expressão gênica que interferem estritamente na atividade dos transcritos e proteínas codificadas.

Os genes alterados nos processos epiléticos estão envolvidos em processos de excitabilidade neuronal, sinaptogênese, morte, proliferação celular, regulação transcricional da expressão gênica, transdução de sinal, dentre outros. Assim, alterações genéticas e epigenéticas na epilepsia são fontes interessantes para a

identificação de novos alvos para supressão de crises e antiepileptogênese. (LOSHER 2015)

Estudos de expressão diferencial de genes envolvidos na neurotransmissão glutamatérgica e GABAérgica, principais mediadores excitatórios e inibitórios do SNC, mostram alterações significativas na expressão gênica hipocampal. Tais genes codificam proteínas que compõem receptores ionotrópicos de glutamato do tipo AMPA (rAMPA), NMDA (rNMDA), cainato (rKA), assim como receptores metabotrópicos de glutamato (rMGlu); receptores de GABA (rGABA A e B) enzimas que participam da síntese de GABA (GAD65 e GAD67); transportadores de glutamato (EAAT1, EAAT2 e EAAT3). (NEDER et al., 2002; AMARA; FONTANA, 2002; CLARK et al., 1994)

Inúmeros trabalhos mostram que a expressão hipocampal de várias neurotrofinas sofre modulação durante o processo epileptogênico. Dentre elas destacam-se a NGF (fator de crescimento neuronal) e BDNF (fator neuronal derivado do cérebro) e seus respectivos receptores TrkA (receptor tropomiosina quinase A) e TrkB (receptor tropomiosina quinase B). (BENGZON et al. 1993; YANG et al., 2016) Estudos genéticos direcionados a genes envolvidos no sistema imune são amplamente observados. Dentre eles podemos destacar a participação das citocinas IL-1 β (interleucina 1 β), TNF- α (fator de necrose tumoral- α) e IL-6 (interleucina 6).

Além dos canais acima supracitados e das alterações genéticas, o processo inflamatório observado na epilepsia tem um papel fundamental na neurobiologia da epilepsia. Modelos de epilepsia em roedores têm fornecido ampla evidência das respostas imunes na iniciação da epilepsia, na modulação da convulsão, na orquestração das crises recorrentes, na regulação da sobrevivência de células cerebrais e no desencadeamento de redes neuronais hiperexcitáveis. (KULKAIR; DHIR, 2009, RIAZI et al., 2010, VEZZANI et al., 2011)

A inflamação cerebral contínua tem o potencial de promover a excitabilidade neuronal através de modificações de canais neuronais, alterações da captação ou liberação de neurotransmissores e a regulação da permeabilidade da barreira hematoencefálica. (FRIEDMAN et al., 2009, VEZZANI et al., 2011) Várias citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF α têm sido relacionadas com quadros epiléticos. Estas alterações podem ser observadas no hipocampo, córtex cerebral, tálamo, hipotálamo entre

outras regiões. (XU et al., 2013) A influência destes mediadores inflamatórios na doença foi constatada através de pacientes resistentes às drogas antiepilépticas convencionais, que tiveram o número de crises reduzido após iniciar o tratamento com anti-inflamatórios. (RIIKONEN, 2004; WIRRELL; FARRELL; WHITING, 2005) Alterações inflamatórias observadas na epilepsia incluem astrogliose, ativação microglial e danos a barreira hematoencefálica, que são acompanhada por um aumento na expressão de citocinas próinflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . (DEVINSKY et al., 2013; SHIMADA et al., 2014)

Além dos processos inflamatórios observados, alterações em outras proteínas atuam como marcadores moleculares na epileptogênese. A neurotrofina BDNF liga-se ao receptor TrkB, um receptor de tirosina kinase (RTKs), desencadeando uma cascata de sinalização que promove crescimento, diferenciação de neurônios durante o desenvolvimento e processos neurológicos, tais como aprendizagem e memória (BARDE et al., 1982) Vários estudos que induzem a convulsão sugerem o efeito protetor de BDNF na epileptogênese. (LARMET et al., 1995 PARADISO et al., 2011; YANG et al., 2016)

O gene c-fos (fos proto-oncogene) é um proto-oncogene que é ativado de forma transiente e rapidamente em resposta a uma ampla variedade de estímulos celulares, tais como dano neuronal. (MATSUOKA et al. 1997) Sua concentração basal é muito baixa nas células neuronais, no entanto, na presença de algum estímulo, como convulsão, sua expressão tende a aumentar (SCHREIBER et al. 1991), sendo considerado como um marcador de atividade neuronal durante a epilepsia.

Outro gene importante na mediação do controle da homeostasia do sistema nervoso é o COX-2 (ciclooxigenase 2). Alguns estudos de lesões cerebrais traumáticas com roedores indicam que a atividade aguda de COX-2 pode ser benéfica. Produção imediata de tromboxano por exemplo, poderia ajudar na hemostasia e reduzir a exposição do cérebro a sangue. (GOPEZ et al., 2005)

Não está claro se a progressão dos danos da epilepsia depende de etiologias subjacentes, convulsões focais prolongadas, frequências de convulsões generalizadas secundárias, durações e frequências de convulsões focais, predisposição genética, outros fatores ambientais (por exemplo, infecções virais, traumatismo craniano) ou uma combinação destes fatores. (LAXER et al., 2014)

Durante o período latente da epilepsia, alterações moleculares e histopatológica, como morte neuronal e reorganização sináptica, que promovem a epileptogênese poderia ser alvo para correção através do desenvolvimento de novos alvos terapêuticos.

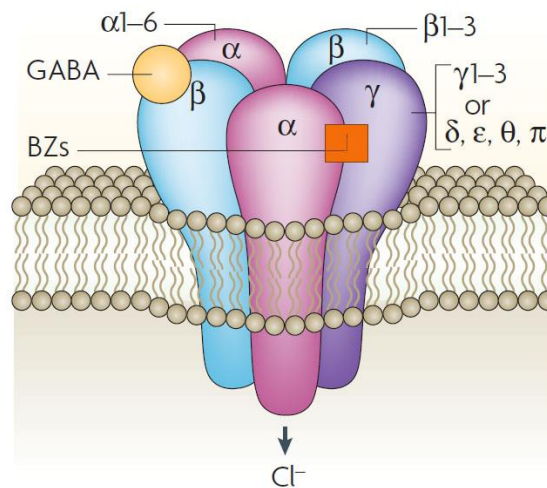
2.3 MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA

Modelo experimental de epilepsia caracteriza-se pela possibilidade de reproduzir, ou modelar, características da epilepsia da qual temos interesse de estudar. São utilizadas várias espécies, desde roedores, insetos, primatas, peixes e outros. No entanto, os mais utilizados são camundongos e ratos pelo baixo custo, ciclo biológico curto, reprodutibilidade, perfil genético próximo, dentre outros aspectos. Os principais modelos induzem uma cascata de eventos moleculares e estruturais que resultam em modificações nas propriedades neuronais intrínsecas, bem como nas redes neuronais, tornando-as epileptogênicas.

Os modelos são baseados em agentes que induzem convulsões através de mecanismos químicos e elétricos. Dentre os principais modelos químicos podemos citar pentilenotetrazol (PTZ), pilocarpina e estricnina. Entre os mecanismos de indução elétrica, existe o eletrochoque auricular máximo (EAM). Ainda podemos citar um modelo de convulsão crônico, também conhecido por modelo de “abrasamento” (kindling). Para que um modelo experimental seja classificado como um modelo de epilepsia, ele deve preencher os seguintes requisitos: demonstrar a presença de atividade epileptiforme nos registros eletroencefalográficos e clinicamente, apresentar uma atividade semelhante àquelas observadas durante uma crise epilética. (MELLO et al., 1986)

Convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) é um dos mecanismos mais estudados na triagem farmacológica de anticonvulsivantes, sendo utilizadas em modelo de crises generalizadas do tipo ausência, mioclônicas ou tônico-clônica. O PTZ atua inibindo canais de cloreto associados a receptores GABA_A, esquematicamente observado na figura 2. (LÖSCHER et al, 1998) Como resultado da administração do PTZ, há uma mioclonia súbita e involuntária (contração da cabeça e músculos faciais) seguida de convulsões tônico-clônicas generalizadas e mantidas. (RHODES; FRYE, 2004)

Figura 2 – Receptor GABA_A.

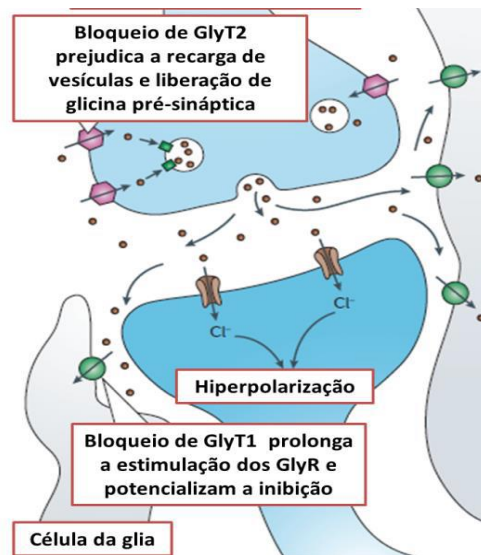


Fonte: Adaptado de Jacob et al., (2008).

O modelo de epilepsia induzido por pilocarpina, um agonista colinérgico muscarínico, induz um quadro de alterações comportamentais com manifestação de crises motoras límbicas, que surgem aos 15-30 minutos após injeção, podendo perdurar por horas, caracterizando o período agudo do modelo. (CAVALHEIRO, 1995) Após a administração, a pilocarpina ativa receptores metabotrópicos muscarínicos do tipo M1, promovendo uma cascata de sinalização intracelular excitatória, com ativação da fosfolipase C β e consequentes lesões cerebrais e mudanças de comportamento. Crises epiléticas de intensidade variável podem ser observadas, caracterizadas por imobilidade, tremor, automatismo bucofaciais, abalos de extremidades, ataxia e crises tônico-clônicas. (TURSKI et al, 1983; MATHERN et al., 1996)

A glicina é um neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central, especialmente a nível da medula espinal, tronco cerebral e retina. Quando receptores de glicina são ativados, o ânion cloreto entra no neurônio através de receptores ionotrópicos, causando um potencial pós-sináptico inibitório (figura 3). A administração de estricnina leva a convulsão por atuar como antagonista seletivo competitivo dos receptores inibitórios de glicina. Nos animais tratados com estricnina, observa-se apenas o desenvolvimento de crises tônicas. (APRISON; LIPPKWITZ; SIMON, 1987; VOGEL, 2008)

Figura 3 - Neurotransmissão glicinérgica.



Fonte: Adaptado de Harvey (2013).

Além dos modelos químicos citados anteriormente, o modelo de convulsão induzido por eletrochoque, também conhecido como eletrochoque auricular máximo (EAM), baseia-se em um modelo elétrico. (PUTNAM; MERRITT 1937) O EAM é um modelo bem estabelecido que mimetiza crises convulsivas generalizadas do tipo tônico-clônica. (LÖSCHER; SCHMIDT, 2006) Essa metodologia tem ampla utilização a drogas que atuam em canais de sódio, como carbamazepina e fenitoina. (MELDRUM, 2002)

Novas metodologias na tentativa de mimetizar convulsões observadas nos seres humanos são desenvolvidas. O modelo de convulsão conhecido como *kindling* (abrasamento) consiste de um modelo de convulsão crônico onde um estímulo elétrico ou químico subconvulsivante é administrado de forma repetitiva. (MCNAMARA, 1984, GODDARD 1969). As substâncias que podem ser utilizadas nesse experimento são antagonistas GABAérgicos, como PTZ, N-metil-D-aspartato e cocaína. O abrasamento através do PTZ é a metodologia mais utilizada entre as existentes. (DHIR, 2012)

Após o modelo de convulsão do tipo *kindling* ter iniciado, ele pode desencadear crises convulsivas espontâneas em dias ou até mesmo meses, desta forma, é um modelo de epilepsia que avalia tanto a epilepsia, quanto a

epileptogênese simulando o que ocorreria nos seres humanos. (MELDRUM; ROGAWSKI, 2007) Desta forma, o mecanismo de ação farmacológico de novas drogas anticonvulsivantes seria melhor compreendido.

2.4 DROGAS ANTIEPILÉPTICAS E PRODUTOS NATURAIS COM ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE

Apesar de muitos estudos fornecerem dados sobre a incidência de epilepsia, poucos trabalhos incluem dados sobre a administração de novas drogas antiepiléticas (DAEs). Muitos dos pacientes com epilepsia são controlados com DAEs, no entanto, cerca de 30 - 40% de todos os pacientes epiléticos apresentam resistência a estes medicamentos. (NGUGI et al, 2010) Esta resistência pode estar associado a grande heterogeneidade clínica, fisiopatológica, a predisposição genética, entre outros fatores, sendo necessário cada vez mais estudos para entender o comportamento e a resposta de pacientes epiléticos frente a novos fármacos.

Embora os mecanismos de ação da maioria das DAE não sejam totalmente elucidados, geralmente envolvem a alteração do equilíbrio entre os mecanismos excitatório e inibitórios neuronais. Três mecanismos básicos, a nível celular, são reconhecidos: modulação dos canais iônicos dependentes de voltagem; aumento da neurotransmissão excitatória, em particular mediada pelo glutamato e aumento da manutenção inibitória mediada pelo GABA. (DECKERS et al, 2003)

Os diversos fármacos benzodiazepínicos comercializados como diazepam, lorezepam, clobazam e clonazepam são exemplos de antiepiléticos específicos de atividade clínica, sendo eficazes no tratamento de crises epiléticas parciais e generalizadas, bem como no tratamento agudo do estado epilético. Esses fármacos ligam-se a um sítio específico do receptor GABA_A, facilitando a ligação do GABA ao seu receptor e consequentemente exacerbando a transmissão inibitória através da abertura de canais de cloreto. (BRODIE et al, 2011)

As DAEs de primeira geração (brometo de potássio, fenitoína, fenobarbital etossuximida) apresentam um número significativo de efeitos adversos tais como sedação, retenção hídrica, hepatotoxicidade, depressão, bradicardia, acidose respiratória, anemia megaloblástica e tolerância, dentre outras. (PEDLEY, 2001;

ALMEIDA, 2006) É verdade que nas duas últimas décadas, com o surgimento das DAEs de segunda geração (diazepam, carbamazepina, valproato, clonazepam) e de terceira geração (topiramato, gabapentina, leviracetam, perampanel), o tratamento da epilepsia tem apresentado muitos avanços e várias outras substâncias têm sido propostas como novos agentes antiepiléticos. O quadro 3 sumariza as principais drogas e seus mecanismos de ação.

Quadro 3 - Características dos DAEs clinicamente aprovadas.

(continua)

DAE	Ano de aprovação	Principais mecanismos de ação presumidos	Indicações aprovadas	Principais limitações
<i>Drogas de primeira geração</i>				
Brometo de potássio	1857	Potenciação do GABA?	Epilepsia tônica clônica generalizada, epilepsia mioclônica	Age como um sedativo
Fenobarbital	1912	Potenciação do GABA	Crises parciais e generalizadas, sedação, ansiedade	Indutor enzimático e Hipersensibilidade cutânea
Fenitoína	1938	Bloqueador do canal de sódio	Crises parciais e generalizadas	Indutor enzimático; Hipersensibilidade cutânea; Farmacocinética não linear; Não é útil para ausência ou convulsões mioclônicas
Trimetadiona	1946	Bloqueio do canal de cálcio tipo T	Crises de ausência	de Teratogênico
Etossuximida	1958	Bloqueio do canal de cálcio tipo T	Crises de ausência	de Sonolência, perda de apetite, náuseas, vômitos, depressão, episódios psicóticos, insônia

Quadro 3 - Características dos DAEs clinicamente aprovadas.

(continuando)

<i>Drogas de segunda geração</i>				
Diazepam	1963	Potenciação de GABA	Distúrbios convulsivos, estado epilético, ansiedade, abstinência alcoólica	Age como um sedativo; leva a Tolerância.
Carbamazepina	1964	Bloqueador do canal de sódio	Crises parciais e generalizadas; Dor trigêmeo, transtorno bipolar	Indutor enzimático; Hipersensibilidade cutânea; Não utilizado para ausência e convulsões mioclônicas
Valproato	1967	Múltiplos (por exemplo, potenciação de GABA, inibição de glutamato (NMDA), Canal de sódio e bloqueio do canal de cálcio do tipo T)	Crises parciais e generalizadas; crises de ausência; profilaxia da enxaqueca, transtorno bipolar	Inibidor enzimático; Teratogenicidade; ganho de peso
Clonazepam	1968	Potenciação de GABA	Síndrome de Lennox-Gastaut, convulsões mioclônicas, transtornos de pânico	Age como um sedativo; Leva à tolerância (perda de eficácia)
<i>Drogas de terceira geração</i>				
Progabide	1985	Potenciação de GABA	Crises parciais e generalizadas, Síndrome de Lennox-Gastaut, convulsões mioclônica,	Hepatotoxicidade clínica
Vigabatrim	1989	Potenciação de GABA	Espasmos infantis, convulsões parciais complexas	Não é útil para ausência ou convulsões mioclônicas; Perda de visão; ganho de peso

Quadro 3 - Características dos DAEs clinicamente aprovadas.

(conclusão)

Lamotrigina	1990	Bloqueio do canal de sódio	Crises parciais e generalizadas, Síndrome de Lennox-Gastaut, transtorno bipolar	Indutor enzimático; Hipersensibilidade cutânea
Oxacarbamazepina	1990	Bloqueio do canal de sódio	Crises parciais	Indutor enzimático; Hipersensibilidade cutânea
Topiramato	1995	Múltiplos (por exemplo, potenciação de GABA, inibição de glutamato (NMDA), bloqueador dos canais de sódio e cálcio	Crises parciais e generalizadas, Síndrome de Lennox-Gastaut, Profilaxia da enxaqueca	Somnolência, tonturas, comprometimento cognitivo, problemas de fala, cálculos renais, perda de peso
Cabapentina	1993	Bloqueio dos canais de cálcio	Crises parciais e generalizadas, neuralgia diabética e pós-herpética	Atualmente, utilizado apenas como adjuvante; ganho de peso; não utilizada para crises de ausência e mioclônicas
Levetiracetam	2000	Modulação da glicoproteína de vesícula sináptica 2ª	Crises parciais e generalizadas, dor trigeminal e doença bipolar	Não utilizado para crises mioclônicas ou de ausência
Perampanel	2012	Antagonista dos receptores AMPA (glutamato)	Convulsões parciais	Atualmente, utilizado apenas como adjuvante; não utilizado para crises mioclônicas ou de ausência

Fonte: Adaptado de Löscher et al., (2013).

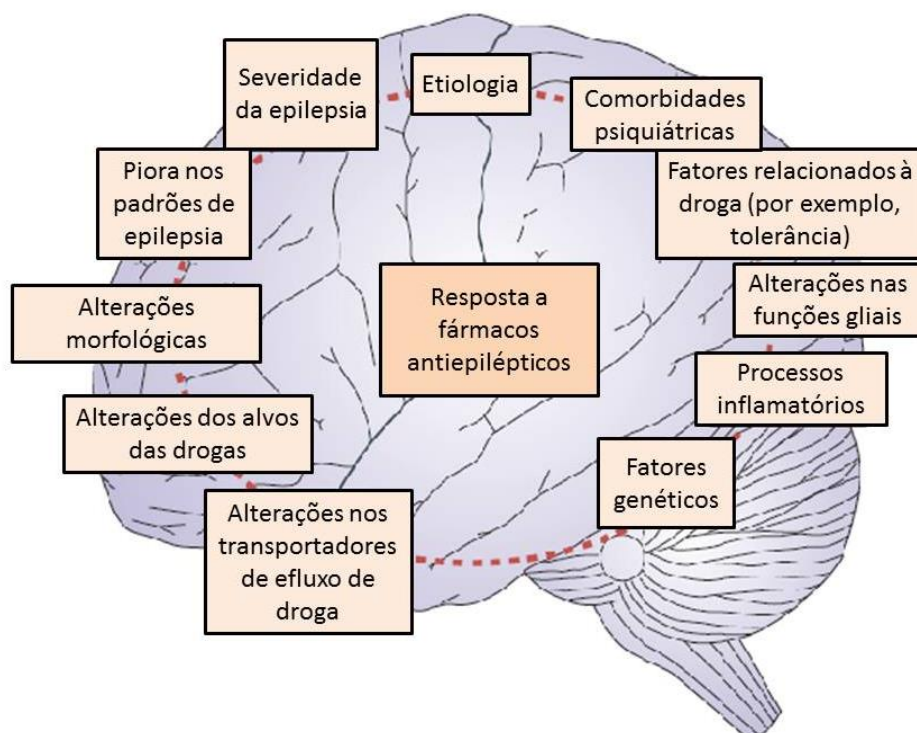
As atuais drogas antiepilépticas não são capazes de reverter a epilepsia resistente a medicamentos, além do alarmante fato de que, cientificamente, não foram feitos grandes avanços no controle das convulsões desde a introdução de fármacos como valproato e carbamazepina no mercado, ao longo dos últimos 50 anos. (LÖSCHER; SCHMIDT, 2011). O percentual de pacientes que não tem um

controle apropriado continua sem modificações significativas. (LÖSCHER; SCHMIDT, 2002; ALMEIDA, 2006).

Nos últimos anos, vários mecanismos potenciais de resistência a fármacos antiepilépticos ou fatores de fracos resultados têm sido implicados em doentes com epilepsia e em modelos animais de convulsões resistentes a fármacos, o que indica que a resistência intrínseca ou adquirida as DAEs é um fenômeno multifatorial. Com base nesses achados, várias hipóteses foram propostas para explicar a resistência as DAEs. Estas hipóteses não são mutuamente exclusivas, mas podem ser relevantes para o mesmo paciente, complicando assim qualquer estratégia para neutralizar ou reverter a farmacoresistência. (LÖSCHER et al., 2013). A figura 4 esquematiza possíveis determinantes da resistência as DAEs em humanos e pesquisas experimentais.

Desta forma surge a preocupação da comunidade acadêmica, bem como de todos os setores responsáveis na área de saúde em buscar novas formas terapêuticas mais eficazes no combate a esta síndrome.

Figura 4 – Esquema dos possíveis determinantes da resistência as DAEs em humanos e pesquisas experimentais.



Fonte: Adaptado de Löscher et al., (2013).

Na tentativa de atingir o êxito farmacoterapêutico, novas drogas estão em fase de desenvolvimento, com pesquisas direcionadas para conhecer a sua ação farmacológica e eventuais mecanismos neurais envolvidos. Dessa forma, a busca e descoberta de novos compostos que apresentam atividades anticonvulsivantes tem sido alvo de estudo de muitos pesquisadores e principalmente da indústria farmacêutica.

Os produtos naturais obtidos dos vegetais representam excelentes fontes para obtenção de compostos, tendo em vista seu amplo poder de síntese e diversidade molecular. Estudos têm mostrado a utilização de produtos naturais no combate a doenças tais como câncer, doenças cardiovasculares, doenças gástrica, no combate a infecções bacteriana, fúngicas, doenças neurológicas, dentre outras. (NSOUR et al, 2000; PRASAD et al., 2004; ALMEIDA et al, 2011; JOBIM et al., 2013).

Convém salientar que plantas indicadas para o tratamento de doenças com manifestações neurológicas e distúrbios psiquiátricos têm apresentado uma grande procura, porém, muitas não apresentam nenhum respaldo científico e às vezes nem sequer têm ação no SNC. As maiores das plantas com ação no SNC estão inseridas na categoria de drogas depressoras com amplo emprego terapêutico, pois de modo geral, atuam por mecanismos que resultam na diminuição da ativação cerebral. (ALMEIDA, 2003).

Vários relatos tem demonstrado a ação de diferentes ervas no combate a doenças neuronais. Dentre os compostos com atividade anticonvulsivante e ou antiepiléptica destacam-se os alcaloides, flavonoides, terpenoides, saponinas e cumarinas. (ZHU et al, 2014). Como exemplo da atividade dos alcaloides, *Aconitum* uma série de diterpeno, que interagem com o canal de Na^+ dependente de voltagem, tem demonstrado ação anticonvulsivante. Os alcaloides berberina e montantina, por exemplo, apresentaram diferentes mecanismos de ação. Embora ambos, montantina e berberina, apresentaram atividade anticonvulsivante modulando sistemas de neurotransmissores, montantina protegeu a convulsão provocada pelo PTZ, enquanto berberina não mostrou atividade no teste PTZ. (SILVA et al, 2006; BHUTADA et al. 2010), mostrando assim a importância de estudar de forma isolada os compostos extraídos de plantas medicinais.

