



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – DCF

DANIEL SOUZA BEZERRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EUCALIPTOL NAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR
PENTILENOTETRAZOL EM CAMUNDONGOS**

JOÃO PESSOA-PB

2017

DANIEL SOUZA BEZERRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EUCALIPTOL NAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR
PENTILENOTETRAZOL EM CAMUNDONGOS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado a
Coordenação do Curso de Farmácia da Universidade
Federal da Paraíba - UFPB, como requisito parcial
para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe

Coorientador: Ms. Álefe Brito Monteiro

JOÃO PESSOA – PB

2017

B574a Bezerra, Daniel Souza.

Avaliação do efeito do eucaliptol nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol em camundongos / Daniel Souza Bezerra. - - João Pessoa, 2017.

72f. : il. -

Orientador: Cícero Francisco Bezerra Felipe.

Coorientador: Álefe Brito Monteiro.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Convulsão. 2. Eucaliptol. 3. Monoaminas. 4. Nitrito. 5. Pentilenotetrazol.
6. Tbars.

BS/CCS/UFPB
009.24(043.2)

CDU: 616.8-

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EUCALIPTOL NAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR
PENTILENOTETRAZOL EM CAMUNDONGOS**

Parte manuscrita do Projeto de Graduação do aluno Daniel Souza Bezerra, apresentado ao Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 09 de 06 de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Cicero Francisco Bezerra Felipe

Prof. Dr. Cicero Francisco Bezerra Felipe – DBM/CCEN/UEPB (orientador)

Álefe Brito Monteiro

Ms. Álefe Brito Monteiro – PgNSB/CCS/UEPB (coorientador)

Hemerson Iury Ferreira Magalhães

Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães – DCF/CCS/UEPB

Liana Clébia de Morais Pordeus

Profª. Dra. Liana Clébia de Morais Pordeus – DFP/CCS/UEPB

AGRADECIMENTOS

Tantos são aqueles que por variadas formas me ajudaram a chegar nesse momento, a conquistar esse sonho tão almejado, não só por mim, mas por todos que me cercam de força, coragem, determinação e boas energias. Aos que não estiverem aqui citados diretamente, não me esqueço por isso, de quão importante foi sua contribuição para a realização desse projeto, desse sonho.

Agradeço imensamente aos meus pais Dona Socorro e Seu José, que desde sempre acreditaram em minhas vitórias, mesmo quando até eu as duvidava, e me encheram de apoio, alegria, amor, ensinamentos e me tornaram o ser humano em constante aprendizado que sou hoje. A eles minha eterna gratidão, amor e dedicação.

Agradeço as minhas irmãs Cristiane e Kátia pelo apoio irrestrito aos meus estudos, tendo a certeza que sem elas não estaria nesse momento tão único da minha vida. Agradeço pelo ouvido de irmãs, que sempre me escutaram e me ajudaram a tomar decisões que mudaram minha vida, bem como ao amor, que é incondicional e reciprocamente verdadeiro.

A minhas primas Renatinha, Tamara e meu primo David que os tenho como irmãos, e que compartilhamos boa parte da infância juntos. Muito obrigado pelo incentivo que me impulsionara até esse momento.

À toda minha família que tenho certeza que sempre estiveram torcendo por mim e pela realização dos meus sonhos, todos vocês foram significativos para essa conquista.

De todas as pessoas, agradeço de modo mais enfático e especial a minha querida Fernanda Marques, por compartilhar comigo todas as dificuldades desse processo, por ser verdadeira, compreensiva, companheira e estar o meu lado em todas as horas que mais precisei ao longo desses anos, apesar de todos os nossos desencontros, meus erros, defeitos e acertos. Dedico essa vitória a ti também, por ser parte dela.

A todos os meus amigos de caminhada no curso de farmácia, aos primeiros: André, Laísa, Vanessa, Bruninho e Aratã que me proporcionaram os melhores momentos da graduação e que perdura até hoje apesar dos caminhos diferentes que todos percorremos. Bem como os recentes, que me acolheram de forma tão carinhosa no seletivo grupo dos refugos, passamos momentos emocionantes juntos. A todos vocês muito obrigado por todo apoio.

De modo especial ao meu orientador e mestre Prof. Cicero, muito obrigado por ter me acolhido no LAFABE e topado essa empreitada de final de curso, sem seus ensinamentos, meu deslumbramento pela neurociência não seria o mesmo. Obrigado pelo incentivo que sempre nos dá, para que galguemos caminhos mais altos a cada passo. Agradeço também a todos que fazer parte no LAFABE, muito obrigado pelo apoio, a todos gratidão.

À Profa. Glauce Socorro de Barros Viana e a todos que fazem o Laboratório de Biofisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte – Estácio/FMJ, onde foram realizadas as análises neuroquímicas. A colaboração foi de fundamental importância.

Aos professores do curso de farmácia, pelo apoio, por me impulsionarem e servirem como exemplo para que despertasse o interesse pela ciência.

À banca examinadora.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho, muito obrigado.

