



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

ERIKA DA CRUZ GUEDES

Ação do *trans*-anetol em modelos agudo e crônico de convulsão em camundongos

João Pessoa – Paraíba

2020

ERIKA DA CRUZ GUEDES

**AÇÃO DO *TRANS*-ANETOL EM MODELOS AGUDO E CRÔNICO DE
CONVULSÃO EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, para obtenção do grau de **mestre, em farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida

Coorientadora: Profa. Dra. Mirian G. S. Stiebbe Salvadori

João Pessoa – Paraíba

2020

G924a Guedes, Erika da Cruz.

Ação do trans-anetol em modelos agudo e crônico de convulsão em camundongos / Erika da Cruz Guedes. - João Pessoa, 2020.

96 f. : il.

Orientação: Reinaldo Almeida.

Coorientação: Mirian Salvadori.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. trans-Anetol. 2. Anticonvulsivante. 3. Fenilpropanoide. 4. Eletrochoque. 5. PTZ. I. Almeida, Reinaldo. II. Salvadori, Mirian. III. Título.

UFPB/BC

Aos meus pais, Flávia Herminia da Cruz Guedes, Edson Barbosa Guedes (in memoriam), e minha avó, Mariana da Cruz Carvalho por todo amor, abnegação e apoio, dedico.

Agradecimentos

Ao bom Deus, pela serenidade e perseverança diante dos obstáculos para realização deste trabalho. E por me mostrar, todos os dias, como sou abençoada e devo ser grata pela minha vida.

À minha família, em especial aos meus pais e minha avó, por todo esforço e amor incondicional. Agradeço, também, pela formação do meu caráter, por todo incentivo e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu orientador, professor Reinaldo Almeida, pelo privilégio de ser sua orientanda. Jamais esquecerei todos os ensinamentos aprendidos por sua ética, profissionalismo e caráter.

À minha coorientadora, Mirian Salvadori, agradeço por me acolher tão bem ao laboratório desde o início da minha iniciação científica, por todos os ensinamentos e experiências que me fizeram crescer e aprender no mundo da ciência.

Ao professor Leandro Ribeiro por toda ajuda e contribuições, especialmente no estudo eletroencefalográfico, e pelo apoio e aprendizado diário.

Aos professores do programa de PgPNSB e da psicofarmacologia, pelos ensinamentos e por contribuírem na minha formação acadêmica.

À banca examinadora, por aceitaram com muita generosidade participar desta defesa e pelas contribuições ao trabalho.

Aos amigos e colegas do laboratório da psicofarmacologia da UFPB que participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho. Em especial a Álefe, Aline, Cesar e Humberto, pelo suporte diário. É bom saber que tenho e posso contar com amigos como vocês.

A todos os meus amigos, que sempre estiveram comigo me apoiando, em especial a Filipe Oliveira, Cleyton Cezar, Taiane Beatriz, Isabelle Fernandes, Amanda Mohema, Ellen Karla e Vanessa Rodrigues.

A José Crispim, Carol, Josué e Mônica pela solicitude de sempre e pelo trabalho realizado.

À Universidade Federal da Paraíba e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal (CAPES), pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a minha formação profissional e realização deste trabalho.

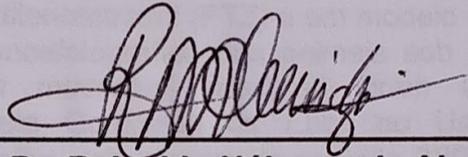
Erika da Cruz Guedes

Erika da Cruz Guedes

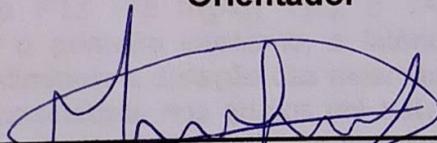
**AÇÃO DO TRANS-ANETOL EM MODELOS AGUDO E CRÔNICO DE
CONVULSÃO EM CAMUNDONGOS**

Aprovado em 11 / 02 / 20, João Pessoa - PB

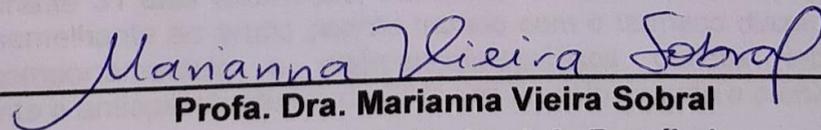
BANCA EXAMINADORA



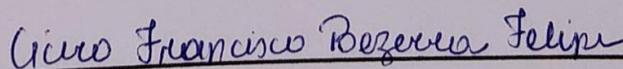
Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientador



Profa. Dra. Mirian G. S. Stebbe Salvadori
(Universidade Federal da Paraíba)
Coorientadora



Profa. Dra. Marianna Vieira Sobral
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora Interna



Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinador Externo

RESUMO

AÇÃO DO *TRANS*-ANETOL EM MODELOS AGUDO E CRÔNICO DE CONVULSÃO EM CAMUNDONGOS

GUEDES, E. C.

Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,
Dissertação, CCS/UFPB (2020)

A epilepsia é um distúrbio neurológico, crônico comum que afeta 1-2% da população mundial, e um terço dos pacientes são refratários ao tratamento farmacológico. Esse fato vem estimulando pesquisas para novos medicamentos antiepilépticos com maior segurança e eficácia do que os atualmente disponíveis. Nesse sentido, os produtos naturais têm sido uma fonte importante no desenvolvimento de novos medicamentos anticonvulsivantes. O *trans*-anetol (TAN) é um fenilpropanoide, componente de alguns óleos essenciais, utilizado na indústria de cosméticos e alimentícia, como aromatizante em alimentos, bebidas e perfumes. Inúmeros óleos essenciais já demonstraram atividade no sistema nervoso central, inclusive a anticonvulsivante. Diante disso, este trabalho objetivou investigar o efeito do TAN em modelos clássicos de convulsão agudo como eletrochoque máximo (ECM) e teste das convulsões induzido pelo pentilenotetrazol (PTZ) e em modelo crônico como o *kindling*, bem como avaliar o perfil eletroencefalográfico dos animais sob influência dessa substância. Camundongos *Swiss (Mus musculus)* machos, foram utilizados e os protocolos experimentais aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Paraíba, sob número de certidão 3890250918. No teste do ECM, o TAN nas doses de 300 e 400 mg/kg (i.p.) foi capaz de reduzir a duração das convulsões tônicas induzidas pela descarga elétrica (0,5 mA, 150 pulsos/s, por 0,5 s). No teste das convulsões induzidas pelo PTZ (75 mg/kg, i.p.), o TAN 400mg/kg (i.p.) foi capaz de aumentar a latência para o primeiro espasmo, a latência para o início das convulsões generalizadas, bem como diminuiu a duração das mesmas. Em relação a mortalidade nesse teste, nenhuma morte foi constatada nos grupos pré-tratados com TAN 400 mg/kg quando comparados ao grupo veículo. Na análise eletroencefalográfica, houve uma diminuição na amplitude das ondas dos grupos TAN 200, 300 e 400 mg/kg, em que se pode notar uma redução da frequência da taxa de disparos dos potenciais de ação induzidos pelo PTZ. No modelo crônico de epilepsia, *kindling* ou abrasamento, o TAN 100 mg/kg reduziu os escores segundo a escala de Racine adaptada, frente aos estímulos subconvulsivantes de PTZ (30 mg/kg, i.p.) durante 31 dias alternados, mantendo os escores abaixo de 1 durante o todo experimento, semelhante ao grupo padrão tratado com o fármaco diazepam. Sendo assim, os dados comportamentais e eletroencefalográficos obtidos indicam um efeito anticonvulsivante e antiepileptogênico do TAN nos modelos agudo e crônico desenvolvidos.

Palavras-chave: *trans*-Anetol, Anticonvulsivante, Fenilpropanoide,

ABSTRACT

EFFECT OF TRANS-ANETHOLE IN ACUTE AND CHRONIC CONVULSION MODELS IN MICE

GUEDES, E. C.

Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,
Dissertação, CCS/UFPB (2020)

Epilepsy is a common chronic neurological disorder that affects 1-2% of the world population, and one third of patients are refractory to pharmacological treatment. This fact has stimulated research for new antiepileptic drugs with higher safety and efficacy than those currently available. In this sense, natural products have been an important source in the development of new anticonvulsant drugs. trans-Anethole (TAN) is a phenylpropanoid, component of some essential oils, used in cosmetic and food industry, as a flavoring in food, drink and perfumes. Numerous essential oils have already shown activity in the central nervous system, including anticonvulsant. Therefore, this study aimed to investigate the effect of TAN in classic seizure models such as maximal electroshock (MES), pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizure test, kindling and evaluate the electroencephalographic profile of animals treated with this substance. Swiss male mice (*Mus musculus*) were used and all experimental protocols were approved by the Animal Ethics Commission (CEUA) of the Federal University of Paraíba (certificate number 3890250918). In the MES test, TAN 300 and 400 mg/kg (i.p.) doses was able to decrease tonic seizures duration induced by electric discharge (0.5mA, 150 pulses/s, for 0.5 s). In the PTZ-induced seizure test (75 mg/kg, i.p.), TAN 400 mg/kg (i.p.) increased the latency for the first spasm, the latency for generalized seizures, and decrease seizure duration. Regarding mortality, in this test, no deaths were found in pre-treated groups with TAN 400 mg/kg, compared to vehicle. Electroencephalographic analysis showed an amplitude decrease of the waves in TAN 200, 300 and 400 mg/kg groups. In addition, a frequency decrease of the firing rate of action potentials PTZ-induced, was observed. In chronic epilepsy model, kindling or abrasion model, TAN 100 mg/kg reduced the scores according to an adapted Racine scale against subconvulsive PTZ stimulus (30 mg / kg, i.p.) during 31 alternate days. The score was kept below 1 during the whole experiment, as a similar data obtained from standard group, diazepam. Therefore, the behavioral and electroencephalographic data results indicate an anticonvulsant and antiepileptogenic effect of TAN in acute and chronic models developed.

Keywords: trans-Anethole, Anticonvulsant, Phenylpropanoid, Maximal Electroshock, PTZ.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema expandido da classificação operacional básica da ILAE 2017 para os tipos de crises epilépticas.....	20
Figura 2 – Esquema para a classificação das epilepsias	21
Figura 3 – Estrutura química do TAN	37
Figura 4 – Desenho experimental do teste do PTZ acompanhado por eletroencefalograma.....	46
Figura 5 – Desenho experimental do modelo do <i>kindling</i>	47
Figura 6 – Efeito do TAN no teste do eletrochoque máximo	49
Figura 7 – Efeito do TAN no teste agudo das convulsões induzidas por PTZ.....	51
Figura 8 – Efeito do TAN na amplitude do registro eletroencefalográfico nas convulsões induzidas pelo PTZ	53
Figura 9 – Efeito do TAN amplitude e os gráficos representativos do registro eletroencefalográfico nas convulsões induzidas pelo PTZ.....	54
Figura 10 – Efeito do TAN no modelo do <i>kindling</i>	56

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais modelos experimentais para avaliação de potenciais anticonvulsivantes em camundongos e/ou ratos.	31
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito do <i>trans</i> -anetol no percentual de mortalidade no teste das convulsões induzidas pelo PTZ em camundongos.....	52
--	----

LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropionico
ANOVA	Análise de variância
CEUA	Comissão de tica no Uso de Animais
DL ₅₀	Dose letal mediana
DPZ	Diazepam
ECM	Eletrochoque máximo
EEG	Eletroencefalograma
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GABA	cido Gama-aminobutirico
GABA _A	Receptor Tipo A do GABA
ILAE	<i>International League Against Epilepsy</i>
i.p.	Intraperitoneal
IPeFarM	Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
mg/kg	Miligramas por kilograma
min.	Minutos
NMDA	N-metil D-Aspartato
OMS	Organizao Mundial da Saúde
PTZ	Pentilenotetrazol
TAN	<i>trans</i> -Anetol
Tween 80	Polioxetileno Sorbitano Monoleato (Polissorbato)
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relao, encontram-se descritas no texto ou são convenes adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	18
2.1 Epilepsia.....	18
2.2 Classificações das epilepsias.....	19
2.3 Epidemiologia.....	22
2.4 Fisiopatologia.....	23
2.5 Fármacos anticonvulsivantes.....	26
2.6 Modelos experimentais para avaliação de novas substâncias anticonvulsivantes.....	30
2.6.1 Modelo por processo físico.....	31
2.6.1.1 Eletrochoque máximo (ECM).....	31
2.6.2 Modelo por estimulação química.....	32
2.6.2.1 Pentilenotetrazol (PTZ).....	32
2.6.2.2 <i>Kindling</i>	33
2.7 Óleos essenciais.....	34
2.8 <i>trans</i> -Anetol.....	36
3. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4. MATERIAIS	41
4.1 Animais.....	41
4.2 Condições experimentais.....	41
4.3 Reagentes.....	41
4.4 Equipamentos.....	42
5. MÉTODOS	44
5.1 Teste das convulsões induzidas pelo eletrochoque máximo.....	44
5.2 Teste agudo das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol e Eletroencefalografia (EEG).....	44
5.3 Modelo do <i>kindling</i>	46
5.4 Análise estatística.....	47

6. RESULTADOS	49
6.1 Teste das convulsões induzidas pelo eletrochoque máximo	49
6.2 Teste agudo das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol	50
6.3 Avaliação eletroencefalográfica do teste das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol	52
6.4 Modelo do <i>kindling</i>	55
7. DISCUSSÃO	58
8. CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS	71
ANEXOS	96
ANEXO A - Certidão de aprovação do projeto junto à Comissão de Ética no Uso de animais.....	96

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A epilepsia é um distúrbio neurológico crônico (RODENBURG, 2011) caracterizado por crises recorrentes espontâneas, através de sinais transitórios de uma atividade cerebral anormal, excessiva ou síncrona (FALCO-WALTER; SCHEFFER; FISHER, 2018; LOWENSTEIN, 2015).

Aproximadamente 70 milhões de pessoas em todo o mundo possuem epilepsia, tornando-a uma das doenças neurológicas globais mais comuns (OMS, 2019; NGUGI et al., 2010). Essa condição clínica possui mais de 15 tipos de convulsões, 30 síndromes epiléticas e está associada a casos de depressão, ansiedade e morbidade somática e psicossocial (BERG et al., 2010; LÖSCHER et al., 2013; RAO; LOWENSTEIN, 2015).

As drogas utilizadas na clínica atual para o tratamento da epilepsia possuem muitos efeitos adversos e geralmente não atuam na epileptogênese (GALANOPOULOU et al., 2012). Apesar do acesso a um grande arsenal farmacológico, muitos pacientes ainda apresentam convulsões (BERG, 2004) e quase 30% deles são resistentes à terapia medicamentosa, sem resposta adequada ao tratamento (KWAN; BRODIE, 2006; RODENBURG, 2011). Além disso, as drogas antiepiléticas não protegem o cérebro da morte neuronal aguda ocasionada durante e após o *status epilético* pela elevação de íons intracelulares (FUJIKAWA et al., 2000). Esses altos níveis de íons intracelulares, como o cálcio, podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio, que quando em excesso no cérebro, geram danos a biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas), que comprometem o funcionamento dos neurônios levando à neurodegeneração (SHIN, et al., 2011).

Diante deste cenário é importante buscar novas alternativas de tratamento para preencher as lacunas existentes na farmacoterapia da epilepsia e seus sintomas. Os produtos naturais demonstraram cientificamente um papel interessante, visto que algumas plantas medicinais utilizadas no tratamento da epilepsia, de forma popular, apresentaram atividade anticonvulsivante promissora em modelos animais (WANNANG et al., 2008; QUINTANS-JÚNIOR, et al., 2002). No meio das diversas espécies vegetais, as “plantas aromáticas” despertaram interesse por suas ações farmacológicas e fisiológicas, com diversas propriedades no sistema nervoso central (SNC), incluindo ação antiepilética (ALMEIDA et al., 2011). Essas atividades normalmente têm sido atribuídas aos óleos essenciais das plantas em

que o TAN pode ser obtido e/ou seus constituintes químicos (FATURI et al., 2010; ALMEIDA et al., 2011). Os óleos essenciais são a fragrância da planta, e são compostos por misturas químicas envolvendo diferentes tipos de moléculas. Esses constituintes químicos são divididos em terpenos e fenilpropanoides (CRAVEIRO et al., 1981).

O anetol [1-metoxi-4- (1-propenil) benzeno] é um fenilpropanoide obtido principalmente a partir do óleo essencial de *Illicium verum* (anis estrelado), *Pimpinella anisum* (anis) e *Foeniculum vulgare* (anis doce) como composto majoritário (YANG et al., 2010; SOARES et al., 2007). É usado em indústria de alimento e cosméticos, e possui certificação de segurança emitida pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos (FDA-US) (PONTE et al., 2012).

Foi demonstrado também que o isômero *trans*-anetol inibe a produção ou liberação de citocinas, prostaglandinas e óxido nítrico (CHAINY et al., 2000; RITTER et al., 2013), e possui atividade antidepressiva (dados não publicados). Além disso, parece ser responsável pela maioria das propriedades atribuídas aos óleos essenciais das plantas de onde é extraído, com atividade antimicrobiana e antiviral (ASTANI; REICHLING; SCHNITZLER, 2011; KWIATKOWSKI et al., 2019), antioxidante (FREIRE et al., 2005), anticarcinogênica (AL-HARBI et al., 1995; CHOO et al., 2011), anti-inflamatória (CHAINY et al., 2000; DOMICIANO et al., 2013) e anti-nociceptiva (RITTER et al., 2013).

Tendo em vista suas várias atividades comprovadas, o presente estudo investigou os efeitos do *trans*-anetol em modelos animais de convulsão e epileptogênese em camundongos.

Fundamentação Teórica

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 EPILEPSIA

A epilepsia é reconhecida como uma das mais antigas doenças no mundo segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2019). Porém sabe-se que as primeiras referências sobre eventos convulsivos surgiram por volta do ano 2000 a.C. na antiga Babilônia, em um texto acádico que continha a descrição de uma convulsão, que atribuía à epilepsia um caráter mágico e sagrado, pois acreditava-se que ela era a manifestação de espíritos do mal ou a expressão do descontentamento divino (CHAUDHARY; DUNCAN; LEMIEUX, 2011).

Hipócrates, em meados de de 400 a.C. afirmou que a causa da epilepsia estava no cérebro e não em espíritos malignos, desfazendo a antiga ideia. Já na Idade Média, a epilepsia foi relacionada à doença mental e tida como doença contagiante (CHAUDHARY; DUNCAN; LEMIEUX, 2011).

Ao longo dos anos os conceitos e terminologias das epilepsias vêm passando por muitas mudanças, mas atualmente a epilepsia é definida como uma doença neurológica crônica, caracterizada por dois ou mais episódios de convulsões recorrentes espontâneas (OMS, 2019), decorrente de uma atividade neuronal excessiva e anormal de uma região específica do cérebro. Esses eventos podem levar a diminuição do nível de consciência e outros sintomas sensoriais ou motores no paciente (FALCO-WALTER; SCHEFFER; FISHER, 2018; FISHER et al. 2014; LOWENSTEIN, 2015). As causas da epilepsia incluem todos os tipos de mutações genéticas em canais iônicos, desenvolvimento cortical alterado e alterações específicas na expressão gênica, por exemplo (KAAS et. al, 2016; LIN et.al, 2010; UEDA et.al, 2007; TANG et.al 2016). As manifestações clínicas geradas por esse distúrbio são causadas pelo disparo intenso, sincronizado e rítmico, de populações neuronais no SNC, com tendência a se repetir ao longo da vida (GUERREIRO, 1993; Da COSTA et al., 1998; MELDRUM,1999).

A epilepsia em sua fase aguda caracteriza-se como crise epiléptica (COSTA et al., 1992), definida como a disfunção neurológica capaz de gerar distúrbios de cognição, consciência, movimentos involuntários, manifestações psíquicas, sensoriais, autonômicas e de comportamento, podendo envolver diferentes áreas cerebrais (CHAUDHARY; DUNCA; LEMIEUX, 2011). A natureza da crise pode ser

apontada de acordo com a duração do evento e localização cerebral do mesmo. (RAO; LOWENSTEIN, 2015; STEFAN et. al, 2009). O evento mais dramático da maioria dos quadros de epilepsia é a convulsão, estando associada à atividade hipersincrônica e repetitiva de grupos neuronais do córtex cerebral e estruturas hipocâmpais (AVANZINI; FRANCESCHETTI, 2003). Os episódios convulsivos são resultado de descargas elétricas neuronais excessivas e parecem estar associados a uma via complexa de neurotransmissores envolvendo sistemas glutamatérgico, colinérgico e GABAérgico (SANDER; SHORVON, 1996).

Sendo assim, a principal diferença entre epilepsia e crise convulsiva é que nas epilepsias as crises tendem a se repetir, já a convulsão, é um fenômeno que tende a se manifestar em eventos isolados (ALMEIDA, 2006). Aproximadamente 10% da população mundial apresenta uma crise convulsiva durante a vida, o que não caracteriza a presença da doença (OMS, 2019).

Por se tratar de uma doença complexa, a epilepsia vem atraindo muitos estudos e avanços no que se refere ao seu diagnóstico, como por exemplo, a descoberta do eletroencefalograma (EEG), por Hans Berger em 1933. Essa descoberta representa um marco significativo no conhecimento da fisiologia do cérebro humano e possibilitou um enorme volume de pesquisas de valor inestimável para o diagnóstico e classificação das epilepsias (MOREIRA, 2004).