Dentre os produtos naturais, os constituintes dos óleos essenciais presentes em plantas aromáticas, destacam-se devido a sua vasta ação terapêutica, tendo mostrado bons resultados no tratamento de distúrbios neurológicos. No geral, os óleos essenciais são constituídos por misturas químicas envolvendo várias dezenas a centenas de diferentes tipos de moléculas. Estes produtos químicos são divididos em duas grandes classes: terpenos e fenilpropanoídicos. No entanto, muitos óleos voláteis, em grande parte, são compostos de monoterpenos, um grupo de terpenos, com dez átomos de carbono. (ALMEIDA et al, 2003; ALMEIDA et al, 2011).

Recente levantamento feito por Almeida e colaboradores (2011) (quadro 4), enumera cerca de trinta espécies de plantas cujos óleos essenciais apresentam atividade anticonvulsivante em modelos de animais clássicos. Nesta revisão, percebe-se uma predominância de espécies pertencentes a algumas famílias, como Myrtaceae e Lamiaceae.

Quadro 4 - Espécies e respectivos óleos essenciais que apresentaram atividade anticonvulsivante.

Família (Espécie)		Parte da planta utilizada	Atividade do óleo essencial/ principal componente
Apiácea	(<i>Cuminum cyminum</i>)	Fruto	O óleo mostrou proteção contra a atividade epilética induzida por pentilenotetrazol.
Apiácea	(<i>Ferula gumosa</i>)	Fruto	Proteção contra convulsões induzidas por pentilenotetrazol. Redução contra neurotoxicidade / Pinene e α -thujene
Araceae	(<i>Acorus gramineus</i>)	Rizomas	Aumentou o limiar convulsivo de ratos à estimulação elétrica / α -asarone
Asteraceae	(<i>Artemisia dracunculus</i>)	Parte aérea	A dose exercida pelo óleo e a atividade anti-sedativa dependente do tempo relatada nos modelos de eletrochoque máximo e pentilenotetrazol / trans-Anethole, α -trans-ocimene, limonene, α -pinene, cymene, eugenol, β -pinene, α -terpinolene, bornyl acetate, and bicyclogermacrene.

Lamiaceae (<i>Aeollanthus suaveolens</i>)	Não revelada	Inibiu o efeito convulsivante de pentilenotetrazol e eletrochoque auricular / linalol
Lamiaceae (<i>Ocimum gratissimum</i>)	Não revelada	Foi capaz de proteger os animais contra convulsões tônicas induzidas por eletrochoque (MES, 50 mA, 0,11 s) / eugenol.
Lauraceae (<i>Laurus nobilis</i>)	Folhas	A atividade anticonvulsivante foi observada contra ataques induzidos por pentilenotetrazol e por electrochoque máximo / Methyleugenol, eugenol e pinene.
Ranunculaceae (<i>Nigella sativa</i>)	Não revelada	O óleo foi o mais eficaz na prevenção de convulsões induzidas por pentilenotetrazol em relação ao valproato; Também mostraram diminuição significativa da lesão oxidativa no tecido cerebral do rato em comparação com o grupo de kindling / Timoquinone.

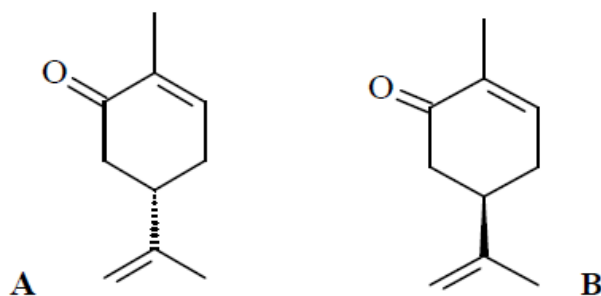
Fonte: Adaptado de Almeida et al., (2011).

2.5 MONOTERPENO (1S)-(-)-VERBENONA

Os compostos terpenóides são compostos de baixo peso molecular, sendo um dos principais componentes químicos de óleos essenciais. Estruturalmente, os terpenos são formados por unidades ramificadas repetidas de cinco carbonos, semelhantes às unidades do isopreno, sendo por este motivo, também denominados como isoprenóides. (BAKKLLI et al, 2008). Dependendo do número de estruturas isoprênicas, os terpenóides podem ser classificados como monoterpenos, sesquiterpeno, diterpenos, titerpenos, tetraterpeno e politerpeno. (CHAPPEL, 1995).

Trabalhos têm relatado atividade anticonvulsivante de monoterpenos, tal como o limoneno (VIANA et al., 2000), o citrônolol (DE SOUSA et al., 2006a) e S-(+)-carvona (figura 5). (DE SOUSA; NOBREGA; ALMEIDA, 2007). Compostos derivados de monoterpenos também apresentam várias propriedades farmacológicas, onde podemos citar algumas delas no SNC tais como antinociceptiva (DE SOUSA et al., 2004), sedativa (DE SOUSA et al., 2006b) e antidepressiva (DE SOUSA et al., 2006c) e anticonvulsivante como a α,β -Epóxi-carvona. (ALMEIDA et al., 2008)

Figura 5 – Estruturas químicas dos monoterpenos (S)-(+)-carvona (A) e (R)-(-)-carvona (B).

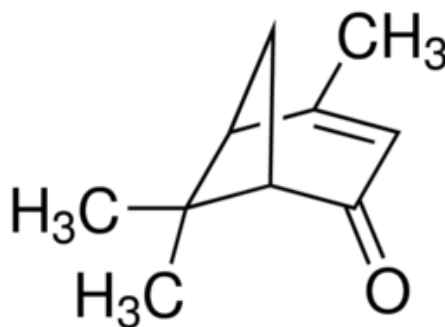


Fonte: NÓBREGA, 2012.

A Verbenona é um composto orgânico natural, classificado como um terpeno que é naturalmente encontrada numa variedade de plantas. (+)-verbenona é um material particularmente atrativo utilizado em síntese do diterpeno taxol, um antitumoral. (LAJUNEN et al, 2000). (-)-verbenona é um dos principais constituintes do aroma de morango, framboesa, alecrim e sabor de hortelã, sendo procurado na indústria de alimentos (RAVID et al, 1997) e, mais recentemente, tem sido usado como substrato para preparar ciclobutilo análogos do aminoácido GABA. (MOGLIONI et al. 2002)

A (1S)-(-)-verbenona, também conhecido por (1S,5S)-2-Pinen-4-one (figura 6), é um ferormônio anti-agregação de ocorrência natural gerada por besouros a partir de um precursor de resina de árvore hospedeira, o α -pineno. Óleos essenciais contendo (1S)-(-)-verbenona têm sido relatados por apresentarem atividade antibacteriana, acaricida e anti-inflamatória. (BERNARDES et al, 2010; MARTINEZ-VELAZQUEZ et al, 2011)

Figura 6 - Estrutura química do monoterpeno (1S)-(-)-verbenona.

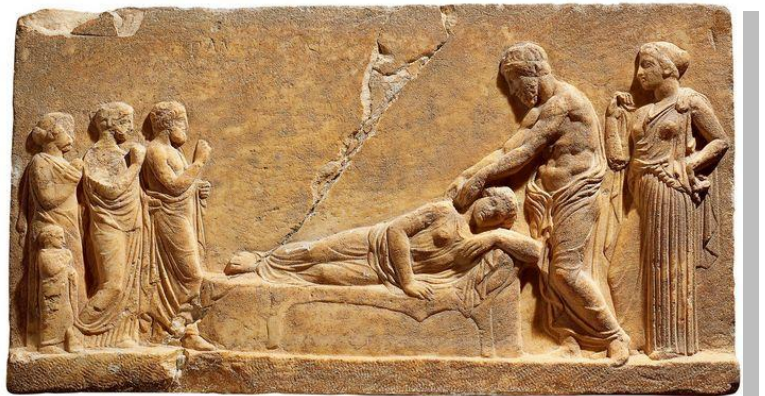


Fonte: www.sigmaaldrich.com.

Recentemente, um trabalho realizado por Ju e colaboradores (2013), demonstrou a importância de substâncias derivadas do monoterpenos (1S)-(-)-verbenona. Foram adicionados compostos que apresentam efeito anti-oxidante e anti-isquêmico neste farmacóforo e identificados moléculas com um potente agente anti-isquêmico num modelo de isquemia in vitro, possivelmente devido à inibição da excitotoxicidade provocadas por receptores NMDA e estresse oxidativo. (JU et al, 2013a)

Geração excessiva de radicais livres é considerada como um importante fator prejudicial, provocando surtos isquêmicos cerebrais. Neurônios são particularmente vulneráveis ao estresse oxidativo devido à sua limitada capacidade anti-oxidante. Como importante fonte de antioxidantes no cérebro, astroglia estão agora sendo estudadas como alvo atrativo para intervenções farmacológicas, na tentativa de reduzir o estresse oxidativo neuronal no acidente vascular cerebral isquêmico. (JU et al. 2013b).

Em seu estudo Ju et al, (2013b), a partir de (1S)-(-)-verbenona, gerou uma nova substância com efeito antioxidante, o LMT-335, e investigou sua atividade anti-isquêmica em co-culturas de neurônios corticais e gliais de ratos. LMT-335 reduziu significativamente os danos neuronais induzidos pela privação de oxigênio e glicose. LMT-335 também aumentou significativamente a expressão astrogliar do antioxidante heme oxigenase-1. Desta forma, mostra-se pertinente uma avaliação do potencial anticonvulsivante de (1S)-(-)-verbenona para a geração de uma possível droga antiepiléptica.



Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito anticonvulsivante do monoterpeno sintético (1S)-(-)-verbenona em animais de laboratório por metodologias específicas comportamentais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a DL50 de (1S)-(-)-verbenona;
- Avaliar o efeito sobre a coordenação motora dos animais;
- Investigar a atividade anticonvulsivante de (1S)-(-)-verbenona em modelos comportamentais agudos que envolvam estímulo químico e elétrico;
- Avaliar as possíveis vias pelas quais ocorre uma possível atividade anticonvulsivante, utilizando modelos animais que envolvem a participação dos sistemas GABAérgico, muscarínico, glicinérgico e canais iônicos de sódio;
- Quantificar os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF α , presentes no hipocampo de camundongos submetidos ao teste agudo;
- Avaliar a expressão gênica dos marcadores moleculares BDNF, COX-2 e c-fos através de PCR em tempo real;
- Verificar o potencial antiepileptogênico de (1S)-(-)-verbenona através de um modelo crônico (*kindling* ou abrasamento);
- Realizar análise histopatológica do hipocampo de animais tratados com (1S)-(-)-verbenona e submetidos ao modelo do *kindling*.



Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Substâncias

- (1S)-(-)-verbenona (VRB), diazepam, cloridrato de pilocarpina, estricnina, hematoxilina-eosina, pentilenotetrazol, tampão fosfato, etanol e formalina (Sigma – E.U.A);
- Cloreto de sódio (Merck – E. U. A.);
- Kit para dosagem de IL-1 β , IL-6 e TNF- α (eBioscience – E.U.A);
- Tween 80 (Vetec – Brasil)
- Reagentes para PCR real time (Applied Biosystems).

4.1.2 Animais

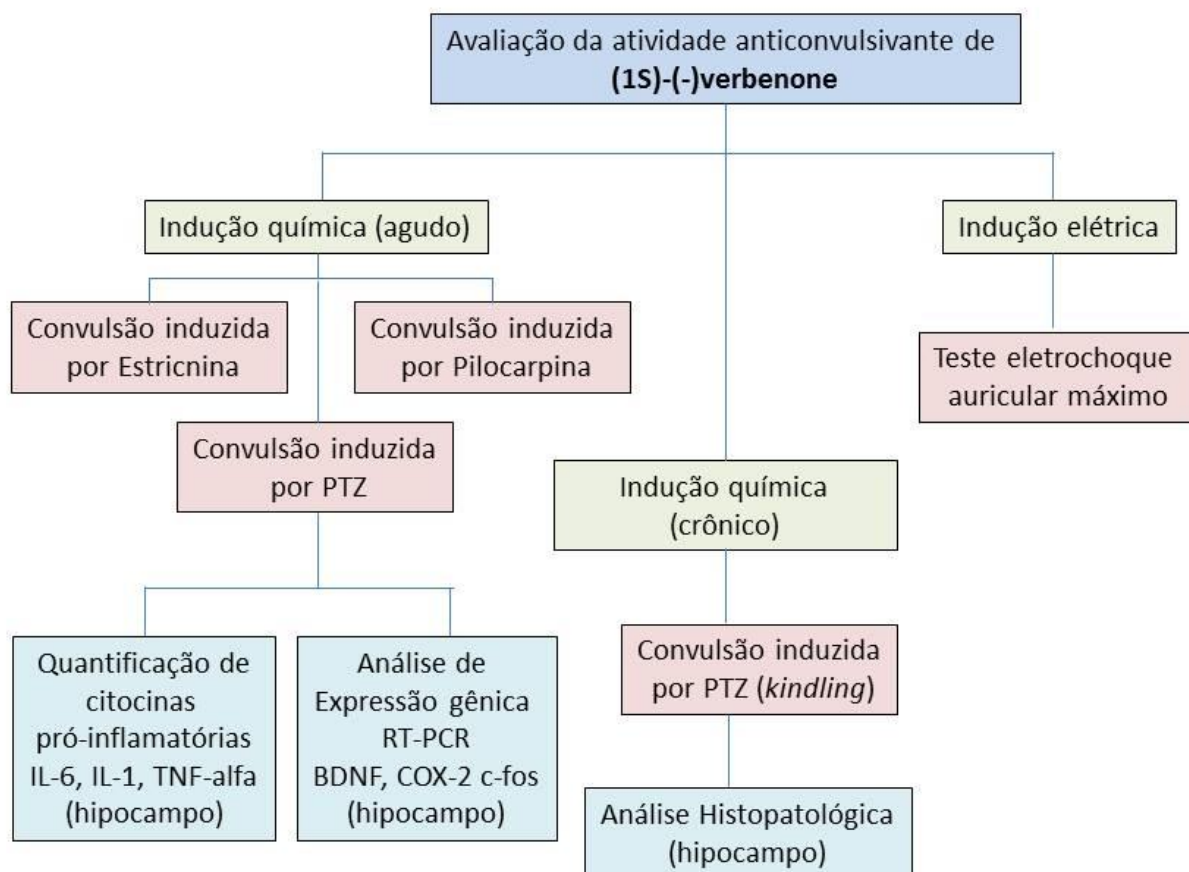
Os animais utilizados para a realização dos testes farmacológicos foram camundongos (*Mus musculus*) suíços, machos, albinos, com 2 - 3 meses de idade, provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba, pesando entre 28 - 35 gramas, mantidos sob condições controladas de temperatura de 21 ± 2 °C e ciclo claro/escuro de 12 horas (fase clara das 06h00 às 18h00 horas e fase escura de 18h00 às 6h00 horas). Esses animais tiveram livre acesso a alimentação (ração tipo pellets) e água. Todos os experimentos foram previamente aprovados pelo CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB, sob a certidão de nº 0208/14 (Anexo 1).

4.2 MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados através da administração via intraperitoneal (i.p.) das substâncias estudadas, com exceção do flumazenil onde a administração foi subcutânea (s.c.). A figura 7 esquematiza todo delineamento

experimental desta pesquisa para avaliar a atividade anticonvulsivante de (1S)-(-)-verbenona.

Figura 7 - Resumo esquemático das metodologias utilizadas para avaliar o potencial anticonvulsivante de (1S)-(-)-verbenona.



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.2.1 Estudo da Toxicidade Aguda (DL50)

É um importante parâmetro na condução, com segurança, dos estudos farmacológicos, pois, a partir da determinação da dose letal 50% (DL50), ou seja, a dose responsável pela morte de 50% dos animais, pode-se determinar doses relativamente seguras para os ensaios farmacológicos. Foi avaliado a toxicidade aguda de VRB via intraperitoneal (i.p.). Cinco grupos de 12 animais (seis machos e seis fêmeas) foram separados e cada grupo recebeu uma respectiva dose, sendo elas 250, 350, 500, 600 e 700 mg/kg. Em um grupo foi administrado uma solução de

tween 80 a 5% (veículo) para servir de parâmetro ao grupo experimental. Os animais sobreviventes após a administração das doses foram observados diariamente durante 14 dias sendo registrado o número de mortes destes animais.

4.2.2 Avaliação da coordenação motora (teste do *Rota rod*)

O efeito sobre a coordenação motora dos animais foi avaliado utilizando o aparelho de *rota rod*, que consiste na análise da coordenação motora dos animais pelo tempo de permanência dos camundongos na barra giratória, (DUNHAM; MIYA et al 1957) Foi realizado uma pré-seleção dos animais, sem administração de substâncias, cujo critério foi a permanência na barra giratória (2,5 cm diâmetro, 7 r.p.m., 25 cm acima do solo) do aparelho de *rota rod* por pelo menos 60 segundos.

Vinte e quatro horas após a pré-seleção, os camundongos foram divididos em grupos de oito animais. O grupo veículo recebeu apenas uma solução tween 80 a 5%; o segundo grupo recebeu diazepam na dose de 1mg/kg e os outros grupos receberam VRB nas doses de 150, 200 ou 250mg/kg. Após 30 minutos os animais foram colocados na barra giratória e avaliado o tempo de permanência total dos mesmos no aparelho, com até três reconduções nos tempos de 30, 60 e 120 minutos. Animais que falharam mais que uma vez em permanecer por três minutos na barra giratória, constituíram um resultado positivo para perda da coordenação motora.

4.2.3 Teste das convulsões induzidas pela pilocarpina

A administração local ou sistêmica de pilocarpina em altas doses gera o chamado *status epilepticus* ou estado de mal epilético (EMP), uma crise duradoura que causa lesão cerebral similar a um quadro epileptogênico em humanos. (TURSKI et al, 1983; MATHERN et al., 1996) Os animais foram então separados em cinco grupos de oito animais, que receberam os seguintes tratamentos: solução veículo a 5% (grupo controle), VRB nas doses 150, 200 e 250 mg/kg e diazepam (DZP) na dose de 4 mg/kg, considerado como droga padrão de ação anticonvulsivante.

Transcorridos 30 minutos dos pré-tratamentos, administrou-se em todos os animais a pilocarpina na dose de 400 mg/kg. Para comparar a severidade das

convulsões entre os grupos, após a administração desse agente químico, procedeu-se à observação dos seguintes parâmetros: surgimento de sinais colinérgicos periféricos (miose, diarreia, micção excessiva), movimentos estereotipados (lamber e cheirar a pata), tremores, convulsões, latência para o aparecimento das convulsões, latência de morte e taxa de mortalidade. Cada animal foi observado durante o período de 1 hora. (ZHOU et al., 2008; SHIN et al., 2011; MORENO et al., 2015; CAVALHEIRO, 1996)

4.2.4 Teste das convulsões induzidas pela estriçnina

A estriçnina provoca o desenvolvimento de crises tônicas, por atuar como antagonista seletivo competitivo dos receptores de glicina pós-sinápticos localizados na medula espinhal, promovendo aumento da excitabilidade neuronal. (APRISON; LIPPKWITZ; SIMON, 1987; VOGEL, 2008) Os animais foram divididos em cinco grupos de oito animais: solução tween 80 a 5% (grupo controle), VRB nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg e DZP na dose de 4 mg/kg, droga padrão de ação anticonvulsivante.

Transcorridos 30 minutos dos pré-tratamentos, administrou-se em todos os animais uma solução de estriçnina na dose de 20 mg/kg. Avaliou-se o perfil anticonvulsivante de VRB nesta metodologia através da observação dos seguintes parâmetros: latência para surgimento da primeira convulsão, latência para morte, porcentagem de animais que exibiram convulsão e porcentagem de mortalidade. (IDRIS; SULE; SALLAU, 2010; WIELAND et al., 1995)

4.2.5 Teste das convulsões induzidas pelo Eletrochoque Auricular Máximo (MES)

Esse protocolo baseia-se no fato que drogas antiepiléticas eficazes no tratamento do “grande mal” epilético, bloqueiam as convulsões tônicas produzidas pelo eletrochoque auricular agudo. Essa metodologia tem ampla utilização a drogas que atuam em canais de sódio, como carbamazepina e fenitoina. (MELDRUM, 1996; 2002) Baseia-se na aplicação de pulsos elétricos repetitivos, o que induz e mimetiza em diferentes estruturais neuronais crises generalizadas do tipo tônico-clônicas. (LÖSCHER; FASSBENDER; NOLTING, 1991; LUSZCZKI et al., 2010)

Foram separados cinco grupos de oito animais. O grupo controle recebeu uma solução tween 80 a 5%, os grupos experimentais foram pré tratados com VRB nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg, nas doses pré-estabelecidas, e um grupo de animais foi tratado com fenitoina na dose 25 mg/kg (droga padrão).

Decorridos 30 minutos das administrações, todos os animais foram submetidos a um choque auricular com corrente nominal de 0,5 mA de intensidade, numa frequência de 15 pulsos/segundo e uma duração de 0,5 segundo. O parâmetro avaliado foi o número de animais que apresentaram convulsões tônicas (extensões completas dos membros posteriores), duração das convulsões e porcentagem de mortalidade (PRAVEEN et al., 2013; TORTORIELLO; ORTEGA, 1993)

4.2.6 Teste das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ)

O mecanismo pelo qual o PTZ atua envolve a inibição de canais iônicos GABA_A para íons cloreto, promovendo um quadro excitatório. Além disso, registros eletrofisiológicos relacionam esta substância com canais iônicos de sódio e cálcio, aumentando as correntes de membrana e consequentemente a excitabilidade neuronal. (LÖSCHER, 1998; FAINGOLD, 1987)

Para determinação de atividade anticonvulsivante, cinco grupos de oito animais foram tratados com solução tween 80 a 5% (grupo controle), VRB nas doses de 150, 200 ou 250mg/kg e um grupo de animais recebeu diazepam (DZP) na dose de 4 mg/kg, respectivamente, considerado como droga padrão de ação anticonvulsivante para este teste.

Transcorridos 30 minutos dos pré-tratamentos, foi administrado em todos os animais PTZ na dose de 75 mg/kg. Imediatamente, após essa administração foram feitas observações dos seguintes parâmetros: latência para o aparecimento da convulsões, tipo de convulsão e o percentual de convulsões. (ALMEIDA, 2006) Os animais foram observados durante um período de 15 minutos.

4.2.7 Avaliação da possível participação do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA_A

Três grupos de oito camundongos foram pré-tratados com flumazenil na dose de 20 mg/kg (s.c.), que é um antagonista seletivo do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA_A, e após 15 minutos foram tratados com solução tween 80 a 5%, diazepam (DZP) na dose de 4 mg/kg e VRB na dose de 200 mg/kg. Como não houve diferença significativa no teste de convulsão induzido por PTZ entre as doses de 200 e 250 mg/kg, preconizou-se a menor dose. Transcorridos 30 minutos dos tratamentos, foi administrado em todos os animais PTZ na dose de 75 mg/kg. Imediatamente, após essa administração foi procedida a observação dos seguintes parâmetros: latência para o aparecimento das convulsões, tipo de convulsão e o percentual de convulsões. Os animais foram observados durante um período de 15 minutos.

4.2.8 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF α) do hipocampo dos camundongos submetidos ao teste de PTZ

Após o experimento realizado no teste das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ) todos os animais, incluindo um grupo sem tratamento com PTZ (veículo), foram eutanasiados utilizando-se uma guilhotina, os encéfalos foram retirados e colocados sobre uma superfície com gelo. Com o auxílio de uma pinça de microdissecação, a camada cortical foi aberta para os lados, expondo a região do hipocampo, que foi retirada. Finalizando-se a etapa de dissecação, o hipocampo retirado foi colocado em papel alumínio devidamente identificado e pesado, sendo imediatamente acondicionado em freezer a -80°C para posterior utilização.

O hipocampo de cada camundongo foi homogeneizado em tampão fosfato de sódio (pH 7,4; 0,05M). Os homogenatos foram centrifugados a 16.000 r.p.m por 30 minutos a 4°C, e, logo em seguida, o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C para posterior análise. Após o descongelamento imediato, os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α foram quantificadas utilizando kit de ELISA de acordo com o protocolo especificado pelo fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA). As placas de ELISA de 96 poços (NUNC-Immuno™) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura, anti-IL-1 β , anti-IL-6 e anti-TNF- α e incubadas durante a noite a 4°C. No dia seguinte, utilizou-se a solução de bloqueio (PBS contendo 10% de SFB) nos sítios inespecíficos por uma hora.

Novamente, as placas foram lavadas em PBST e adicionou-se 50 µL das amostras e diferentes concentrações das citocinas recombinantes. As placas foram novamente incubadas por uma noite a 4°C. Em sequência, os poços foram lavados e uma mistura de anticorpos biotinilados secundários foi adicionada. Após a incubação por 1 hora, estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente, R-ficoeritrina (estreptavidina-RPE), foi adicionada aos poços da placa e então incubada por 30 minutos.

Após a lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, adicionou-se a placa uma solução tampão *sheath fluid* (Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA). Em sequência, realizou-se a leitura em leitor de microplaca (MICROPLATE READER versa Max, tunable, BN 2529 Molecular Devices) a 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão e expressos como quantidade total por mililitro (pg/mL).

4.2.9 Análise da expressão gênica dos genes BDNF, COX-2 e c-fos.

4.2.9a Extração do RNA

A avaliação da expressão gênica foi realizada a partir dos hipocampus extraídos após o ensaio de convulsão induzida por PTZ. Após o experimento, os hipocampus foram retirados e armazenados em RNAlater sendo em seguida estocados em -80°C até extração do RNA. RNA total foi extraído dos tecidos de interesse e criopreservado pelo método de CHOMEZYNSKI & SACCHI (1987), usando o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O processo de extração de RNA consiste em quatro fases:

1) *Fase de separação do RNA*: Aproximadamente 100 mg de tecido congelado foi pulverizado com nitrogênio líquido adicionando Trizol de forma progressiva (até 1 ml) e macerando a amostra até ficar de forma homogênea. As amostras foram incubadas por 10 minutos na temperatura ambiente e adicionou em seguida 0,2 ml de clorofórmio, agitando logo após vigorosamente durante 15 segundos, deixando repousar durante 15 segundos. Centrifugou-se a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C observando a separação de três fases. A fase orgânica que

contêm o DNA, a interfase contendo proteínas e a fase aquosa contendo o RNA. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, evitando-se a interfase.

2) *Fase de precipitação do RNA*: Foi adicionado a fase aquosa retirada do passo anterior 0,5 ml de álcool isopropílico, homogeneizado por inversão e mantido no freezer à -20°C por um período de 12 horas.

3) *Fase de lavagem*: Após esse período, centrifugou-se novamente as amostras (15 minutos/14000rpm/ 4°C), descartando o sobrenadante e preservando o material precipitado, que foi ressuspenso em 1ml de etanol (75%), seguidos de 5 minutos de centrifugação a 12.000 rpm a 4°C .

4) *Dissolução do RNA*: Desprezou-se o sobrenadante, preservando o precipitado (onde está contido o RNA), deixando os tubos abertos e invertidos sobre papel absorvente. Adicionamos 50 μL de H_2O deionizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) (Merck, Alemanha), que constitui um forte inibidor de ribonuclease, sendo essa quantidade suficiente para diluir o pellet de RNA. Dessa solução final, foi retirado 1 μL para leitura em espectrofotômetro e 1 μL para a eletroforese em gel de agarose para avaliar a qualidade de extração.

A avaliação da concentração e o grau de pureza das amostras de RNA por foi realizado a partir de 1 μL em NanoDrop e como referência utilizou-se H_2O DEPEC. A leitura foi determinada através da absorbância, em comprimento de onda de 260nm e 280nm, este aparelho emite ondas de luz que, após atravessarem a solução, ou seja, quanto menos luz for captada pelo foto-detector, maior é a concentração da amostra. A relação entre as leituras obtidas com ondas de 260nm e 280nm (260/280) deve ser entre 1,7 e 2,0; quando obtemos RNA com alto grau de pureza, sendo comprovados em todas nossas amostras que obtiveram leitura entre 1,8 e 2,1.

4.2.9b Tratamento do RNA com DNase

Para a completa eliminação de DNA genômico, as amostras de RNA foram tratadas com desoxiribonuclease I. (Sigma). As amostras foram diluídas e padronizadas para uma concentração de 1 μg em 8 μl adicionando-se DNase I e o tampão (10X Reaction Buffer, 1 ml of 200 mM Tris-HCl, pH 8.3, 20 mM MgCl_2), sendo então mantido a uma temperatura ambiente durante 15 min. Após este

período foi adicionado a solução Stop (50 mM EDTA) e mantido a uma temperatura de 70°C por 10min para inativar a DNase I, colocando imediatamente no gelo após este tempo.

4.2.9c Reação de Transcriptase Reversa (RT) para obtenção de cDNA

Foi retirado 1µL a partir das amostras tratadas com DNase, adicionado os iniciadores oligo-dT16, dNTPs e completado para um volume de 11µL de água estéril tratado com DEPC, sendo aquecido a 65°C por 5min para garantir a desestruturação de estruturas secundárias do RNA. Ao tubo anterior, foi acrescentado 4µL de tampão (5X First-Strand Buffer), 2µL de DTT (0.1 M DTT) e 1µL de RNaseOUT™ (40 units/µL) e foi submetido a uma temperatura de 42°C a 2 minutos. Duzentas unidades da superscript (SuperScript II Reverse Transcriptase; Invitrogen) foram adicionadas e submetidas a uma temperatura de 42°C por 50 minutos para a atividade da enzima e em seguida 70°C por 20 minutos para a inibição da atividade enzimática.

4.2.9d Reação em Cadeia da Polimerização (PCR) em Tempo Real

Esta PCR avalia o acúmulo do produto na fase logarítmica da reação de amplificação, o qual está diretamente relacionado à quantidade de molde existente no início da reação, sendo atualmente considerado um método bastante preciso e reprodutível para a quantificação da expressão gênica.

A reação de RT-PCR em tempo real foi realizada em um termociclador 7500 Fast Real-Time PCR System software version 2.0.4 (Applied Biosystems) a partir da reação com SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystem), cDNA e *primers* previamente selecionados e analisados (tabela 1). As reações foram realizadas nas condições 50°C/2min, 95°C/2min, 40X/95°C/15s, 58°C (BDNF, COX-2 e ACT) ou 56°C (c-fos) 30s, 72°C/1min.

O método comparativo CT ($\Delta\Delta CT$) foi usado para quantificar a expressão dos genes de interesse (BDNF, COX-2 e c-fos) e a expressão relativa foi calculada como $2^{-\Delta\Delta CT}$. A expressão relativa de BDNF, COX-2 e c-fos foi normalizada pelo gene β -actina (ACT), e a expressão gênica de cada amostra foi depois comparada com a

expressão da amostra referência, veículo (animais que receberam apenas a solução de tween 80). (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001)

Tabela 1 – Iniciadores utilizados na amplificação da PCR em tempo real.

Gene	Primer reverse	Primer forward	Tamanho da amplificação
BDNF	5'CATAAGGACGCGGA CTTGTACA3'	5'AGACATGTTTGCGGCA TCCA3'	120 pb
COX-2	5'CAGTCTCTCAATGA GTACCGCA3'	5'GTACAGTTCCATGACA TCGATG3'	120pb
c-fos	5'TGTACTGTAGTCCTT CAGCGTCA3'	5'TGTCAGAACATTCAGA CCACCTC3'	80 pb
β -actina	5'TATTGGCAACGAGC GGTTCC3'	TGGCATAGAGGTCTTTA CGGATGTC3'	140 pb

Para a detecção da amplificação das amostras utilizou-se o sistema de detecção por SYBR Green, que se baseia no uso de uma molécula fluorescente, que se intercalada à dupla fita da DNA. (WALKER, 2002) Neste método de detecção, a confirmação de especificidade da amplificação é realizada por meio da análise da curva de desnaturação ou *melting curve*. Nesta curva, analisa-se a fluorescência das amostras em relação ao aumento contínuo da temperatura, o que possibilita determinar a temperatura de fusão ou *melting temperature* (T_m) de cada fragmento, resultante da reação de amplificação.

Cada fragmento amplificado possui um T_m específico, o que permite a diferenciação entre os produtos resultantes. Durante a reação, a fluorescência aumenta a cada novo ciclo de polimerização e atinge um limiar (threshold), no qual todas as amostras podem ser comparadas. Este limiar corresponde ao momento utilizado para análise da fluorescência. Este ponto foi definido pelo equipamento e obrigatoriamente deve estar na faixa em que a quantidade de fluorescência gerada pela amplificação das amostras torna-se significativamente maior que a fluorescência da base (background). O limiar é definido na fase exponencial da reação de PCR, quando a quantidade de produto formada traduz de forma satisfatória a concentração inicial de fitas molde (cDNA) amplificadas pela reação. O

ciclo exato no qual o limiar de fluorescência é definido denomina-se Ct (threshold cycle). Amostras mais concentradas (com maior número de fitas molde iniciais) atingem o limiar mais precocemente e mostram valores de Ct mais baixos. Quando a eficiência da reação de PCR está próxima de 100%, o número de cópias geradas aumenta de forma exponencial, dobrando a cada ciclo da reação.

A quantificação relativa da expressão gênica é usada para descrever mudanças na expressão de um gene de interesse em um grupo de amostras em relação a um grupo de referência. Este método foi usado nesse estudo para determinar os níveis de expressão relativa de BDNF, COX-2 e c-fos. Para determinar a eficiência de amplificação foi utilizado o programa LinRegPCR obtendo uma eficiência superior a 1,8 de todos os genes.

4.2.10 Modelo crônico de epilepsia: abrasamento ("kindling")

O modelo crônico de epilepsia é observado com a administração de doses subconvulsivantes (20-40 mg/kg; i.p.) intermitentes de PTZ, resultando no desenvolvimento de convulsões generalizadas em roedores. (IZQUIERDO et al., 1975; BECKER et al., 1992) Esses estímulos repetitivos, tanto de origem química quanto elétrica, são chamados de abrasamento, uma vez que através deles, tem-se o desenvolvimento de crises espontâneas que podem ocorrer mesmo após dias ou meses da estimulação inicial. (KARLER et al., 1989)

Para obtenção do kindling, os animais foram divididos em cinco grupos de sete animais e tratados com solução tween 80 a 5%, VRB nas doses de 40, 60 ou 80 mg/kg e DZP na dose de 4 mg/kg, respectivamente. Trinta minutos após os respectivos tratamentos, administrou-se nos animais uma dose subconvulsiva de PTZ (35 mg/kg). Após cada injeção de PTZ, os animais foram observados durante 30 minutos, sendo o comportamento enquadrado de acordo com a escala de Racine:

- Nível 0 (nenhuma resposta);
- Nível 1 (movimento involuntário das orelhas e mandíbulas);
- Nível 2 (1 a 10 espasmos mioclônicos);
- Nível 3 (acima de 10 espasmos mioclônicos);
- Nível 4 (convulsão clônica generalizada);

- Nível 5 (convulsão tônico-clônica generalizada e status epilepticus)
- Nível 6 (convulsão seguida de morte do animal).

Foram feitos sete tratamentos subconvulsivos, em dias alternados, onde a cada tratamento os referidos parâmetros eram registrados. No oitavo tratamento, os animais receberam a maior dose de PTZ (75 mg/kg) e foram avaliados em relação aos mesmos parâmetros citados anteriormente. (DHIR, 2012). A figura 8 esquematiza o cronograma de tratamentos.

Figura 8 – Cronograma de administração do PTZ no teste do “kindling”.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.11 Análise histopatológica do hipocampo a partir do teste do “kindling”

Ao término do teste do “kindling”, hipocampus de 3 animais por grupo retirados e fixados em formalina 10% e estocados para posterior análise histopatológica utilizando o corante hematoxilina-eosina (HE). A descrição das etapas subsequentes correspondente ao preparo do material histológico deu-se da seguinte forma. (ROSS; PAWLINA, 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008):

1.Desidratação: inicialmente, o tecido passou pelo processo de desidratação para evitar a retração do tecido e conseqüentemente lesões estruturais irreversíveis.

Este processo consiste em imergir os cassetes contendo os órgãos em uma concentração crescente de álcool etílico.

2.Diafanização ou clarificação: o material foi então imerso duas vezes no xilol com duração de 1 h cada imersão. O xilol, por suas propriedades químicas lipofílicas, funciona como solvente da parafina e ao mesmo tempo como desalcolizante.

3.Impregnação: o material histológico foi banhado duas vezes em parafina, pré-aquecida no dispensador, cada banho com duração de 1 hora. Devido ao calor, o xilol evapora e os espaços anteriormente ocupados ficam livres.

4.Emblocagem: após a impregnação, o material histológico foi colocado em formas com parafina oriunda do seu dispensador. Após a imersão do material em parafina, cada fôrma foi deixada ao ar livre para solidificação da parafina e a obtenção dos blocos.

5.Microtomia: as amostras nos blocos foram retiradas das formas, e foram realizados os cortes histológicos no micrótomo. Os blocos de parafina contendo as amostras foram seccionados pela navalha do micrótomo em cortes de aproximadamente 5µm de espessura. Os cortes foram levados ao banho maria a uma temperatura em torno de (39 – 40°C).

6.Pescaria: Com auxílio de uma lâmina, foi pescado o corte na fita de parafina no banho-maria. A fim de facilitar a aderência à lâmina, adiciona-se ao banho albumina ou gelatina. Em seguida, as lâminas foram colocadas na estufa (60 °C) por 10 minutos para secagem.

7.Coloração e montagem da lâmina: com os cortes aderidos às lâminas, o processo de coloração foi realizado com o corante hematoxilina-eosina (HE) para análise da estrutura tecidual (presença ou ausência de morte celular) como também os corpúsculos característicos do modelo da doença utilizado. Em seguida, foi realizada a montagem das lâminas com colocação de lamínulas. Como meio de montagem foi utilizado o bálsamo do Canadá.

8.Captura das imagens: As fotografias digitais foram capturadas pela câmera Moticam 5.0 MP acoplada ao microscópio óptico. A análise histológica foi realizada com o software ImageJ (Fiji version 1.46r, de domínio público, o programa de processamento de imagens baseado em Java desenvolvido no Instituto Nacional de Saúde para o Macintosh).

Para quantificação da lesão neuronal vista a partir da análise histopatológica do hipocampo, criou-se um escore, o qual consistiu em pontuações que variaram de 0 a 3 pontos. Os parâmetros avaliados a partir dos quais foram gerados os escores, foram: morte celular, sendo esta por necrose ou apoptose; presença de processo inflamatório, sendo neste quesito avaliado a presença de células inflamatórias e por fim, edema. Quando presente uma dessas características, soma-se 1 ao escore do animal, totalizando 3, caso estejam presentes todas as lesões. (FANG; LEI; 2010).

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram obtidos utilizando o método ANOVA/Kruskal Wallis seguido de Dunn's, para dados não paramétricos. A análise paramétrica dos dados foi realizada utilizando one-way ANOVA/Dunnett's ou one-way ANOVA/Tukey. A incidência (%) de convulsões clônicas ou tônico-clônicas, bem como a mortalidade, foram avaliadas pelo Teste de Fisher. Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.00 (GraphPad Software Incorporated, San Diego, CA, EUA) e os valores obtidos foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.



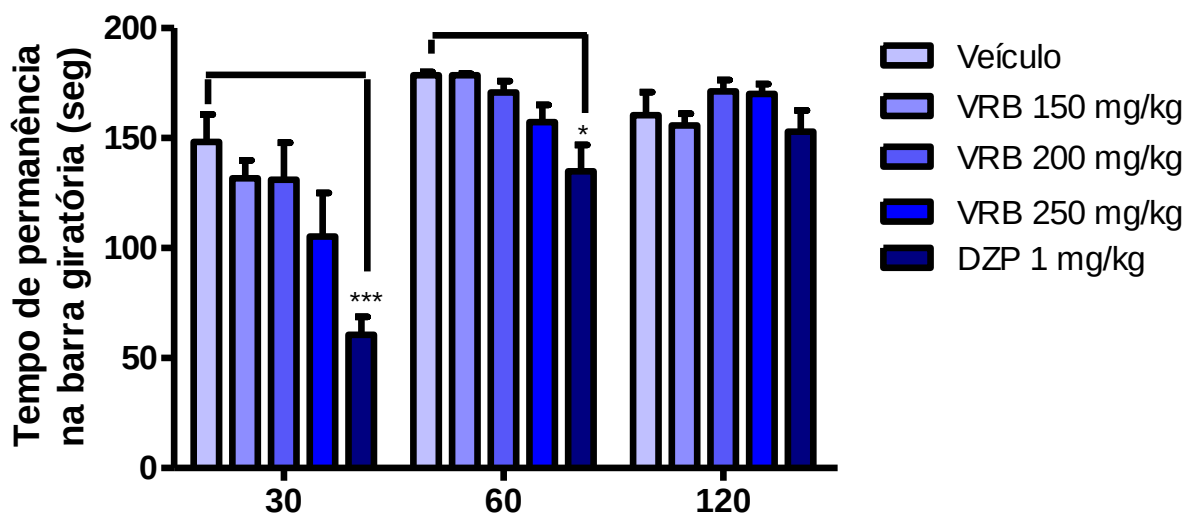
Resultados

5 RESULTADOS

5.1 TOXICIDADE E AVALIAÇÃO DA COORDENAÇÃO MOTORA (TESTE DO ROTAROD) DE (1S)-(-)-VERBENONA

A análise da toxicidade agora revelou que durante os 14 dias de observação não houve morte dos camundongos tratados nas doses de 200 e 250 mg/kg. Doses superiores revelaram um percentual de morte: 350 mg/kg (33,3%), 500 mg/kg (50%), 600 mg/kg (83,3%) e 700 mg/kg (100%). O valor da DL_{50} calculada para VRB foi de 438,9 mg/kg ($371,8 - 518,1 \pm E.P.M.$). Os camundongos pré tratados com VRB nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg não apresentaram alterações na coordenações motoras nos momentos avaliados, 30, 60 e 120 minutos (gráfico 1). No entanto, os animais tratados com diazepam (1mg/kg) apresentaram um desempenho alterado na permanência na barra nos tempos de 30 e 60 minutos quando comparado ao grupo veículo.

Gráfico 1 – Avaliação da atividade locomotora de (1S)-(-)-verbenona no teste da barra giratória.



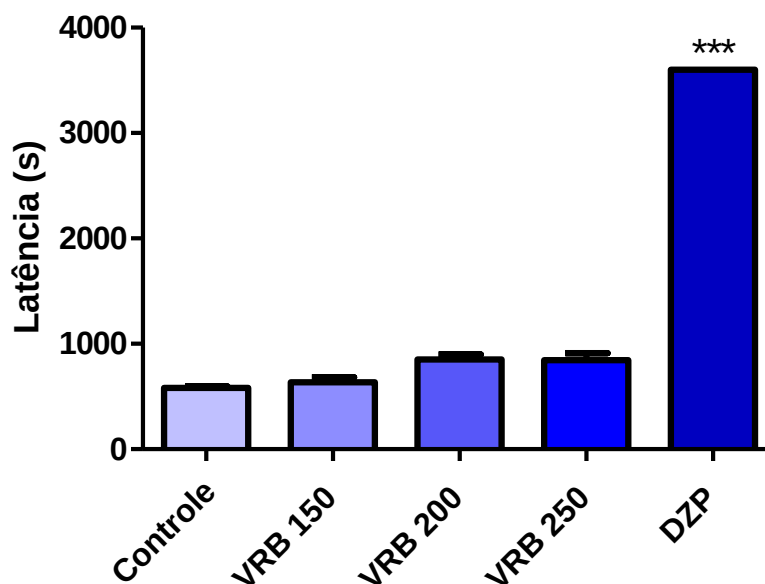
Fonte: Elaborado pelo autor. Valores estão representados como média $\pm$ erro padrão da média $n = 8$ animais por grupo. * $p < 0,05$; *** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo veículo em cada tempo (teste One-way ANOVA seguido de Kruskal-Wallis).

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DE (1S)-(-)-VERBENONA

5.2.1 Teste das convulsões induzidas pela pilocarpina

No teste de convulsões por pilocarpina, não foi observado proteção no desenvolver das convulsões. As doses de VRB não foram capazes de aumentar a latência das convulsões (gráfico 2), reduzir os sinais colinérgicos ou os movimentos esteriotipados (tabela 2) e não reduziram o percentual de morte dos animais (gráfico 3). DZP como esperado, foi capaz de aumentar a latência para o aparecimento das convulsões (3600 ± 0 s) quando comparado ao grupo controle ($652,6 \pm 31,7$ s / $p < 0,0001$). DZP foi capaz de aumentar significativamente a latência da morte (3600 ± 0 s / $p < 0,0001$) quando comparado ao controle ($1314 \pm 229,4$ s / $p < 0,05$).

Gráfico 2 - Efeito de (1S)-(-)-verbenona na latência para início das convulsões induzidas por pilocarpina.



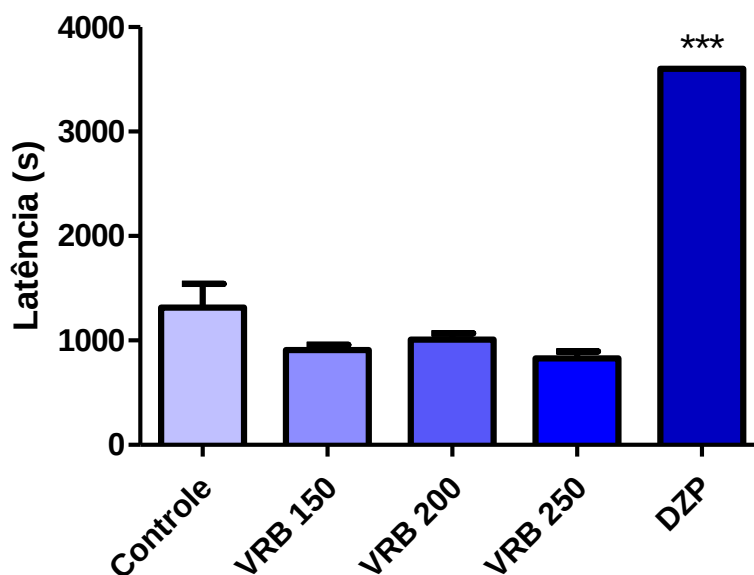
Fonte: Elaborada pelo autor. Valores estão representados como média $\pm$ erro padrão da média. $n = 8$ animais por grupo. Os grupos correspondem a controle, VRB tratado com (1S)-(-)-verbenona nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg e DZP 4 mg/kg. Todos os grupos receberam pilocarpina na dose de 400 mg/kg. *** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle (teste One-way ANOVA seguido de Kruskal-Wallis).

Tabela 2 - Efeito de (1S)-(-)-verbenona no teste das convulsões induzidas por pilocarpina.

Tratamento	Sinais colinérgicos periféricos (%)	Movimentos esteriotipados (%)	% de morte
Controle	100	100	100
VRB 150	100	75	100
VRB 200	100	87,5	100
VRB 250	100	87,5	100
DZP	100	50 ^a	0 ^b

Fonte: Elaborada pelo autor. Os grupos correspondem a controle, VRB tratado com (1S)-(-)-verbenona nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg e DZP 4 mg/kg. Todos os grupos receberam pilocarpina na dose de 400 mg/kg. ^ap<0,05 (teste de Fisher) em relação ao controle. ^bp<0,001 (teste de Fisher) em relação ao controle.

Gráfico 3 - Efeito de (1S)-(-)-verbenona na latência para morte dos animais no teste das convulsões induzidas por pilocarpina.