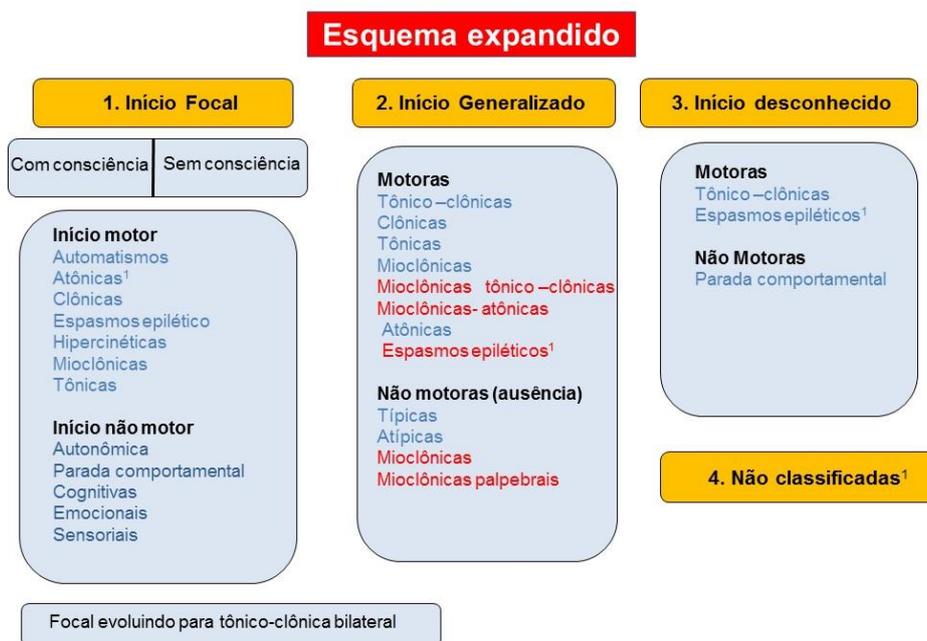
2.2. CLASSIFICAÇÃO DAS EPILEPSIAS

Segundo a ILAE as crises epilépticas podem ser classificadas de muitas formas, conforme etiologia, idade de início e topografia das descargas, por exemplo. Para uma melhor padronização e atualização sobre a classificação, terminologia e conceitos relacionados a epilepsias, essa comissão propõe uma nova linguagem e conceitos nos sistemas de classificação (ILAE, 2017).

As crises tônicas são caracterizadas por uma contração muscular mantida por segundos ou minutos. Enquanto que as crises clônicas consistem em eventos de contração muscular seguidas de relaxamento, gerando abalos musculares contínuos. A mioclonia representa rápidas contrações musculares, de forma similar a choques, enquanto que as crises atônicas referem-se à diminuição da contração muscular (ENGEL, 2001). A crise tônico-clônica compreende-se de duas fases, a tônica, em que há perda de consciência, seguida de fase clônica de ambos os

membros. O espasmo epiléptico apresenta-se como uma flexão, uma extensão ou um movimento misto de flexão-extensão súbitos dos músculos (ILAE, 2017).

Figura 1. Esquema expandido da classificação operacional básica da ILAE 2017.



Fonte: ILAE, 2017 (adaptada) ¹ Grau de percepção usualmente não é especificado.

A figura 1 mostra as crises epiléticas categorizadas por tipo de início. Crises de início focal são definidas como iniciadas em redes neurais limitadas a um hemisfério, podendo evoluir para crises tônico-clônicas bilaterais. Crises de início generalizado são definidas como crises iniciadas em algum local de uma rede neuronal com rápido envolvimento de redes distribuídas bilateralmente (BERG et al., 2010).

Essa nova classificação das epilepsias é disposta em vários níveis, designada para atender à categorização da epilepsia em ambientes clínicos diferentes e pode ser observado na figura 2. O diagnóstico deve ser realizado em três níveis, tipo de convulsão, tipo de epilepsia e síndrome epilética, bem como a etiologia da epilepsia do indivíduo (ILAE, 2017).

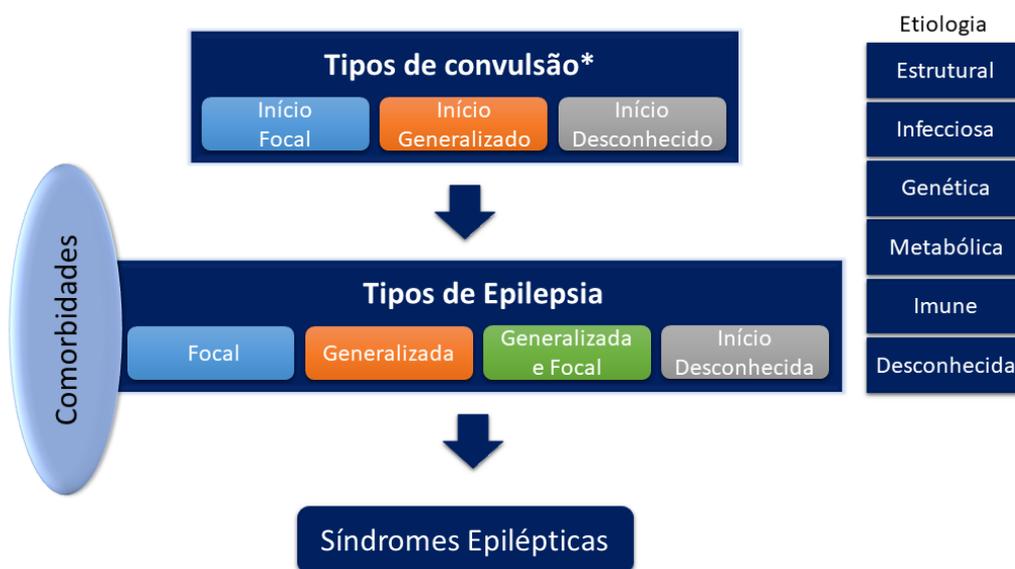
O primeiro ponto de partida do quadro de classificação da epilepsia é o tipo de crises epiléticas (FISHER et al., 2017). As convulsões são classificadas em início focal, início generalizado e início desconhecido (figura 1). Em alguns contextos, a classificação de acordo com o tipo de convulsão pode ser o nível

máximo possível para o diagnóstico, com acesso ao vídeo do eletroencefalograma e estudos de imagem.

Já o segundo nível está relacionado ao tipo de epilepsia e pressupõe que o paciente tem um diagnóstico de epilepsia com base na definição de 2018 (FALCO-WALTER; SCHEFFER; FISHER, 2018). Para um diagnóstico de epilepsia generalizada, o paciente normalmente mostra atividade de um pico de onda característico de uma convulsão generalizada no EEG. Os indivíduos podem ter uma combinação de tipos de convulsão, incluindo ausência, mioclônica, atônica, tônica e convulsões tônico-clônicas (ILAE, 2017).

As epilepsias focais incluem transtornos unifocal e multifocal, envolvendo convulsões em um hemisfério. Podem ser vistos vários tipos de crises, incluindo convulsões focais conscientes, convulsões focais com consciência diminuída, convulsões motoras focais, convulsões não motoras focais e convulsões focais a bilaterais tônico-clônicas (ILAE, 2017).

Figura 2. Esquema para a classificação das epilepsias.



Fonte: ILAE, 2017 Adaptada * Classificação das convulsões de acordo com seu início.

Um novo grupo de epilepsia generalizada e focal combinada existe, pois há pacientes que têm tanto convulsões generalizada como focal. O EEG pode mostrar ambos os picos de ondas de descargas generalizadas e focais. Exemplos comuns nos quais ocorrem ambos os tipos de crises são a síndrome de Dravet e a síndrome de Lennox-Gastaut (ILAE, 2017). Já o termo "desconhecido" é usado para denotar o paciente que tem epilepsia, mas o clínico é incapaz de determinar se o tipo de epilepsia é focal ou generalizado porque não há informação disponível suficiente (ILAE, 2017).

O terceiro nível caracteriza um diagnóstico de síndrome epiléptica. Uma síndrome epiléptica refere-se ao conjunto de características que incorporam tipos de crises, EEG e características de imagem que tendem a ocorrer conjuntamente. Geralmente tem-se características idade-dependente, como idade para início das crises, remissão, gatilhos convulsivos, variação diurna e, por vezes, prognóstico (ILAE, 1985; ILAE, 1989). Pode haver também comorbidades distintas, como disfunção intelectual e psiquiátrica, juntamente com achados específicos em EEG e estudos de imagem. Existem muitas síndromes bem reconhecidas, como a epilepsia de ausência na infância, a síndrome de West e a síndrome de Dravet (BERG et al., 2010).

2.3. EPIDEMIOLOGIA

De acordo com a OMS, a epilepsia é uma das mais sérias condições neurológicas, afetando mais de 70 milhões de pessoas pelo mundo. É a terceira doença neurológica mais comum, depois de acidente vascular cerebral e Alzheimer, sendo considerada um problema de saúde pública (HIRTZ et al., 2007; OMS, 2019; NGUGI et al., 2010). Pacientes acometidos por esse distúrbio apresentam mortalidade 2 a 3 vezes maior que a população geral (MORIMOTO et al., 2004). Além disso, estima-se que 1% da população desenvolva epilepsia até completar os vinte anos de idade (BERG et al., 2003), e que a epilepsia acomete 1 a 3% da população mundial (ENGEL et al, 2003).

Estudos no Brasil sobre a prevalência são muito escassos e não há dados publicados sobre a incidência da epilepsia. Porém, estima-se que em nosso país sejam diagnosticados, a cada ano, 340 mil novos casos de epilepsia, com a existência de 1,8 milhão de pessoas com epilepsia ativa, e que pelo menos

9 milhões já apresentaram crise epiléptica alguma vez na vida (GALLUCCI; MARCHETTI, 2005; IBGE, 2003). Dados de prevalência para epilepsia ativa apresentam uma estimativa de 11,9 indivíduos para cada 1.000 habitantes na grande São Paulo (MARINO; CUKIERT, 1986) e de 16,5:1.000 em Porto Alegre (FERNANDES et. al, 1992).

Nas últimas décadas, opções para o tratamento farmacológico da epilepsia tem sido feita com a inserção de mais de 15 drogas antiepilépticas de terceira geração, entretanto, estes medicamentos falham no controle das convulsões de 20 a 30% dos pacientes que não obtém resposta terapêutica, tornando-se refratários ao tratamento, ou seja, mesmo com tratamento com anticonvulsivantes continuam a apresentar crises (BRODIE et. al, 2012, LÖSCHER e SCHMIDT, 2011; SILLANPÄÄ e SCHMIDT, 2006; LÖSCHER et al., 2002b). Esses pacientes são chamados de farmacorresistentes uma vez que eles não respondem adequadamente a terapia. Nesses pacientes a remoção cirúrgica do foco epiléptico é, geralmente, a única opção terapêutica para atingir o controle das convulsões (KWAN; BRODIE, 2006).

Este distúrbio neurológico apresenta mais de 15 tipos crises, mais de 30 síndromes epilépticas e associa-se a casos de morbidade somática e psicossocial, além de depressão, ansiedade e aumento da morbidade (BERG et. al, 2010; LÖSCHER et.al, 2013; RAO; LOWENSTEIN, 2015).

2.4. FISIOPATOLOGIA

As crises epilépticas podem ser causadas por mecanismos diversos. Dentre esses mecanismos podem estar envolvidos alterações em neurotransmissores ou em canais iônicos, como HCN, neuroplasticidade, ativação de citocinas e estresse oxidativo (REID; PHILLIPS; PETROU, 2012). Além disso os danos causados pelas crises convulsivas também podem levar a alterações oxidativas que são demonstradas em áreas cerebrais como córtex pré-frontal (PFC), estriado, e hipocampo. O estresse oxidativo é consequência de crises prolongadas, estando diretamente relacionado a lesão cerebral (AGUIAR et. al, 2012; AGUIAR et. al, 2013; DE SOUZA et.al, 2018).

Entretanto, um princípio geralmente aceito é que as crises surgem quando há um rompimento do equilíbrio entre excitação e inibição no cérebro. Em condições normais, há mecanismos que facilitam o disparo neuronal normal e mecanismos de

controle que protegem os neurônios de descargas excessivas de potenciais de ação (SCHARFMAN, 2007).

A indução da atividade epiléptica se dá através de duas formas, pelo bloqueio de vias inibitórias, ou ativação de vias excitatórias dependentes de voltagem (MATSUMOTO; AJMONEMARSAN, 1994; PRINCE; WILDER, 1967; WALTHER et. al, 1986; YACUBIAN, 2008). Logo, o bloqueio das crises dá-se por aumento da inibição ou diminuição da excitação (WIECHERT; HERBST, 1966; CROUCHER; COLLINS; MELDRUM, 1982).

No foco da discussão sobre a epilepsia se tem os neurônios excitatórios e interneurônios inibitórios. Na neurotransmissão excitatória, o glutamato, principal neurotransmissor excitatório, é liberado e liga-se aos seus receptores, especialmente os ionotrópicos NMDA (N-metil D-aspartato) e AMPA (alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico) em outros neurônios, desencadeando o disparo da crise convulsiva. Por outro lado, a inibição desta via ocorre através da liberação do ácido gama-aminobutírico (GABA) por interneurônios inibitórios. O GABA exerce uma função majoritária na modulação e regulação de processos neuronais como convulsões, ansiedade, atividade do sono, memória e aprendizado (IBRAHIM; MANSOUR, 2015). Aproximadamente 40% de todas as sinapses cerebrais dos vertebrados são GABAérgicas (URE; PERASSOLO, 2000). Esse neurotransmissor se liga aos seus receptores presentes em neurônios, impedindo o disparo da crise. Os neurotransmissores atuam na fenda sináptica, havendo, porém, receptores para o GABA localizados em outras regiões neuronais. Esta seria um mecanismo do organismo garantir a neurotransmissão inibitória (EISENSTEIN, 2014).

A membrana dos neurônios no seu estado de repouso possui carga interna negativa e carga externa positiva, estando assim polarizada. A ativação da neurotransmissão glutamatérgica, leva à abertura de canais iônicos na membrana do neurônio, permitindo o influxo de íons cálcio e sódio. Este evento irá despolarizar a célula, gerando o disparo neuronal (GOODMAN; GILMAN, 2018).

Já a sinalização GABAérgica, através do receptor GABA_A, permite que haja um influxo de íons negativos, cloreto, hiperpolarizando a célula neuronal e inibindo o disparo das crises. Danos na via GABAérgica podem ocorrer por morte de interneurônios ou disfunção dos receptores do tipo GABA_A. Evidências apontam que deficiência nas funções dessa via, sejam inerentes ou adquiridas, podem desencadear a gênese da epilepsia. Dessa forma, o antagonismo da via

GABAérgica em cérebro saudável pode causar crises convulsivas agudas. Modelos animais experimentais se baseiam nesse mecanismo ao utilizar antagonistas dos receptores GABA_A, como pentilenotetrazol (PTZ), para indução das convulsões. Do contrário, substâncias que potencializam a inibição GABAérgica, tendem a atenuar as convulsões (KHAZIPOV, 2016).

Uma vez que os sistemas de inibição estão prejudicados não há um mecanismo para conter o aumento da excitação (HOLTKAMP; MEIERKORD, 2007). A desregulação, diminuição ou aumento, de sinapses GABAérgicas ou glutamatérgicas podem ser pró-convulsivantes dependendo do tipo de neurônio pós-sináptico envolvido (BRACCI et. al, 2001; LE DUGOU; HOLDEN; KULLMANN, 2011; JANE; LODGE; COLLINGRIDE, 2009; MÉNDEZ; BACCI, 2011). Os mecanismos para compensar esse desequilíbrio trabalham bem, até que o organismo não consiga mais conter a situação, gerando a convulsão (EISENSTEIN, 2014).

A perda do equilíbrio da concentração de determinados íons nos espaços intra e extracelular é outro mecanismo que pode estar envolvido na excitação neuronal, tendo como principais íons o potássio, o cálcio, os prótons e o cloreto (FISHER et.al, 1976; STALEY; SOLDÓ; PROCTOR, 1995; RANSOM; SONTHEIMER, 2000; RAIMONDO et. al, 2013).

A ocorrência de mutações em vias relacionadas a malformações cerebrais, como PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase), mTOR (proteína alvo da rapamicina em mamíferos) e IGF (fator de crescimento semelhante à insulina), displasias corticais focais, esclerose tuberosa, hemimegalencefalia, podem explicar o surgimento de quadro epiléptico (GUERRINI; DOBYNS, 2014; MIRZAA; PODURI, 2014; BERDICHEVSKY et. al, 2013; LASARGE; DANZER, 2014; WONG, 2013). Outras mutações, como por exemplo, nos genes que codificam proteínas envolvidas na homeostase iônica, também podem estar associadas com a epilepsia, uma vez que estão amplamente distribuídas no cérebro (VEERAMAH et. al, 2013; RAJAKULENDRAN; KASKI; HANNA, 2012; DENG, XIU; SONG, 2014).

As características clínicas dessa doença vão depender da localização anatômica do foco, causa, tipo e extensão do espraio da crise, mecanismos neuroquímicos subjacentes e também da idade e nível de maturidade cerebral (COCKERELL; SHORVON, 1997). Diante disso, diferentes vias podem levar ao desencadeamento deste distúrbio excitatório de auto reforço (STALEY, 2015).

Mediante uma lesão cerebral, alguns indivíduos podem desenvolver epilepsia após certo período de tempo. O que ocorre é que a lesão induz uma reorganização dos circuitos cerebrais que, com o tempo, se torna um foco gerador de descargas epiléticas. Esse mecanismo pelo qual um cérebro assintomático se transforma, sendo capaz de gerar crises epiléticas espontâneas, é chamado de epileptogênese. As mais frequentes lesões cerebrais adquiridas que estão associadas ao desenvolvimento de epilepsia são traumatismo, acidente vascular, infecção e estado de mal epilético (*status epilepticus* - SE) (SALAZAR et al., 1985; HESDORFFER et al., 1998; LOSSIUS et al., 2005; FERRO et al. 2003; ANNEGERS et al., 1988). Esse quadro “*status epilepticus*” caracteriza-se por crises suficientemente prolongadas, ou repetidas em intervalos curtos, que resulta em um estado epilético contínuo e duradouro (LETTER, 1973).

Pesquisas mais atuais mudaram a visão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos e tem mostrado que a epilepsia é uma doença de redes neurais e não somente um sintoma de anormalidades cerebrais localizadas (BLUMENFELD, 2014). Nessas últimas décadas, foi possível a descoberta de vários mecanismos envolvidos no processo da epileptogênese, através de estudos em modelos experimentais (PITKANEN, SCHWARTZKROIN, MOSHÉ, 2006; ARIDA et al., 2006), como por exemplo a indução química ou elétrica de um *status epilepticus*, utilizando animais de laboratório, tais como camundongos e ratos (DA COSTA et al., 1998; PITKANEN, SCHWARTZKROIN, MOSHÉ, 2006, MESKINIMOOD et al., 2019).

2.5. FÁRMACOS ANTICONVULSIVANTES

Um fármaco para ser considerado um anticonvulsivante ou antiepilético deve atingir um ou mais alvos no cérebro, como, canais iônicos, transportadores de neurotransmissores e enzimas metabólicas neurotransmissoras, e esses alvos uma vez estimulados, promovem uma diminuição da excitabilidade e sincronismo neuronal, impedindo a propagação dos disparos para locais distantes e o comportamento convulsivo (ROGAWSKI; LOSCHER, 2004).

O marco zero como proposta terapêutica farmacológica para o tratamento da epilepsia foi realizada em 1857, com o uso do brometo de potássio. Em 1912, o descobrimento do fenobarbital marcou o início da farmacoterapia moderna da epilepsia (ALMEIDA, 2006).

Outros fármacos como benzodiazepínicos, carbamazepina, etossuximida, fenitoína, valproato de sódio, e outros, surgiram nesses últimos 70 anos, como drogas anticonvulsivantes estabelecidas (*antiepileptic established drugs*) ou drogas antiepilépticas (DAE) de primeira geração (KWAN et al., 2001).

Durante muito tempo na terapêutica acreditou-se que um único fármaco antiepiléptico (FAE) pudesse ser desenvolvido para o tratamento de todas as formas de epilepsia. Entretanto, as causas dessa doença são extremamente diversas e abrangem falhas genéticas e de desenvolvimento, como também processos infecciosos, doenças traumáticas e neoplasias degenerativas. Existe alguma especificidade de acordo com o tipo de convulsão, como pode ser observado por exemplo, nas crises generalizadas do tipo ausência. Nesse tipo de crise, as descargas de pico e onda costumam ocorrer de 2 a 3 Hz no EEG, tendo boa resposta para o tratamento com a etossuximida e ao valproato, mas podendo se exacerbar com fenitoína e carbamazepina (KATZUNG, 2017).

Atualmente, apesar do grande arsenal terapêutico de DAE, e da certa seletividade dessas no SNC, cerca de 30% dos pacientes não têm tratamento adequado (HERMAN; PEDLEY, 1999; LÖSCHER; SCHMIDT, 2006). Desse percentual, aproximadamente 40% apresentam farmacoresistência, o que denota a ineficácia dos medicamentos até então presentes no mercado. A ausência de eficácia terapêutica a pelo menos duas drogas antiepilépticas de primeira linha caracteriza uma farmacoresistência, mesmo face a níveis plasmáticos adequados (REGESTA; TANGANELLI, 1999). Essa resistência aos fármacos pode ser observada desde o início da terapia como após um período de tratamento relativamente bem-sucedido (KATZUNG, 2017). A farmacoresistência juntamente com um número considerável de reações adversas, como diminuição da capacidade cognitiva e complicações psiquiátricas, dificultam o tratamento e sua adesão, deixando uma parcela considerável de pacientes sem um tratamento adequado (MELDRUM; ROGAWSKI, 2007).

Outro ponto é que os antiepilépticos disponíveis agem apenas suprimindo sintomaticamente as convulsões depois que elas aparecem, não prevenindo o desenvolvimento da epilepsia no paciente que ainda não apresentou a primeira convulsão (SCHMIDT; SILLANPÄÄ, 2012; TEMKIN, 2009). Uma parcela significativa dos pacientes tratados sofre mais com os efeitos colaterais decorrentes do

medicamento do que com a própria condição epiléptica (TREVISOLO-BITTENCOURT; SANDER, 1989).