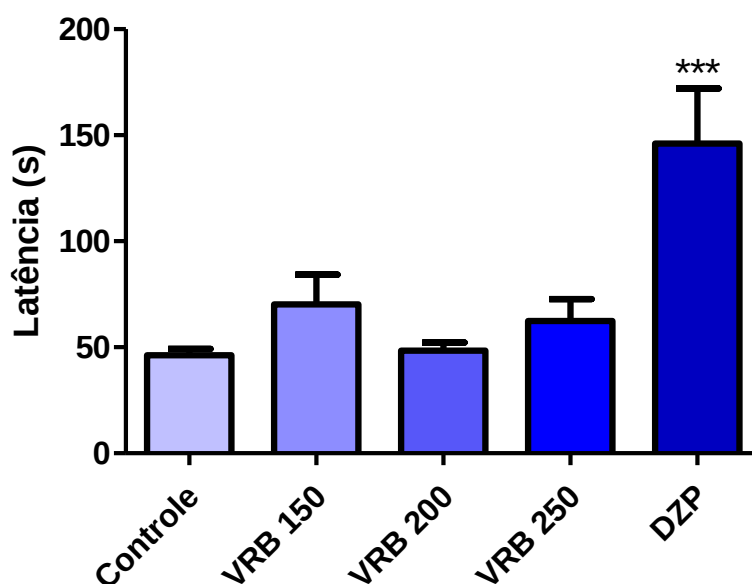


Fonte: Elaborado pelo autor. Valores estão representados como média ± erro padrão da média n = 8 animais por grupo. Os grupos correspondem a controle, VRB tratado com (1S)-(-)-verbenona nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg e DZP 4 mg/kg. Todos os grupos receberam pilocarpina na dose de 400 mg/kg. ***p< 0,0001 quando comparado ao grupo controle (teste ANOVA seguido de Dunnett's).

5.2.2 Teste das convulsões induzidas pela estriknina

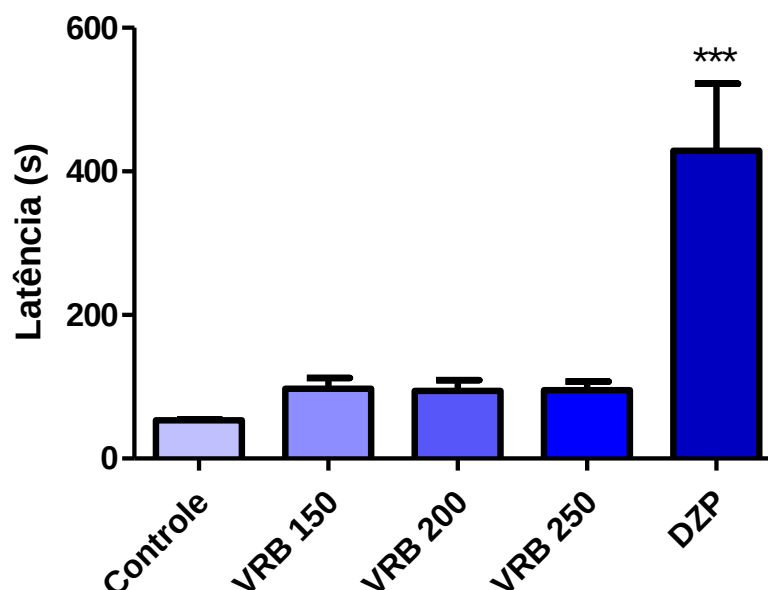
Quando observado o parâmetro latência para o aparecimento da primeira convulsão, não foram observadas diferenças significativas entre os animais tratados com (1S)-(-)-verbenona e o grupo controle (gráfico 4), no teste de convulsão induzido por estriknina. Porém o grupo diazepam foi capaz de aumentar a latência de maneira significativa ($146,1 \pm 25,8$ s / $p < 0,0001$) quando comparado ao grupo controle ($46,2 \pm 3,0$ s). Nenhuma das doses de VRB foi também capaz de reduzir a latência da morte dos animais neste teste, no entanto, o grupo DZP foi capaz de aumentar a latência da morte ($428,9 \pm 93,5$ s / $p < 0,0001$) em relação ao grupo controle ($53,1 \pm 1,7$ s) (gráfico 5).

Gráfico 4 - Efeito de (1S)-(-)-verbenona na latência para início das convulsões induzidas pela estriknina.



Fonte: Elaborada pelo autor. Valores estão representados como média $\pm$ erro padrão da média $n = 8$ animais por grupo. Os grupos correspondem a controle, VRB tratado com (1S)-(-)-verbenona nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg e DZP 4 mg/kg. Todos os grupos receberam estriknina na dose de 20 mg/kg. *** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle (teste ANOVA seguido de Dunnett's).

Gráfico 5 - Efeito de (1S)-(-)-verbenona na latência para morte dos animais no teste das convulsões induzidas pela estriçnina.



Fonte: Elaborada pelo autor. Valores estão representados como média $\pm$ erro padrão da média $n = 8$ animais por grupo. Os grupos correspondem a controle, VRB tratado com (1S)-(-)-verbenona nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg e DZP 4 mg/kg. Todos os grupos receberam estriçnina na dose de 20 mg/kg. *** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle (teste ANOVA seguido de Dunnett's).

A tabela 3 sumariza os percentuais de animais que apresentaram convulsões, bem como os percentuais de animais que morreram após a administração de estriçnina. Os tratamentos com VRB não foram capazes de reduzir o percentual de convulsão e o percentual de morte quando comparados ao grupo controle.

Tabela 3 – Efeito de (1S)-(-)-verbenona no teste das convulsões induzidas pela estriçnina.

Tratamento	Presença de convulsões (%)	Percentual de morte
Controle	100	100
VRB 150	100	100
VRB 200	100	100
VRB 250	100	100
DZP (4 mg/kg)	100	100

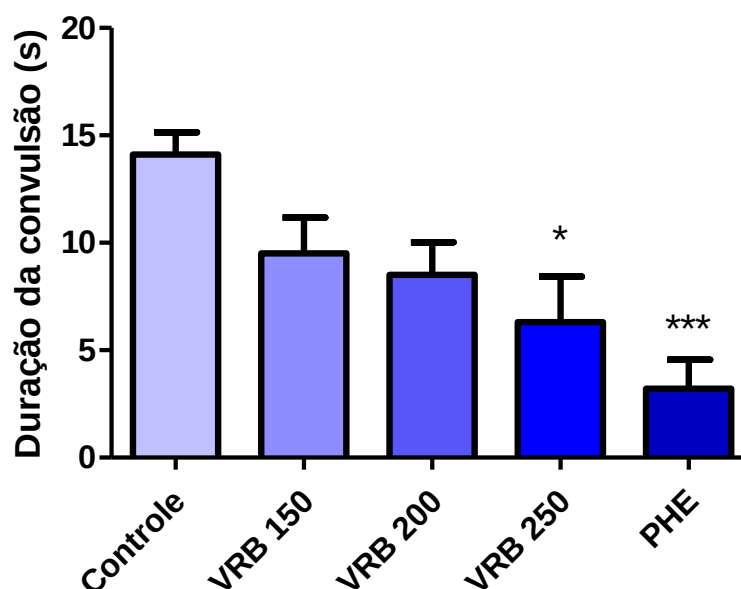
Fonte: Elaborado pelo autor. Os grupos correspondem a controle, VRB tratado com (1S)-(-)-verbenona nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg e DZP 4 mg/kg. Todos os grupos receberam estriçnina na dose de 20 mg/kg.

5.2.3 Teste das convulsões induzidas pelo Eletrochoque Auricular Máximo (MES)

Neste teste, verificou-se que VRB 150 mg/kg ($9,5 \pm 1,6$ s) e VRB 200 mg/kg ($8,5 \pm 1,5$ s) não foram capazes de reduzir o tempo das convulsões tônicas provocadas pelo eletrochoque auricular máximo quando comparado ao grupo controle ($14,1 \pm 1,0$ s). No entanto, VRB 250 mg/kg ($6,3 \pm 2,1$ s / $p < 0,05$) foi capaz de reduzir o tempo de convulsão (gráfico 6) de forma significativa. Conforme esperado, a fenitoína (PHE) foi capaz de reduzir significativamente o tempo das convulsões ($3,2 \pm 1,3$ s / $p < 0,0001$), quando comparado ao grupo controle.

Quando observado o percentual da presença de convulsão e o percentual de morte, a tabela 4 sumariza os dados observados. Nenhum tratamento com VRB foi capaz de reduzir significativamente a porcentagem de convulsão. Apenas os animais tratados com fenitoína reduziram o percentual de convulsão para 37,5%. Todos os tratamentos apresentaram baixa taxa de mortalidade.

Gráfico 6 - Efeito de (1S)-(-)-verbenona na duração das convulsões no teste do eletrochoque auricular máximo em camundongos.



Fonte: Elaborada pelo autor. Valores estão representados como média $\pm$ erro padrão da média $n = 8$ animais por grupo. Os grupos correspondem a controle, VRB tratado com (1S)-(-)-verbenona nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg e PHE 25 mg/kg. * $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle (teste One-way ANOVA seguido de Kruskal-Wallis).

Tabela 4 - Efeito de (1S)-(-)-verbenona no teste das convulsões induzidas pelo eletrochoque auricular máximo.

Tratamento	Presença das convulsões (%)	Taxa de mortalidade (%)
Controle	100	25
VRB 150	75	25
VRB 200	87,5	25
VRB 250	62,5	0
Fenitoína	37,5 ^b	0

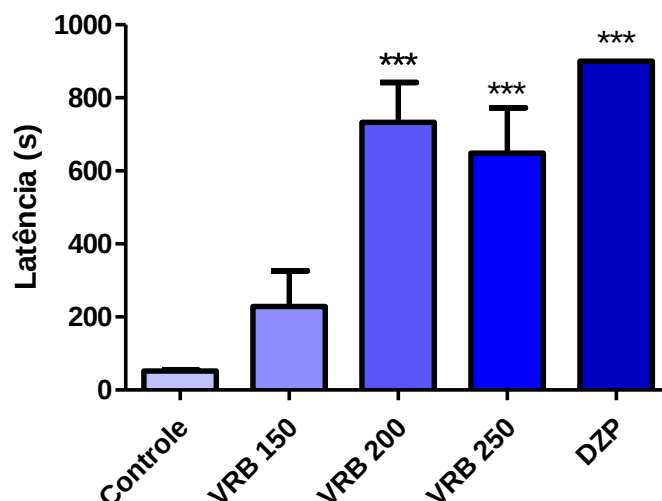
Fonte: Elaborada pelo autor. Valores estão representados como porcentagem. n = 8 animais por grupo. Os grupos correspondem a controle, VRB tratado com (1S)-(-)-verbenona nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg e PHE 25 mg/kg. ^b p < 0,0001 quando comparado ao grupo controle (teste Fisher).

5.2.4 Teste de convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ) e avaliação na participação do sítio benzodiazepínico nos receptores GABA_A

No teste agudo das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol, VRB 200 ($733 \pm 109,4$ s) e VRB 250 ($648,8 \pm 124,5$ s) aumentaram significativamente a latência para o início da primeira convulsão, em comparação ao grupo controle ($51,8 \pm 2,8$ s). Contudo, o VRB 150 ($229 \pm 96,8$ s) não teve o mesmo efeito (gráfico 7). O VRB nas três doses experimentais reduziu significativamente a porcentagem de convulsões tônico-clônicas (CT), tal como o grupo tratado com DZP. No entanto, apenas os grupos de animais tratados com VRB 200 ou DZP apresentaram reduções significativas na porcentagem de crises mioclônicas (MC), quando comparadas com o grupo controle (tabela 5). Observou-se uma redução na porcentagem de morte para todos os tratamentos VRB quando comparados com o grupo controle.

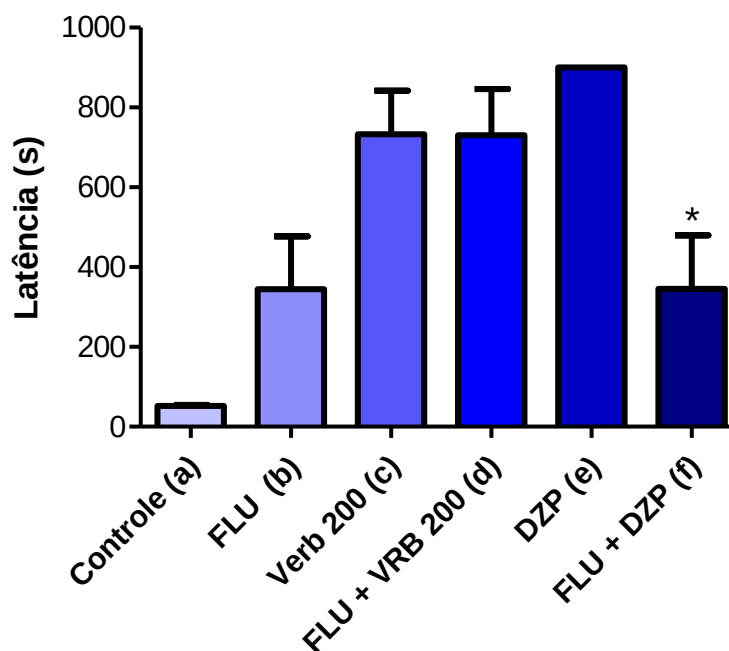
Na avaliação da possível participação do sítio benzodiazepínico dos receptores GABA_A, o pré-tratamento com flumazenil (FLU) reverteu o efeito anticonvulsivo do diazepam (DZP) (p < 0,05), mas não reverteu o efeito anticonvulsivo do VRB 200 ($730,8 \pm 115,1$ s) (gráfico 8). Esta dose foi preconizada nesta análise devido a nenhuma diferença estatística entre os efeitos anticonvulsivantes de VRB 200 e 250 mg/kg no teste de convulsão induzido por PTZ.

Gráfico 7 - Efeito de (1S)-(-)-verbenona na latência da convulsão induzida por pentilenotetrazol.



Fonte: Elaborada pelo autor. Valores estão representados como média $\pm$ erro padrão da média $n = 8$ animais por grupo. Os grupos correspondem a controle, VRB tratado com (1S)-(-)-verbenona nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg e DZP 4 mg/kg. *** $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo controle (One-way ANOVA/Kruskal-Wallis, seguido de Dunn).

Gráfico 8 - Efeito de (1S)-(-)-verbenona na latência da convulsão induzida por pentilenotetrazol após a administração de flumazenil.



Fonte: Elaborada pelo autor. Valores estão representados como média $\pm$ erro padrão da média $n = 8$ animais por grupo. Os grupos correspondem a controle, VRB tratado com (1S)-(-)-verbenona nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg, DZP tratado com 4 mg/kg de diazepam.

Os grupos b, d, f foram pré tratados com 20 mg/kg de flumazenil (FLU). Todos os grupos receberam 75 mg/kg de pentilenotetrazol. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo DZP (One-way ANOVA/Kruskal-Wallis).

Tabela 5 – Efeito de (1S)-(-)-verbenona no teste de convulsão induzida por pentilenotetrazol.

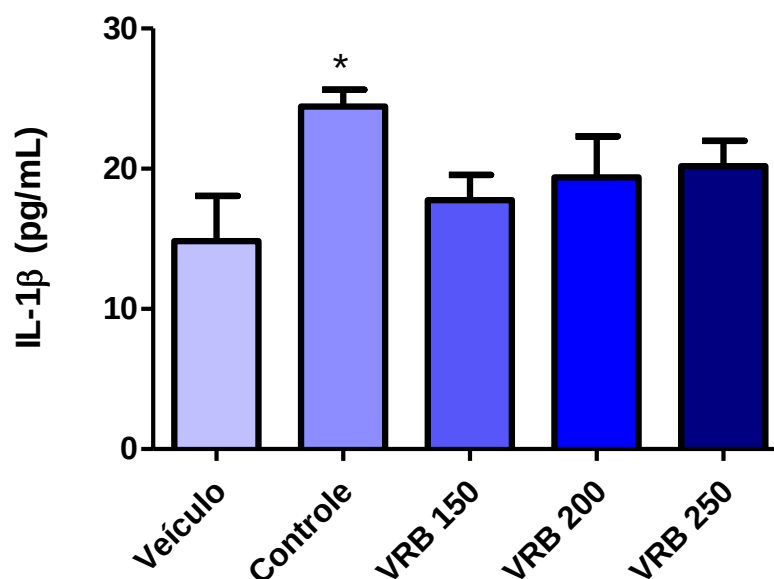
Tratamento	Latência (s) ^a	% Convulsões TC	% Convulsões MC	% Morte
Controle	51,8 ± 2,8	75	100	75
VRB 150	229 ± 96,8	0 ^a	87,5	0 ^a
VRB 200	733 ± 109,4 ^{***}	0 ^a	25 ^a	0 ^a
VRB 250	648,8 ± 124,5 ^{***}	12,5 ^b	62,5	12,5 ^b
DZP	900 ± 0 ^{***}	0 ^a	0 ^a	0 ^a
FLU	344,3 ± 132,5	0	75	25
FLU + VRB 200	730,3 ± 115,1	0	25	0
FLU + DZP	345,7 ± 133,8 [#]	25	62,5	0

Fonte: Elaborado pelo autor. Os valores foram expressos como a média ± erro padrão da média. n = 8 animais. Os grupos correspondem a controle, VRB tratado com (1S)-(-)-verbenona nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg, DZP 4 mg/kg, e FLU 20 mg/kg de flumazenil. Todos os grupos receberam 75 mg/kg de pentilenotetrazol. ^a $p < 0,001$ (teste de Fisher), significativamente diferente do controle. ^b $p < 0,05$ (teste de Fisher), significativamente diferente do controle. ^{***} $p < 0,0001$ em comparação com o grupo controle, teste One-way ANOVA/Kruskal-Wallis. [#] $p < 0,05$ em comparação com os valores do grupo DZP + PTZ. TC = convulsões tônicas. MC = convulsões mioclônico.

5.2.4a Citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF α

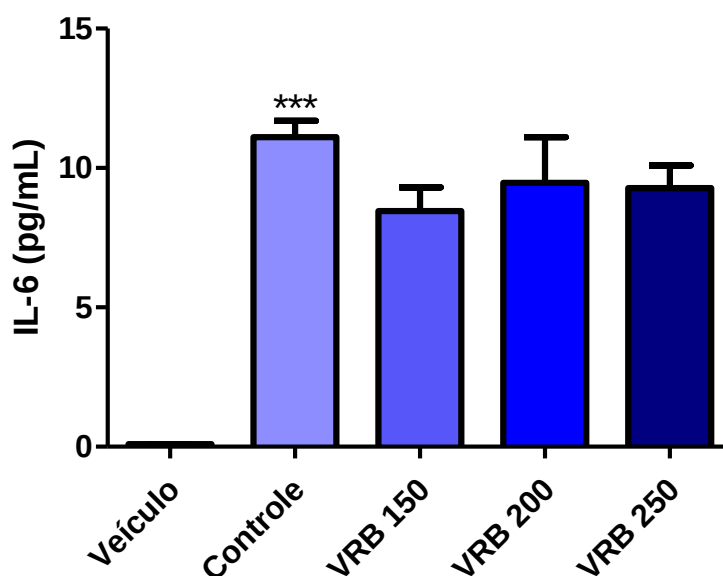
A determinação na quantificação de citocinas no hipocampo nos animais submetidos ao teste de PTZ mostrou que os animais tratados com VRB não apresentaram diferenças significativas das três citocinas analisadas: IL-1 β , IL-6 e TNF- α , quando comparados ao grupo controle. Os animais tratados apenas com PTZ, mostraram expressão aumentada destas citocinas pró-inflamatórias, quando comparado com o grupo veículo (solução tween 80).

Gráfico 9 – Efeito de (1S)-(-)-verbenona nos níveis de IL-1 β no teste de convulsão induzidos por PTZ.



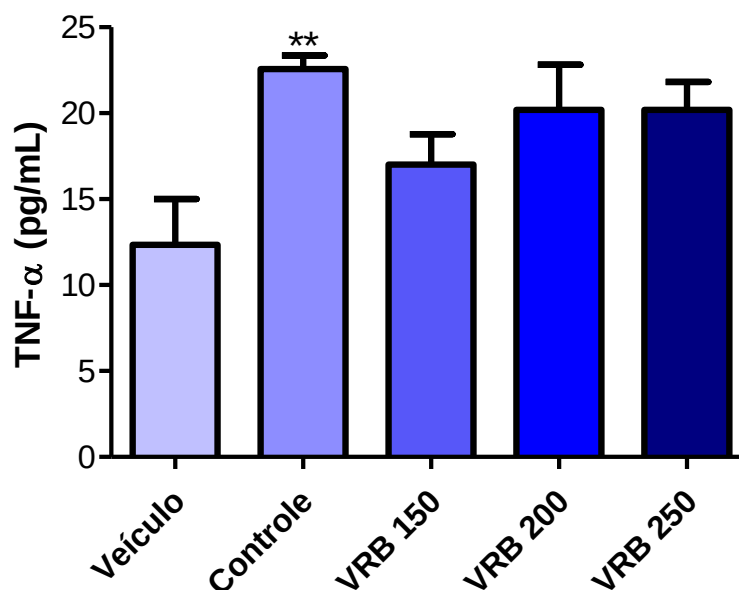
Fonte: Elaborado pelo autor. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (n = 8 animais por grupo). Os grupos correspondem a controle, VRB tratado com (1S)-(-)-verbenona nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg. Todos os grupos, com exceção do veículo (tween 80), receberam pentilenotetrazol na dose de 75 mg/kg. * $p < 0,05$ (One-way ANOVA/Dunnett's) comparado ao grupo veículo.

Gráfico 10 – Efeito de (1S)-(-)-verbenona nos níveis de IL-6 no teste de convulsão induzidos por PTZ.



Fonte: Elaborado pelo autor. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média (n = 8 animais por grupo). Os grupos correspondem a controle, VRB tratado com (1S)-(-)-verbenona nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg. Todos os grupos, com exceção do veículo (tween 80), receberam pentilenotetrazol na dose de 75 mg/kg. *** $p < 0,0001$ (One-way ANOVA/Dunnett's) comparado ao grupo veículo.

Gráfico 11 - Efeito de (1S)-(-)-verbenona nos níveis de TNF- α no teste de convulsão induzidos por PTZ.



Fonte: Elaborado pelo autor. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média ($n = 8$ animais por grupo). Os grupos correspondem a controle, VRB tratado com (1S)-(-)-verbenona nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg. Todos os grupos, com exceção do veículo (tween 80), receberam pentilenotetrazol na dose de 75 mg/kg. ** $p < 0,001$ (One-way ANOVA/Dunnett's) comparado ao grupo veículo.

5.2.4b Análise da expressão gênica de mRNA de BDNF, COX-2 e c-fos.

Na análise da expressão gênica foi possível observar a amplificação de regiões específicas dos genes de interesse a partir da análise da curva de *melting* (figura 9, 10, 11 e 12).

Figura 9 – Análise da curva de melting do gene ACT (beta-actina).

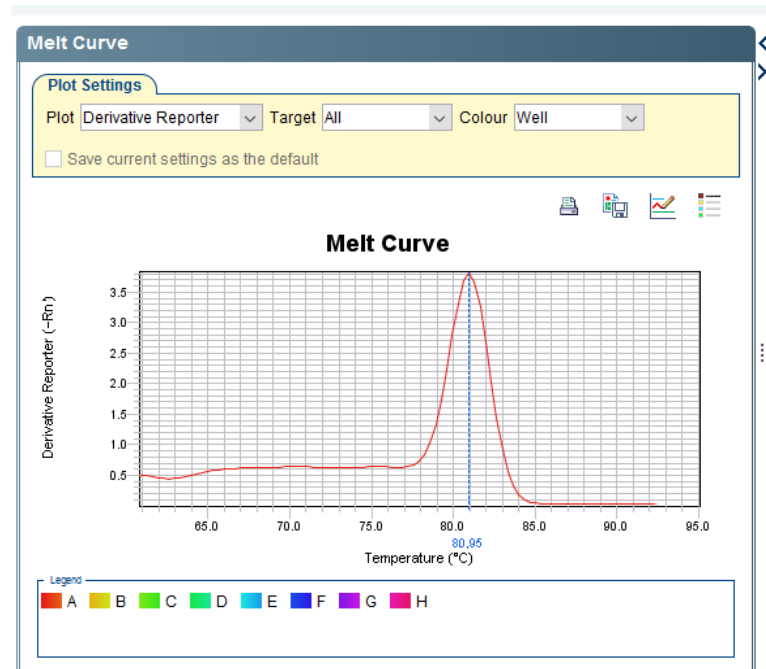


Figura 10 – Análise da curva de melting do gene c-fos.