Diante desse contexto, a busca por substâncias que possam suprir os problemas existentes no tratamento da epilepsia vem se mostrando de grande importância, sendo os produtos naturais e os sintetizados a partir de fontes naturais recursos promissores para este propósito. Um exemplo disso é a descoberta de novas substâncias com atividade anticonvulsivante, em modelos clássicos de epilepsia como PTZ e pilocarpina, oriundas de produtos naturais (OKOYE et al., 2013; COSTA et al., 2012).

Os estudos mais atuais buscam o desenvolvimento de novas DAE no âmbito de drogas com maior potencial anticonvulsivante que controlem de forma mais seletiva os diversos tipos de epilepsia, e tenham baixa toxicidade (FRENCH; GAZZOLA, 2011; GOLDENBERG, 2010; LÖSCHER; SCHMIDT, 1994; LÖSCHER, 1998). Nesse sentido, pretende-se que as novas DAE atuem na própria epileptogênese, inibindo o desenvolvimento e progressão da epilepsia, mudando o enfoque das DAE tradicionais que, de maneira geral, agem suprimindo a propagação inicial das convulsões, tratando, assim, apenas os sintomas (ROBERTSON et al., 2011).

Apesar dos mecanismos de ação da maioria das DAE não sejam totalmente elucidados, os três principais mecanismos básicos descritos, a nível celular, são limitação dos disparos neuronais repetitivos, pelo bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem, aumento da neurotransmissão inibitória mediada pelo GABA e bloqueio da neurotransmissão glutamatérgica excitatória (DECKERS et al. 2003).

A inibição dos canais de sódio afeta a excitabilidade da membrana, uma vez que, os canais de sódio dependentes de voltagem são responsáveis por levar corrente de entrada necessária para geração de um potencial de ação. Quando esses canais de sódio são bloqueados (por fármacos como fenitoína, carbamazepina, valproato e lamotrigina) a excitação das células que estão disparando repetitivamente também é bloqueada, sendo que quanto mais alta a frequência dos disparos, maior é o bloqueio produzido (RANG; DALE; RITTER, 2016; GOODMAN; GILMAN, 2018).

Assim os fármacos antiepiléticos que atuam bloqueando os canais de sódio dependente de voltagem têm a capacidade de bloquear as descargas de alta

frequência que ocorre numa crise epiléptica sem interferir indevidamente nos disparos de baixa frequência dos neurônios no estado normal, discriminando assim os canais de sódio em seus estados de repouso, aberto e inativado. A despolarização de um neurônio aumenta a proporção de canais de sódio no estado inativado. Os antiepilépticos se ligam preferencialmente aos canais nesse estado, impedindo-os de retornarem ao seu estado de repouso, reduzindo o número de canais funcionais disponíveis para gerar potencial de ação (RANG; DALE; RITTER, 2016).

Os fármacos que aumentam a neurotransmissão do GABA, potencializam a ativação dos receptores GABA_A, facilitando assim a abertura dos canais de cloreto mediado pelo GABA, aumentando o influxo dos íons cloreto, levando a uma inibição da neurotransmissão. Os antiepilépticos que agem por essa via são o fenobarbital e os benzodiazepínicos. A vigabatrina atua inibindo a enzima GABA transaminase, que é responsável pela inativação GABA, e a tiagabina inibe a captação de GABA; ambas, dessa forma potencializam a ação do GABA como neurotransmissor inibitório (RANG; DALE; RITTER, 2016; GOODMAN; GILMAN, 2018).

Já os fármacos que agem inibindo a neurotransmissão glutamatérgica atuam bloqueando os receptores ionotrópicos NMDA e AMPA do glutamato, localizados na membrana pós-sináptica das sinapses excitatórias, impedindo o influxo de íons, principalmente, Na⁺ e Ca²⁺, inibindo assim a geração do potencial de ação para as neurotransmissões excitatórias. Valproato e topiramato são exemplos de fármacos que atuam na via glutamatérgica (RANG; DALE; RITTER, 2016; GOODMAN; GILMAN, 2018).

O aumento agudo do influxo de Ca²⁺ também é importante para manutenção da hiperexcitabilidade reflexa que ocorre em processos convulsivos. Além disso, a ativação de canais de Ca²⁺ pode induzir alterações na expressão gênica (JONES, 2002), e sugere uma participação de maneira crônica na epilepsia. Os canais de cálcio tipo T tem papel importante nas descargas rítmicas das crises epiléticas generalizadas de ausência (DECKERS et al., 2003). Ainda, o influxo de Ca²⁺ pré-sináptico se associa à liberação desses neurotransmissores, enquanto que o influxo pós-sináptico dos mesmos gera uma despolarização sustentada do neurônio. Logo o bloqueio dos canais de Ca²⁺ pode produzir vários efeitos no funcionamento neuronal como: bloqueio dos canais tipo T (associado ao tratamento das crises de ausência); bloqueio dos canais tipo L (associado ao controle de crises parciais); bloqueio de

canais de Ca^{+2} podendo prevenir a liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato e bloqueio desses canais diminuindo a concentração dos íons Ca^{+2} no citoplasma neuronal, reduzindo a possibilidade de dano celular excitotóxico. Alguns fármacos que atuam nesses alvos dos canais de cálcio são a etossuximida e felbamato (JONES, 2002).

2.6. MODELOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DE NOVAS SUBSTÂNCIAS ANTICONVULSIVANTES

Diante do pouco conhecimento da fisiopatogenia dos distúrbios epiléticos e na tentativa de melhorar os conhecimentos acerca das epilepsias no ser humano, várias pesquisas de novas drogas anticonvulsivantes passaram a se desenvolver utilizando como instrumento experimental os animais de laboratório (ALMEIDA, 2006). A principal relevância de um modelo experimental é determinada pelo grau em que o modelo serve como testemunha do fenômeno natural (QUEIROZ et al., 2002).

O potencial efeito anticonvulsivante das DAE de primeira, segunda e terceira gerações foi inicialmente evidenciado em modelos animais de convulsão. De fato, os testes das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ) e/ou eletrochoque máximo (ECM) em ratos ou camundongos mostraram que a atividade clínica de uma DAE pode ser estudada preliminarmente em modelos animais (LÖSCHER; SCHMIDT, 2002).

Nas triagens (*screening*) farmacológicas de drogas antiepiléticas os modelos experimentais sempre foram utilizados, cujo objetivo principal é a contenção das crises convulsivas por drogas em estudo. Esses modelos ainda são muito utilizados, e contribuíram substancialmente com informações a respeito dos mecanismos envolvidos na gênese e manutenção das crises (MELLO et al., 1986). Os modelos experimentais animais para avaliação de drogas anticonvulsivantes estão sumarizados no quadro 1.

Quadro 1. Principais modelos experimentais para avaliação de potenciais anticonvulsivantes em camundongos e/ou ratos.

Modelos experimentais para avaliação de drogas anticonvulsivantes		
Tipos de epilepsia que mimetizam	Focal	Generalizada
Agudos	<ul style="list-style-type: none"> • Metais (Cobalto e Ácido Túngstico) • Fármacos convulsivantes (penicilina, estriçnina, oubaiña, estrógenos conjugados, ácido quinolônico, etc.) • Estimulação elétrica focal 	<ul style="list-style-type: none"> • Elétricas (ECM) • Químicas: (PTZ, pilocarpina, picrotoxina, bicuculina, estriçnina) - Bloqueio dos sistemas de transporte de eletrólitos nas células (lítio, tiocianato) - Crises induzidas por CO₂ - Por abstinência de drogas (barbitúricos, álcool, etc.)
Crônicos	<ul style="list-style-type: none"> • Metais (gel de albumina) • Abrasamento (<i>kindling</i>: elétrico, audiogênico, químico (PTZ)) • Sistêmicos: ácido caínico e pilocarpina Modelos IGER (<i>Ilhara's genetically epileptic rats</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • Por precipitação sensorial: crises fotossensíveis, audiogênicas, estresse • Espontâneas: Mutações genéticas (Genetic absence epileptic rats from Strasbourg – GAERS)

Fonte: ALMEIDA, 2006

2.6.1. MODELO POR PROCESSO FÍSICO

2.6.1.1. Eletrochoque máximo (ECM)

É um dos principais testes animais sendo muito utilizado na triagem de DAE. O ECM é um modelo bem estabelecido que mimetiza crises convulsivas generalizadas do tipo tônico-clônicas (LÖSCHER; SCHMIDT, 2006). Esse modelo baseia-se na observação de que a estimulação por meio de pulsos elétricos repetitivos usando parâmetros adequados é capaz de induzir, em diferentes estruturas neuronais, um padrão característico de atividade epiléptica que, quando automantida, é comumente denominada de pós-descarga (LÖSCHER; SCHMIDT, 2002).

É um teste capaz de avaliar principalmente substâncias que atuam em canais de sódio, como a fenitoína (MELDRUM, 1996). Portanto a capacidade de uma droga de inibir as convulsões tônicas produzidas por um eletrochoque auricular agudo é forte indicativo de que a mesma possa ser um antiepilético eficaz para crises generalizadas (CONTAR et al., 1985). Em conjunto com PTZ, e em decorrência da sua simplicidade e rapidez de resposta, esse é um dos testes padrões utilizados na investigação de novos compostos com potencial anticonvulsivante (ALMEIDA, 2006).

2.6.2. MODELO POR ESTIMULAÇÃO QUÍMICA

2.6.2.1. Pentilenotetrazol (PTZ)

O pentilenotetrazol (PTZ) é uma das principais substâncias indutoras da convulsão e é utilizada na triagem não-clínica de novos fármacos anticonvulsivantes (LÖSCHER, 1998; QUINTANS-JÚNIOR; MELLO, 2006; SMITH et al, 2007). O desenvolvimento de benzodiazepínicos e barbitúricos no tratamento das crises convulsivas veio a partir de estudos com essa ferramenta farmacológica (LÖSCHER; SCHMIDT, 1988).

Essa substância é capaz de produzir contrações mioclônica súbitas e involuntárias que tipicamente resulta em convulsões generalizadas do tipo tônico-clônicas, podendo também induzir crises generalizadas do tipo de ausência (HUOT; RADOUCO-THOMAS, 1973; RHODES; FRYE, 2004).

O mecanismo pelo qual o PTZ atua envolve a inibição dos receptores GABA_A, que são canais de cloreto, gerando um aumento da excitabilidade neuronal (LÖSCHER; SCHMIDT, 2002). Além disso, o PTZ também está relacionado com canais iônicos de sódio e cálcio, aumentando as correntes de membrana e consequentemente a excitabilidade neuronal, segundo dados eletroencefalográficos (LOSCHER, 1998; FAINGOLD, 1987).

O tipo da crise induzida pelo PTZ está relacionado com a dose e via de administração (LÖSCHER et al., 1991). Quando administrado na dose de 40-60 mg/kg, via subcutânea, o PTZ induz convulsões clônicas, e acima dessas doses convulsões tônico-clônicas em ratos (CORTEZ; SNEAD, 2006).

Portanto, sabe-se que o bloqueio das convulsões induzidas quimicamente pelo PTZ, em roedores, é uma característica de algumas drogas depressoras do SNC que pertencem a classe dos anticonvulsivantes (ANCA et al., 1993). De maneira geral, o PTZ permite a identificação eficaz de compostos contra crises de ausência quando administrado via intravenosa e permite uma avaliação genérica do potencial anticonvulsivante de uma droga quando administrado em altas doses via intraperitoneal (KUPFERBERG; SCHMUTZ, 1997).

2.6.2.2. Kindling

Os modelos animais mais antigos de convulsão não conseguiam reproduzir de forma fidedigna a fenomenologia encontrada em humanos, pois as crises convulsivas eram induzidas de forma aguda, não observando a ocorrência de crises espontâneas (LEITE; TERRA-BUSTAMANTE, 2000). Dessa forma, o modelo do abrasamento, mais conhecido como *kindling*, representa um modelo crônico de epilepsia através da indução de crises espontâneas ocasionadas por estímulos subconvulsivantes repetitivos. É um modelo que mimetiza a epileptogênese em humanos, e em animais pode ser induzido tanto por estímulo elétrico como químico (MCNAMARA, 1984; GODDARD, 1969).

Esse estímulo leva ao desencadeamento de crises convulsivas espontâneas, que permite a exploração da rede neuronal com a progressão de crises parciais para crises generalizadas (DELGADO; SEVILLANO, 1961; GODDARD et al., 1969; RACINE, 1972; LEUNG, 1987).

Ao ser descrito pela primeira vez por Goddard et al. (1969), o modelo do *kindling* demonstrou a possibilidade de induzir um quadro progressivo de convulsões, em ratos, por meio de contínuos estímulos elétricos subconvulsivantes, como visto em alguns tipos de epilepsia.

A indução dessas convulsões também pode ser feita de forma química, através do uso de substâncias convulsivantes como antagonistas GABAérgicos (pentilenotetrazol, bicuculina), N-metil-D-aspartato e cocaína, por exemplo (DHIR, 2012).

Sabe-se que a administração consecutiva de pentilenotetrazol em roedores leva ao desenvolvimento de crises generalizadas espontâneas. Essas crises podem se desencadear em dias ou meses após a estimulação inicial, uma vez que essas

alterações cerebrais podem perdurar por toda vida do animal (IZQUIERDO et al., 1975; BECKER et al., 1992; LÖSCHER, 2002). Sendo assim esse é um modelo capaz de avaliar tanto epilepsia quanto a epileptogênese (MELDRUM; ROGAWSKI, 2007) e, uma vez que uma substância inibe o abrasamento induzido pelo PTZ, é um indicativo de efeito anticonvulsivante provavelmente relacionado a epilepsia do lobo temporal, e crise parcial e complexa em humanos.

2.7. ÓLEOS ESSENCIAIS

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças continua a exercer um papel fundamental no cuidado à saúde (MOERMAN, 1986; JOHNSON, 1999). Além disso, os produtos isolados de fontes naturais têm servido como inspiração para uma grande parte da Farmacopeia atual (KINGSTON, 2011), sendo alvo de muitas pesquisas, demonstrando um grande potencial como fonte para a obtenção de compostos de interesse farmacológico (HONG, 2011).

A maior biodiversidade do mundo de plantas se encontra no Brasil, que possui mais de 45 mil espécies de plantas superiores, ou seja, cerca de 22% do total que existe no planeta (SIBBR, 2016). Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, associado a uma rica diversidade étnica e cultural que detém um valioso conhecimento tradicional em relação ao uso de plantas medicinais, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside uma das suas maiores potencialidades. Para isso, é necessário que haja estímulo a pesquisas que envolvam o uso de plantas medicinais consagradas no meio popular (AGRA, FREITAS, BARBOSA-FILHO, 2007).

A utilização de produtos naturais para tratamento de doenças com manifestações neurológicas e distúrbios psiquiátricos, em particular, tem tido uma grande procura no uso popular, porém muitos desses produtos não apresentam nenhuma validação científica e às vezes sequer possuem ação no SNC (ALMEIDA, 1999). Estudos que garantam a eficácia dos produtos e a não existência de riscos à saúde são extremamente necessários para fornecer uma maior segurança.

Atualmente, existe um crescente interesse da comunidade científica em elucidar os mecanismos responsáveis pelos efeitos de plantas medicinais, tão utilizadas empiricamente, bem como de seus constituintes químicos, a fim de tornar o seu uso mais eficaz e com menos de efeitos adversos (QI; WANG; YUAN, 2011).

Entre as mais diversas espécies vegetais, algumas têm despertado certo interesse de grupos de pesquisadores pelas suas múltiplas ações farmacológicas e fisiológicas apresentadas, como é o caso das chamadas “Plantas Aromáticas”. Várias propriedades no SNC, incluindo ação antiepiléptica têm sido referidas a espécies de plantas desta categoria (ALMEIDA et al., 2011).

Estas atividades em geral têm sido atribuídas aos óleos essenciais (OE), e/ou seus componentes químicos que representam de 1-2% da composição desses vegetais (FATURI et al., 2010; ALMEIDA et al., 2011). Alguns OEs atuam sobre o SNC (FATURI et al., 2010; KHALID et al., 2011) desencadeando efeitos analgésicos (ALMEIDA; NAVARRO; BARBOSA-FILHO, 2001; BAKKALI et al., 2008), ansiolíticos (ALMEIDA et al., 2004), antidepressivos (VICTORY; BRAHM; SAVEGNAGO, 2013) e anticonvulsivantes (NÓBREGA, 2012; DE SOUSA et al., 2006a), por exemplo.

Os óleos voláteis ou óleos éteros, como também são chamados os óleos essenciais, são produtos de origem natural, com misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, com aroma acentuado e líquido, podendo ser obtidos de todas as partes das plantas, como botões, flores, folhas, caules, ramos, sementes, frutos, raízes ou cascas (REGNAULT-ROGER; VINCENT; ARNASON, 2012; BAKKALI et al., 2008). São extraídos de plantas aromáticas geralmente encontradas em países de clima temperado e tropical (BAKKALI et al., 2008), sendo os principais responsáveis por suas ações terapêuticas (FATURI et al., 2010). Em temperatura ambiente apresentam-se como substância líquida oleosa e bastante volátil (SIMÕES; SPITZER, 2004).

Os OEs são produzidos como metabólitos secundários de plantas aromáticas (BAKKALI et al., 2008). Pertencem a duas séries de compostos: série dos terpênicos, cuja origem biossintética ocorre a partir de unidades do isopreno que, por sua vez, origina-se a partir do ácido mevalônico (BAKKALI et al., 2008), chamados de monoterpenos e sesquiterpenos e, a série dos compostos arênicos, que biogeneticamente, derivam do ácido chiquímico (drogas derivadas dos fenilpropanoides (ALMEIDA, 2006; RAHIMMALEK et al., 2009).

Os fenilpropanoides fazem parte de um grupo de compostos orgânicos produzidos por plantas para protegê-las de infecções, herbívoros, patógenos, radiação ultravioleta, além de atrair polinizadores. Eles são sintetizados a partir do aminoácido fenilalanina que é convertido em ácido cinâmico. O grupo ácido carboxílico do ácido cinâmico é reduzido, gerando os fenilpropanoides (FRIEDRICH, 1976; SÁ et al., 2014, BERNARDS, 2010). Existe na literatura a participação de vários fenilpropanoides com diferentes mecanismos de ação relacionados à atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em protocolos experimentais (CARVALHO et al., 2015).

2.8. TRANS-ANETOL

O *trans*-anetol [*trans*-1-metoxi-4-(prop-1-enil) benzeno] é um fenilpropanoide, componente de vários óleos essenciais (figura 3). À temperatura ambiente se apresenta na forma de cristais brancos, com ponto de fusão de 21 °C e ponto de ebulição de 81 °C. Sua fórmula química é C₁₀H₁₂O e tem como isômero de posição o estragol: um composto que ocorre naturalmente em um grande número de umbelíferas, entre as quais a salsa, e de labiadas, como o manjeriço e a sálvia (SOUZA, 2008).

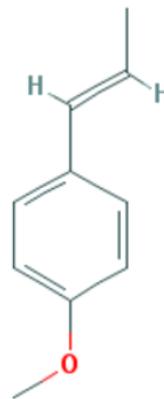
Esse composto por ser obtido principalmente do óleo essencial do *Illicium verum* (anis estrelado), *Pimpinella anisum* (anis) e *Foeniculum vulgare* (erva-doce), e compõe mais de 90% do óleo essencial dessas plantas (YANG et al., 2010; SOARES et al., 2007). Ele ainda é encontrando em menores concentrações nos óleos essenciais do bálsamo de limão (6.1%), coentro (0.5%) e manjeriço (0.08%) (CHAINY, 2000). As plantas sintetizam o isômero *trans* do anetol de forma quase que exclusiva. As sementes do óleo de anis, por exemplo, produzem 94% de (*trans*)-anetol e menos de 1% de (*cis*)-anetol (OZCAN; CHALCHAT, 2006). O isômero *trans* é usado como flavorizante e aromatizante, enquanto que o isômero *cis* possui um aroma menos agradável. Dessa forma uma simples mudança na isomeria da estrutura da molécula do anetol pode levar a mudanças sensoriais, bem como farmacológicas (BARBER; NEWBY, 2013).

Foi demonstrado experimentalmente que o anetol em baixas doses possui pouca toxicidade (SMITH et al., 2002) e é considerado não genotóxico e não carcinogênico, portanto, consideravelmente seguro (FREIRE et al., 2005; YEA et al.,

2006). Em ensaios de toxicidade aguda, segundo a OECD 423, o *trans*-anetol apresentou sua DL₅₀ estimada em 1.000 mg/kg (dados não publicados).

O *trans*-anetol foi identificado como sendo o composto majoritário do OE da *Illicium verum* (SINGH et al., 2006; HUANG; ZHAO; ZHOU et al., 2010). Sendo assim, ele parece ser o responsável pela maioria das propriedades atribuídas ao óleo essencial da anis estrelado (*Illicium verum*) que apresenta atividades como inseticida (SINGH et al., 2006; RAVID; PUTIEVSKY; KATZIR, 1994), antimicrobiana e antiviral (ASTANI; REICHLING; SCHNITZLER, 2011), antimetástica (CHOO et al., 2011), anticarcinogênica (AL-HARBI et al., 1995; CHOO et al., 2011), anti-inflamatória (CHAINY, 2000; DOMICIANO et al., 2013), antihipernociceptiva (RITTER et al., 2013) e antioxidante (FREIRE et al., 2005). Também, o *trans*-anetol isolado possui algumas atividades descritas como antifúngica (HUANG; ZHAO; ZHOU et al., 2010) e anti-inflamatória em doença pulmonar crônica (KIM; LEE; SEOL, 2017), antimicrobiana (WIECZYŃSKA et. al, 2018), e antidepressiva (dados não publicados). Entretanto, até o presente momento não há dados na literatura referentes à ação dessa molécula em modelos experimentais de convulsão agudo e crônico.

Figura 3. Estrutura química do *trans*-anetol



Fonte: Pubchem, 2020

Objetivos

3. OBJETIVOS

3.2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do fenilpropanoide *trans*-anetol em modelos animais de convulsão agudo e crônico.

3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a ação do *trans*-anetol em protocolos clássicos de investigação para drogas anticonvulsivantes por metodologia comportamental aguda de indução química e elétrica;
- Caracterizar o perfil eletroencefalográfico de animais submetidos a indução de processos convulsivos, tratados com o *trans*-anetol, a fim de confrontar estes dados eletrofisiológicos com os comportamentos observados;
- Avaliar o possível efeito anti-epileptogênico do *trans*-anetol em modelo animal crônico do *kindling* químico.

Materials

4. MATERIAIS

4.1. ANIMAIS

Para realização dos testes foram utilizados camundongos Swiss albino (*Mus musculus*) machos, com 2-3 meses de idade e massa corporal variando entre 25 - 35 gramas, provenientes do Biotério Prof. Dr. Thomas George da Universidade Federal da Paraíba.

Os animais foram mantidos em caixas de polietileno, com quatro camundongos no máximo por caixa, em condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), com livre acesso a ração do tipo pellets (Purina®) e água em garrafas de polietileno. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12 horas, sendo a fase clara de 6:00 às 18:00 horas.

4.2. CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Os animais foram aclimatados por uma hora antes dos experimentos, com o intuito de minimizar possíveis alterações comportamentais.

A bancada e os equipamentos foram higienizados com álcool 70% antes e ao término dos experimentos, e com álcool a 10% durante os testes, a fim de diminuir possíveis odores que pudessem interferir no comportamento dos animais.

Todos os procedimentos experimentais ocorreram entre 8:00 e 17:00 horas, sendo os animais utilizados apenas uma vez para cada teste e eutanasiados por deslocamento cervical com anestesia prévia ao final. As carcaças foram refrigeradas e depois descartadas por uma empresa especializada. Todos protocolos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFPB, sob certidão de número 3890250918.

4.3. REAGENTES

O *trans*-anetol foi solubilizado em Tween 80® (2%) e as demais substâncias [pentilenotetrazol (75 e 30 mg/kg), diazepam (5 e 2 mg/kg) e a fenitoína (25 mg/kg)] foram dissolvidos em solução salina (0,9%). O *trans*-anetol e pentilezotetrazol foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), diazepam pela Hipolabor®

(Belo Horizonte, Brasil), fenitoína pela Cristália® (São Paulo, Brasil) e a salina pela FARMAX® (Divinópolis, Brasil).

As doses utilizadas do TAN (100, 200, 300 e 400 mg/kg) foram escolhidas de acordo com estudo prévio da DL50, que foi estimada em 1.000 mg/kg segundo o protocolo para toxicidade aguda OECD 423 (dados não publicados).

4.4. EQUIPAMENTOS

- Aparelho de eletrochoque auricular (ECT UNIT 7401- Ugo Basile - Itália);
- Balança analítica (M254A, BEL Engineering, Itália);
- Eletroencefalograma (Neuromap – Brasil);
- Estereotáxico (Insight – Brasil).

Métodos

5. MÉTODOS

5.1. TESTE DAS CONVULSÕES INDUZIDAS PELO ELETROCHOQUE MÁXIMO

O teste do eletrochoque máximo (ECM) é umas das metodologias clássicas iniciais para avaliar drogas com potencial anticonvulsivante. Foi primeiramente descrito por Putnam e Merritt (1937) e se baseia na aplicação de pulsos elétricos auriculares que induzem crises generalizadas do tipo tônico-clônica (LOSCHER; FASSBENDER; NOLTING, 1991; LUSZCZKI et al., 2010).

Neste experimento os animais foram divididos em cinco grupos (n = 8). O grupo veículo foi tratado com solução salina a 0,9% (10 mL/kg, i.p.) e o grupo padrão com fenitoína (25 mg/kg, i.p.). Os grupos experimentais foram tratados com diferentes doses de trans-anetol (200 mg/kg, 300 mg/kg e 400 mg/kg, i.p.), sendo o tempo de tratamento foi definido a partir de uma triagem realizada num estudo anterior (dados não publicados). Após 30 minutos de tratamento com o grupo veículo e padrão e 60 minutos após os grupos experimentais, as crises convulsivas foram induzidas através de um par de eletrodos auriculares conectados ao equipamento de eletrochoque com estímulo de 0,5 mA, 50 pulsos/s, com duração de 0,5 s. Logo após a indução elétrica os animais foram observados para o seguinte parâmetro: duração das crises tônicas (extensões completas dos membros posteriores) (PRAVEEN et.al, 2013; TORTORIELLO; ORTEGA, 1993).

5.2. TESTE DAS CONVULSÕES INDUZIDAS PELO PENTILENOTETRAZOL E ELETROENCEFALOGRAFIA (EEG)

O PTZ é um agente químico utilizado para induzir a convulsão, sendo usado como triagem preliminar para caracterizar novas drogas anticonvulsivantes (LÖSCHER 1998; SAYYAH; NADJAFNIA; KAMALINEJAD, 2004).

Neste experimento, foram induzidas as crises epiléticas com pentilenotetrazol e concomitantemente foi realizado o registro eletroencefalográfico das ondas cerebrais dos animais. Para isso, os animais foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica para implantação de eletrodos.

Os animais foram previamente anestesiados com cetamina (70 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) e imobilizados num aparelho estereotáxico. Posteriormente, dois eletrodos foram cirurgicamente inseridos bilateralmente sobre o córtex parietal, e um terceiro parafuso foi inserido sobre o córtex frontal como eletrodo de referência. Os eletrodos foram ligados a um conector por soldagem e fixados com cimento acrílico dental. Após a cirurgia, os animais foram tratados com analgésico tramadol e antibiótico amoxicilina (i.p.). Os testes foram realizados 4-5 dias após o procedimento cirúrgico (CAVALHEIRO et al., 1992).

Depois do tempo de recuperação, os animais previamente cirurgiados foram divididos em cinco grupos com 8-9 animais por grupo. Posteriormente foram conectados, através do eletrodo, a um encefalograma digital e colocados em uma caixa de vidro, um animal por vez, para o registro da atividade eletrofisiológica cerebral durante o experimento. Foi feito um período de aclimatação dos animais na caixa e posteriormente iniciou-se o experimento em que foi registrado um período basal de 10 minutos. Em seguida, os animais receberam os seguintes tratamentos via intraperitoneal: solução tween 80 5% (grupo veículo), TAN 400 mg/kg, TAN 300mg/kg, TAN 200mg/kg e diazepam 5 mg/kg (substância padrão). Após 30 minutos da administração do veículo e substância padrão foi administrado o PTZ na dose de 75 mg/kg. Os grupos experimentais receberam o PTZ na mesma dose após 60 minutos do tratamento. Imediatamente após a injeção do PTZ os animais foram observados quanto aos seguintes parâmetros: latência para o primeiro espasmo, latência para a primeira convulsão tônico-clônica, duração da convulsão tônico-clônica e porcentagem de mortalidade (ALMEIDA, 2006) conforme pode ser visualizado na figura 4.

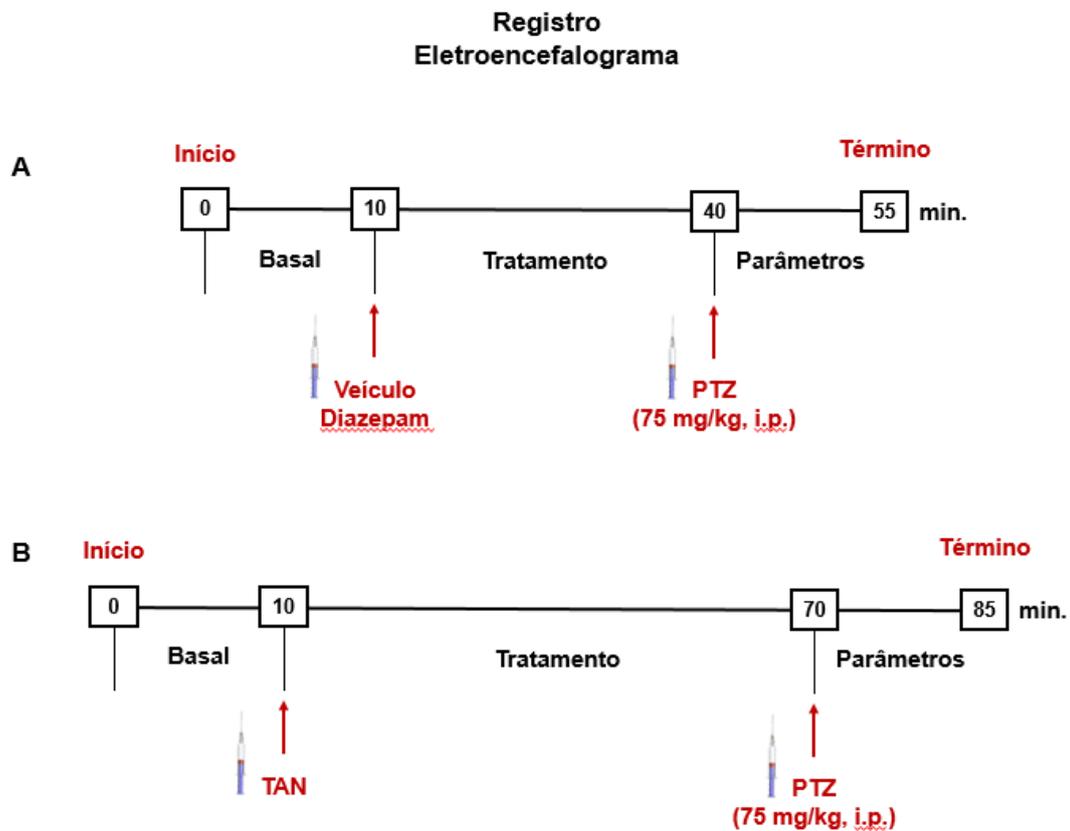


Figura 4. Desenho experimental do teste do pentilenotetrazol (PTZ) acompanhado por EEG. Delineamento da administração dos grupos veículo e diazepam (A) e do transanetol (TAN) (B).

Fonte: Elaborado pelo autor

5.3. MODELO DO KINDLING

O *kindling*, também conhecido como abrasamento, é um modelo crônico de epilepsia que mimetiza a epileptogênese em humanos através de um estímulo subconvulsivante inferido de forma repetitiva (MCNAMARA, 1984).

Para realização deste experimento, os animais foram divididos em cinco grupos com 4-8 animais. Durante 31 dias os animais foram tratados em dias alternados via i.p. com: solução tween 80 a 5% (grupo veículo), TAN 300mg/kg, TAN 200mg/kg, TAN 100mg/kg e diazepam 2 mg/kg (substância padrão). Após 30 minutos da administração do veículo e substância padrão e 60 minutos da substância teste foi administrado o PTZ numa dose subconvulsivante de 30 mg/kg. Os animais foram observados em seguida durante 30 minutos e o comportamento foi classificado segundo uma escala de Racine (1972) adaptada para os critérios: 0

(nenhuma alteração de comportamento), 1 (parada comportamental súbita, olhar fixo imóvel, tremor de vibrissas), 2 (movimentos orofaciais e de mastigação, crise de ausência e espasmos), 3 (tremores mioclônicos, cauda rígida, convulsão clônica de membros anteriores na postada sentada), 4 (convulsão clônica ou tônico-clônica com *rearing*, e ou seguido de queda, sem perda de equilíbrio), 5 (convulsão tônico-clônica com perda de postura, saltos selvagens e convulsão tônica e morte).

Os animais receberam doses subconvulsivantes de PTZ em dias alternados até que o grupo veículo apresentasse o escore 5 na escala de Racine, encerrando assim o experimento (figura 5).



Figura 5. Desenho experimental do modelo do *kindling*.
Fonte: adaptada de DHIR, 2012.

5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os resultados obtidos pelo teste do eletrochoque máximo foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguido do teste de Tukey para inferências estatísticas de dados paramétricos. Os dados comportamentais para as convulsões induzidas pelo PTZ foram analisados por ANOVA de uma via seguido do teste de Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn's. Os dados são apresentados como mediana e intervalo interquartil. Já a análise dos dados do EEG e do *kindling* foram analisados pela ANOVA de duas vias seguido do teste de Tukey. A porcentagem de mortalidade foi calculada pelo teste exato de Fisher.

Os valores de H foram considerados significativos e apresentados apenas quando $p < 0,05$. Todos os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

Resultados

6. RESULTADOS

6.1 TESTE DAS CONVULSÕES INDUZIDAS PELO ELETROCHOQUE MÁXIMO

No teste do eletrochoque máximo pode-se observar que o grupo tratado com o TAN na dose de 300 mg/kg ($12,00 \pm 2,9$ s) e 400 mg/kg ($9,00 \pm 4,4$ s) foi capaz de diminuir a duração das convulsões do tipo tônico quando comparados ao grupo veículo ($21,71 \pm 6,5$ s) (figura 6).

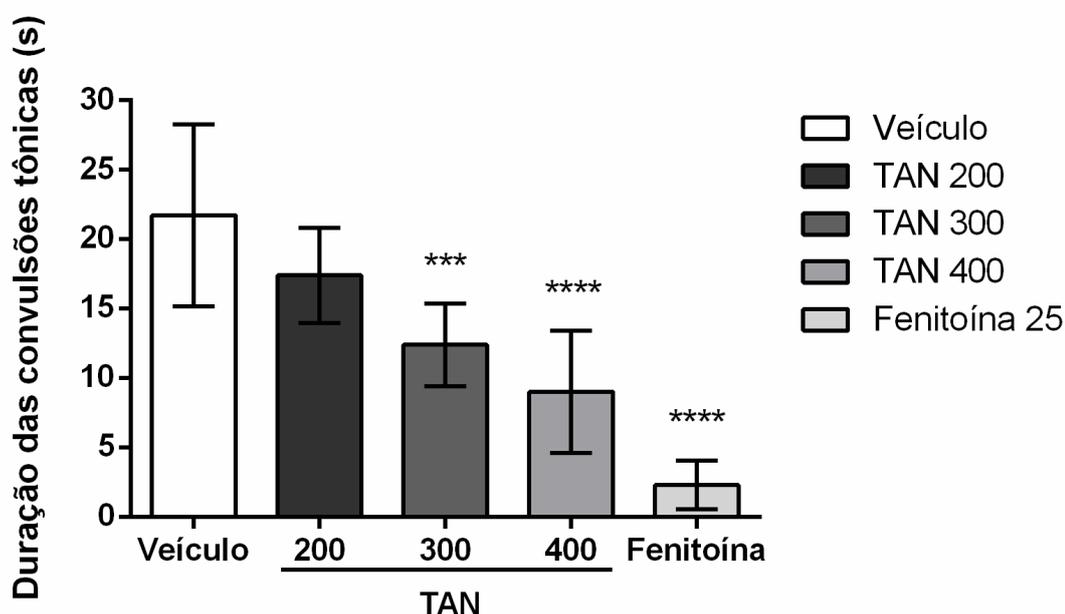


Figura 6. Efeito do *trans*-anetol na duração convulsões tônicas (s) induzidas pelo eletrochoque máximo em camundongos ($n=8$ /grupo). Grupos: veículo (tween 80 5%), *trans*-anetol (TAN; 200, 300 e 400 mg/kg), e Fenitoína (25 mg/kg). Análise dos dados por ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey. *** $p<0,001$ e **** $p<0,0001$ comparado com o veículo (controle). Os valores representam a média \pm desvio padrão.

O mesmo não pode ser observado no grupo TAN na dose de 200 mg/kg ($17,38 \pm 3,4$ s). O grupo padrão tratado com fenitoína 25 mg/kg ($2,29 \pm 1,7$ s), como previsto, foi capaz de atenuar significativamente as convulsões por indução elétrica.

6.2. TESTE AGUDO DAS CONVULSÕES INDUZIDAS PELO PENTILENOTETRAZOL

No teste agudo de convulsões induzidas pelo PTZ, o TAN (400 mg/kg) [80,0, (56,0 - 134,0 s)] aumentou a latência para o surgimento do primeiro espasmo ($p < 0,05$), em comparação com o grupo veículo [34,0, (10,0 - 82,0 s); $H(4) = 23,17$] (figura 7A). O grupo tratado com diazepam (5 mg/kg) também apresentou resultados semelhantes [144,0, (76,0 - 900 s)] $p < 0,0001$. Já o TAN na dose de 300 mg/kg [66,5, (49,0 - 91,0 s)] e 200 mg/kg [60,0 (44,0 - 82,0 s)] não expressou resultados significativos quando comparados com o grupo veículo.

Os resultados da latência para crise generalizada do tipo tônico-clônica estão na figura 7B. O grupo experimental tratado com o TAN na dose de 400 mg/kg [900,0 (861,0 - 900,0 s)] aumentou significativamente o tempo de latência, em relação ao grupo veículo [90,0, (23,0 - 160,0 s); $H(4) = 33,3$; $p < 0,0001$], apresentando um resultado símile quando comparado ao grupo padrão diazepam (5 mg/kg) [900,0 (900,0 - 900,0 s)]. O TAN 300 mg/kg [639,5 (87,0 - 900,0 s)] e 200 mg/kg [399,0 (127,0 - 735,0 s)] não expressaram resultados significativos quando comparados ao veículo.

Para o parâmetro da duração da crise generalizada do tipo tônico-clônica, apenas o grupo experimental tratado com TAN 400 mg/kg [0,0, (0,0 - 10,0 s)] e o grupo diazepam [0,0, (0,0 - 16,0 s)] diferiram significativamente do grupo veículo [20, (8 - 52,0 s); $H(4) = 28,97$; $p < 0,0001$] ao diminuir a duração das convulsões (figura 7C).

Não foram registradas mortes nos grupos pré-tratados com TAN (400, 300, 200 mg/kg) e o padrão, diazepam (5 mg/kg), quando comparados estatisticamente ao grupo veículo, que apresentou uma taxa de 75% de mortalidade (tabela 1).

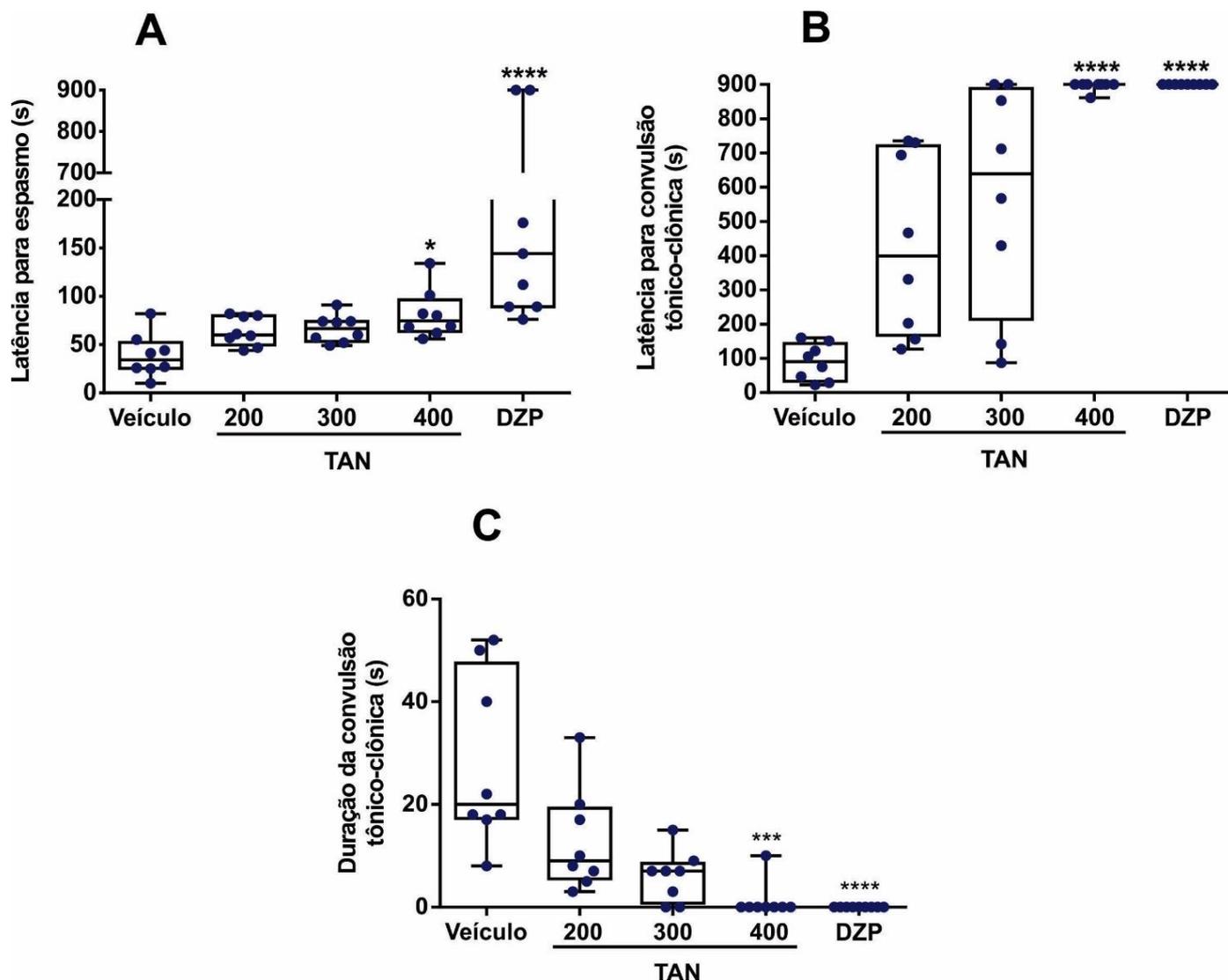


Figura 7. Efeito do *trans*-anetol no teste agudo das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ; 75 mg/kg, i.p.) (n = 8 - 9/grupo). Grupos veículo (tween 80 5%), *trans*-anetol (TAN; 200, 300 e 400 mg/kg), e diazepam (DZP; 5 mg/kg). Avaliação dos parâmetros da latência para o primeiro espasmo (A), latência para convulsão tônico-clônica (B), duração da convulsão tônico-clônica (C). Os dados foram analisados pela ANOVA de uma via, seguido do teste Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn's e representam a mediana e intervalo interquartil (p < 0,05).