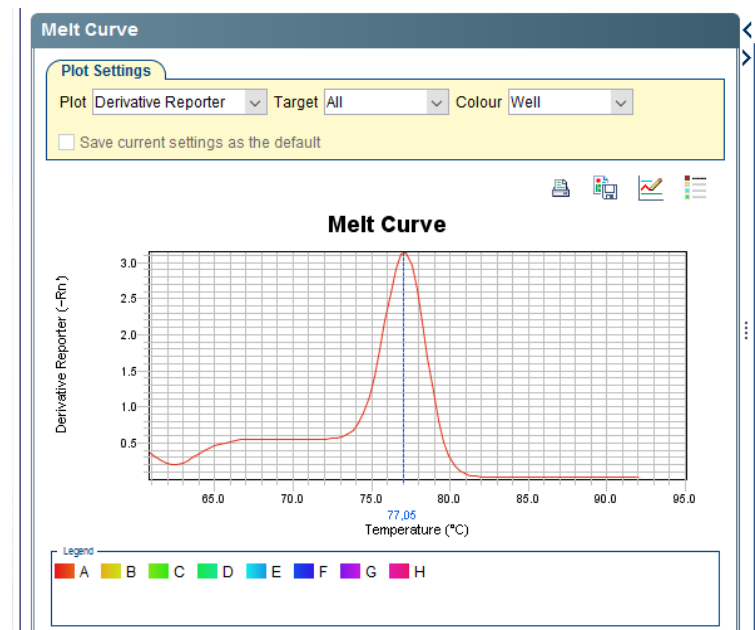


Figura 11 – Análise da curva de melting do gene BDNF.

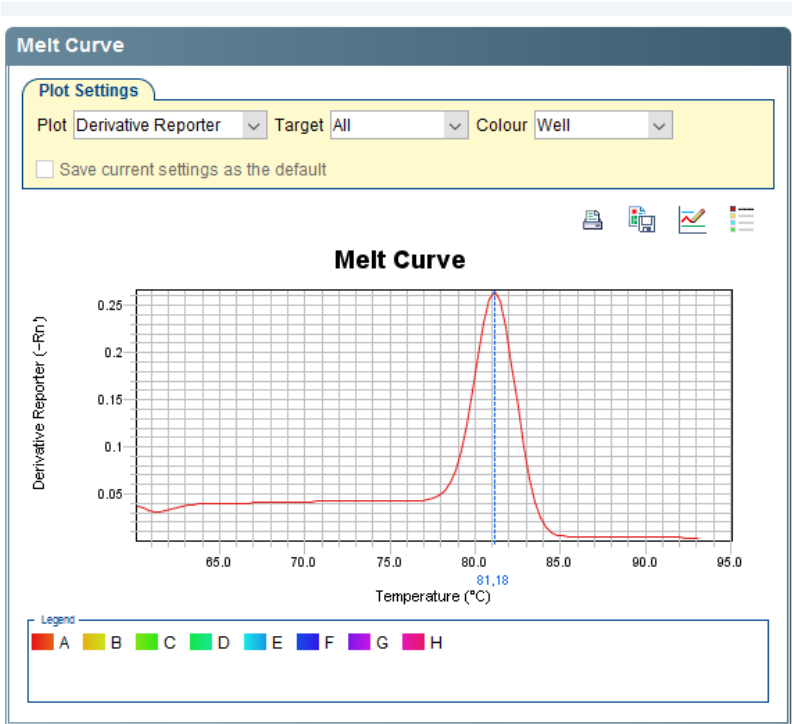
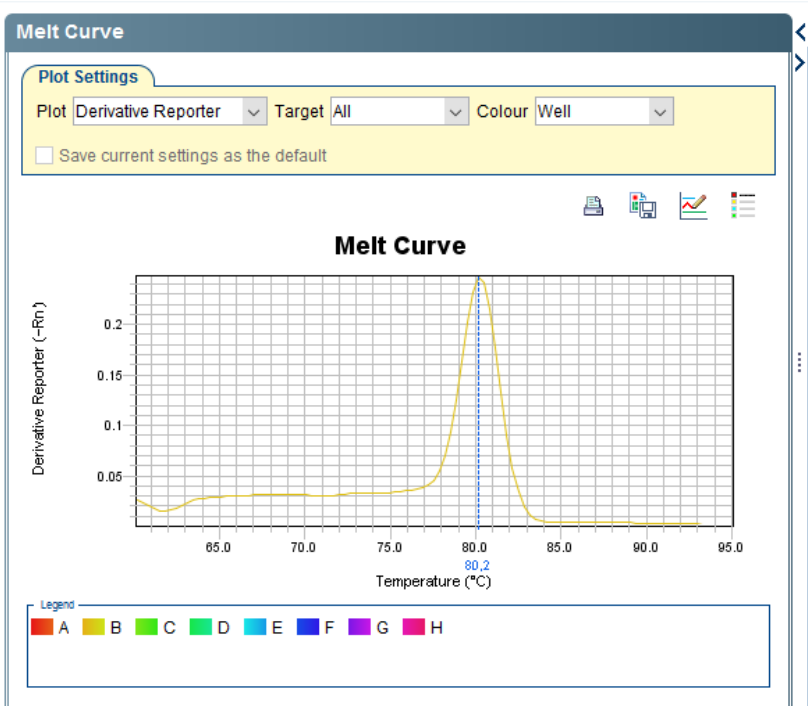
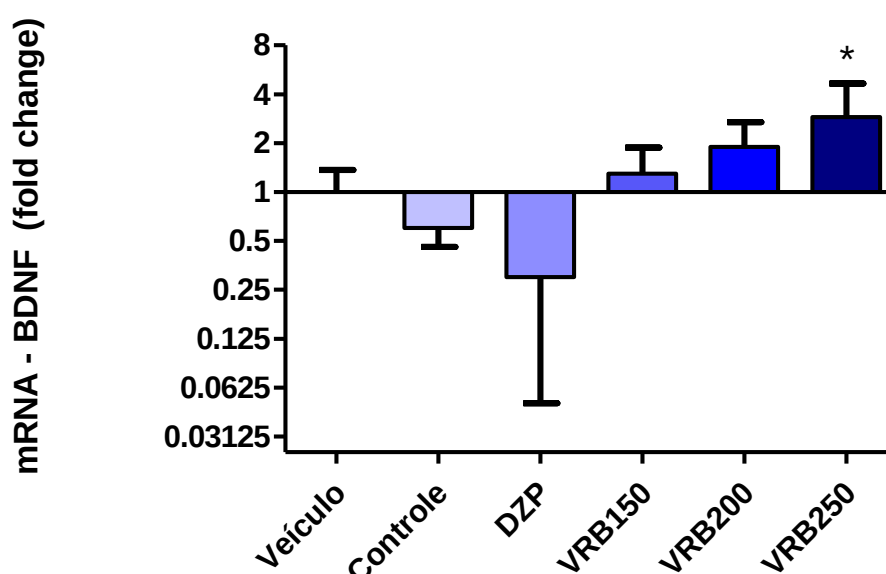


Figura 12 – Análise da curva de melting do gene COX-2.



A expressão de BDNF foi significativamente aumentada apenas nos animais tratados com VRB na dose de 250 mg/kg quando comparado ao grupo controle ($p < 0,01$) (gráfico 12). A expressão deste gene no grupo VRB 250 aumentou 2,9 vezes (tabela 6) em relação grupo veículo, ou seja, 290%. A expressão de BDNF no grupo controle diminui 0,4 vezes em relação ao veículo, ou seja, uma diminuição relativa de 40%.

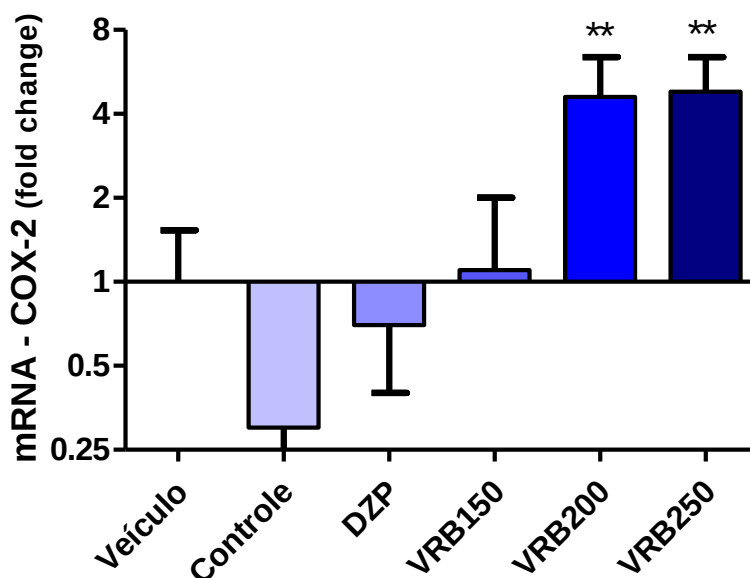
Gráfico 12 – Análise da expressão gênica de BDNF nos animais tratados com (1S)-(-)-verbenona.



Fonte: Elaborado pelo autor. Os dados expressam média $\pm$ desvio padrão ($n=8$ animais por grupo). Os grupos correspondem a controle, VRB tratado com (1S)-(-)-verbenona nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg. Todos os grupos, com exceção do veículo (tween 80), receberam pentilenotetrazol na dose de 75 mg/kg. * $p < 0,01$ (ANOVA/teste Tukey) comparado ao grupo controle.

Os grupos VRB 200 e VRB 250 apresentaram aumento na expressão de COX-2 em 4,6 e 4,8 vezes (tabela 6), respectivamente, ou seja, obteve um aumento relativo de 460% e 480%. Quando comparado ao grupo controle, ambos os grupos foram capazes de aumentar significativamente a expressão de COX-2 ($p < 0,001$). O grupo tratado apenas com PTZ (controle) reduziu a expressão de COX-2 em 0,7 vezes (70% a menos) (gráfico 13).

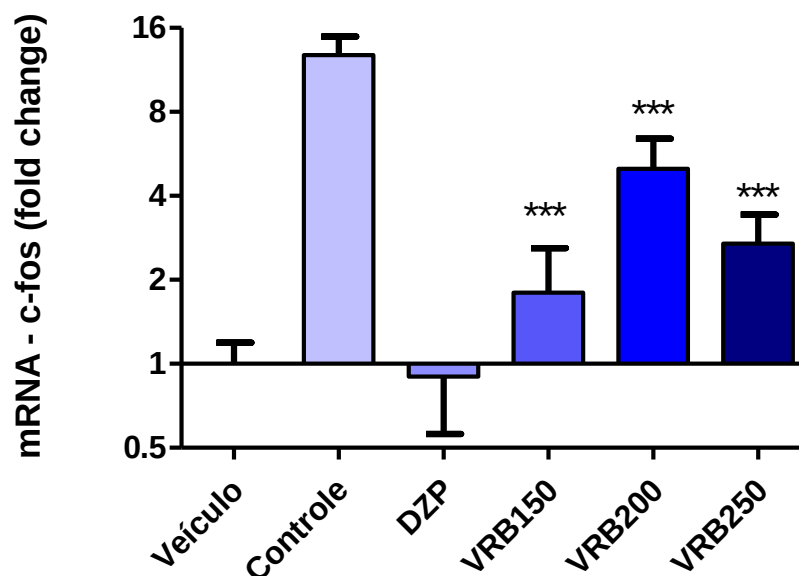
Gráfico 13 - Análise da expressão gênica de COX-2 nos animais tratados com (1S)-(-)-verbenona.



Fonte: Elaborado pelo autor. Os dados expressam média $\pm$ desvio padrão (n=8 animais por grupo). Os grupos correspondem a controle, VRB tratado com (1S)-(-)-verbenona nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg. Todos os grupos, com exceção do veículo (tween 80), receberam pentilenotetrazol na dose de 75 mg/kg. ** $p < 0,001$ (ANOVA/teste Tukey) comparado ao grupo controle.

As três doses de VRB foram capazes de alterar a expressão de c-fos quando comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$). A expressão de c-fos nos grupos experimentais foi relativamente inferior do que o grupo controle. O grupo controle, tratado apenas com PTZ, aumentou 12,8 vezes a expressão de c-fos (tabela 6), ou seja, um aumento em percentual de 1280%. Os grupos pré tratados com VRB 150, VRB 200 e VRB 250, submetidos ao teste de PTZ, reduziram este percentual para 180, 500 e 270%, respectivamente (gráfico 14).

Gráfico 14 - Análise da expressão gênica de c-fos nos animais tratados com (1S)-(-)-verbenona.



Fonte: Elaborado pelo autor. Os dados expressam média $\pm$ desvio padrão (n=8 animais por grupo). Os grupos correspondem a controle, VRB tratado com (1S)-(-)-verbenona nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg. Todos os grupos, com exceção do veículo (tween 80), receberam pentilenotetrazol na dose de 75 mg/kg. ***p < 0,0001 (ANOVA/teste Tukey) comparado ao grupo controle.

Tabela 6 – Expressão relativa dos RNAs mensageiros dos genes BDNF, COX-2 e c-fos extraídos de hipocampus de camundongos submetidos ao teste das convulsões induzidas por PTZ.

Genes			
Grupos	BDNF	COX-2	c-fos
Veículo	1.0 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.2
Controle	0.6 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	12.8 $\pm$ 2.1
VRB 150	1.3 $\pm$ 0.6	1.1 $\pm$ 0.9	1.8 $\pm$ 0.8*** ↓
VRB 200	1.9 $\pm$ 0.8	4.6 $\pm$ 1.8** ↑	5.0 $\pm$ 1.4*** ↓
VRB 250	2.9 $\pm$ 1.7* ↑	4.8 $\pm$ 1.6** ↑	2.7 $\pm$ 0.7*** ↓
DZP	0.3 $\pm$ 0.2	0.7 $\pm$ 0.3	0.9 $\pm$ 0.3

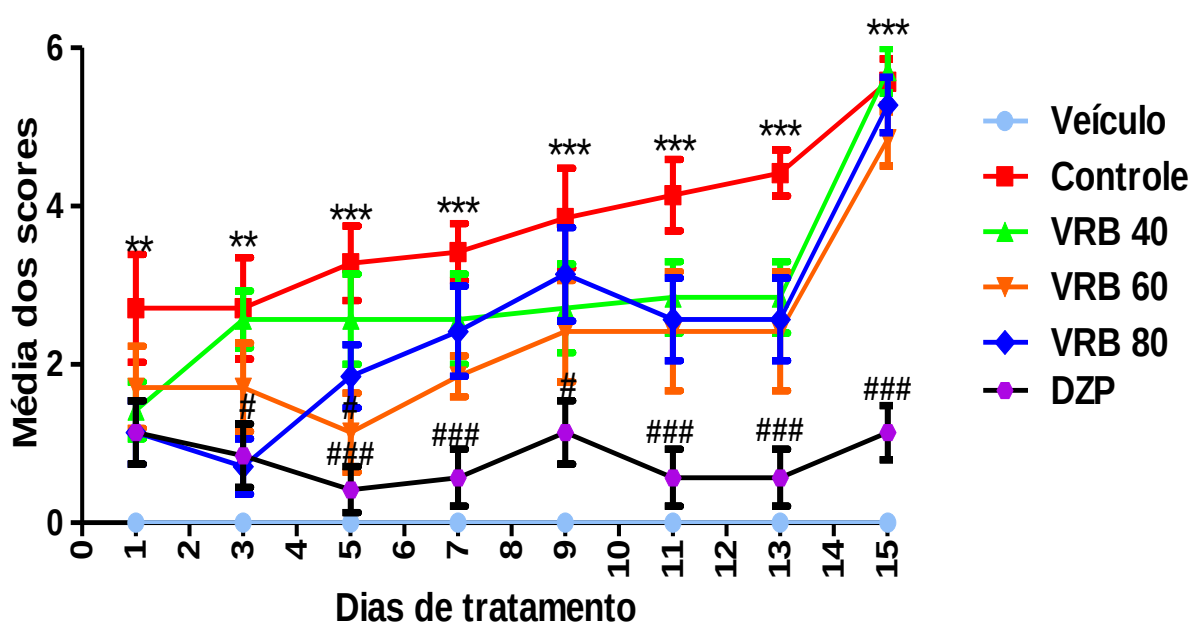
Fonte: Elaborado pelo autor. Os dados expressam média $\pm$ desvio padrão (n=8 animais por grupo). Os grupos correspondem a controle, VRB tratado com (1S)-(-)-verbenona nas doses de 150, 200 e 250 mg/kg. Todos os grupos, com exceção do veículo (tween 80), receberam pentilenotetrazol na dose de 75 mg/kg. * p < 0,01 **p < 0,001, ***p < 0,0001 (ANOVA/teste Tukey) comparado ao grupo controle. ↑ aumento da expressão, ↓ redução da expressão.

5.2.5 Modelo crônico de epilepsia: abrasamento (“kindling”)

VRB não apresentou efeito anticonvulsivante no modelo crônico. No entanto, no terceiro dia de experimento (2ª aplicação da sub dose de PTZ), VRB 80 foi capaz de reduzir a média dos escores ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle. A redução da média dos escores também foi observada no quinto dia de experimento (3ª aplicação da sub dose de PTZ) nos grupos tratados com VRB 60 ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle. Porém, este efeito não foi mantido ao longo dos outros dias de experimento (gráfico 15).

Após a administração da dose desafio (75mg/kg), no último dia do experimento, os animais tratados com VRB 60 e VRB 80 apresentaram redução na taxa de mortalidade quando comparado ao grupo controle (tabela 7). Apenas 28,5% dos animais tratados com VRB 60 e 57,1% dos animais tratados com VRB 80 morreram. A dose de 40 mg/kg (85,7%) não foi capaz de reduzir o percentual de morte quando comparado ao grupo controle (71,4%).

Gráfico 15 – Efeito de (1S)-(-)-verbenona na média dos escores no teste de “kindling” induzido pelo PTZ em camundongos.



Fonte: Elaborado pelo autor. Valores estão representados como média $\pm$ erro padrão da média $n = 7$ animais por grupo. ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ comparado ao grupo controle e # $p < 0,01$, ## $p < 0,001$ e ### $p < 0,0001$ comparando ao grupo controle (ANOVA/teste Tukey).

Tabela 7 – Efeito de (1S)-(-)-verbenona no teste de “kindling” induzido pelo PTZ em camundongos.

Grupos	Dose mg/kg	Mortalidade (%)
Veículo	Tween 80	0
Controle	Tween 80 + PTZ 75 mg/kg	71,4
VRB 40	40 mg/kg + PTZ 75 mg/kg	85,7
VRB 60	60 mg/kg + PTZ 75 mg/kg	28,5*
VRB 80	80 mg/kg + PTZ 75 mg/kg	57,1
DZP	4 mg/kg + PTZ 75 mg/kg	0

Fote: Elaborada pelo autor. (n=7). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle. Teste exato de Fisher.

5.2.5a Análise histopatológica de hipocampo a partir do teste do “kindling”

As imagens histológicas mostram os hipocampos de animais submetidos ao modelo *kindling*. A figura 13 representa uma visão geral da histologia dos hipocampos dos animais em um aumento de 40X. É possível evidenciar alterações nos grupos controle, VRB 60 e VRB 80 mg/kg. Os animais tratados com DZP não apresentaram alterações histológicas quando comparado ao grupo controle.

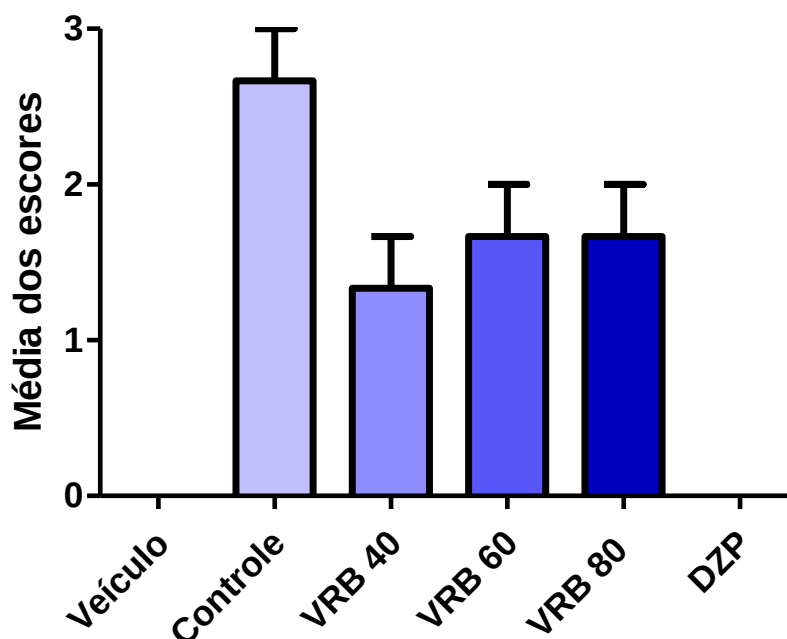
A figura 14 representa um aumento de 100X, onde podemos evidenciar um edema do giro denteado (seta com quatro pontas) e hiper celularidade (cabeça das setas) no grupo controle, caracterizando os efeitos histopatológicos induzidos pelo agente químico pentilenotetrazol. Também é possível identificar hiper celularidade nos grupos VRB 60 e VRB 80 mg/kg (cabeça das setas). Todas as observações foram comparadas ao grupo veículo, sendo este grupo ausente de qualquer alteração (gráfico 16).

É possível evidenciar no grupo tratado com VRB 60 mg/kg hiper celularidade no hipocampo de maneira difusa e no giro denteado, característico de processo inflamatório (cabeça da seta). Também é observado um vaso dilatado (seta fina) (Figura 15). A figura 16 representa o corte histológico do hipocampo do grupo controle. Neste grupo é possível evidenciar várias alterações como:

hipercelularidade, edema, apoptose e dilatação vascular. Estas alterações não foram evidenciadas no grupo veículo.

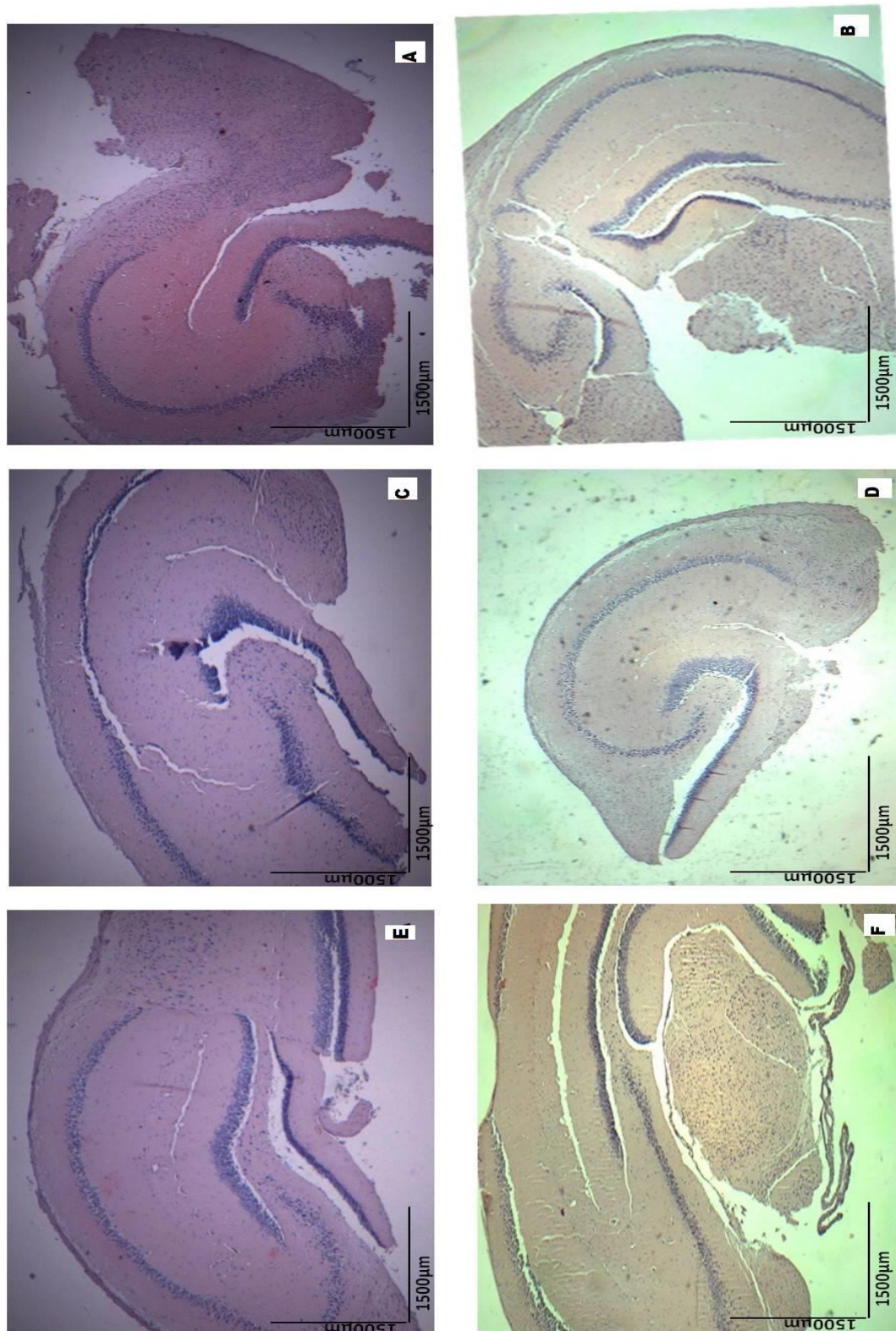
Em relação aos escores que mensuravam o dano neuronal causado na região do hipocampo dos animais tratados, o gráfico 16 expressa as respectivas médias obtidas. O grupo veículo não apresentou nenhuma alteração nos escores ($0,0 \pm 0,0$), enquanto que os animais tratados apenas com PTZ (controle), apresentou média de escore de ($2,6 \pm 0,3$). Nos grupos experimentais foram possíveis observar uma redução da média dos escores para VRB 40 ($1,3 \pm 0,3$), VRB 60 ($1,6 \pm 0,3$) e VRB 80 ($1,6 \pm 0,3$). Como já esperado, os animais tratados com diazepam apresentaram redução da média dos escores ($0,0 \pm 0,0$).