Tabela 1. Efeito do *trans*-anetol no percentual de mortalidade no teste das convulsões induzidas pelo PTZ em camundongos.

Grupos	Dose	% Mortalidade
Veículo (Salina – 0,9 %)	—	75
<i>trans</i>-Anetol	200 mg/Kg	0 ***
	300 mg/Kg	0 ***
	400 mg/Kg	0 ***
Diazepam	5 mg/kg	0 ***

Teste exato de Fisher, *** p <0.001, comparado ao grupo veículo.

6.3. AVALIAÇÃO ELETROENCEFALOGRÁFICA DO TESTE DAS CONVULSÕES INDUZIDAS PELO PENTILENOTETRAZOL

A análise do eletroencefalograma das convulsões induzidas pelo PTZ em camundongos no teste agudo está disposta na figura 8.

Durante o período de 3 minutos centrais do registro basal não houve diferença entre os grupos (figura 8A), porém durante os 3 minutos centrais do tratamento houve uma redução na amplitude [F (4, 37) = 22.1, p < 0,0001], bem como na média total da amplitude [F (4, 40) = 770.6, p < 0,0001] dos grupos que receberam a administração com TAN comparado ao veículo e diazepam (figura 8B).

Na representação dos 3 minutos iniciais após a administração do PTZ (figura 8C), observa-se que o grupo veículo teve um aumento significativo da amplitude do registro quando comparado aos grupos diazepam e experimentais do TAN [F (4, 37) = 10.26, p < 0,0001]. Quando realizada a média desse mesmo período, constatou-se que o grupo tratado com TAN 400 mg/kg (1,06 ± 0,16) e 300 mg/kg (1,82 ± 0,23) apresentou uma amplitude menor que a do grupo veículo (2,48 ± 0,12), assim como o grupo padrão diazepam (0,90 ± 0,06) [F (4, 40) = 13.01, p < 0,0001] (figura 8F).

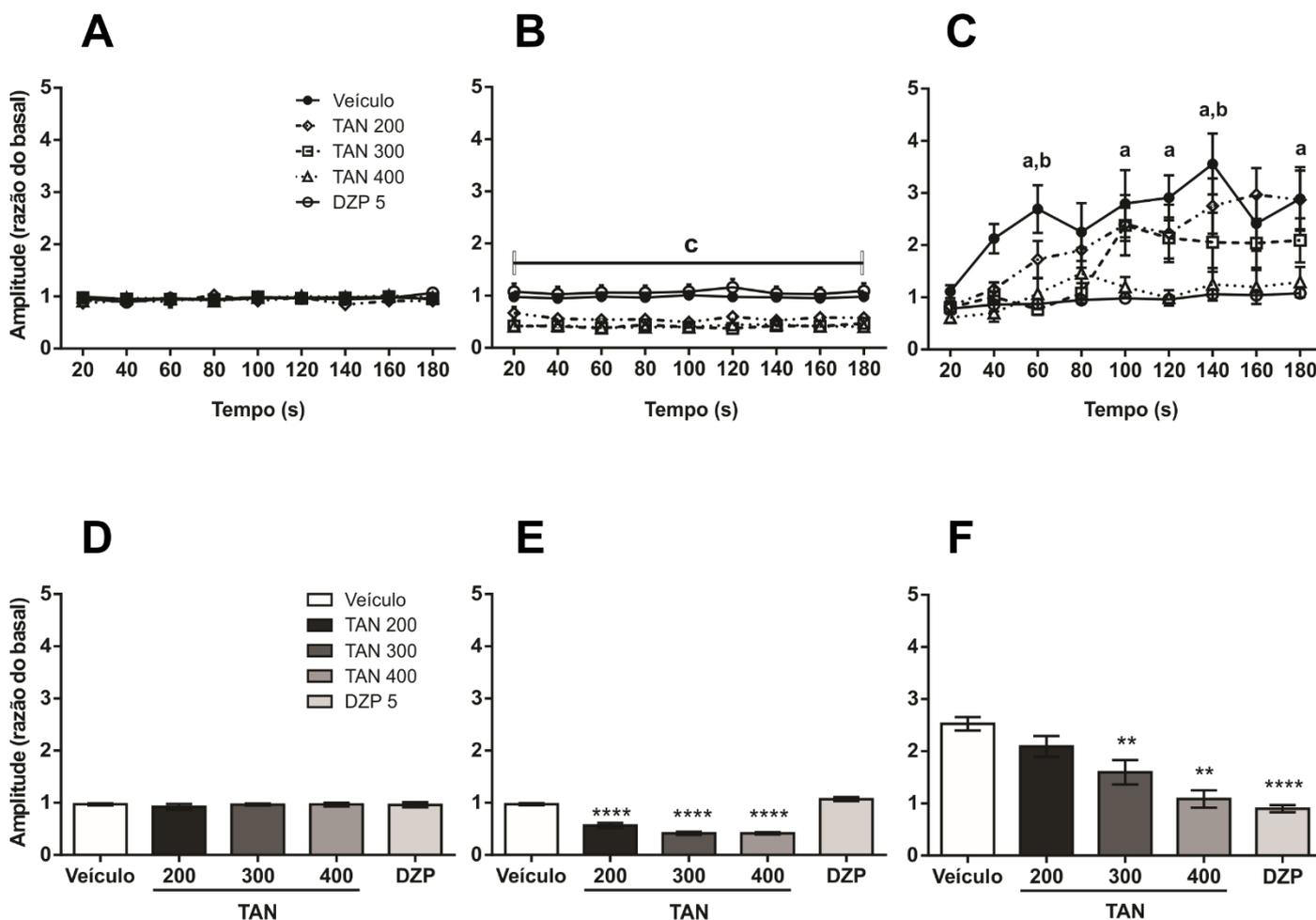


Figura 8. Quantificação da amplitude do registro eletroencefalográfico (EEG) nas convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ; 75 mg/kg, i.p.) (n = 6-10/grupo). Grupos veículo (tween 80 5%), *trans*-anetol (TAN; 200, 300 e 400 mg/kg), e diazepam (DZP; 5 mg/kg). Amplitude (média a cada 20 s) e média total da amplitude, respectivamente, dos 3 minutos centrais do registro da linha basal (A e D), do registro da administração dos tratamentos (B e E), e nos 3 minutos iniciais logo após a administração do PTZ (C e F). Os dados foram analisados por ANOVA de duas vias (amplitude) e por ANOVA de uma via (média total da amplitude), seguidas pelo teste de Tukey e apresentados como a média \pm erro padrão da média. 'a' indica uma diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre os grupos DZP e TAN 400 mg/kg comparados com o veículo; 'b' indica diferença entre TAN 300 mg/kg e veículo; 'c' diferencia os grupos do TAN comparados ao veículo. O asterisco indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo veículo, ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$.

Para corroborar e confirmar esses resultados, foi feita também uma avaliação dos registros gráficos do eletroencefalograma. Os gráficos da figura 9 apresentam os dados da amplitude durante os 3 minutos iniciais após a administração do PTZ, separados por grupo, e seus respectivos registros do EEG de animais representativos de cada grupo ao lado.

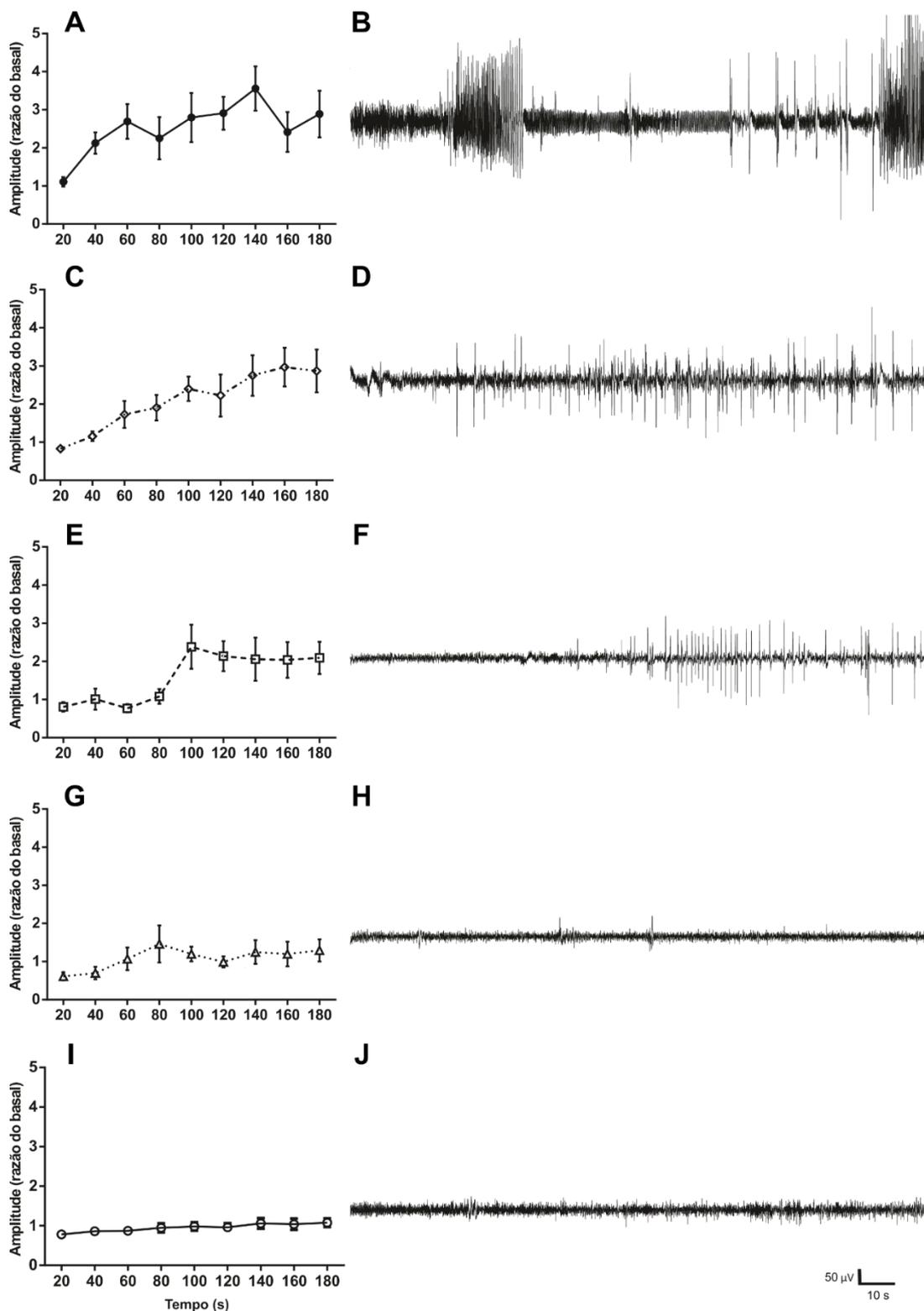


Figura 9. Quantificação da amplitude (derivada da figura 8C) (n = 6-9/grupo) e os gráficos representativos do registro eletroencefalográfico (EEG) de um animal de cada grupo, respectivamente, após a administração do pentilenotetrazol (PTZ; 75 mg/kg, i.p.). Grupos: veículo (tween 80 5%) (A e B), *trans*-anetol: TAN 200 mg/kg (C e D), TAN 300 mg/kg (E e F), TAN 400 mg/kg (G e H), e diazepam: DZP 5 mg/kg (I e J). Os dados foram normalizados pela média do período basal total (10 minutos) e apresentados como a média (linha) a cada 20 segundos.

Nesta figura pode-se observar que o TAN 300 mg/kg (figura 9E e 9F) e 400 mg/kg (fig. 9G e 9H) conseguiram aumentar a latência para o aparecimento dos espasmos, bem como atenuar e inibir as convulsões generalizadas tônico-clônicas induzidas pelo PTZ.

6.4. MODELO DO *KINDLING*

Nas convulsões induzidas pelo modelo do *kindling*, o tratamento com PTZ na dose subconvulsivante de 30 mg/kg, durante 31 dias alternados, promoveu um aumento da média dos escores do grupo veículo + PTZ ($1,43 \pm 1,30$) comparado ao grupo diazepam + PTZ ($0,05 \pm 0,14$), atingindo o escore máximo (5) durante o penúltimo e último dia de experimento (figura 10). A partir do décimo quinto dia, o grupo tratado com TAN na dose de 100mg/kg ($0,29 \pm 0,30$) foi capaz de reduzir a média dos escores até o final do experimento quando comparado ao veículo + PTZ. O mesmo pode ser observado no grupo padrão diazepam + PTZ ($0,05 \pm 0,14$). Na dose de 200 mg/kg ($1,05 \pm 1,09$), o TAN também foi capaz de reduzir o mesmo parâmetro no último dia de experimento. Já a dose TAN 300 mg/kg ($1,35 \pm 1,65$) reduziu a média dos escores, juntamente com os outros grupos tratados, apenas no 15° e 16°, não sendo capaz de manter durante o final do experimento quando comparado ao veículo + PTZ.

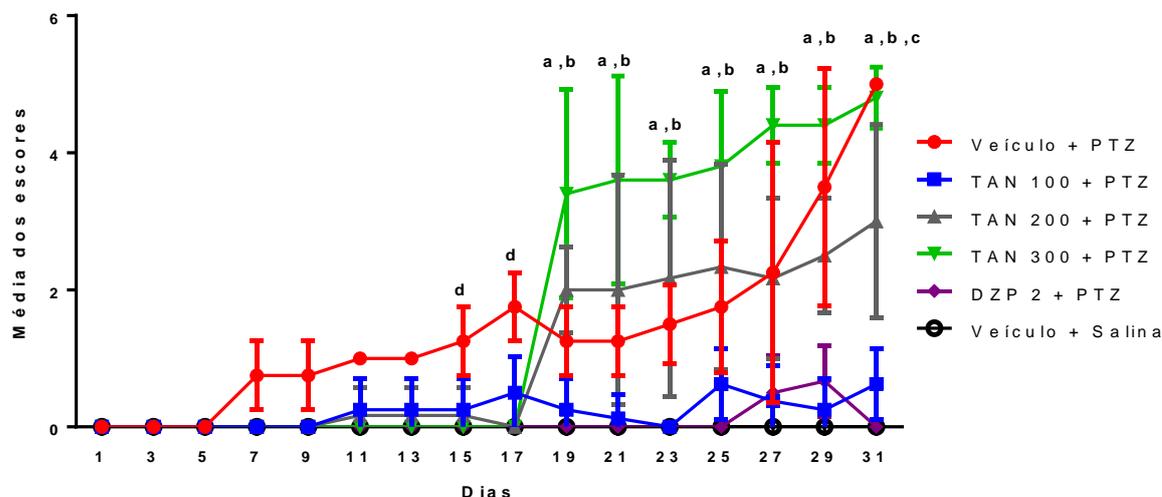


Figura 10. Efeito do *trans*-anetol em camundongos, no modelo do *kindling* induzido pelo pentilenotetrazol (PTZ; 30 mg/kg), representado pela média dos escores segundo a escala de Racine adaptada ($n = 4 - 8/\text{grupo}$). Grupos veículo (tween 80 5%) + PTZ, *trans*-anetol (TAN; 200, 300 e 400 mg/kg) + PTZ, e diazepam (DZP; 2 mg/kg) + PTZ e veículo (tween 80 5%) + salina 0,9%. Os valores foram analisados pela ANOVA de duas vias, seguido do teste de Tukey e representam a média \pm desvio padrão. 'a' indica uma diferença significativa ($P < 0,05$) dos grupos DZP 2 + PTZ e veículo + salina comparados ao grupo veículo + PTZ. 'b' e 'c' indica uma diferença dos grupos TAN 100 + PTZ e TAN 200 + PTZ, respectivamente, comparados ao grupo veículo + PTZ. 'd' representa uma diferença de todos os grupos tratado em relação ao veículo + PTZ.

Discussão

7. DISCUSSÃO

Epilepsia é uma das desordens neurológicas mais comuns (BHUTADA et al., 2010), e é comumente associada a disfunções cerebrais, que levam a várias comorbidades e afeta profundamente muitos aspectos na qualidade de vida dos pacientes (BAULAC et al., 2001; SANDER et al., 2003). Apesar dos anticonvulsivantes atualmente disponíveis serem eficazes na redução da gravidade e no número de convulsões, aproximadamente 30% dos pacientes continuam a ter convulsões. Isso incentivou uma pesquisa considerável para novos medicamentos antiepilépticos (BHUTADA et al., 2010).

No âmbito dos produtos naturais, uso dos OEs vem se destacando e ganhando popularidade nos últimos tempos por apresentar benefícios à saúde e, com isso, um aumento no número de estudos e evidências que suportam o seu uso também vem sendo observado (DONATELLI; SOMES; MILLER; 2018). De maneira particular, alguns componentes químicos dos OEs possuem ação no SNC, incluindo atividade anticonvulsivante. Assim, os OEs e seus principais constituintes vem atraindo e incentivando novos estudos em relação aos seus aspectos químicos e potencial farmacológico com intuito de gerar o desenvolvimento de novas drogas anticonvulsivantes, que possuam maior eficácia e adesão, do que os medicamentos na terapia atual (ALMEIDA; MOTTA; LEITE; 2003; ASBAHANI et al., 2015). Diante disso, o estudo investigou a ação do TAN um composto proveniente de OEs em modelos animais clássicos de convulsão.

Inicialmente, realizou-se o teste das convulsões induzidas pelo eletrochoque máximo, que é um modelo consolidado e muito utilizado nos testes iniciais para o desenvolvimento de agentes anticonvulsivantes (PORTER et al., 1983; TOMAN; SWINYARD; GOODMAN, 1946). O fundamento desse teste baseia-se na aplicação de descargas elétricas por um curto intervalo de tempo, levando a despolarização, ou seja, abertura dos canais de sódio das células nervosas, e esse potencial de ação gerado se propaga levando a excitabilidade dos neurônios, o que pode desencadear convulsões. Nesse teste, as crises se manifestam do tipo tônico-clônicas, sendo caracterizadas pela extensão tônica dos membros posteriores (BARROS; LEITE, 1986; FAINGOLD; FROMM, 1991). No ECM pode-se avaliar a capacidade de substâncias que agem em canais iônicos com o potencial para impedir a gênese e/ou a propagação das convulsões (PORTER et al., 1983).

Investigando a ação do TAN neste teste, foi possível observar que nas doses de 300 mg/kg e 400 mg/kg, a substância em experimento foi capaz de reduzir significativamente a duração das convulsões tônicas quando comparadas ao grupo veículo, e de modo semelhante ao fármaco padrão, fenitoína.

No ECM, substâncias que atenuam as convulsões generalizadas, ou seja, do tipo tônico-clônicas, possuem o potencial de prevenir a propagação da descarga elétrica através dos neurônios, diminuindo assim a duração das convulsões e aumentando o limiar para o aparecimento de novas crises, sendo caracterizadas portanto como potenciais agentes anticonvulsivantes (LUSZCZKI et al., 2010; YA'Û et al., 2008; SWINYARD, 1969; LÖSCHER; FASSBENDER; NOLTING, 1991).

Nesse contexto o TAN pode estar atenuando as crises epiléticas nesse modelo através de um possível envolvimento dos canais de sódio. Para a confirmação dessa via, seria necessário o uso de metodologias como por exemplo do "patch-clamping" para investigação da participação dos canais de sódio (OLIVA; BERKOVIC; PETROU, 2012).

Um estudo realizado por Woźniak e colaboradores (2018) demonstrou que o óleo essencial de *Thymus vulgaris* exerceu proteção contra crises induzidas por ECM. Dentre os principais compostos isolados do óleo, o borneol, timol e eugenol, numa dose fixa de 300 mg/kg, dose semelhante a utilizada no presente estudo pela mesma via intraperitoneal, igualmente exerceu uma proteção ainda maior contra convulsões induzidas por descargas elétricas.

Outra metodologia validada e largamente utilizada até hoje para triagem de novas substâncias anticonvulsivantes é o teste das convulsões induzidas pelo PTZ (RANDRIANARIVO et al., 2016; MESDAGHINIA et al., 2019; NOZADZE et al., 2011; MEHLA et al., 2010). O PTZ é uma ferramenta farmacológica que promove sua ação convulsivante por meio do antagonismo dos receptores ionotrópicos inibitórios GABA_A. Essa via possui o GABA como um importante neurotransmissor inibitório no cérebro (SILAMBUJANAKI et al., 2010) e o aprimoramento da neurotransmissão GABAérgica inibe ou atenua convulsões, enquanto que a falha desse sistema de neurotransmissão pode precipitar/facilitar a ocorrência das convulsões (SHIN et al., 2011; AMABEOKUA et al., 2007). Além desse mecanismo o PTZ ainda pode causar excitação neuronal através da ativação de canais de sódio diretamente na membrana do neurônio (SMITH; WHITE; WILCOX, 2007; LÖSCHER, SCHIMIDT, 1988; FAINGOLD, 1987).

Medicamentos anticonvulsivantes padrão, como diazepam e fenobarbital, apresentam potencial para proteger de convulsões induzidas por PTZ em camundongos (MAHOMED; OJEWOLE, 2006; PRAVEEN, et al., 2013).

Os resultados obtidos nesta etapa de experimentos demonstram que o TAN aumentou a latência para a primeira manifestação convulsiva (latência para espasmo), bem como aumentou a latência para o surgimento da primeira convulsão tônico-clônica. Além disso, diminuiu a duração das convulsões tônico-clônicas quando comparado ao grupo veículo. Esses dados demonstram um efeito protetor do TAN que foi capaz de atenuar e até inibir o surgimento das crises tônico-clônicas. Esse resultado foi expressivo e pode ser observado nos animais tratados com a dose de TAN 400 mg/kg. As doses de 200 e 300 mg/kg apesar de diminuírem a duração e aumentarem a latência para as convulsões, não apresentaram resultados estatisticamente significantes em relação ao veículo.

No grupo tratado com diazepam, substância utilizada como padrão, também pode-se observar um aumento da latência para espasmo e diminuição da duração das crises, demonstrando um efeito protetor semelhante ao observado no tratamento com TAN. O diazepam, sendo um benzodiazepínico, atua inibindo as convulsões ao potencializar a ação do GABA nos seus canais de cloreto associados ao receptor GABA_A, facilitando dessa forma a transmissão GABAérgica, hiperpolarizando os neurônios e aumentando o limiar para o desencadeamento das crises convulsivas (BORMANN, 1991; GOODMAN; GILMAN, 2018).

A proteção também se estendeu à taxa de mortalidade dos animais em todas as doses do TAN e no grupo diazepam. Esses resultados demonstram que o TAN na dose de 400 mg/kg apresenta um efeito anticonvulsivante e neuroprotetor, assim como as doses de 200 e 300 mg/kg que mesmo não sendo capazes de inibir as convulsões protegeram os animais da morte, apresentam também um efeito neuroprotetor.

Os resultados comportamentais encontrados no teste do PTZ são suportados pelas análises eletroencefalográficas realizadas neste experimento, e estas foram divididas em três etapas, segundo o delineamento experimental: basal, tratamento e administração do PTZ.

Durante o período para o estabelecimento da linha basal dos animais, não foi observada diferença na amplitude das ondas registradas ou alteração no perfil eletroencefalográfico, como era esperado. Esse controle da linha basal de cada

animal em experimento se faz importante para a posterior comparação e quantificação dos dados após os tratamentos e administração do PTZ.

Na administração do tratamento, também foi realizada a análise da amplitude das ondas entre os grupos, e não foi observada diferença significativa entre o grupo veículo e o diazepam. Já os grupos tratados com TAN apresentaram uma ligeira diminuição na amplitude das ondas em comparação com o grupo veículo. Isso pode ser explicado devido ao efeito depressor do TAN no SNC, sendo um indicativo de uma possível ação via GABAérgica (HERBERG; WILLIAMS, 1983). O diazepam é uma droga que age por via GABAérgica e não apresenta um perfil depressor das ondas no EEG, entretanto essa pode ser uma característica intrínseca do perfil eletroencefalográfico do TAN, uma vez que diferentes substâncias psicotrópicas apresentam sua própria “impressão digital” de EEG (DIMPFL, 2003).

Em sequência, logo após a injeção do PTZ foram analisados os 3 minutos do período inicial do tempo total de 15 minutos desta etapa, em que se observa que o grupo veículo já apresentava um aumento da amplitude das ondas encefalográficas em 60 segundos após administração. Em contrapartida os grupos tratados com TAN foram capazes de diminuir essa amplitude, em que as doses de 300 e 400 mg/kg difeririam significativamente do grupo veículo. Esses dados podem ser observados tanto nos gráficos de amplitude em função do tempo, como nos representativos do período em barras.

Para uma melhor visualização, os dados da amplitude após a injeção do PTZ foram separados por grupo de animais, e referenciados com seu respectivo perfil eletroencefalográfico ao lado, para o mesmo intervalo de tempo. Na representação do EEG do grupo veículo é possível observar um padrão de ondas hipersincrônica, com alta amplitude e baixa frequência, que dão início as crises convulsivas. O EEG desse grupo aponta uma hiperexcitabilidade neuronal com despolarização paroxística, em que os animais tratados com salina, após a injeção do PTZ, aumentaram a frequência da taxa de disparo neuronal e a duração do potencial de ação, sendo um indicativo do aumento da excitabilidade neuronal de processos de convulsão (FARAJNIA et al., 2011).

Referente a dose TAN 200 mg/kg observa-se uma atenuação na amplitude com picos mais espaçados e na dose de TAN 300 mg/kg há um aumento na latência para o aparecimento dos picos bem como estes se apresentam com menor amplitude. Nesses grupos nota-se uma mudança do perfil eletroencefalográfico em

relação ao veículo, mesmo com a presença das convulsões ocorre uma diminuição na taxa de disparos e na duração da despolarização dos potenciais de ação, atenuando as convulsões (FARAJNIA et al., 2011).

O mesmo pode ser visualizado no grupo tratado com TAN 400 mg/kg em que o padrão de ondas característico das crises não se forma durante esse período, apresentando apenas picos referentes a espasmos. O tratamento com TAN 400 mg/kg, especificamente, levou ao desaparecimento completo do deslocamento da despolarização paroxística, que foi desencadeado pelo PTZ. Esse resultado corrobora com os achados comportamentais em que TAN 300 e 400 mg/kg aumentam a latência para espasmo, surgimento da primeira convulsão e da sua duração em relação ao veículo, demonstrando um efeito protetor.

Já o grupo tratado com o diazepam também apresenta um eletroencefalograma normal sem alterações com características de convulsões, como esperado. A atividade epiléptica pode ser inibida por medicamentos que favorecem a neurotransmissão inibitória mediada por receptores GABA_A, como benzodiazepínicos e fenobarbital (MACDONALD; KELLY, 1995), como mencionado anteriormente. O diazepam, utilizado como padrão neste experimento, é um agonista do sítio de ligação dos benzodiazepínicos no complexo receptor GABA_A, e suprime os disparos neuronais induzidos pelo PTZ tanto durante a despolarização como durante a fase de hiperpolarização, sendo capaz de romper com esses disparos repetitivos por gerar longos potenciais pós-sináptico inibitórios (CHEVALLIER, 1996).

Um estudo do nosso grupo de pesquisa, utilizando a mesma metodologia comportamental e análise eletroencefalográfica evidenciou que o monoterpeneo 4-terpineol inibiu as crises convulsivas e também reduziu a amplitude das ondas no EEG (NOBREGA et al., 2014). Farajnia e colaboradores (2011) relataram o potencial anticonvulsivante da tarragona, uma substância derivada de óleo essencial, através do teste das convulsões induzidas pelo PTZ e avaliação eletroencefalográfica. Nesse experimento foi constatado que a substância, derivada do produto natural, foi capaz de inibir a atividade epiléptica induzida pelo PTZ, via ativação de receptores GABA_A e indiretamente pela via de inibição de canais iônicos.

Já outro estudo conduzido por Machado e colaboradores (2015) demonstrou que o ferulato de isopentila um composto da mesma classe dos fenilpropanoides

como TAN, apresentou uma atividade anticonvulsivantes no teste do PTZ com possível envolvimento da via GABAérgica.

Esses trabalhos evidenciam o potencial anticonvulsivante de substâncias provenientes de óleos essenciais, como o TAN, em modelos animais para investigação de substâncias anticonvulsivantes.

O eletroencefalograma e a análise de espectro de potência têm sido amplamente utilizados para identificar a natureza da ação farmacológica de drogas no SNC (GHOSH et al., 1989; BARBANOJ et al., 2006; DIMPFEL, 2009). A atividade neural como uma somatória de potenciais elétricos em um determinado momento específico reflete um estado cerebral funcional que compreende seus processos dinâmicos (LEHMANN et al., 1998). A análise do EEG tem sido sugerida como uma técnica importante para identificar a atividade antiepiléptica de um composto neuroativo (DIMPFEL, 2003).

Até o momento não havia estudos sobre o perfil eletroencefalográfico do TAN ou sua modulação durante a convulsão. Esse estudo aponta que o TAN na dose de 400 mg/kg foi capaz de atenuar, retardar e inibir as convulsões induzidas pelo PTZ nesse protocolo em camundongos, demonstrando um efeito protetor nas crises do tipo tônico-clônica tanto no parâmetro comportamental, como através do perfil eletroencefalográfico. Apesar de não apresentarem um efeito anticonvulsivante o TAN nas doses de 200 e 300 mg/kg apresentou um registro com picos atenuados. Os gráficos de amplitude do EEG confirmam a atividade anticonvulsivante do TAN, que diminuiu a amplitude e a frequência da taxa de disparos induzido pelo PTZ, gerando um efeito protetor por uma possível inibição na propagação das crises, e retardando para o aparecimento da próxima convulsão, provavelmente por aumentar o período de potenciais de ação pós-sináptico inibitórios, como o diazepam.

A base molecular da epilepsia em humanos ainda permanece incerta, sendo a farmacoterapia direcionada para o controle dos sintomas e supressão das convulsões. Atualmente, o uso clínico de medicamentos antiepilépticos é limitado devido à sua resistência e efeitos colaterais relacionados ao SNC. Esse efeito é especialmente pronunciado em pacientes com epilepsia do lobo temporal (ELT) nos quais é observada a progressão da doença e um alto grau de resistência ao tratamento (O'DELL et al., 2012). Os medicamentos anticonvulsivantes atuais mostram eficácia limitada contra crises recorrentes espontâneas e são incapazes de interferir com a fisiopatologia subjacente a doença, além disso geram um impacto

negativo na qualidade de vida dos pacientes. Consequentemente, são necessárias estratégias inovadoras de tratamento antiepileptogênico para atrasar ou impedir o aparecimento da doença (PITKÄNEN; ENGEL, 2014). Portanto, um dos principais objetivos do desenvolvimento de novos medicamentos antiepiléticos é introduzir medicamentos que atuem em alvos moleculares na epileptogênese.

Um modelo animal que mimetiza a epilepsia sintomática observada na prática clínica é o *kindling* ou modelo do abrasamento. Dessa forma, a investigação de drogas utilizando esse modelo fornece dados sugestivos de eficácia clínica (LÖSCHER, 2002b; MEHLA et al., 2010).

Esse teste se fundamenta na aplicação de estímulos subconvulsivantes repetitivos, seja químico ou elétrico, gerando o desenvolvimento progressivo de convulsões que se agravam nos últimos dias de tratamento (RACINE; GARTNER; BURNHAM, 1972; RAHMATI et al., 2013; YU et al., 2019). A utilização desse modelo permite a investigação de possíveis mecanismos epileptogênicos, bem como das manifestações comportamentais das convulsões ao longo dos dias de experimento (STONE; GOLD, 1988; KUMAR; LALITHA; MISHRA, 2013).

Neste estudo, a administração intraperitoneal de PTZ numa dose subconvulsivante de 30 mg/kg, em dias alternados, durante 31 dias, gerou uma susceptibilidade para surgimento de convulsões espontâneas a partir da décima sexta injeção do PTZ. Esse resultado pode ser observado no grupo veículo + PTZ, que ao longo do experimento teve um aumento dos escores atingindo a maior média no penúltimo e último dia de tratamento, como previsto.

No estudo realizado por Sancheti e colaboradores (2014), a dose subconvulsiva de PTZ (35 mg/kg), quando administrada pela mesma via intraperitoneal em dias alternados, levou mais tempo para que os camundongos entrassem no estado de “*kindling*” do que no presente estudo. Os autores relatam que o abrasamento ocorreu após a vigésima quarta injeção do PTZ, porém, a partir do quarto dia de experimento, já foi possível observar uma alteração comportamental do grupo veículo + PTZ pelo aumento dos escores.

Os dados acima apontam que as doses subconvulsivantes do PTZ começam a induzir o abrasamento nos animais a partir do quarto dia de administração, como o achado neste estudo, favorecendo o aparecimento das crises espontâneas (DAVOUDI et al., 2013).

O grupo tratado com a substância padrão, diazepam (2 mg/kg), foi capaz de prevenir as convulsões induzidas pelo PTZ, levando a uma diminuição significativa na média dos escores. Esse grupo apresentou regularidade nos escores permanecendo com a média abaixo de 1, durante todo o experimento, confirmando a proteção esperada por essa substância.

Os animais tratados com TAN 100 mg/kg apresentaram um perfil de resposta semelhante ao diazepam. Essa dose foi capaz de diminuir a média dos escores, mantendo abaixo de 1 durante todo o experimento, evidenciando um efeito protetor diante das repetidas exposições dos animais ao PTZ. Entretanto, as doses de 200 e 300 mg/kg do TAN não foram capazes de proteger os animais da convulsão, em que a partir do décimo nono dia elevou os escores acima do grupo veículo + PTZ sendo um indicativo de um possível efeito neurotóxico. Contudo, a dose de 200 mg/kg, no dia mais crítico de experimento para o grupo veículo, trigésimo dia, foi capaz de reduzir a média dos escores.

A epileptogênese é um processo gradual pelo qual o cérebro normal é convertido em cérebro epilético. É sabido que a hiperexcitabilidade e a liberação de espécies reativas de oxigênio são um dos processos associados à epileptogênese (BONDY, 1995). Na inflamação do PTZ, o efeito convulsivo é produzido em vários sistemas de neurotransmissores, como os sistemas GABAérgicos, adenosinérgicos e glutamatérgicos e pode produzir alterações morfológicas no hipocampo, incluindo morte neuronal, brotamento axonal e dendrítico, gliose, reorganização molecular das membranas e proteínas da matriz extracelular e intermediários envolvidos na homeostase celular (PITKÄNEN; SUTULA, 2002).

O PTZ também desencadeia uma variedade de processos bioquímicos, como a ativação de fosfolipases membranas, proteases e nucleases. Alterações marcantes no metabolismo de fosfolípidios de membrana em animais “kindled” (que sofreram abrasamento químico) resultam na liberação de ácidos graxos livres, diacilgliceróis, eicosanóides, peroxidase lipídica e radicais livres. O PTZ também causa a redução simultânea nos níveis de glutathione, uma enzima endógena que reage com os radicais livres e impede a geração de radicais hidroxilas nesses animais (ATILLA et al., 2005; SHINETAL, 2011). Assim, foi comprovado que vários compostos com potencial antioxidante podem impedir o processo de epileptogênese no modelo do *kindling* induzido pelo PTZ (MEHLA et al.2010).

O TAN possui estudos com atividade antioxidante, em que apresenta um efeito neuroprotetor contra uma lesão induzida por isquemia cerebral, privação/reoxigenação de oxigênio-glicose, *in vitro*. Os pesquisadores relatam que essa proteção pode estar diretamente ligada à sua capacidade de inibir a excitotoxicidade, estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (RYU et al., 2014).

Além disso, outros estudos demonstraram que seu efeito antioxidante *in vitro* é atribuído à sua capacidade de sequestrar radicais livres, diminuindo as concentrações de espécies reativas de oxigênio (CHAINY et al., 2000; SAHPAZ et al., 2002). Sua atividade antioxidante é semelhante à de outros compostos fenólicos, sendo dependente de ligações duplas conjugadas (CHAINY et al., 2000).

Assim, o TAN pode aumentar os níveis intracelulares de glutathione e glutathione-S-transferase, inibindo a peroxidação lipídica (CHAINY et al., 2000; LUBET et al., 1997). A glutathione é uma forma antioxidante endógena e impede a geração de radicais hidroxila, que é a forma mais tóxica de radicais livres (GOLECHHA et al., 2010). Nesse contexto, o TAN pode atenuar convulsões e proteger os neurônios da neurodegeneração causada pelos radicais livres em excesso produzidos durante as convulsões, sendo esse um dos seus possíveis mecanismos de ação.

O TAN apresentou um controle significativo das convulsões tanto no teste do PTZ, quanto no teste do ECM, o que ressalta o potencial anticonvulsivante dessa substância. Isso sugere a realização posterior de estudos de mecanismo de ação, como por exemplo, o uso de antagonista seletivo para sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A, flumazenil, para investigação e confirmação do envolvimento da via GABAérgica (GOLECHHA, et al., 2014), bem como avaliar seu possível efeito e neuroprotetor, *in vivo*, pela quantificação de agentes antioxidantes como a glutathione e peroxidação lipídica (GUPTA; KUMAR; SRIVASTAVA, 2003).

Em resumo, os resultados deste trabalho demonstram o potencial anticonvulsivante de um produto natural, derivado de óleo essencial, em modelos clássicos de convulsão, se mostrando efetivo tanto em modelos agudos, quanto em modelo crônico, apresentando também uma possível atividade antiepiléptogênica. Além disso, o TAN, apresentou resultado nos testes comportamentais que foram corroborados pelo seu perfil eletroencefalográfico.

Resultados como estes exibem a potencialidade desse fenilpropanoide, fornecendo um caminho para futuras investigações sobre os possíveis mecanismos de ação pelos os quais o TAN exerce seu efeito no SNC.

Conclusões

8. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos nesse estudo sobre a ação do TAN em modelos de convulsão, pode-se constatar que:

- O TAN apresentou atividade anticonvulsivante em protocolos agudos clássicos para investigação de drogas anticonvulsivante, nas doses de 300 e 400 mg/kg no teste por indução elétrica (ECM) e na dose de 400 mg/kg por indução química (teste do PTZ);
- No teste das convulsões induzidas pelo PTZ, o TAN apresentou um perfil eletroencefalográfico com diminuição da amplitude das ondas eletroencefalográficas e dos disparos neuronais com indicativo de ação anticonvulsivantes que corrobora com os dados comportamentais obtidos;
- A dose de 100 mg/kg do TAN apresentou um efeito antiepileptogênico em modelo animal crônico de abrasamento que mimetiza a epilepsia em humanos. Já as doses de 200 e 300 mg/mg não foram capazes de proteger os animais das convulsões;
- Os achados caracterizam a relevância da atividade anticonvulsivante desse produto natural e direciona estudos posteriores para investigação do mecanismo de ação dessa substância no SNC.

Referências

- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F. D.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.
- AGUIAR, C. C. T. et al. Effects of agomelatine on oxidative stress in the brain of mice after chemically induced seizures. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 33, n. 6, p. 825–835, ago. 2013.
- AGUIAR, C. C. T. et al. Oxidative stress and epilepsy: literature review. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, 2012.
- AL-HARBI, M. M.; QURESHI, S.; RAZA, M.; AHMED, M. M.; GIANGRECO, A. B.; SHAH, A. H. Influence of anethole treatment on the tumour induced by Ehrlich ascites carcinoma cells in paw of Swiss albino mice. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 4, n. 4, p. 307–318, 1995.
- ALMEIDA, R. N.; AGRA, M. F.; SOUTO MAIOR, F. N.; DE SOUSA, D. P. Essential Oils and Their Constituents: Anticonvulsant Activity. **Molecules**, v. 16, p. 2726-2742, 2011.
- ALMEIDA, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M. Drogas psicotrópicas. In: **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.1, p. 3-23, 2006.
- ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. T., et al. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 80, p. 72-76, 1999.
- ALMEIDA, R.N.; MOTTA, S.C.; LEITE, J.R. Óleos essenciais com propriedades anticonvulsivantes. **Latin American and Caribbean Bulletin of Medicinal and Aromatic Plants**, v.2, p.3-6, 2003.
- ALMEIDA, R.N.; OLIVEIRA, T.M.L. Triagem Farmacológica Comportamental. In: **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.11, p. 131-137, 2006.
- ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v.1000, p.40-56, 2004.

- AMABEOKUA, G. J.; GREEN, I.; KABATENDE, J. Anticonvulsant activity of *Cotyledon orbiculata* L. (Crassulaceae) leaf extract in mice. **J Ethnopharmacol** v.112, p. 101-107, 2007.
- ANCA, J. M.; LAMELA, M.; CALLEJA, J. M. Activity on the central nervous system of *Himantalia elongate*. **Planta Médica**, v.59, p. 218-20, 1993.
- ANNEGERS, J. F.; HAUSER, W. A.; BEGHI, E.; NICOLOSI, A.; KURLAND, L. T. The risk of unprovoked seizures after encephalitis and meningitis. **Neurology**, v. 38, p.1407-10, 1988.
- ARIDA, R. M.; SILVA, A.V.; PRIEL, M.R.; CAVALHEIRO, E. A. Animal models of epilepsy. In: Tatlisumak T, Fisher M, editors. **Handbook of Experimental Neurology: Methods and Techniques in Animal Research**. Cambridge University Press; 2006.
- ASBAHANI, A.E.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M.; AÏT ADDI, E.H.; CASABIANCA H.; MOUSADIK, A.E.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F.N.R.; ELAISSARI, A. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.483, p.220-243, 2015.
- ASTANI, A.; REICHLING, R.; SCHNITZLER, P. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. **Evid. Based Compl. Alternat Med**, p. 253643, 2011.
- ASTANI, A.; REICHLING, R.; SCHNITZLER, P. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. **Evid. Based Compl. Alternat Med**, p. 253643, 2011.
- AVANZINI, G.; FRANCESCHETTI, S. Cellular biology of epileptogenesis. **The Lancet: Neurology**, v. 2, 2003.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446-475, 2008.
- BARBANOJ, M. J. et al. Quantifying drug-drug interactions in pharmacoelectroencephalogram (EEG). **Clinical EEG and neuroscience**, v. 37, n. 2, p. 108-120, 2006.