Gráfico 16 – Efeito de (1S)-(-)-verbenona sobre a média dos escores das alterações histológicas observados no hipocampo dos animais submetidos ao teste do “kindling” induzido pelo PTZ.



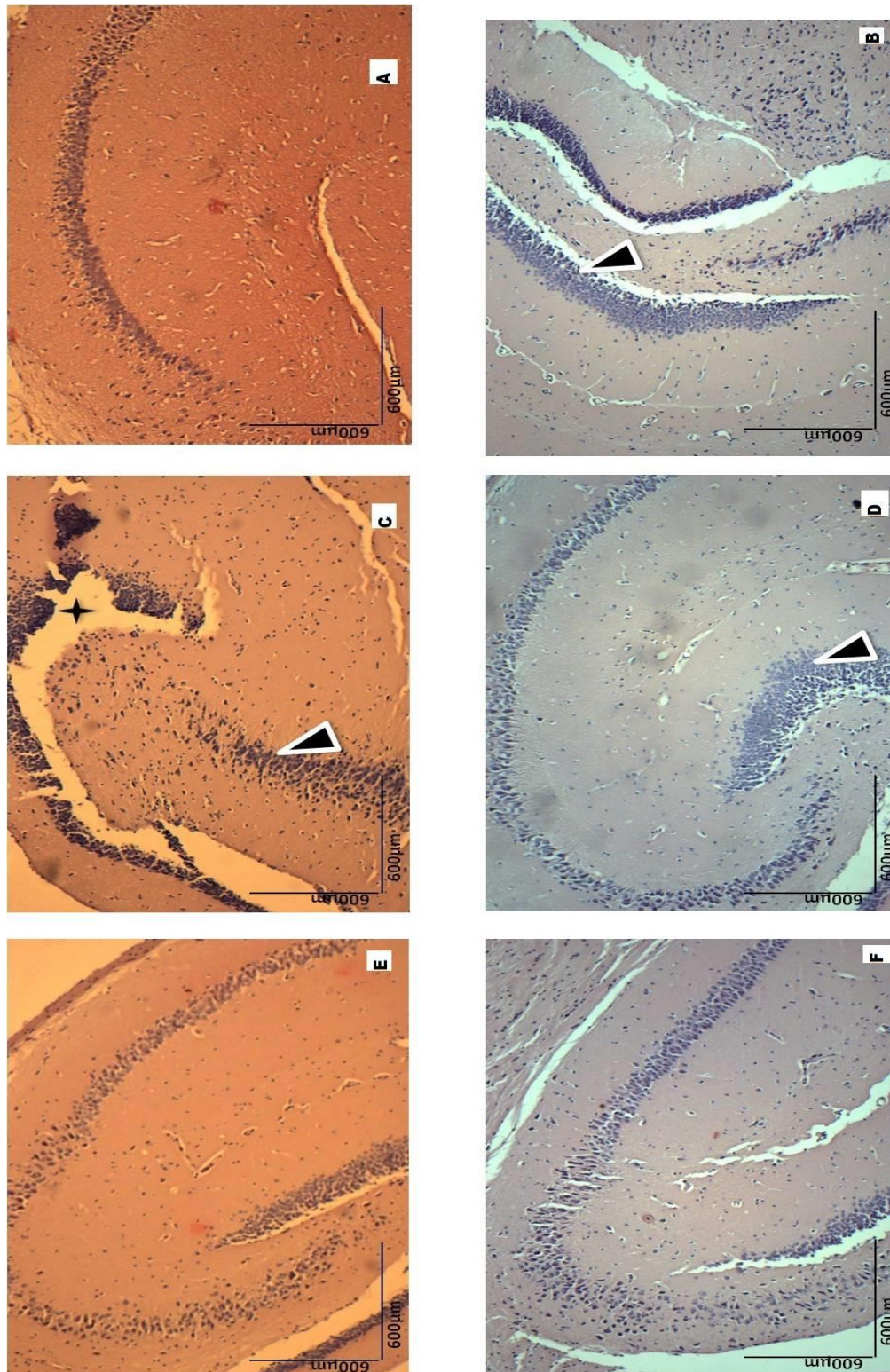
Fonte: Elaborada pelo autor. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média ($n = 3$ animais por grupo). (teste t).

Figura 13 – Histologia dos hipocampus dos camundongos submetidos ao modelo crônico (aumento 40X).



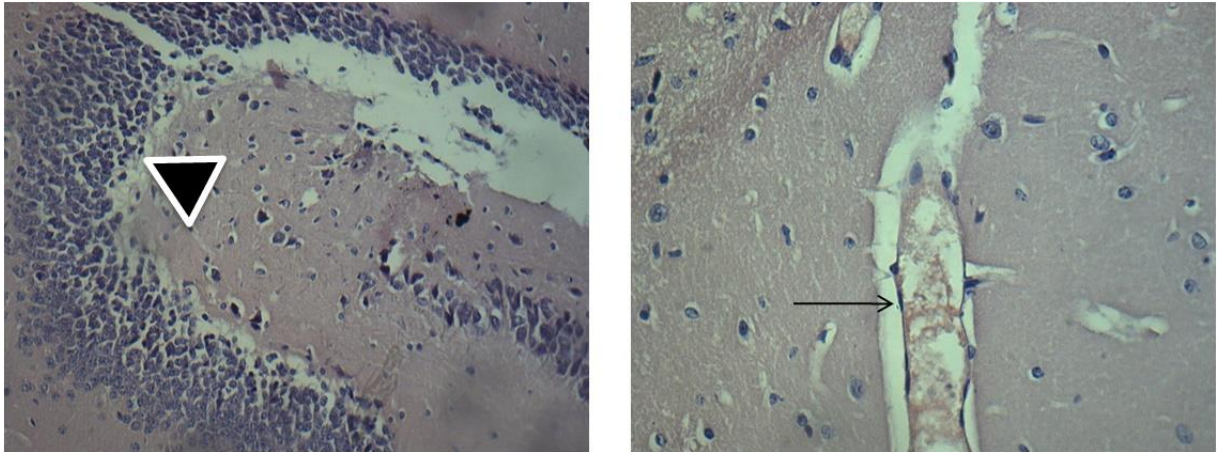
Fonte: Elabora pelo autor. Aumento de 40X. E (grupo veículo), C (grupo controle), A (grupo DZP), F (grupo VRB 40), D (grupo VRB 60) e B (grupo VRB 80).

Figura 14 – Histologia dos hipocampus dos camundongos submetidos ao modelo crônico (aumento 100X).



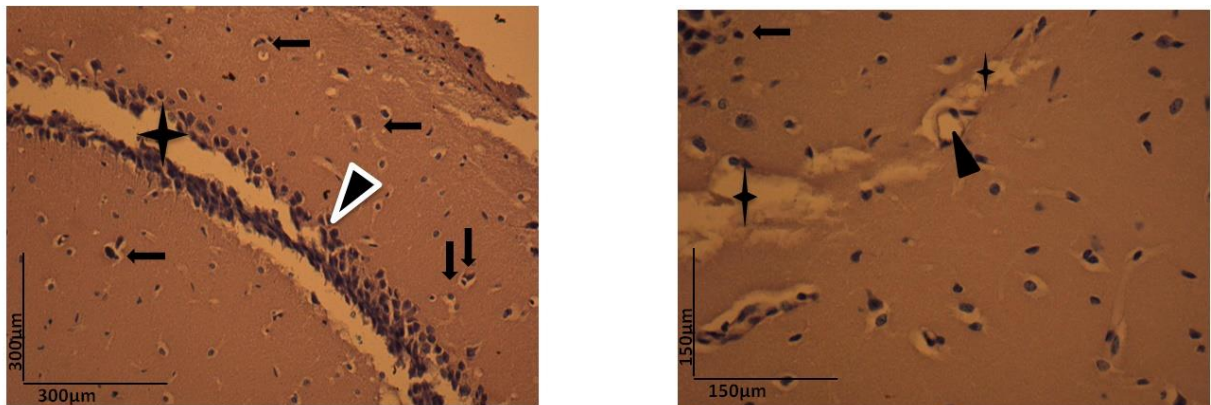
Fonte: Elaborado pelo autor. Aumento de 100X. E (grupo veículo), C (grupo controle), A (grupo DZP), F (grupo VRB 40), D (grupo VRB 60) e B (grupo VRB 80). Cabeça da seta indica hiper celularidade e estrela de quatro pontas indica edema no giro denteado.

Figura 15 – Corte histológico do hipocampo referente ao grupo VRB 60.

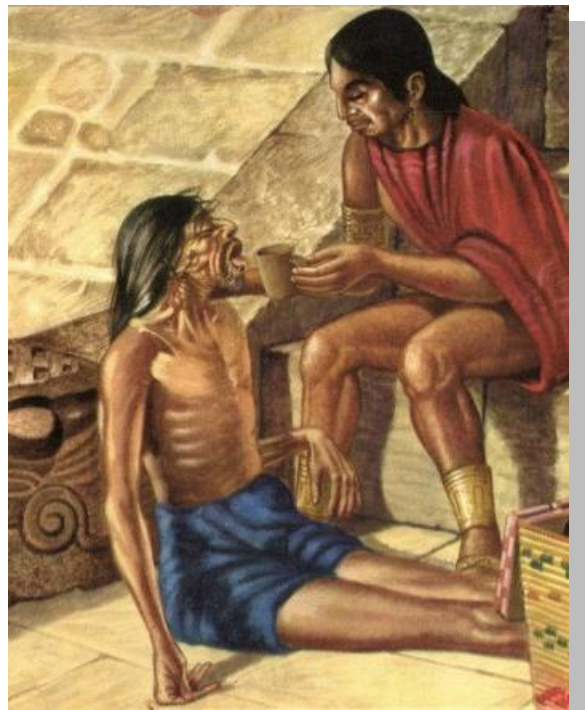


Fonte: Elaborada pelo autor. Cabeça da seta indicando hiper celularidade. Seta fina indicando a presença de um vaso dilatado.

Figura 16 - Corte histológico do hipocampo referente ao grupo controle.



Fonte: Elaborada pelo autor. Primeira foto representando aumento de 100X. Destruição do giro dentado (cabeça da seta com borda branca), edema no giro dentado (estrela de quatro pontas) e apoptose (setas pretas). Segunda foto mostrando aumento de 400X. Vasodilatação (cabeça da seta preta), edema no giro dentado (estrela de quatro pontas) e apoptose (setas pretas).



Discussão

6 DISCUSSÃO

Novas drogas que apresentam atividade antiepiléptica têm sido desenvolvidas com a finalidade de bloquear ou reduzir as convulsões. Entre os testes de triagem utilizados para identificar o potencial anticonvulsivante das substâncias, destacam-se o pentilenotetrazol (PTZ), eletrochoque auricular máximo (EAM), pilocarpina (PILO) e estricnina. (SWINYARD 1949; LÖSCHER; SCHMIDT, 1988). Desta forma, (1S)-(-)-verbenona foi testada para avaliar seu potencial efeito anticonvulsivante.

Ao avaliar a atividade locomotora dos animais após o tratamento com VRB no teste de *rota rod*, foi possível observar que a substância não alterou o tônus muscular nas três diferentes doses estudadas. O efeito de relaxamento muscular e redução da coordenação motora são condições observadas quando a droga age reduzindo a atividade locomotora, sendo caracterizado como um dos efeitos adversos observados durante a administração de benzodiazepínicos. (PIRES et al., 2015)

Um dos modelos animais que induzem convulsões reproduzindo componentes de epilepsias humanas, é o teste das convulsões induzidas pela pilocarpina. (ZGRAJKA et al., 2010). A atividade convulsiva é decorrente da administração de uma alta dose de pilocarpina, onde, após a crise, tem-se um período de latência que precede crises focais espontâneas e recorrentes. Mudanças neuropatológicas, como esclerose hipocampal, ocorrem com a indução do *status epilepticus* gerado pela pilocarpina, de forma semelhante à epilepsia do lobo temporal em humanos. (SCHAUWECKER, 2012)

A pilocarpina é um agonista não seletivo dos receptores muscarínicos. (CLIFFORD et al., 1987). Muitos estudos têm mostrado o potencial efeito anticonvulsivante de vários monoterpenos a partir do teste de convulsão induzido por pilocarpina. (COSTA et al. 2012; PIRES et al. 2015; SALGADO et al. 2015). No entanto, VRB não apresentou efeito significativo no teste de PILO. Desta forma, é possível identificar que VRB não atua na neurotransmissão colinérgica.

A administração de estricnina, um antagonista competitivo seletivo da inibição pós-sináptica mediada pela glicina, é um potente agente convulsivante. Após a administração de estricnina, os animais apresentam distúrbios motores, aumento do

tônus muscular, alterações da retina, entre outras, que resultam em convulsões tônicas, morte por paralisia respiratória ou por parada cardíaca. (PHILIPPE et al., 2004)

A (1S)-(-)-verbenona não apresentou efeito sobre o teste de convulsão induzido por estriçnina, tendo em vista que esta substância não foi capaz de aumentar a latência para o aparecimento da convulsão ou aumentar a latência da morte dos animais após a administração de estriçnina, sugerindo que VRB possivelmente não atua nos receptores de glicina.

Na convulsão induzida por EAM, apenas a dose de 250 mg/kg foi capaz de apresentar atividade neuroprotetora, reduzindo a duração da convulsão tônico-clônica. No entanto, nenhuma alteração foi observada na taxa de mortalidade e no percentual de convulsão, quando comparado ao grupo controle. Este teste ocorre através de aplicação de cargas elétricas em um curto período de tempo que promove a despolarização das células neuronais culminando na formação de convulsões do tipo tônico-clônica. (LUSZCZKI et al., 2010)

Os testes de triagem EAM e PTZ são bastante utilizados para a descoberta de novas drogas com possível atividade anticonvulsivante. O modelo de eletrochoque é considerado como triagem para drogas no tratamento do “grande mal”, hoje caracterizada como convulsões tipo tônico-clônica generalizada. (WHITE et al., 2007). As drogas que são clinicamente efetivas no tratamento neste tipo de convulsão são fenitoina, fenobarbital, lamotrigina e carbamazepina. (LÖSCHER, 1998). Desta forma, drogas que apresentam proteção contra os efeitos convulsivantes a partir da indução elétrica, podem ser ótimas candidatas para o tratamento da epilepsia.

O monoterpeno citrionelol mostrou atividade neuroprotetora no teste de convulsão induzido por PTZ e EAM. No teste de EAM, citrionelol na dose de 400 mg/kg reduziu a convulsão para 80%. (SOUSA et al., 2006). O monoterpeno timol, na dose de 100mg/kg, também foi capaz de reduzir a convulsão tônico-clônica, quando comparado ao grupo controle (SANCHETI et al., 2014). Como previamente reportado, o monoterpeno α,β -epoxy-carvona preveniu as convulsões tônicas induzidas neste teste (ALMEIDA et al., 2008), sendo esta substância um composto químico que apresenta características estruturais semelhantes a VRB.

O pentilenotetrazol causa convulsões pela inibição dos canais de cloreto associados a receptores GABA_A ou atuando diretamente sobre a membrana do neurônio, através da ativação de canais de sódio. (LÖSCHER; SCHMIDT, 2006). Esta metodologia validada é extensivamente utilizada na triagem de novas drogas anticonvulsivantes, (ROGAWSKI, 2006; MEHLA et al., 2010; NOZADZE et al., 2011) onde, mimetiza no animal, crises convulsivas generalizadas de ausência e mioclônicas. (LÖSCHER; SCHMIDT, 1988; LÖSCHER, 2002a; LÖSCHER; SCHMIDT, 2006)

Os dados obtidos neste estudo revelam que os animais tratados com VRB nas doses de 200mg/kg ou 250mg/kg, mostraram aumento para a latência do aparecimento da primeira convulsão no teste de PTZ. Além deste resultado, VRB 200 e 250 também foi capaz de reduzir o percentual de convulsões tônico-clônica e morte dos animais quando comparado ao grupo controle.

Muitas plantas tem demonstrado um grande potencial para o tratamento de doenças neuronais, tais como a epilepsia. Recentemente, *Pseudospondias microcarpa*, uma planta utilizada no tratamento de várias doenças do SNC, foi estudada no tratamento de epilepsia. O extrato hidroalcolico desta planta foi avaliado nas convulsões induzidas por PTZ, demonstrando grande potencial anticonvulsivante neste teste, porém, nenhum efeito foi observado no teste EAM. (ADONGO et al., 2017)

O estudo de substâncias isoladas a partir das plantas permite direcionar o responsável pelo efeito anticonvulsivante no tratamento da epilepsia. O extrato aquoso de *Justicia spicigera* e seu composto bioativo kaempferitina, um flavonoide, retardou o aparecimento da convulsão e reduziu a frequência das convulsões tônicas e mortalidade dos camundongos, evidenciando o potencial desta substância como agente anticonvulsivante já utilizado na medicina popular. (GONZÁLEZ-TRUJANO et al., 2017)

Trabalhos realizados por Almeida e colaboradores (2008) após avaliar a atividade anticonvulsivante do monoterpeno monocíclico α,β -epoxy-carvona nas doses de 200, 300 ou 400 mg/kg, mostraram que apenas a dose de 300 e 400 mg/kg foram capazes de reduzir a porcentagem de convulsão quando comparado ao grupo tratado apenas com PTZ. A dose de 300 mg/kg aumentou a latência da convulsão similar aos resultados obtidos por VRB. O monoterpeno epóxi-carvona,

também na dose de 300 mg/kg, apresentou atividade anticonvulsivante após aumentar a latência para o surgimento das convulsões no teste de PTZ, em quatro diferentes isômeros analisados (+)-cis-EC, (-)-cis-EC, (+)-trans EC e (-)-trans EC. A proteção estendeu-se também ao parâmetro de mortalidade dos animais, tendo em vista que não houve mortes nos grupos tratados com as substâncias teste. (SALGADO et al., 2015)

Substâncias da classe dos benzodiazepínicos e barbitúricos, como diazepam e fenobarbital, são capazes de potencializar a transmissão GABAérgica, inibindo o neurônio e aumentando o limiar para desencadeamento das convulsões, através da abertura dos canais de cloreto. (PRAVEEN et al., 2013). No entanto, novas substâncias estão sendo cada vez mais estudadas, na tentativa de abranger as classes das DAEs, pois muitos pacientes não respondem ao tratamento de drogas disponibilizadas no mercado ou tornam-se resistentes a terapia utilizada.

Após os dados observados na triagem farmacológica a partir de metodologias que induzem a convulsão, VRB não apresentou efeito no teste de PILO e estricnina, porém, no teste de convulsão induzido por EAM e PTZ a dose de 250 mg/kg se mostrou efetiva em ambos os testes. A interação de drogas através de vários receptores pode levar a efeitos adversos devido a sua não seletividade. Estes efeitos são comuns em fármaco antiepilépticos disponíveis no mercado que acabam por levar danos a qualidade de vida do paciente e atribuições a falha no tratamento de aproximadamente 40% dos pacientes (PERUCCA; MEADOR 2005), provocando a exclusão destas drogas como drogas de primeira linha no tratamento da epilepsia.

Uma vez que VRB foi capaz de aumentar a latência da convulsão no teste de PTZ, foi investigada a ação desta substância no sítio dos benzodiazepínicos do receptor GABA_A, através da administração de flumazenil (FLU), um antagonista seletivo deste sítio no receptor GABA_A. (FILE; PELLOW, 1986). Os benzodiazepínicos, após a ligação no seu sítio do receptor GABA_A, promove o aumento da frequência de abertura do canal GABA_A possibilitando o influxo de cloreto na célula pós sináptica e, conseqüentemente, a hiperpolarização neural. (GOODMAN; GILMAN, 2012). Neste estudo, FLU não foi capaz de reverter o efeito de VRB, mostrando que a atividade anticonvulsivante de VRB não está relacionada ao sítio benzodiazepínico, como observado com o tratamento com diazepam.

Resultados semelhantes ao obtido com VRB, mostram que o FLU não foi capaz de reverter o efeito anticonvulsivante de α,β -epoxy-carvone nas doses de 300 mg/kg, mas bloqueou o efeito de DPZ, como esperado. (ALMEIDA et al., 2008). O extrato etanólico de *Rauvolfia ligustrina*, apresentou atividade anticonvulsivante no teste de PTZ, porém a administração de FLU não antagonizou o efeito deste extrato na prolongação da latência da convulsão. (QUITANS-JUNIOR et al., 2010)

Outros mecanismos de ação podem estar envolvidos na atividade anticonvulsivante de VRB. Muitos estudos têm demonstrado o papel da inflamação nas alterações do sistema nervoso que contribuem para o desenvolvimento de convulsões e epilepsia. (DEVINSKY et al., 2013). As alterações inflamatórias observadas na epilepsia incluem astrogliose, ativação da microglia e danos à barreira hematoencefálica, acompanhadas de expressão aumentada de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF- α . (SHIMADA et al., 2014)

Drogas como a carbamazepina e levetiracetam, reduzem a expressão de mediadores inflamatórios em cultura de células da glia. Já se sabe também, da capacidade destes fármacos anti-epilépticos em amenizar a influência dos mediadores inflamatórios, normalizando o potencial de membrana de células gliais e até mesmo suprimindo a ativação dessas células, evento este produzido pelo levetiracetam. (HAGHIKIA et al., 2008; MATOTH et al., 2000)

Modelos animais de estimulação farmacológica ou elétrica das convulsões produzem convulsões acompanhadas de resposta inflamatória no cérebro destes animais, e estes mediadores inflamatórios apresentam estreita relação com parâmetros como, latência para início das convulsões, frequência, duração e gravidade das crises. (KOŁOSOWSKA et al., 2014; SITGES et al., 2014)

Tabassum e colaboradores (2015) relataram que o monoterpeno álcool perílico tem a capacidade de reduzir os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF α , e consequentemente promover proteção neuronal.

Para verificar se o monoterpeno VRB reduziria as convulsões induzido por PTZ na via inflamatória, foi investigado a concentração das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α no hipocampo de camundongos submetidos ao teste de PTZ agudo. Os dados mostram que não houve redução dessas citocinas nos grupos tratados com VRB. Similar aos nossos achados, a sertralina, um medicamento usado no tratamento da depressão, não reduziu os níveis de expressão dos genes IL-1 β e

TNF- α em testes de crises induzidas por PTZ. (SITGES et al., 2014). Discordante com os resultados observados, Abdallah (2010) demonstrou um aumento na expressão de TNF- α em camundongos pré-tratados com valproato, que tiveram convulsões induzidas por PTZ, indicando assim um possível potencial modulador para esta citocina no modelo PTZ agudo.