- BARBER, V. P.; NEWBY, J. J. Jet-Cooled Fluorescence Spectroscopy of a Natural Product: Anethole. **Journal of Physical Chem. A**, v. 117, p.12831–12841, 2013.
- BARROS, H. M. T.; LEITE, J. R. Mecanismos neuroquímicos da ação de drogas anticonvulsivantes. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**. V. 8, p. 80-83, 1986.
- BAULAC, S.; HUBERFELD, G.; GOURFINKEL-AN, I., et al. First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. **Nat Genet**, v.28, n.1, p.46–8, 2001.
- BECKER, A. et al. Kindling and its consequences on learning in rats. **Behavioral and neural biology**, v. 57, n. 1, p. 37-43, 1992.
- BERDICHEVSKY, Y. et al. PI3K-Akt signaling activates mTOR-mediated epileptogenesis in organotypic hippocampal culture model of post-traumatic epilepsy. **The Journal of Neuroscience**, v.33, p.9056-9067, 2013.
- BERG, A. T. Understanding the delay before epilepsy surgery: who develops intractable focal epilepsy and when?.. **CNS spectrums**, v. 9, n. 2, p. 136-144, 2004.
- BERG, A. T; BERKOVIC, S.F.; BRODIE, M. J.; 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.
- BERG, A.T.; LANGFITT, J.; SHINNAR, S., et al. How long does it take for partial epilepsy to become intractable? **Neurology**, v. 60, p.186-190, 2003.
- BERNARDS, M. A. Plant Natural Products: A Primer. **Can. J. Zool**, v. 88, 601–614, 2010.
- BHUTADA, P.; MUNDHADA, Y.; BANSOD, K., et al. Anticonvulsant activity of berberine, an isoquinoline alkaloid in mice. **Epilepsy Behavior**, v.18, p.207–210, 2010.
- BLUMENFELD, H. What is a seizure network? Long-range network consequences of focal seizures. In: **Issues in Clinical Epileptology: A View from the Bench**. Springer, Dordrecht, p. 63-70, 2014.

BONDY, S. C. The relation of oxidative stress and hyperexcitation to neurological disease. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 208, n. 4, p. 337-345, 1995.

BORMANN, J., 1991. Electrophysiological characterization of diazepam binding inhibitor (DBI) on GABAA receptors. **Neuropharmacology**, v. 30, n.12, p. 1387-1389.

BRACCI, E.; VREUGDENHIL, M.; HACK, S.P.; JEFFERYS, J.G. Dynamic modulation of excitation and inhibition during stimulation at gamma and beta frequencies in the CA1 hippocampal region. **Journal of Neurophysiology**, v.85, p.2412-2422, 2001.

BRODIE, M. J. Do we need any more new antiepileptic drugs? **Epilepsy research**, v. 45, n. 1-3, p. 3-6, 2001.

BRODIE, M. J.; COVANIS, A.; GIL-NAGEL, A.; LERCHE, H.; PERUCCA, E.; SILLS, G. J.; WHITE, H. S. Antiepileptic drug therapy: Does mechanism of action matter? **Epilepsy & Behavior**, v. 21, p. 331–341, 2011.

BRODIE, M.J.; BARRY, S.J.; BAMAGOUS, G.A.; NORRIE, J. D.; KWAN, P. Patterns of treatment response in newly diagnosed epilepsy. **Neurology**, v78, p.1548-1554, 2012.

CARVALHO, F.L.; FONSÊCA, D.V.; PENHA, A. R. S. et.al. Involvement of pro-inflammatory cytokines and nociceptive pathways on the pharmacological activity of hydantoin derivate 5-(4-isopropylphenyl)-3-phenyl-imidazolidine-2,4-dione. **Pharmaceutical biology**, 2015.

CAVALHEIRO, E. A.; FERNANDES, M. J.; TURSKI, L. et al. Neurochemical changes in the hippocampus of rats with spontaneous recurrent seizures. **Epilepsy Res. Suppl**, v. 9, p. 239-247, 1992.

CHAINY, G. B.; MANNA, S. K.; CHATURVEDI, M.M.; Aggarwal, 478 B.B. Anethole blocks both early and late cellular responses transduced by tumor necrosis factor: effect on NF kappa B, AP-1, JNK, MAPKK and apoptosis. **Oncogene**, v.19, p. 2943-2950, 2000.

CHAUDHARY, U. J.; DUNCAN, J. S.; LEMIEUX, L. A dialogue with historical concepts of epilepsy from the Babylonians to Hughlings Jackson: Persistent beliefs. **Epilepsy and Behavior**, v. 21, p. 109-114, 2011.

CHEVALLIER, A. **The Encyclopedia of Medicinal Plants**. Dorling Kindersley. London; 1996.

CHOO, E. J.; RHEE, Y.H.; JEONG, S. J. et al. Anethole exerts antimetastatic activity via inhibition of matrix metalloproteinase 2/9 and AKT/mitogen-activated kinase/nuclear factor kappa B signaling pathways. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 1, p. 41–46, 2011.

CHOO, E. J.; RHEE, Y.H.; JEONG, S. J. et al. Anethole exerts antimetastatic activity via inhibition of matrix metalloproteinase 2/9 and AKT/mitogen-activated kinase/nuclear factor kappa B signaling pathways. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 1, p. 41–46, 2011.

COCKERELL, O. C.; SHORVON, S.D. Epilepsia – Conceitos Atuais. **Current Medical Literature**, p. 94, 1997.

COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. **Epilepsia**, v. 26, p. 268–278, 1985.

COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. **Epilepsia**, v. 30, p. 389–399, 1989.

CORTEZ, M. A.; SNEAD, P. C. Pharmacologic models of generalized absence seizure in rodents. In: A Pitkänem, PA Schwartzkoin, SL Moshé (Eds), Model of Seizures and Epilepsy. **Elsevier Academic Press**, Burlington, MA, p. 111-126, 2006.

COSTA, J. C.; RUSSO, R. E.; GUILLHERMO, G.; VELLUTI, J. C. Bases celulares da epilepsia. **Jornal da Liga Brasileira de Epilepsia**, v. 5, n.1, p. 9-17, 1992.

COSTA, J. P. et al. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. **Neuroscience letters**, v. 523, n. 2, p. 115-118, 2012.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S., et al. **Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste**; Edições UFC: Fortaleza, Brazil, 1981.

CROUCHER, M.J.; COLLINS, J.F.; MELDRUM, B.S. Anticonvulsant action of excitatory amino acid antagonists. **Science**, v. 216, p. 899-901, 1982.

Da COSTA, J. C.; PALMINI, A.; YACUBIAN, E. M. T.; CAVALHEIRO, E.A. Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias: Aspectos Clínicos e Cirúrgicos. São Paulo: **Lemos Editorial**, p. 33-35, 1998.

DE SOUSA, D.P.; GONÇALVES, J.C.R.; QUINTANS-JÚNIOR, L., et al. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neuroscience Letters**, v.401, p.231-235, 2006a.

DE SOUZA, A. G. et al. Prevention of pentylenetetrazole-induced kindling and behavioral comorbidities in mice by levetiracetam combined with the GLP-1 agonist liraglutide: Involvement of brain antioxidant and BDNF upregulating properties. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 429-439, 2019.

DECKERS, C.L.P.; GENTON, P.; SCHMIDT, D. Current limitations of antiepileptic drug therapy: a conference review. **Epilepsy Research**, v. 51, p.1-17, 2003.

DENG, H.; XIU, X.; SONG, Z. The molecular biology of genetic-based epilepsies. **Molecular Neurobiology**, v.49, p.352-367, 2014.

DESTRO, B. G.; JORGE, R. M. M.; MATHIAS, A. L. Optimization of high-concentration trans-anethole production through hydrodistillation of star anise. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 823-830, 2019.

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

DIMPFEL, W. Preclinical data base of pharmaco-specific rat EEG fingerprints (tele-stereo-EEG). **European journal of medical research**, v. 8, n. 5, p. 199-207, 2003.

DIMPFEL, W. Rat electropharmacograms of the flavonoids rutin and quercetin in comparison to those of moclobemide and clinically used reference drugs suggest antidepressive and/or neuroprotective action. **Phytomedicine**, v. 16, n. 4, p. 287-294, 2009.

DOMICIANO, T. P.; DALALIOM, M.; SILVA, E. L., et al. Inhibitory effect of anethole in nonimmune acute inflammation. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol**, v. 386, p. 331-338, 2013.

DONATELLI, N. S.; SOMES, J.; MILLER, M. Essential oils: Options for the Older Adult. **Journal of Emergency Nursing**, v. 44, n. 5, p. 520-522, 2018.

EISENSTEIN, M. Unrestrained excitement. **Nature**, v.511, p. 4-6, 2014.

ENGEL Jr, J. ILAE Commission Report. A proposed diagnostic Scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 42, n. 6, p. 796-803, 2001.

ENGEL Jr, J.; WIEBE, S.; FRENCH, J.; et al. Practice parameter: temporal lobe and localized neocortical resections for epilepsy. **Neurology**, v. 44, n. 6, p.741-751; 2003.

FALCO-WALTER, J. J.; SCHEFFER, I. E.; FISHER, R. S. The new definition and classification of seizures and epilepsy. **Epilepsy research**, v. 139, p. 73-79, 2018.

FAINGOLD, C. L. **Seizures induced by convulsant drugs**. In: Jobes PC, Laird HE (eds) Neurotransmitters and epilepsy. **Humana Press**, Clifton, p.215-276, 1987.

FAINGOLD, C.L., FROMM, G.H. The electroshock model, neuronal network and antiepileptic drugs. In: (Eds.), **Drugs for Control of Epilepsy: Actions on Neuronal Networks in Seizure Disorders**. **CRC Press, Boca Raton, FL**, p. 195–211, 1991.

FARAJNIA, S. et al. The Electrophysiological Consequences of Artemisia dracuncululus L. (Tarragon) Extract on Pentylenetetrazol-Induced Epileptiform Activity in Snail Neurons. **Cell Journal**, v.12, n.4, 2011.

FATURI, C. B.; LEITE, J. R.; ALVES, P. B.; CANTON, A. C.; TEIXEIRA-SILVA, F. Anxiolytic-like effect of sweet orange aroma in Wistar rats. **Progress in Neuro Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 34, p. 605–609, 2010.

FERNANDEZ, J. G. Prevalence of epilepsy: the Porto Alegre study. **Epilepsia**, v. 33, n. 3, p. 132, 1992.

FERRO, J. M.; CORREIA, M.; ROSAS, M. J.; PINTO, A. N.; NEVES, G. Seizures in cerebral vein and dural sinus thrombosis. **Cerebrovasc Dis**, v.15, p. 78-83, 2003.

FISHER, R. S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLU, A., et al. A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v.55, p. 475–482, 2014.

FISHER, R. S.; CROSS, J. H.; FRENCH, J. A., et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, p. 522–530, 2017.

FISHER, R. S.; PEDLEY, T. A.; MOODY, W. J.; PRINCE, D. A. The role of extracellular potassium in hippocampal epilepsy. **Archives of neurology**, v.33, p76-83, 1976.

FREIRE, R. S. S.; MORAIS, M.; CATUNDA Jr, F. E. A.; PINHEIRO, D. C. S. N. Synthesis and antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotector activities of anethole and related compounds. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 13, p. 4353-4358, 2005.

FRENCH, J. A.; GAZZOLA, D. M. New generation antiepileptic drugs: what do they offer in terms of improved tolerability and safety?. **Therapeutic advances in drug safety**, v. 2, n. 4, p. 141-158, 2011.

FRIEDRICH, H. Phenylpropanoid constituents of essential oils. **Lloydia**, v.39, n.1, p.1-7, 1976.

FUJIKAWA, D. G.; ITABASHI, H. H.; WU, A., SHINMEI, S. S. Status epilepticus-induced neuronal loss in human without systemic complications or epilepsy. **Epilepsia**, n. 41, p.981-991, 2000.

GALLUCCI NETO, J.; MARCHETTI, R.L. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 27, p.323-328, 2005.

GARCÍA, D. A. et al. Allosteric positive interaction of thymol with the GABAA receptor in primary cultures of mouse cortical neurons. **Neuropharmacology**, v. 50, n. 1, p. 25-35, 2006.

GHOSH, T. K., et al. Effects of toluene exposure on the spontaneous cortical activity in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 32, n. 4, p. 987-992, 1989.

GODDARD, G. V.; MCINTYRE, D. C.; L. CURTIS, K. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. **Experimental neurology**, v. 25, n. 3, p. 295-330, 1969.

GOLDENBERG, M. M. Overview of drugs used for epilepsy and seizures: etiology, diagnosis, and treatment. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 35, n. 7, p. 392, 2010.

GOLECHHA, M.; BHATIA, J.; ARYA, Dharamvir S. Hydroalcoholic extract of *Emblica officinalis* Gaertn. affords protection against PTZ-induced seizures, oxidative stress and cognitive impairment in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.48, p. 474-478, 2010.

GOLECHHA, M., et al. Naringin ameliorates pentylentetrazol-induced seizures and associated oxidative stress, inflammation, and cognitive impairment in rats: possible mechanisms of neuroprotection. **Epilepsy & Behavior**, v. 41, p. 98-102, 2014.

GOODMAN; GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: Ed. McGraw Hill, 13ª Edição, 2018.

GUERREIRO, C. Aspectos Gerais. Epilepsia. São Paulo, **Lemos Editorial**, p. 1-11, 1993.

GUERRINI, R.; DOBYNS, W.B. Malformations of cortical development: clinical features and genetic causes. **The Lancet Neurology**, v. 13, p.710-726, 2014.

GUPTA, Y. K.; KUMAR, M. H. V.; SRIVASTAVA, A. K. Effect of *Centella asiatica* on pentylentetrazole-induced kindling, cognition and oxidative stress in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 74, n.3, p. 579-585, 2003.

HAESLER, G. et al. Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol. **European journal of anaesthesiology**, v. 19, n. 8, p. 571-579, 2002.

HERBERG, L. J.; WILLIAMS, S. F. Anti-conflict and depressant effects by GABA agonists and antagonists, benzodiazepines and non-gabergic anticonvulsants on

self-stimulation and locomotor activity. **Pharmacol Biochem Behav.**, v.19, n.4, p. 625-33, 1983.

HERMAN, S. T.; PEDLEY, T.A. Novas opções para o tratamento da Epilepsia. **JAMABrasil**, v.3, n.1, 1999.

HESDORFFER, D. C.; LOGROSCINO, G.; CASCINO, G.; ANNEGERS, J. F.; HAUSER, W. A. Risk of unprovoked seizure after acute symptomatic seizure: effect of status epilepticus. **Annals of Neurology**, v. 44, p. 908-12, 1998.

HIRTZ, D.; THURMAN, D. J.; GWINN-HARDY, K.; MOHAMED, M.; CHAUDHURI, A. R.; ZALUTSKY, R. How common are the “common” neurologic disorders? **Neurology**, v. 68, p. 326–37, 2007.

HOLTKAMP, M.; MEIERKORD, H. Anticonvulsant, antiepileptogenic and antiictogenic Pharmacostategies. **Cell Mol Life Sci**, v. 64, p. 2023-41, 2007.

HONG, J. Role of natural product diversity in chemical biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 15, p. 1–5, 2011.

HOSSEINZADEH, H.; TALEBZADEH, F. Anticonvulsant evaluation of safranal and crocin from *Crocus sativus* in mice. **Fitoterapia**, v.76, p.722-724, 2005.

HUANG, Y.; ZHAO, J.; ZHOU, L., et al. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Illicium verum* Fruit and Its Main Component trans-Anethole. **Molecules**, v.15, p.7558-7569, 2010.

HUOT, J., RADOUCO-THOMAS C. **Qualitative and quantitative evaluation of experimentally induced seizures**. In: Mercier J, ed. Anticonvulsant drugs. Oxford Pergamon, v.1, p.123-85, 1973.

ILHAN, A., et al. Antiepileptogenic and antioxidant effects of *Nigella sativa* oil against pentylentetrazol-induced kindling in mice. **Neuropharmacology**, v. 49, n. 4, p. 456-464, 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Demográfico**. Sinopse preliminar. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/ibge/estatistica/populacao/censo2000/default.shtm>. Acesso em março, 2019. 2003.

IZQUIERDO, I et al. Effect of daily saline, drug or blank injections in the susceptibility to the convulsant effect of drugs. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 3, n. 4, p. 721-722, 1975.

JANE, D. E.; LODGE, D.; COLLINGRIDGE, G.L. Kainate receptors: pharmacology, function and therapeutic potencial. **Neuropharmacology**, v56, p.90-113, 2009.

JOHNSON, T. **CRC ethnobotany desk reference**, CRC Press, Boca Raton, FL, 1999.

JONES, O. T. Ca²⁺ channels and epilepsy. **European Journal of Pharmacology**, v.447, p.211-25, 2002.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 13. ed. Porto Alegre: AMGH, 2017.

KHALID, M. H.; AKHTAR, M. N.; MOHAMAD, A. S.; PERIMAL, E. K.; AKIRA, A.; ISRAF, D. A.; LAJIS, N.; SULAIMAN, M. R. Antinociceptive effect of the essential oil of *Zingiber zerumbet* in mice: Possible Mechanisms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 345-351, 2011.

KHAZIPOV, R. Sincronização GABAérgica na epilepsia. **Perspectivas de Cold Spring Harbor em medicina** , v. 6, n. 2, p. a022764, 2016.

KIM, K. Y.; LEE, H. S.; SEOL, G.H. Anti-inflammatory effects of trans-anethole in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 91, p. 925-930, 2017.

KINGSTON, D. G. I. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. **Journal os Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496-511, 2011.

KUMAR A.; LALITHA, S.; MISHRA, J. Possible nitric oxide mechanism in the protective effect of hesperidin against pentylenetetrazole (PTZ)-induced kindling and associated cognitive dysfunction in mice. **Epilepsy and Behavior**, v.29, p.103-111, 2013.

KUPFERBERG, H.J.; SCHMUTZ, M. Screening of new compounds and the role of the pharmaceutical industry. In: Enjel, J.; Pedley, T. (eds.). **Epilepsy: a**

Comprehensive Textbook. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, p, 1417-34, 1997.

KWAN, P.; BRODIE, M.J. Refractory epilepsy: mechanisms and solutions. **Expert Rev. Neurother**, v. 6, 397–406, 2006.

KWAN, P.; SILLS, G. J.; BRODIE, M. J. The mechanism of action of commonly used antiepileptic drugs. **Pharmacology and Therapeutics**, v.90, p. 21-34, 2001.

LASARGE, C. L.; DANZER, S. C. Mechanisms regulating neuronal excitability and seizure development following mTOR pathway hyperactivation. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v.7, n.18, 2014.

LE DUIGOU, C.; HOLDEN, T., KULLMANN, D.M. Short- and long-term depression at glutamatergic synapses on hippocampal interneurons by group I mGluR activation. **Neuropharmacology**, v.60, p.748-756, 2011.

LEHMANN, D. et al. Brain electric microstates and momentary conscious mind states as building blocks of spontaneous thinking: I. Visual imagery and abstract thoughts. **International Journal of Psychophysiology**, v. 29, n. 1, p. 1-11, 1998.

LEITE, J. P.; TERRA-BUSTAMANTE, V. C. **Plasticidade neuronal e epileptogênese.** Disponível em: http://www.videbulas.com.br/dinfo/atualida/021016_07.htm. Acesso em fevereiro, 2019. 2000.

LETTER, G. H. Epileptic Seizures. **Developmental Medicine and Child Neurology**, v. 15, n. 5, p. 688-689, 1973.

LÖSCHER, W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 50, n. 1-2, p. 105-123, 2002.

LÖSCHER, W. Current status and future directions in the pharmacotherapy of epilepsy. **Trends Pharmacol Sci**, v. 23, n. 3, p. 113-8, 2002b.

LÖSCHER, W. New visions in the pharmacology of anticonvulsants. **European Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 342, p.1-13, 1998.

LÖSCHER, W.; HONACK, D.; FASSBENDER, C. P. et al. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. 3. Pentylentetrazole seizure models. **Epilepsy Res.**, v.8, n.3, p. 171-89, 1991.

LÖSCHER, W.; KLITGAARD, H.; TWYMAN, R. E.; SCHMIDT, D. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 10, p. 757-776, 2013.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT D. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: ways out of the current dilemma. **Epilepsia**, v. 52, p.657–678, 2011.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT D. New horizons in the development of antiepileptic drugs: Innovative strategies. **Epilepsy Research**, v. 69, p. 183-272, 2006.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT D. Strategies in antiepileptic drug development: is rational drug design superior to random screening and structural variation? **Epilepsy Research**, v. 17, p. 95-134, 1994.

LOSSIUS, M. I.; RONNING, O. M.; SLAPO, G. D.; MOWINCKEL, P.; GJERSTADT, L. Post-stroke epilepsy: occurrence and predictors – a long-term prospective controlled study (Akershus Stroke Study). **Epilepsia**, v. 46, p. 1246-51, 2005.

LOWENSTEIN, D.H. Edging toward breakthroughs in epilepsy diagnostics and care. **Nature Reviews Neurology**, v.11, n. 11, p. 1-2, 2015.

LUBET, R. A., et al. Chemopreventive efficacy of anethole trithione, N-acetyl-L-cysteine, miconazole and phenethylisothiocyanate in the DMBA-induced rat mammary cancer model. **International journal of cancer**, v. 72, n. 1, p. 95-101, 1997.

LUSZCZKI, J. J. et al. Effect of arachidonyl-2'-chloroethylamide, a selective cannabinoid CB1 receptor agonist, on the protective action of the various antiepileptic drugs in the mouse maximal electroshock-induced seizure model. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 34, n. 1, p. 18-25, 2010.

MACDONALD, R. L.; KELLY, K. M. Antiepileptic drug mechanisms of action. **Epilepsia**, v. 36, n.2, p. S2–12, 1995.

MACHADO, K. C., et al. Anticonvulsant and behavioral effects observed in mice following treatment with an ester derivative of ferulic acid: Isopentyl ferulate. **Chemico-biological interactions**, v. 242, p. 273-279, 2015.

MAHOMED, I. M.; OJEWOLE, J. A. Anticonvulsant activity of Harpagophytum procumbens DC. (Pedaliaceae) secondary root aqueous extract in mice. **Brain Res Bull**, v.69, p. 57-62, 2006.

MANSOUR, M. E.; IBRAHIM, A. N. Possible anticonvulsant effect of ivabradine in kainite–induced epilepsy in rats: amelioration of oxidative stress. **World J of Pharmaceut Res**, v. 4, n. 12, p. 247-257, 2015.