Gómez e colaboradores (2014), pelas técnicas de PCR e Western blot, investigaram a capacidade de redução das citocinas IL-1 β e TNF- α através da administração de duas drogas clássicas, carbamazepina e ácido valpróico, e uma droga não clássica, vimpocetina. Neste estudo foi possível observar que vimpocetina e carbamazepina reduziram a expressão de IL-1 β e TNF- α , enquanto que ácido valpróico falhou na redução destas citocinas. (GÓMEZ et al., 2014)

Estudos mostram que os níveis de citocinas podem diferir entre experimentos agudos e crônicos, como visto em uma metodologia crônica (*kindling*) onde os camundongos recebem doses subconvulsivas (30 mg/kg) de PTZ por um período de aproximadamente 15 dias. (KOŁOSOWSKA et al., 2014) Kołosowska et al. (2014) observaram que os grupos de camundongos no tratamento crônico de kindling, apresentaram um aumento na citocina IL-1 β maior que os grupos tratados com apenas uma dose de PTZ (30 mg/kg). A exposição repetida ao PTZ pode ser necessária para mediar o processo inflamatório e aumentar os níveis de citocinas pró-inflamatórias. (KOŁOSOWSKA et al., 2014) A pioglitazona apresentou aumento na expressão do TNF- α nos modelos agudos de PTZ, enquanto que nos modelos de inflamação crônica ocorreu uma redução dessa citocina. (ABDALLAH, 2010)

Alterações da expressão de fatores de transcrição e de genes neuroprotetores têm sido fortemente envolvidas na cascata de eventos moleculares que levam à epilepsia. Desta forma, diferenças na expressão de BDNF, COX2 e c-fos podem estar envolvidas na ocorrência e desenvolvimento da epilepsia. Muitas substâncias com atividade antiepiléptica são estudadas, no entanto seus mecanismos de ação ainda permanecem escassos. BDNF tem mostrado efeito pró, mas também produz efeito antiepiléptico. Múltiplos estímulos têm sido descritos que alteram a expressão de BDNF em estágios fisiológicos e patológicos. Convulsões aumentam a expressão da proteína e mRNA de BDNF (AMADA et al., 2013), no entanto, os dados deste trabalho contradizem esses resultados.

No teste de convulsão induzido por PTZ, camundongos tratados apenas com PTZ apresentaram redução na expressão de BDNF, enquanto que os animais tratados com PTZ e VRB na dose de 250mg/kg apresentaram aumento significativo na latência para o aparecimento da primeira convulsão, bem como a expressão de BDNF (gráfico 12).

Estudos recentes observaram que *Ganoderma lucidum*, um fungo oriental, demonstrou efeito antiepiléptico e aumentou significativamente a expressão de BDNF sendo inversamente proporcional a taxa de apoptose. (YANG et al., 2016) O flavonoide luteolin também foi capaz de reduzir a atividade epiléptica induzida por PTZ, aumentar a expressão de BDNF, além de reduzir os danos neuronais. (ZHEN et al., 2016) Desta forma, o aumento na expressão de BDNF, principalmente dos grupos tratados com VRB 250 mg/kg, pode estar associado ao efeito neuroprotetor de (1S)-(-)-verbenona, uma vez que BDNF é um dos muitos fatores neurotróficos conhecido por promover a sobrevivência e o crescimento de uma variedade de neurônios.

A suplementação de FGF-2 (Fator de crescimento fibroblástico 2) e BDNF, em hipocampo epileptogênico, reduziu a frequência e a severidade de convulsões induzidas por pilocarpina. Esta neuroproteção pode está envolvida na capacidade de BDNF e FGF-2 em diminuir a perda neuronal. (PARADISO et al., 2011) Injeções intrahipocampal com BDNF em camundongos submetidos ao teste de pilocarpina, observou também uma redução da amplitude e frequência das convulsões quando comparado ao grupo tratado apenas com pilocarpina. (EFTEKHARI et al., 2016)

A COX-2 é uma enzima chave responsável pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, potentes mediadores da sinalização inflamatória. (BARBALHO et al., 2016) A relação entre a epilepsia e inflamação tem sido estabelecida, no entanto o mecanismo de COX-2 na neuropatologia não está bem compreendido. Nossos resultados demonstraram um aumento na expressão de COX-2 nos grupos pré tratados com VRB na dose de 200 e 250mg/kg submetidos a PTZ (gráfico 13), quando comparado com o grupo apenas tratado com PTZ. Como as prostaglandinas desempenham um papel importante nas respostas inflamatórias, suas funções na epileptogênese têm sido estudadas por um período de tempo considerável, no entanto, os dados sobre os papéis da COX-2 na epilepsia parecem ser bidirecionais.

Por exemplo, o tratamento pós- crise com o inibidor seletivo de COX-2 (NS-398, após uma injeção de ácido caínico (KA), impediu a perda de células neuronais no hipocampo. (TAKEMIYA et al., 2006) No entanto, a administração de outros inibidores da COX-2, nimesulida e celecoxib, 1 hora antes de uma injeção de KA, agravou fortemente as crises induzidas por KA e aumentou a taxa de mortalidade dos animais. (KUNZ et al., 2001; GOBBO; O'MARA, 2004) A inibição da ativação da COX-2 antes da indução da convulsão, resulta num aumento da mortalidade e comportamentos de convulsões exacerbados nos camundongos. (BAIK et al., 1999)

Alguns estudos de lesões cerebrais traumáticas com roedores indicam que a atividade aguda de COX-2 pode ser benéfica. Produção imediata de tromboxano, por exemplo, poderia ajudar na hemostasia e reduzir a exposição do cérebro a sangue. (GOPEZ et al., 2005). Esses resultados conflitantes podem ser parcialmente explicados por possíveis papéis duais para a COX-2, que demonstrou desempenhar papéis neuroprotetores e neurotóxicos. Efeitos iniciais de COX-2 apresentaria seu papel na neuroproteção e seus efeitos tardios uma função na hiperexcitabilidade neuronal (SHIMADA et al., 2014), podendo explicar seu papel na neuproteção nos testes de convulsões agudos observados nos resultados deste trabalho.

O aspecto bifuncional de COX-2 na epileptogênese também pode ser devido a diversidade de prostaglandinas que a COX induz. Por exemplo, inibições de PGD2 em camundongos nocautes submetidos a convulsões induzidas por PTZ, mostraram maiores severidades nas convulsões quando comparados com o grupo selvagem. (KAUSHIK et al., 2014) A administração intracerebral de $\text{PGF}_2\alpha$ antes do tratamento com KA reduziu o escore de convulsões e a taxa de mortalidade (CHUNG et al., 2013), onde as prostaglandinas podem exibir um efeito anticonvulsivante.

Em nossos resultados, o aumento significativo da expressão de c-fos nos grupos tratados apenas com PTZ, foi significativo (gráfico 14), apresentando uma expressão superior quando comparado aos demais genes. Muitas substâncias isoladas de plantas têm demonstrado um efeito protetor das convulsões devido a uma redução da expressão de c-fos. Estudos prévios tem demonstrado um aumento significativo da expressão de c-fos, em várias regiões do cérebro, submetidos a convulsão induzidas por PTZ. (DRAGUNOW et al., 1988; SAGAR et al., 1988)

Todos os grupos tratados com VRB foram capazes de reduzir a expressão de c-fos, de forma semelhante ao grupo tratado com a droga padrão, quando

comparado ao grupo PTZ. A capacidade de VRB em reduzir a expressão de c-fos, mesmo em baixas doses, mostra o grande potencial neuroprotetor de VRB, assim como também observado em outras substâncias isoladas. Alcaloides totais extraídos de Fuzi, uma planta ocidental utilizada para o tratamento de várias doenças, aumentou a latência das convulsões induzidas por PTZ. Fuzi mostrou uma inibição significativa da expressão de c-fos no hipocampo de camundongos. (LI et al., 2013)

O proto-oncogene c-fos é um dos membros de genes iniciadores imediatos (IEGs) envolvido na excitação neuronal e desempenham um papel fundamental em eventos de epilepsia. (MATSUOKA et al., 1997) Nossos resultados demonstram uma concentração da expressão de c-fos basal do grupo veículo. De acordo com Shreiber e colaboradores (1991) a concentração de c-fos é muito baixa nas células neuronais, no entanto, pode ser induzida ao aumento em resposta a vários estímulos tais como convulsões, sendo assim considerado um marcador fundamental para alterações neuronais.

A despolarização neuronal desencadeada pelo PTZ, aumenta os níveis de AMPc e Ca^{++} que culmina na fosforilação de CREB, que por sua vez ativa a transcrição do proto-oncogene c-fos, um fator de transcrição para uma variedade de genes específicos de neurônios. (FLAVELL; GREENBERG, 2008) Convulsões prolongadas induzidas por PTZ estão diretamente relacionadas a morte neuronal, e desta forma, a expressão aumentada de c-fos também é um evento crucial observado nestes neurônios. (SMEYNE et al., 1993) Nestes experimentos podemos hipotetizar que VRB foi capaz de aumentar a latência para o aparecimento de convulsões induzidas por PTZ, além de reduzir a expressão de c-fos, mesmo na menor dose estudada.

Na tentativa de mimetizar as convulsões observadas nos seres humanos, o modelo de convulsão conhecido como *kindling* (abrasamento) foi realizado para investigar a capacidade de VRB no tratamento de convulsões crônicas. Este modelo consiste da administração de uma dose subconvulsivante de forma repetitiva. (MCNAMARA, 1984, GODDARD 1969) Após a instalação desse processo, podem-se desencadear crises convulsivas espontâneas em dias ou até meses após o abrasamento inicial. (LÖSCHER, 2002) Algumas substâncias pertencentes às classes dos benzodiazepínicos e barbitúricos, apresentam uma excitabilidade neuronal diminuída sob influência de agentes convulsivantes que mimetizam o

modelo crônico. (LÖSCHER; SCHMIDT, 2006) Logo, a investigação de drogas neste modelo, fornece dados sugestivos de eficácia clínica das mesmas. (MEHLA et al. 2010)

Ficus plathyphylla, é uma planta utilizada na medicina popular na Nigéria. Seu extrato metanólico apresentou atividade no tratamento de convulsão crônica induzidas pelo teste de *kindling*. O extrato demonstrou melhora na severidade das convulsões, no déficit cognitivo e redução da diminuição das células neuronais. Este composto também demonstrou afinidade pelos receptores GABAérgico e glutamatérgicos. (CHINDO et al., 2014) No entanto, é necessário compreender qual elemento bioativo apresenta esta atividade.

Muitas substâncias isoladas vêm mostrando efeito significativo nos experimentos de estimulação crônica. O monoterpeno timol, na dose de (25 mg/kg, i.p.), foi analisado no modelo crônico de convulsão (*kindling*). Esta dose foi capaz de reduzir os níveis dos escores da progressão da convulsão, quando comparado ao grupo controle e reduzir os níveis de glutatona e malondialdeído. (SANCHETI et al., 2014)

Neste trabalho, foi possível evidenciar o estabelecimento deste modelo crônico no terceiro dia de administração da subdose de PTZ (35 mg/kg). Neste período, os animais do grupo controle já apresentaram aumento nos escores estabelecidos, diferente dos animais tratados com o benzodiazepínicos (DZP) onde as médias dos escores mantiveram-se inferior a 2 (gráfico 15). Apenas no segundo e terceiro dia de administração de subdoses de PTZ, VRB foi capaz de reduzir as médias dos escores. No entanto, este efeito não manteve-se ao longo do experimento. VRB 40 e VRB 80 mesmo não apresentando efeito antiepileptogênico neste modelo crônico, foi possível observar uma redução na taxa de mortalidade quando comparado ao grupo controle.

A ausência de efeito de VRB no teste de convulsão crônico pode ser explicado devido ao ajuste da dose para este modelo. Além das doses inferiores ao modelo agudo, estudos mostram que alterações na estrutura da molécula podem gerar isômeros com atividades diferenciadas. Neste experimento não avaliamos outros isômeros de VRB, podendo ser uma alternativa para o efeito positivo no teste do *kindling*.

O modelo de convulsão crônico induzido por PTZ (kindling) aumenta os danos no DNA devido a ativação da cascata de sinalização que culminará na apoptose das células neuronais e células gliais. (OLIVEIRA et al., 2008). Estas alterações foram observadas nos camundongos.

Uma vez que VRB não apresentou efeito sobre o teste de convulsão crônico, não foi avaliado o mecanismo envolvido neste processo como realizado no experimento agudo. No entanto, diante da capacidade de redução do percentual de morte dos camundongos, foi investigado através de análise histológica o estado dos hipocampus dos diferentes grupos.

Através da análise histológica dos hipocampus tratados com VRB, foi possível observar uma redução na morte das células neurais em comparação ao grupo controle. A redução da taxa de mortalidade das células neuronais pôde ser observada devido ao aumento da expressão do gene BDNF evidenciado no modelo agudo. Yang e colaboradores (2016) observaram que camundongos pré tratados com o triterpeno, ácido ganodérico, extraído de um fungo *Ganoderma lucidum*, aumentou a expressão de BDNF, podendo ser responsável pela redução da morte neuronal dos camundongos em um modelo de convulsão crônico. A intensidade de fluorescência de BDNF nos grupos tratados com ácido gonadérico foi aumentada em comparação ao grupo controle e a taxa de apoptose dos neurônios mostrou inversamente proporcional a expressão de BDNF. Um dos muitos fatores neurotróficos conhecido por promover a sobrevivência e o crescimento de uma variedade de neurônios é o BDNF.

Borneol, um monoterpeneo bicíclico que atravessa facilmente a barreira hematocefálica, demonstrou reduzir o stress oxidativo e processo inflamatório. No teste de convulsão crônico induzido por PTZ, borneol foi capaz de reduzir os danos neuronais dos hipocampus corados pela técnica de hematoxilina e eosina. Alterações bioquímicas induzidas pelo teste de kindling foram amenizadas através do pré tratamento com boneol, mostrando aumento dos níveis de SOD (dismutase superoxidase), GSH (glutathiona redutase) e CAT (catalase). (TAMBE et al., 2016)

Octreotide, um análogo da somatostatina, apresentou redução dos efeitos provocados pelo kindling, diminuiu o nível da caspase 3, o nível de óxido nítrico além de reduzir o nível da dopamina cortical. Desta forma, octreotide pode ter reduzido os efeitos deste modelo crônico a partir de controlar os mecanismos inflamatórios e

redução dos processos apoptóticos provocados por este modelo de convulsão. (AL-SHORBAGY; NASSAR, 2017).

O efeito de nerolidol um dos muitos fito constituintes presentes nos óleos essenciais de plantas aromáticas, assim como VRB, foi investigado no teste convulsão crônico estabelecido pelo tratamento com PTZ e em modelos comportamentais. Os resultados mostraram que nerolidol reduziu significativamente a progressão do kindling, além de aumentar os níveis de noradrenalina no córtex e nos hipocampus destes camundongos, quando comparado ao grupo veículo. (KAUR et al., 2016)

A epileptogênese, por ser um processo altamente complexo, não deve ser vista apenas através do componente neuronal. Confirmando isto, estudos não clínicos e clínicos tem, cada vez mais, mostrado a participação de outras estruturas no desenvolvimento da epilepsia, como células da glia (WETHERINGTON; SERRANO; DINGLEDINE, 2008), vasculatura cerebral (FRIEDMAN; KAUFER, HEINEMANN, 2009) e leucócitos periféricos. (GREENWOOD et al., 2002) As células da glia, por exemplo, tem seu mecanismo epileptogênico explicado através do aumento da excitabilidade neuronal e por ocasionar a instalação de processos inflamatórios, cujo papel na epilepsia vem sendo extensivamente investigado.

É importante ressaltar que alteração na dose das substâncias pode levar a uma mudança no seu efeito anticonvulsivante. Desta forma, VRB pode não ter sido eficiente na redução das convulsões crônicas induzidas por PTZ devido aos ajustes para as doses de 40, 60 e 80 mg/kg. Além da dose, mudança na estrutura química das substâncias podem também levar a alterações no seus efeitos farmacológicos.

Algumas substâncias mostram-se eficientemente diferentes em relação aos seus isômeros. O isômero trans-2-en-valproato mostrou atividade anticonvulsivante maior do que o valproato no teste do “kindling” ou abrasamento, apesar deste evento ocorrer em doses que promoviam a falta de coordenação motora nos animais. (HÖNACK; RUNDFELDT; LÖSCHER, 1992)

Desta forma, os resultados observados neste trabalho evidenciam o efeito protetor de VRB no teste de convulsão agudo induzido por PTZ. No entanto, por ser um estudo preliminar, os resultados obtidos darão um direcionamento futuro para o mecanismo farmacológico envolvido na ação anticonvulsivante de VRB, podendo torná-la promissora no desenvolvimento de novos fármacos. Estes achados

caracterizam a relevância deste monoterpeno bem como serve de base para as pesquisas acerca desta temática. Assim, é necessária mais pesquisas para entender o mecanismo de ação da VRB nos modelos de epilepsia estudados neste trabalho.



Conclusões

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos com VRB é possível obter as seguintes conclusões:

- As doses experimentais utilizadas de VRB foram seguras
- Não foram observadas alterações na coordenação motora.
- VRB não obteve êxito nos testes de convulsões químicos induzidos por pilocarpina e estriknina, porém apresentou atividade sobre as convulsões induzidos por estimulação elétrica apenas na dose de 250 mg/kg.
- VRB apresentou atividade anticonvulsivante significativa no teste de convulsão agudo induzido por PTZ nas doses de 200 ou 250 mg/kg.
- O mecanismo de ação anticonvulsivante de VRB envolvendo canais iônicos ainda é passível de estudos mais detalhados.
- Não houve alterações nos níveis de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF α dos animais tratados com VRB submetidos ao teste de convulsão agudo mediado por PTZ.
- As expressões dos genes BDNF e COX-2 foram aumentadas nos animais submetidos ao teste agudo induzido por PTZ, e a expressão de c-fos foi significativamente reduzida nos animais tratados com VRB.
- VRB não apresentou efeito anticonvulsivante no modelo de abasamento por PTZ.
- VRB exibiu neuroproteção na região do hipocampo nos animais submetidos ao teste do “kindling” promovendo redução da morte neuronal.

REFERÊNCIAS

ABDALLAH, Dalaal M. Anticonvulsant potential of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist pioglitazone in pentylenetetrazole-induced acute seizures and kindling in mice. **Brain research**, v. 1351, p. 246-253, 2010.

ADONGO, Donatus Wewura *et al.* Anticonvulsant activity of *Pseudospondias microcarpa* (A. Rich) Engl. hydroethanolic leaf extract in mice: the role of excitatory/inhibitory neurotransmission and nitric oxide pathway. **Journal Of Ethnopharmacology**. Ireland, May 17, 2017.

ALMEIDA, Reinaldo Nóbrega. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

ALMEIDA, Reinaldo Nóbrega *et al.* Essential oils and their constituents: anticonvulsant activity. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2726-2742, 2011.

ALMEIDA, Reinaldo Nóbrega *et al.* Anticonvulsant effect of a natural compound α , β -epoxy-carvone and its action on the nerve excitability. **Neuroscience letters**, v. 443, n. 1, p. 51-55, 2008.

AL-SHORBAGY, M. Y.; NASSAR, Noha N. Octreotide ameliorates inflammation and apoptosis in acute and kindled murine PTZ paradigms. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 390, n. 1, p. 61-68, 2017.

AMADA, Naoki *et al.* Cannabidivarin (CBDV) suppresses pentylenetetrazole (PTZ)-induced increases in epilepsy-related gene expression. **PeerJ**, v. 1, p. e214, 2013.

AMARA, Susan G.; FONTANA, Andreia CK. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. **Neurochemistry international**, v. 41, n. 5, p. 313-318, 2002.

ANGELES, Dr KF. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. **Epilepsia**, v. 22, n. 4, p. 489-501, 1981.

ATTI-SANTOS, Ana Cristina *et al.* Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. essential oils. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 6, p. 1035-1039, 2005.

BAKER, Gus A.; JACOBY, Ann; CHADWICK, David W. The associations of psychopathology in epilepsy: a community study. **Epilepsy research**, v. 25, n. 1, p. 29-39, 1996.

BARDE, Yves-Alain; EDGAR, David; THOENEN, Hans. Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. **The EMBO journal**, v. 1, n. 5, p. 549, 1982.

BAIK, Eun Joo et al. Cyclooxygenase-2 selective inhibitors aggravate kainic acid induced seizure and neuronal cell death in the hippocampus. **Brain research**, v. 843, n. 1, p. 118-129, 1999.

BARBALHO, Patrícia Gonçalves et al. Cyclooxygenase-1 as a Potential Therapeutic Target for seizure suppression: evidences from Zebrafish Pentylene-tetrazole-seizure Model. **Frontiers in Neurology**, v. 7, 2016.

BENGZON, J. et al. Regulation of neurotrophin and trka, trkb and trkc tyrosine kinase receptor messenger RNA expression in kindling. **Neuroscience**, v. 53, n. 2, p. 433-446, 1993.

BERG, Anne T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676-685, 2010.

BERNARDES, Wagner A. et al. Antibacterial Activity of the Essential Oil from *Rosmarinus officinalis* and its Major Components against Oral Pathogens. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 65, n. 9-10, p. 588-593, 2010.

BORMANN, Joachim; FEIGENSPAN, Andreas. GABA c receptors. **Trends in neurosciences**, v. 18, n. 12, p. 515-519, 1995.

BHUTADA, Pravinkumar et al. Anticonvulsant activity of berberine, an isoquinoline alkaloid in mice. **Epilepsy & Behavior**, v. 18, n. 3, p. 207-210, 2010.. ISSN: 1525-5069.

BRODIE, Martin J. et al. Antiepileptic drug therapy: does mechanism of action matter?. **Epilepsy & Behavior**, v. 21, n. 4, p. 331-341, 2011.. ISSN: 1525-5069.

CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy. **Ital J Neurol Sci**, v.16, n.1-2, p.33-7, 1995

COSTA, Dayane Alves et al. Anticonvulsant and antioxidant effects of cyano-carvone and its action on acetylcholinesterase activity in mice hippocampus. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 32, n. 4, p. 633-640, 2012.

CURTIS, D. R.; HÖSLI, L.; JOHNSTON, G. A. R. Inhibition of spinal neurones by glycine. **Nature**, v. 215, n. 5109, p. 1502-1503, 1967.

CHAPPELL, Joseph. The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. **Plant physiology**, v. 107, n. 1, p. 1, 1995.

CHINDO, Ben A.; SCHRÖDER, Helmut; BECKER, Axel. Methanol extract of *Ficus platyphylla* ameliorates seizure severity, cognitive deficit and neuronal cell loss in pentylene-tetrazole-kindled mice. **Phytomedicine**, v. 22, n. 1, p. 86-93, 2015.

CHUNG, Jee-In et al. Seizure susceptibility in immature brain due to lack of COX-2-induced PGF 2 α . **Experimental neurology**, v. 249, p. 95-103, 2013.

CLARK, Mike *et al.* Analysis of the hippocampal GABA A receptor system in kindled rats by autoradiographic and in situ hybridization techniques: contingent tolerance to carbamazepine. **Molecular brain research**, v. 26, n. 1, p. 309-319, 1994.

CLIFFORD, D. B. *et al.* The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. **Neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 953-968, 1987.

CRAVEIRO, Afrânio Aragão. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Edições UFC, 1981.

DA SILVA, Ana Flávia Schürmann *et al.* Anxiolytic-, antidepressant-and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, n. 1, p. 148-154, 2006.

DE SOUSA, Damião Pergentino; DE SOUSA OLIVEIRA, Fernando; DE ALMEIDA, Reinaldo Nóbrega. Evaluation of the central activity of hydroxydihydrocarvone. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 4, p. 811-812, 2006b.

DE SOUSA, Damião Pergentino *et al.* Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neuroscience Letters**, v. 401, n. 3, p. 231-235, 2006a.

DE SOUSA, Damião Pergentino *et al.* Influence of the chirality of (R)-(-)-and (S)-(+)-carvone in the central nervous system: A comparative study. **Chirality**, v. 19, n. 4, p. 264-268, 2007.

DE SOUSA, Damião Pergentino *et al.* Antinociceptive profile of 2-phenylselenenyl-1, 8-cineole in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 6, p. 910-911, 2004.

DE SOUSA, Damião Pergentino *et al.* Synthesis and antidepressant evaluation of three para-benzoquinone mono-oximes and their oxy derivatives. **Molecules**, v. 11, n. 2, p. 148-155, 2006c.

DREIFUSS *et al.* Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. From the Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. **Epilepsia**, v. 22, p. 489-501, 1981.

DECKERS, C. L. P. *et al.* Current limitations of antiepileptic drug therapy: a conference review. **Epilepsy research**, v. 53, n. 1, p. 1-17, 2003.

DEVINSKY, Orrin *et al.* Glia and epilepsy: excitability and inflammation. **Trends in neurosciences**, v. 36, n. 3, p. 174-184, 2013.

DHIR, Ashish. Pentylenetetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. **Current Protocols in Neuroscience**, p. 9.37. 1-9.37. 12, 2012.

DRAGUNOW, M.; ROBERTSON, H. A.; ROBERTSON, G. S. Amygdala kindling and c-fos protein (s). **Experimental neurology**, v. 102, n. 2, p. 261-263, 1988.

DUNHAM N.W.; MIYA T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc. Am. Pharm. Assoc.** v.46, p. 208–209, 1957.

EFTEKHARI, Sanaz et al. Brain derived neurotrophic factor modification of epileptiform burst discharges in a temporal lobe epilepsy model. **Basic and clinical neuroscience**, v. 7, n. 2, p. 115, 2016.

FONNUM, Frode. Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. **Journal of neurochemistry**, v. 42, n. 1, p. 1-11, 1984.

FLAVELL, Steven W.; GREENBERG, Michael E. Signaling mechanisms linking neuronal activity to gene expression and plasticity of the nervous system. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 31, p. 563-590, 2008.

FRIEDMAN, Alon; KAUFER, Daniela; HEINEMANN, Uwe. Blood–brain barrier breakdown-inducing astrocytic transformation: novel targets for the prevention of epilepsy. **Epilepsy research**, v. 85, n. 2, p. 142-149, 2009.

GAITATZIS, Athanasios *et al.* Life expectancy in people with newly diagnosed epilepsy. **Brain**, v. 127, n. 11, p. 2427-2432, 2004.

GILLIAM, Frank; CARTER, Jewell; VAHLE, Victoria. Tolerability of antiseizure medications Implications for health outcomes. **Neurology**, v. 63, n. 10 suppl 4, p. S9-S12, 2004.

GOBBO, O. L.; O'MARA, S. M. Post-treatment, but not pre-treatment, with the selective cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib markedly enhances functional recovery from kainic acid-induced neurodegeneration. **Neuroscience**, v. 125, n. 2, p. 317-327, 2004.

GODDARD, Graham V.; MCINTYRE, Dan C.; LEECH, Curtis K. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. **Experimental neurology**, v. 25, n. 3, p. 295-330, 1969.

GÓMEZ, Carlos D.; BUIJS, Rudolf M.; SITGES, María. The anti-seizure drugs vinpocetine and carbamazepine, but not valproic acid, reduce inflammatory IL-1 β and TNF- α expression in rat hippocampus. **Journal of neurochemistry**, v. 130, n. 6, p. 770-779, 2014.

GONZÁLEZ-TRUJANO, Ma Eva *et al.* Justicia spicigera Schltdl. and kaempferitrin as potential anticonvulsant natural products. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 240-248, 2017.

GOPEZ, Jonas J. *et al.* Cyclooxygenase-2-specific inhibitor improves functional outcomes, provides neuroprotection, and reduces inflammation in a rat model of traumatic brain injury. **Neurosurgery**, v. 56, n. 3, p. 590, 2005.

GOODMAN, Gilman. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: Ed. McGraw Hill, Ed. 12^a, 2012.

GUILHOTO, L. Revisão terminológica e conceitual para organização de crises e epilepsias: relato da Comissão da ILAE de Classificação e Terminologia, 2005-2009. Novos Paradigmas?. **J Epilepsy**, v. 17, n. 3, p. 100-105, 2011.

GREENWOOD, John *et al.* Lymphocyte migration into the central nervous system: implication of ICAM-1 signalling at the blood–brain barrier. **Vascular pharmacology**, v. 38, n. 6, p. 315-322, 2002.

HAGHIKIA, Aiden *et al.* Implications of antiinflammatory properties of the anticonvulsant drug levetiracetam in astrocytes. **Journal of neuroscience research**, v. 86, n. 8, p. 1781-1788, 2008.

HARVEY, Robert J.; YEE, Benjamin K. Glycine transporters as novel therapeutic targets in schizophrenia, alcohol dependence and pain. **Nature reviews Drug discovery**, v. 12, n. 11, p. 866-885, 2013.

HIGASHIMA, Masato *et al.* Involvement of GABA A and GABA B receptors in afterdischarge generation in rat hippocampal slices. **Brain research**, v. 865, n. 2, p. 186-193, 2000.

HÖNACK, Dagmar; RUNDFELDT, Chris; LÖSCHER, Wolfgang. Pharmacokinetics, anticonvulsant efficacy, and adverse effects of trans-2-en-valproate after acute and chronic administration in amygdala-kindled rats. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 345, n. 2, p. 187-196, 1992.

IVERSEN, Leslie. GABA pharmacology—what prospects for the future?. **Biochemical pharmacology**, v. 68, n. 8, p. 1537-1540, 2004.

JACOB, Tija C.; MOSS, Stephen J.; JURD, Rachel. GABAA receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 9, n. 5, p. 331-343, 2008.

JACOBS, M.P.; LEBLANC, G.G.; BROOKS-KAYAL, A.; *et al.* Curing epilepsy: progress and future directions. **Epilepsy & Behavior**, v.14, p.438-445, 2009.

JALLON, Pierre. Epilepsy and epileptic disorders, an epidemiological marker? Contribution of descriptive epidemiology. **Epileptic disorders: international epileptic journal with videotape**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2002.

JOBIM, Micheli Lamberti *et al.* Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism. **Microbiological research**, v. 169, n. 4, p. 314-323, 2014.

JU, Chung *et al.* Discovery of novel (1S)-(-)-verbenone derivatives with anti-oxidant and anti-ischemic effects. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 23, n. 19, p. 5421-5425, 2013b.

JU, Chung *et al.* Up-regulation of astroglial heme oxygenase-1 by a synthetic (S)-verbenone derivative LMT-335 ameliorates oxygen–glucose deprivation-evoked injury in cortical neurons. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 431, n. 3, p. 484-489, 2013a.

KAUR, Dilpreet; PAHWA, Priyanka; GOEL, Rajesh Kumar. Protective Effect of Nerolidol Against Pentylene-tetrazol-Induced Kindling, Oxidative Stress and Associated Behavioral Comorbidities in Mice. **Neurochemical research**, v. 41, n. 11, p. 2859-2867, 2016.

KAUSHIK, Mahesh K. *et al.* Prostaglandin D 2 is crucial for seizure suppression and postictal sleep. **Experimental neurology**, v. 253, p. 82-90, 2014.

KERR, David IB; ONG, Jennifer. GABAB receptors: targets for drug development. **Drug Discovery Today**, v. 1, n. 9, p. 371-380, 1996.

KOŁOSOWSKA, Karolina *et al.* The role of interleukin-1 β in the pentylene-tetrazole-induced kindling of seizures, in the rat hippocampus. **European journal of pharmacology**, v. 731, p. 31-37, 2014.

KULKARNI, S. K.; DHIR, Ashish. Cyclooxygenase in epilepsy: from perception to application. **Drugs of today (Barcelona, Spain: 1998)**, v. 45, n. 2, p. 135-154, 2009.

KUNZ, Tina; OLIW, Ernst H. The selective cyclooxygenase-2 inhibitor rofecoxib reduces kainate-induced cell death in the rat hippocampus. **European Journal of Neuroscience**, v. 13, n. 3, p. 569-575, 2001.

KURTZ, Zarrina; TOOKEY, Pat; ROSS, Euan. Epilepsy in young people: 23 year follow up of the British national child development study. **Bmj**, v. 316, n. 7128, p. 339-342, 1998.

KWAN P, SILLS GJ, BRODIE MJ. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. **Pharmacology Therapy**. V.90, p. 21-34, 2001.

LAJUNEN, Marja K.; MAUNULA, Tatja; KOSKINEN, Ari MP. Co (II) catalysed oxidation of α -pinene by molecular oxygen. Part 2. **Tetrahedron**, v. 56, n. 41, p. 8167-8171, 2000.

LARMET, Yves *et al.* Protective effects of brain-derived neurotrophic factor on the development of hippocampal kindling in the rat. **Neuroreport**, v. 6, n. 14, p. 1937-1941, 1995.

LAXER, Kenneth D. *et al.* The consequences of refractory epilepsy and its treatment. **Epilepsy & Behavior**, v. 37, p. 59-70, 2014.

LIMA, Daniella KS *et al.* Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C. DC in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 274-282, 2012.

LONGRIGG, James. Epilepsy in ancient Greek medicine—the vital step. **Seizure**, v. 9, n. 1, p. 12-21, 2000.

LÖSCHER, Wolfgang. Basic pharmacology of valproate. **CNS drugs**, v. 16, n. 10, p. 669-694, 2002.a.

LÖSCHER W.; SCHMIDT D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy research**, v. 2, n. 3, p. 145-181, 1988.

LÖSCHER, Wolfgang; SCHMIDT, Dieter. Experimental and clinical evidence for loss of effect (tolerance) during prolonged treatment with antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 47, n. 8, p. 1253-1284, 2006.

LÖSCHER, Wolfgang *et al.* New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. **Nature reviews drug discovery**, v. 12, n. 10, p. 757-776, 2013.

LI, Bingjin *et al.* Anticonvulsant effects of fuzi total alkaloid on pentylenetetrazole-induced seizure in mice. **Journal of pharmacological sciences**, v. 123, n. 2, p. 195-198, 2013.

MARCHETTI, Renato Luiz *et al.* Transtornos mentais associados à epilepsia. **Rev Psiq Clín**, v. 32, n. 3, p. 170-82, 2005.

MARTINEZ-VELAZQUEZ, M. *et al.* Acaricidal effect of essential oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 4, p. 822-827, 2011.

MATHERN, Gary W. *et al.* The pathogenic and progressive features of chronic human hippocampal epilepsy. **Epilepsy research**, v. 26, n. 1, p. 151-161, 1996.

MATOTH, Israel *et al.* Inhibitory effect of carbamazepine on inflammatory mediators produced by stimulated glial cells. **Neuroscience research**, v. 38, n. 2, p. 209-212, 2000.

MATSUOKA, Masato; WISPRIYONO, Bambang; IGISU, Hideki. Induction of c-fos gene by mercury chloride in LLC-PK 1 cells. **Chemico-biological interactions**, v. 108, n. 1, p. 95-106, 1997.

MEHLA, Jogender *et al.* Protective effect of curcumin against seizures and cognitive impairment in a pentylenetetrazole-kindled epileptic rat model. **Life sciences**, v. 87, n. 19, p. 596-603, 2010.

MELDRUM, Brian. Do preclinical seizure models preselect certain adverse effects of antiepileptic drugs. **Epilepsy research**, v. 50, n. 1, p. 33-40, 2002.

MELLO, Luiz Eugênio Araújo de Moraes; BORTOLOTO, Zuner Assis; CAVALHEIRO, Esper Abrão. Modelos experimentais de epilepsia: uma revisão. **Neurobiologia**, v. 49, n. 3, p. 68-231, 1986.

MÉNDEZ, Pablo; BACCI, Alberto. Assortment of GABAergic plasticity in the cortical interneuron melting pot. **Neural plasticity**, v. 2011, p.1-14, 2011.

MIYAZAWA, Mitsuo; SUGIE, Atsushi; SHIMADA, Tsutomu. ROLES OF HUMAN CYP2A6 AND 2B6 AND RAT CYP2C11 AND 2B1 IN THE 10-HYDROXYLATION OF (-)-VERBENONE BY LIVER MICROSOMES. **Drug metabolism and disposition**, v. 31, n. 8, p. 1049-1053, 2003.

MOGLIONI, Albertina G. *et al.* Stereoselective synthesis of cyclobutyl GABA analogues and related compounds from (-)-(S)-verbenone. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 13, n. 5, p. 451-454, 2002.

MOREIRA, Sebastião Rogério Góis. Epilepsia: concepção histórica, aspectos conceituais, diagnóstico e tratamento. **Mental**, v. 2, n. 3, p. 107-122, 2004.

MCNAMARA, Robert K.; SKELTON, Ronald W. The neuropharmacological and neurochemical basis of place learning in the Morris water maze. **Brain Research Reviews**, v. 18, n. 1, p. 33-49, 1993.

MCNAMARA, James O. Kindling: An animal model of complex partial epilepsy. **Annals of Neurology**, v.16, p.72-76, 1984.

NEDER, Luciano *et al.* Glutamate NMDA receptor subunit R1 and GAD mRNA expression in human temporal lobe epilepsy. **Cellular and molecular neurobiology**, v. 22, n. 5, p. 689-698, 2002.

NOZADZE, M. *et al.* Anticonvulsant activities of myo-inositol and scyllo-inositol on pentylenetetrazol induced seizures. **Seizure**, v. 20, n. 2, p. 173-176, 2011.

NGUGI, Anthony K. *et al.* Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. **Epilepsia**, v. 51, n. 5, p. 883-890, 2010.

NSOUR, W. M.; LAU, CB-S.; WONG, I. C. K. Review on phytotherapy in epilepsy. **Seizure**, v. 9, n. 2, p. 96-107, 2000.

O'CALLAGHAN, Finbar JK; OSMOND, Clive; MARTYN, Christopher N. Trends in epilepsy mortality in England and Wales and the United States, 1950–1994. **American journal of epidemiology**, v. 151, n. 2, p. 182-189, 2000.

OLIVEIRA, Paulo Alexandre *et al.* Effects of gamma-decanolactone on seizures induced by PTZ-kindling in mice. **Experimental brain research**, v. 187, n. 1, p. 161-166, 2008.

OLSEN, Richard W.; AVOLI, Massimo. GABA and epileptogenesis. **Epilepsia**, v. 38, n. 4, p. 399-407, 1997.

OTTOMAN, Ruth. Analysis of genetically complex epilepsies. **Epilepsia**, v. 46, n. s10, p. 7-14, 2005.

PARADISO, Beatrice *et al.* Localized overexpression of FGF-2 and BDNF in hippocampus reduces mossy fiber sprouting and spontaneous seizures up to 4 weeks after pilocarpine-induced status epilepticus. **Epilepsia**, v. 52, n. 3, p. 572-578, 2011.

PARADISO, Beatrice *et al.* Localized overexpression of FGF-2 and BDNF in hippocampus reduces mossy fiber sprouting and spontaneous seizures up to 4 weeks after pilocarpine-induced status epilepticus. **Epilepsia**, v. 52, n. 3, p. 572-578, 2011.

PEDLEY, Timothy A. As epilepsias. In: **Tratado de Medicina Interna**. GOLDMAN, Lee; BENNETT, J. Claude Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 2001.

PELLOW, Sharon; FILE, Sandra E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in an elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 24, n. 3, p. 525-529, 1986.

PERUCCA E, MEADOR KJ. Adverse effects of antiepileptic drugs. **Acta Neurol Scand Suppl** 181: p.30–35, 2005

PIRES, Lúcio Fernandes *et al.* Neuropharmacological effects of carvacryl acetate on δ -aminolevulinic dehydratase, Na⁺, K⁺-ATPase activities and amino acids levels in mice hippocampus after seizures. **Chemico-biological interactions**, v. 226, p. 49-57, 2015.

PHILIPPE, Geneviève *et al.* About the toxicity of some Strychnos species and their alkaloids. **Toxicon**, v. 44, n. 4, p. 405-416, 2004.

PRASAD, N. Rajendra *et al.* Antidermatophytic activity of extracts from *Psoralea corylifolia* (Fabaceae) correlated with the presence of a flavonoid compound. **Journal of ethnopharmacology**, v. 91, n. 1, p. 21-24, 2004.

PRAVEEN, K. U. *et al.* Evaluation of antiepileptic activity of methanolic extract of *Brassica nigra* seeds in mice. **Journal of Pharmaceutical Innovation**, v.3, p.73–84, 2013.

PUTNAM, T. B.; MERRITT, H. Houston. Experimental determination of the anticonvulsant properties of some phenyl derivatives. **Science**, v.85, p.525–526, 1937.

QUINTANS-JÚNIOR, Lucindo José *et al.* Antinociceptive effects of citronellal in formalin-, capsaicin-, and glutamate-induced orofacial nociception in rodents and its action on nerve excitability. **J Orofac Pain**, v. 24, n. 3, p. 305-12, 2010.

RAO, V.R.; LOWENSTEIN, D.H. Epilepsy. **Current Biology**, v.25, n.17, p.42-46, 2015.

RAVID, Uzi *et al.* Nativ. Identification of (1R)(+)-verbenone in essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 12, p. 109-112, 1997.

RIAZI, Kiarash; GALIC, Michael A.; PITTMAN, Quentin J. Contributions of peripheral inflammation to seizure susceptibility: cytokines and brain excitability. **Epilepsy research**, v. 89, n. 1, p. 34-42, 2010.

RIIKONEN, Raili. Infantile spasms: therapy and outcome. **Journal of Child Neurology**, v.19, p.401-404, 2004.

ROGAWSKI, Michael A. Diverse mechanisms of antiepileptic drugs in the development pipeline. **Epilepsy research**, v. 69, n. 3, p. 273-294, 2006.

RHODES, Madeline E.; FRYE, Cheryl A. Progestins in the hippocampus of female rats have antiseizure effects in a pentylenetetrazole seizure model. **Epilepsia**, v. 45, n. 12, p. 1531-1538, 2004.

SAGAR S.M.; SHARP Frank R.; CURRAN T. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. **Science** 240 p. 1328-1331, 1988.

SALGADO, Priscila Camile Barioni; SOUZA, Elisabete Abib Pedroso de. Impacto da epilepsia no trabalho: avaliação da qualidade de vida. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 60, n. 2, p. 442-445, 2002.

SALGADO, Paula Regina Rodrigues *et al.* Comparative anticonvulsant study of epoxycarvone stereoisomers. **Molecules**, v. 20, n. 11, p. 19660-19673, 2015.

SANCHETI, Jayant *et al.* Characterization of anticonvulsant and antiepileptogenic potential of thymol in various experimental models. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 387, n. 1, p. 59-66, 2014.

SILVA A. V.; CABRAL F. R.; Ictogênese, Epileptogênese e Mecanismo de Ação das Drogas na Profilaxia e Tratamento da Epilepsia. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**. v. 14, p.39-45, 2008.

SIMJEE, Shabana Usman *et al.* Suppression of c-Fos protein and mRNA expression in pentylenetetrazole-induced kindled mouse brain by isoxylitones. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 47, n. 3, p. 559-570, 2012.

SITGES, María; GÓMEZ, Carlos D.; ALDANA, Blanca I. Sertraline reduces IL-1 β and TNF- α mRNA expression and overcomes their rise induced by seizures in the rat hippocampus. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e111665, 2014.

SCHAUWECKER, P. Elyse. Strain differences in seizure-induced cell death following pilocarpine-induced status epilepticus. **Neurobiology of disease**, v. 45, n. 1, p. 297-304, 2012.

SCHARFMAN, Helen E. The neurobiology of epilepsy. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v.7, p.348–354, 2007.

SCHREIBER, Steven S. *et al.* Activation of immediate early genes after acute stress. **Neuroreport**, v. 2, n. 1, p. 17-20, 1991.

SCHREIBER, Steven S. *et al.* A negative correlation between the induction of long-term potentiation and activation of immediate early genes. **Molecular brain research**, v. 11, n. 1, p. 89-91, 1991.

SHEN, Hai-Ying *et al.* Glycine transporter 1 is a target for the treatment of epilepsy. **Neuropharmacology**, v. 99, p. 554-565, 2015.

SHIMADA, Tadayuki *et al.* Role of inflammatory mediators in the pathogenesis of epilepsy. **Mediators of inflammation**, v. 2014, 2014.

SHNEKER, Bassel F.; FOUNTAIN, Nathan B. Epilepsy. **Disease-a-Month**. v.49(7), p.426-447, 2003.

SMEYNE, Richard J. *et al.* Continuous c-fos expression precedes programmed cell death in vivo. **Nature**, v. 363, n. 6425, p. 166, 1993.

SMITH, D. Defalla ba, Chadwick DW. The misdiagnosis of epilepsy and the management of refractory epilepsy in a specialist clinic. **Qjm**, v. 92, n. 1, p. 15-23, 1999.

STALEY, Kevin. Molecular mechanisms of epilepsy. **Nature neuroscience**, v.18, n.3, p.367-372, 2015.

SWINYARD, Ewart A. Laboratory assay of clinically effective antiepileptic drugs*,†† This investigation was supported from the Division of Research Grants and Fellowships of the National Institute of Health, US Public Health Service. **Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)**, v. 38, n. 4, p. 201-204, 1949.

TABASSUM, Rizwana *et al.* Perillyl alcohol improves functional and histological outcomes against ischemia–reperfusion injury by attenuation of oxidative stress and repression of COX-2, NOS-2 and NF-κB in middle cerebral artery occlusion rats. **European journal of pharmacology**, v. 747, p. 190-199, 2015.

TAKEMIYA, Takako *et al.* Prostaglandin E 2 produced by late induced COX-2 stimulates hippocampal neuron loss after seizure in the CA3 region. **Neuroscience research**, v. 56, n. 1, p. 103-110, 2006.

TAMBE, Rufi *et al.* Antiepileptogenic effects of borneol in pentylenetetrazole-induced kindling in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 389, n. 5, p. 467-475, 2016.

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

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

DE BARROS, Glauce Socorro *et al.* Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, n. 11, p. 1314-1317, 2000.

WATKINS JC. **L-glutamate as a central neurotransmitter**: looking back. *Biochem Soc Trans* 8(4): p.297-309, 2000.

WETHERINGTON, Jonathon; SERRANO, Geidy; DINGLEDINE, Ray. Astrocytes in the epileptic brain. **Neuron**, v. 58, n. 2, p. 168-178, 2008.

WIRRELL, Elaine; FARRELL, Kevin; WHITING, Sharon. The epileptic encephalopathies of infancy and childhood. **Canadian Journal of Neurological Sciences/Journal Canadien des Sciences Neurologiques**, v. 32, n. 04, p. 409-415, 2005.

WHITE, H. Steve; SMITH, Misty D.; WILCOX, Karen S. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. **International Review of Neurobiology**, v.81, p.85-110, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION *et al.* **Atlas: epilepsy care in the world**. Geneva, Switzerland, 2005.

XU, Dan; MILLER, Stephen D.; KOH, Sookyong. Immune mechanisms in epileptogenesis. **Frontiers in Cellular Neuroscience** (7) p.1-8, 2013.

YACUBIAN, Elza Márcia Targas. Tratamento da epilepsia na infância. **Jornal de Pediatria**, v.78, n.1, p.S19-S27, 2002.

YANG, Zhi-Wei; WU, Fei; ZHANG, Sheng-Li. Effects of ganoderic acids on epileptiform discharge hippocampal neurons: insights from alterations of BDNF, TRPC3 and apoptosis. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 6, p. 340-344, 2016.

ZHEN, Jun-Li *et al.* Luteolin rescues pentylenetetrazole-induced cognitive impairment in epileptic rats by reducing oxidative stress and activating PKA/CREB/BDNF signaling. **Epilepsy & Behavior**, v. 57, p. 177-184, 2016.

ZHU, Hui-Ling *et al.* Medicinal compounds with antiepileptic/anticonvulsant activities. **Epilepsia**, v. 55, n. 1, p. 3-16, 2014.

ZGRAJKA, Wojciech *et al.* Evidences for pharmacokinetic interaction of riluzole and topiramate with pilocarpine in pilocarpine-induced seizures in rats. **Epilepsy research**, v. 88, n. 2, p. 269-274, 2010.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO



João Pessoa, 25 de setembro de 2014

CEUA Nº 0208/14

Ilmo(a). **Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida**

Departamento Ciências Farmacêuticas - CBIOTEC - UFPB

Orientando(a): **Cynthia Germoglio Farias de Melo, (Doutorado)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **25/09/2014** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE E ESTUDOS COMPORTAMENTAIS DO MONOTERPENO SINTÉTICO (1S)-(-)-VERBENONE**.

Com previsão de empregar **380 Camundongos SWISS Machos - ANIMAIS DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George**.

Para serem utilizados no período de **01/01/2014 a 01/12/2017**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBIOTEC/UFPB