MARINO J.R.; CUKIERT, A.; PINHO, E. Epidemiological aspects of epilepsy in São Paulo, Brazil: a prevalence rate study. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 44, n. 3, p. 243-254, 1986.

MATSUMOTO, H.; AJMONEMARSAN, C. Cellular mechanisms in experimental epileptic seizures. **Science**, v.144, p.193-194, 1964.

MCNAMARA, J. O. Kindling: an animal model of complex partial epilepsy. **Annals of neurology**, v. 16, n. S1, 1984.

MEHLA, J., et al. Protective effect of curcumin against seizures and cognitive impairment in a pentylentetrazole-kindled epileptic rat model. **Life sciences**, v. 87, n. 19-22, p. 596-603, 2010.

MELDRUM, B. S. Antiepileptic drugs potentiating GABA. **Electroencephalogr ClinNeurophysiol**, v. 50, p. 450-457, 1999.

MELDRUM, B. S.; ROGAWSKI, M. A. Molecular Targets for Antiepileptic Drug Development. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental**, v. 4, p. 18–61, 2007.

MELLO, L. E.; BORTOLOTTI, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Modelos experimentais de epilepsias. Uma Revisão. **Neurobiologia**, v. 49, p. 231-268, 1986.

MÉNDEZ, P.; BACCI, A. Assortment of GABAergic plasticity in the cortical interneuron melting pot. **Neural Plasticity**, v.2011, p1-4, 2011.

MESDAGHINIA, A. et al. Anticonvulsant effects of thiamine on pentylentetrazole-induced seizure in mice. **Nutritional neuroscience**, v. 22, n. 3, p. 165-173, 2019.

MESKINIMOOD, S. et al. Efeito modulatório de ligantes opióides no status epilepticus e o papel da via do óxido nítrico. **Epilepsia e Comportamento**, v. 101, p. 106563, 2019.

MIRZAA, G. M.; PODURI, A. Megalencephaly and hemimegalencephaly: breakthroughs in molecular etiology. **American Journal of Medical Genetics Part C**, v.166, p.156-172, 2014.

MOERMAN, D.E. **Medicinal plants of native America**, University of Michigan Museum of Anthropology, Ann Arbor, MI, 1986.

MOREIRA, S., R., G. Epilepsy: historical notion, conceptual aspects, diagnosis and treatment. **Mental**, v.2, n.3, p. 107-122, 2004.

MORIMOTO, K.; FAHNESTOCK, M.; RACINE, R. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. **Progress in Neurobiology**, v.7, n.1, p. 1-60, 2004.

NGUGI, A. K.; BOTTOMLEY, C.; KLEINSCHMIDT, I.; SANDE, J. W.; NEWTON, C. R. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a metaanalytic approach. **Epilepsia**, v.51, n.5, p. 883-90, 2010.

NÓBREGA, F.F. de F. **Monoterpeno 4-terpineol – uma molécula com atividade anticonvulsivante: estudos comportamentais e eletrofisiológicos**. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

NÓBREGA, F. F., SALVADORI, M. G., MASSON, C. J., et al. Monoterpenoid terpinen-4-ol exhibits anticonvulsant activity in behavioural and electrophysiological studies. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2014.

- NÓBREGA, R. A.; MOTTA, S. C.; LEITE, J. R. Óleos essenciais com propriedades anticonvulsivantes. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 2, n. 1, p. 3-6, 2003.
- NOZADZE, M.; MIKAUTADZE, E.; LEPSVERIDZE, E., et.al. Anticonvulsant activities of myo-inositol and scyllo-inositol on pentylenetetrazol induced seizures. **Seizure**, v. 20, p. 173-176, 2011.
- NWAIWU, J.I.; AKAH, P.A. Anticonvulsant activity of the volatile oil from the fruit of *Tetrapleura tatraptera*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.8, p.79-84, 2006.
- O'DELL, C. M. et al. Understanding the basic mechanisms underlying seizures in mesial temporal lobe epilepsy and possible therapeutic targets: a review. **Journal of neuroscience research**, v. 90, n. 5, p. 913-924, 2012.
- OKOYE, Theophine C. et al. Anticonvulsant effect of kaurenoic acid isolated from the root bark of *Annona senegalensis*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 109, p. 38-43, 2013.
- OLIVA, M.; BERKOVIC, S., F.; PETROU, S. Sodium channels and the neurobiology of epilepsy. **Epilepsia**, v. 53, n. 11, p. 1849-1859, 2012.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Health topics: Epilipsy**. Find in: <http://www.who.int/topics/epilepsy/en/> Acessed: September, 2019. 2019.
- OYEMITAN, I. A. et al. Hypnotic, anticonvulsant and anxiolytic effects of 1-nitro-2-phenylethane isolated from the essential oil of *Dennettia tripetala* in mice. **Phytomedicine**, v. 20, n. 14, p. 1315-1322, 2013.
- OZCAN, M. M.; CHALCHAT, J. C. Chemical Composition and Antifungal Effect of Anise (*Pimpinella Anisum* L.) Fruit Oil at Ripening Stage. **Ann. Microbiol**, v. 56, p. 353-358, 2006.
- PATHAN, S.A.; ZAIDI, S.M.A.; JAIN, G.K., VAHORA, D. AHMAD, F.J; KHAR, R.K. Anticonvulsant evaluation of safranal in pentylenetetrazole-induced status epilepticus in mice. **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, v.3, p.106-108, 2009.
- PITKÄNEN, A.; ENGEL, J.. Past and present definitions of epileptogenesis and its biomarkers. **Neurotherapeutics**, v. 11, n. 2, p. 231-241, 2014.

PITKANEN, A.; SCHWARTZKROIN, P. A.; MOSHÉ, S. L. Models of seizures and epilepsy. **Elsevier Academic Press**, 2006.

PITKANEN, A.; SUTULA, T.P. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. **Lancet Neurol**, v.1, p.173–181, 2002.

PONTE, E. L.; SOUSA, P. L.; ROCHA, M. V., et al. Comparative study of the anti-edematogenic effects of anethole and estragole. **Pharmacol. Rep**, v. 64, p. 984-990, 2012.

PRAVEEN, K. U. et al. Evaluation of antiepileptic activity of methanolic extract of Brassica nigra seeds in mice. **International Journal of Periodontology and Implantology**, v. 3, p. 73-84, 2013.

PRINCE, D. A.; WILDER, B.J. Control mechanisms in cortical epileptogenic “Surround” inhibition. **Archives of Neurology**, v.16, p.194-202, 1967.

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

QI, L. W.; WANG, C. Z.; YUAN, C. S. Ginsenosides from American ginseng: Chemical and pharmacological diversity, **Phytochemistry**, v. 72, p. 689–699, 2011.

QUEIROZ, C.; LEITE, J.; MELLO, L.E.A.M. **Modelos experimentais em epilepsias**. Disponível em: <http://www.comciencia.br/reportagens/epilepsia/ep24.htm>. Acessado em: janeiro, 2017. 2002.

QUINTANS-JUNIOR, L. J. et al. Avaliação da Atividade anticonvulsivante de plantas do Nordeste Brasileiro. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, n. 21, v. 3, p. 179-184, 2002.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; MELLO, L. E. A. M. In: Almeida RN. **Psicofarmacologia: Fundamentos práticos**. 1ª ed. Editora Guanabara Koogan, 2006.

RACINE, R.J.; GARTNER, J.G.; BURNHAM, W.M. Epileptiform activity and neural plasticity in limbic structures. **Brain Research**, v.47, p.262-268, 1972.

RAHIMMALEK, M.; TABATABAEI, B. E. S.; ETEMADI, N., et al. Essential oil variation among and within six *Achillea* species transferred from different ecological regions in Iran to the field conditions. **Industrial crops and products**, v. 29, p. 348–355, 2009.

RAHMATU, B.; KHALILI, M.; ROGHANI, M.; AHGHARI, P. Anti-epileptogenic and antioxidant effect of *Lavandula officinalis* aerial part extract against pentylentetrazole-induced kindling in male mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.148, p.152-157, 2013.

RAIMONDO, J.V.; JOYCE, B.; KAY, L.; SCHLAGECK, T. NEWHEY, S.E.; SRINIVAS, S.; AKERMAN, C.J. A genetically-encoded chloride and pH sensor for dissociating ion dynamics in the nervous system. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.7 n.202, p. 1-10, 2013.

RAJAKULENDRAN, S.; KASKI, D.; HANNA, M. G. Neuronal P/Q-type calcium channel dysfunction in inherited disorders of the CNS. **Nature Reviews Neurology**, v.8, p.86-96, 2012.

RANDRIANARIVO, E. et al. Evaluation of the anticonvulsant activity of the essential oil of *Myrothamnus moschatus* in convulsion induced by pentylentetrazole and picrotoxin. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 6, p. 501-505, 2016.

RANG, H.P; DALE, M.M; RITTER, J.M. Farmacologia. **Elsevier**. Rio de Janeiro 8ª ed., cap. 45, 2016.

RANSOM, C. B.; RANSOM, B.R.; SONTHEIMER, H. Activity-dependent extracellular K⁺ accumulation in rat optic nerve: the role of glial and axonal Na⁺ pumps. **The Journal of Physiology**, v. 522, p. 427-442, 2000.

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

RAVID, U.; PUTIEVSKY, E.; KATZIR, I. Chiral GC analysis of enantiomerically pure (R)-(-)-linalyl acetate in some Lamiaceae, myrtle and petigrain oils. **Flav. Fragr. J.**, v.9, p. 275-276, 1994.

REGESTA, G.; TANGANELLI, P. Clinical aspects and biological bases of drug resistant epilepsies. **Society for Neuroscience**, v. 34, p. 109-22, 1999.

REGNAULT-ROGER, C.; VINCENT, C.; ARNASON, J.T. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual Review of Entomology**, v.57, p.405-424, 2012.

REID, C. A.; PHILLIPS, A. M.; PETROU, S. Canalopatias do HCN: fisiopatologia na epilepsia genética e implicações terapêuticas. **British journal of pharmacology** , v. 165, n. 1, p. 49-56, 2012.

RHODES, M. E.; FRYE, C. A. Progestins in the Hippocampus of Female Rats Have Antiseizure Effects in a Pentylentetrazole Seizure Model. **Epilepsia**, v.45, n.12, p.1531-1538, 2004.

RITTER, A. M. V.; DOMICIANO, T. P.; VERRI Jr, W. A., et al. Antihypernociceptiveness of anethole in experimental inflammatory pain. **Inflammopharmacology**, v. 21, n. 2, p. 187–197, 2013.

ROBERTSON, C. R.; FLYNN, S. P.; WHITE, H. S.; BULAJ, G. Anticonvulsant neuropeptides as drug leads for neurological diseases. **Natural Product Reports**, v. 28, p. 741-762, 2011.

RODENBURG, R. et al. Psychosocial issues for children with epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 22, n. 1, p. 47-54, 2011.

RODENBURG, R.; WAGNER, J. L.; AUSTIN, KERR, M.; DUNN, D. W. Psychosocial issues for children with epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, v.22, p.47–54, 2011.

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

RYU, S., et al. Trans-anethole protects cortical neuronal cells against oxygen–glucose deprivation/reoxygenation. **Neurological Sciences**, v. 35, n. 10, p. 1541-1547, 2014.

SÁ, R. C. S.; ALMEIDA, R. N. Toxicidade Aguda. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap.10, p.124-130, 2006.

- SAHPAZ, S., et al. Isolation and pharmacological activity of phenylpropanoid esters from *Marrubium vulgare*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 79, n. 3, p. 389-392, 2002.
- SAHU, S. et al. Anticonvulsant effect of *Marsilea quadrifolia* Linn. on pentylenetetrazole induced seizure: A behavioral and EEG study in rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 141, n. 1, p. 537-541, 2012.
- SALAZAR, A. M.; JABBARI, B.; VANCE, S. C.; GRAFMAN, J.; AMIN, D.; DILLON, J. D. Epilepsy after penetrating head injury. I. Clinical correlates: a report of the Vietnam Head Injury Study. **Neurology**, v. 35, p.1406-14, 1985.
- SANCHETI, J., 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.
- SANDER, J. W.; HART, Y. M. Epilepsia: um guia prático. **Merrit Publishing Internacional**, 1999.
- SANDER, J. W. The epidemiology of epilepsy revisited. **Curr Opin Neurol**, v.16, n.2, p.165–70, 2003.
- SAYYAH, M.; NADJAFNIA, L.; KAMALINEJAD, M. Anticonvulsant activity and chemical composition of *Artemisia dracunculus* L. essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2-3, p. 283-287, 2004.
- SCHARFMAN, H. E. The neurobiology of epilepsy. **Curr Neurol Neurosci** 1, v.7, n.4, p.348-54, 2007.
- SCHMIDT, D.; SILLANPÄÄ, M. Evidence-based review on the natural history of the epilepsies. **Current Opinion in Neurology**, v.25, p.159-163, 2012.
- SHIN, E. J.; BACH, J. H.; NGUYEN, T. T. L., et al. *Gastrodia elata* Bl attenuates cocaine-induced conditioned place preference and convulsion, but not behavioral sensitization in mice: Importance of GABAA receptors. **Curr. Neuropharmacol**, v.9, p.26–29, 2011.
- SHIN, E., et al. Role of oxidative stress in epileptic seizures. **Neurochemistry international**, v. 59, n. 2, p. 122-137, 2011.

SILAMBUJANAKI, P. et al. Anti-convulsant activity of methanolic extract of *Butea monosperma* leaves. **Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences**, v. 1, n. 2, p. 431-435, 2010.

SILLANPÄÄ, M; SCHMIDT, D. natural history of treated childhood-onset epilepsy: prospective, long-term population-based study. **Brain**, v.129, p.617-624, 2006.

SIMBAR, M. et al. The combination of “*Pimpinella anisum*, *Apium graveolens* and *Crocus sativus* (PAC)” is more effective than “mefenamic acid” on postpartum after-pain. **Journal of herbal medicine**, v. 5, n. 1, p. 20-25, 2015.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, cap.18, p.467-495, 2004.

SINGH, G.; MAURYA, S.; DE LAMPASONA, M.P.; CATALAN, C. Chemical constituents, antimicrobial investigations and antioxidative potential of volatile oil and acetone extract of star anise fruits. **J. Sci. Food Agr**, v.86, p.111-121, 2006.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO SOBRE A BIODIVERSIDADE BRASILEIRA (SIBBR). **Biodiversidade Brasileira**. Disponível em: <http://www.sibbr.gov.br/areas/?area=biodiversidade>. Acesso em: 16 mar. 2019.

SKALICKA-WOŹNIAK, K., et al. The anticonvulsant and anti-plasmid conjugation potential of *Thymus vulgaris* chemistry: an in vivo murine and in vitro study. **Food and chemical toxicology**, v. 120, p. 472-478, 2018.

SMITH, M.; WILCOX, K. S.; WHITE, H. S. Discovery of Antiepileptic Drugs. **Neuro Therapeutics**, v. 4, p. 12–17, 2007.

SMITH, R. L.; ADAMS, T. B.; DOULL, J, FERON, V. J., et al. Safety assessment of allylalkoxybenzene derivatives used as flavouring substances – methyl eugenol and estragole. **Food Chem. Toxicol**, v.40, p. 851-870, 2002.

SOARES, P.M. G.; LIMA, R. F.; PIRES, A. F.; SOUZA, E. P.; ASSREUY, M. S.; CRIDDLE, D. N. Effects of anethole and structural analogues on the contractility of

- rat isolated aorta: involvement of voltage-dependent Ca^{2+} -channels. **Life Sciences**, v. 81, n. 13, p. 1085–1093, 2007.
- SOUZA, M. P. Erva Doce. **Cadernos de prospecção**. UFB, v.1, n.1, p. 28- 29, 2008.
- STALEY, K. J.; SOLDI, B. L.; PROCTOR, W. R. Ionic mechanism of neuronal excitation by inhibitory GABA_A receptors. **Science**, v.269, p. 977-981, 1995.
- STEFAN, H.; PAULINI-RUF, A.; HOPFENGÄNTNER, R.; RAMPP, S. Network characteristics of idiopathic generalized epilepsies in combined MEG/EEG. **Epilepsy Research**, v.85, p.187-198, 2009.
- STONE, W.S.; GOLD, P.E. Amygdala kindling effects on sleep and memory in rats. **Brain Research**, v.449, p.135-140, 1988.
- SUN, W.; SHAHRAJABIAN, M. H.; CHENG, Q. Anise (*Pimpinella anisum* L.), a dominant spice and traditional medicinal herb for both food and medicinal purposes. **Cogent Biology**, v. 5, n. 1, p. 1673688, 2019.
- SWINYARD, E. A. Laboratory evaluation of antiepileptic drugs: Review of Laboratory evaluation of antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 10, n. 2, p. 107-119, 1969.
- TEMKIN, N. R. Preventing and treating posttraumatic seizures: The human experience. **Epilepsia**, v.50, p. 10-13, 2009.
- TOMAN, J.E.P.; SWINYARD, E.A.; GOODMAN, L.S. Properties of maximal seizures and their alteration by anticonvulsant drugs and other agents. **Journal of Neurophysiology**, v.9, n.3, p.231-9, 1946.
- TORTORIELLO, J.; ORTEGA, A. Sedative effect of galphimine B, a nor-seco-triterpenoid from *Galphimia glauca*. **Planta medica**, v. 59, n. 05, p. 398-400, 1993.
- TREVISOL-BITTENCOURT, P. C; SANDER, J. W. A. S. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v.18, n. 3, p. 147-54, 1989.
- URE, J. A.; PERASSOLO, M. Update on the pathophysiology of the epilepsies. **Journal of Neurological Sciences**, 177, 1-17, 2000.

VEERAMAH, K. R.; JOHNSTONE, L.; KARAFET, T. M.; WOLF, D.; SPRISLER, R.; SALOGIANNIS, J.; et al. Exome sequencing reveals new casual mutations in children with epileptic encephalopathies. **Epilepsia**, v.54, p.1270-1281, 2013.

VICTORY, F.N.; BRAHM, A.S.; SAVEGNAGO, L. Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. **Neuroscience Letters**, v.544, p.105-109, 2013.

WALTHER, H.; LAMBERT, J. D.; JONES, R. S.; HERINEMANN, U.; HAMON, B. Epileptiform activity in combined slices of the hippocampus, subiculum and entorhinal cortex during perfusion with low magnesium medium. **Neuroscience Letters**, v.69, p. 156-161, 1986.

WANNANG, N. N.; ANUKA, J. A.; KWANASHIE, H. O., et al. Anti-seizure activity of the aqueous leaf extract of *Solanum nigrum* L. (Solanaceae) in experimental animal. **Afr Health Sci** v.8, p.74-79, 2008.

WIECHERT, P.; HERBST, A. Provocation of cerebral seizures by derangement of the natural balance between glutamic acid and γ -aminobutyric acid. **Journal of Neurochemistry**, v.13, p59-64, 1966.

WIECZYŃSKA, J.; CAVOSKI, I.. Antimicrobial, antioxidant and sensory features of eugenol, carvacrol and trans-anethole in active packaging for organic ready-to-eat iceberg lettuce. **Food chemistry**, v. 259, p. 251-260, 2018.

YA'U, J.; YARO, A. H.; ABUBAKAR, M. S.; ANUKA, J. A.; HUSSAINI, I. M. Anticonvulsant activity of *Carissa edulis* (Vahl) (Apocynaceae) root bark extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p. 255-258, 2008.

YACUBIAN, E. M. T. Epilepsias, em: Nitrite R, Bacheschi LA – A Neurologia que Todo Médico Deve Saber. 2a Ed, São Paulo, **Atheneu**, p. 235-256, 2008.

YANG J. F.; YANG, C. H.; CHANG, H. W., et al. Chemical composition and antibacterial activities of *Illicium verum* against antibiotic-resistant pathogens. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 5, p. 1254–1262, 2010.

YEA, S. S.; JEONG, H. S.; CHOI, C. Y., et al. Inhibitory effect of anethole on T-lymphocyte proliferation and interleukin-2 production through down-regulation of the NF-AT and AP-1. **Toxicology in vitro**, v. 20, n. 7, p. 1098-1105, 2006.

YUN, C. H. Inhibitory effect of anethole on T-lymphocyte proliferation and interleukin-2 production through down regulation of the NF-AT and AP-1. **Toxicol. In-vitro**, v. 20, p. 1098-1105, 2006.

YU, J.T., et al. Up-regulation of antioxidative proteins TRX1, TXNL1 and TXNRD1 in the cortex of PTZ kindling seizure model mice. **PloS one**, v. 14, n. 1, p. e0210670, 2019.

Anexos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE DO TRANS-ANETOL EM MODELOS COMPORTAMENTAIS DE CONVULSÃO EM CAMUNDONGOS", protocolada sob o CEUA nº 3890250918 (ID 000498), sob a responsabilidade de **Reinaldo Nóbrega de Almeida e equipe; Erika da Cruz Guedes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB) na reunião de 22/02/2019.

We certify that the proposal "INVESTIGATION OF TRANS-ANETHOL ACTIVITY IN BEHAVIORAL MODELS OF SEIZURE IN MICE", utilizing 235 Heterogenics mice (235 males), protocol number CEUA 3890250918 (ID 000498), under the responsibility of **Reinaldo Nóbrega de Almeida and team; Erika da Cruz Guedes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Paraíba (CEUA/UFPB) in the meeting of 02/22/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **11/2018 a 11/2019** Área: **Fisiologia E Patologia**

Origem: **Unidade de Produção Animal IPeFARM**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **2 a 3 meses**

N: **235**

Linhagem: **Mus musculus - Swiss**

Peso: **25 a 35 g**

Local do experimento: **Laboratório de Psicofarmacologia, Universidade Federal da Paraíba**

João Pessoa, 27 de fevereiro de 2019

Prof. Dra. Islania Gisela Albuquerque Gonçalves
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal da Paraíba

Anexo A – Certidão de aprovação do projeto junto à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)