RESUMO

O processo de desenvolvimento das epilepsias envolve mecanismos diversos que culminam na hiperatividade de uma população de neurônios, resultando em um padrão de despolarizações repetidas e rítmicas. Os fármacos antiepilépticos agem através do aumento da neurotransmissão GABAérgica, da redução dos efeitos do glutamato, ou do bloqueio de canais iônicos, sendo dotados de efeitos adversos sérios que dificultam a adesão do paciente ao tratamento. Este fato tem incentivado a busca por compostos de origem natural com potencial efeito anticonvulsivante. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do eucaliptol nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ). Para tanto, foram utilizados camundongos Swiss machos, tratados oralmente com o monoterpeno. O primeiro protocolo realizado avaliou a toxicidade e a DL₅₀ estimada do composto. Com base no valor da DL₅₀, foram selecionadas as doses do terpeno utilizadas nos testes comportamentais e neuroquímicos. Para os testes comportamentais, grupos de camundongos foram previamente tratados com salina (10 mL/kg, v.o.), diazepam (2 mg/kg, i.p.) e eucaliptol (100, 200 e 400 mg/kg, v.o.) e posteriormente com pentilenotetrazol (80 mg/kg, i.p.) e avaliados quanto aos seguintes parâmetros: intensidade das convulsões, latência para primeira convulsão e tempo de morte. Para os testes neuroquímicos, grupos de camundongos foram previamente tratados com salina (10 mL/kg, v.o.) e eucaliptol (400 mg/kg, i.p.) e posteriormente com pentilenotetrazol (80 mg/kg, i.p.); a determinação da concentração de neurotransmissores (monoaminas – dopamina, noradrenalina e serotonina) e dos marcadores de estresse oxidativo (nitrito e substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico – TBARs) foram os parâmetros avaliados. Os resultados foram analisados por ANOVA ou Kruskal-Wallis, seguido dos testes de Student-Newman-Keuls, e Dunns, respectivamente. Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$. Os resultados mostraram que a administração oral do eucaliptol apresentou baixa toxicidade e a DL₅₀ estimada foi superior a 2000 mg/kg. No teste das convulsões induzidas por PTZ apenas a dose maior do monoterpeno (400 mg/kg) reduziu de forma significativa a intensidade das convulsões em 60%, aumentou a latência para aparecimento da primeira convulsão em 85% e o tempo de morte dos animais em 75% em relação ao controle. De forma semelhante, o tratamento com eucaliptol (400 mg/kg) reduziu de forma significativa a concentração de noradrenalina, dopamina e serotonina, em 50%, 33% e 70%, respectivamente, em relação ao grupo tratado com PTZ (80 mg/kg). Além disso, o tratamento com eucaliptol (400 mg/kg) reduziu de forma significativa a concentração de TBARs em 33%, mas não de nitrito, em relação ao grupo tratado com PTZ (80 mg/kg). Tomados em conjunto, os resultados mostram que o monoterpeno estudado apresenta baixa toxicidade oral e importante efeito anticonvulsivante, visto que sua administração é capaz de atenuar as convulsões quimicamente induzidas por pentilenotetrazol com consequente redução da concentração de monoaminas e das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico, elementos cujo aumento está associado ao fenômeno da epileptogênese.

Palavras-chave: Convulsão, Eucaliptol, Monoaminas, Nitrito, Pentilenotetrazol, TBARs.

ABSTRACT

The developmental process of epilepsies involves diverse mechanisms that culminate in the hyperactivity of a population of neurons, resulting in a pattern of repeated and rhythmic depolarizations. Antiepileptic drugs act by increasing GABAergic neurotransmission, reducing the effects of glutamate, or blocking ion channels, and are endowed with serious adverse effects that make it difficult for patients to adhere to treatment. This fact has encouraged the search for compounds of natural origin with potential anticonvulsant effect. Thus, the present study aimed to evaluate the effect of eucalyptol in seizures induced by pentylenetetrazole (PTZ). For this, male Swiss mice, orally treated with monoterpene, were used. The first protocol evaluated the toxicity and the estimated LD50 of the compound. Based on the value of LD50, the doses of terpene used in the behavioral and neurochemical tests were selected. For the behavioral tests, groups of mice were pretreated with saline (10 mL/kg, vol), diazepam (2 mg/kg, ip) and eucalyptol (100, 200 and 400 mg/kg, vol) and then with pentylenetetrazole 80 mg/kg, ip) and evaluated for the following parameters: seizure intensity, latency for first seizure and time of death. For neurochemical tests, groups of mice were pretreated with saline (10 mL/kg, v.o.) and eucalyptol (400 mg/kg, i.p.) and subsequently with pentylenetetrazole (80 mg/kg, i.p.); The determination of the concentration of neurotransmitters (monoamines - dopamine, noradrenaline and serotonin) and oxidative stress markers (nitrite and thiobarbituric acid reactive substances - TBARs) were the parameters evaluated. The results were analyzed by ANOVA or Kruskal-Wallis, followed by Student-Newman-Keuls, and Dunns, respectively. Values of $p < 0.05$ were considered significant. The results showed that oral administration of eucalyptol had low toxicity and the estimated LD50 was greater than 2000 mg / kg. In the PTZ-induced seizure test, only the higher dose of monoterpene (400 mg/kg) significantly reduced seizure intensity by 60%, increased latency for onset of the first seizure by 85% and time of death of the animals in 75% in relation to the control. Similarly, treatment with eucalyptol (400 mg/kg) significantly reduced the concentration of noradrenaline, dopamine and serotonin by 50%, 33% and 70%, respectively, in relation to the PTZ-treated group (80 mg/kg). In addition, treatment with eucalyptol (400 mg/kg) significantly reduced the concentration of TBARs by 33%, but not nitrite, relative to the PTZ treated group (80 mg/kg). Taken together, the results show that the monoterpene studied has low oral toxicity and an important anticonvulsant effect, since its administration is capable of attenuating the convulsions chemically induced by pentylenetetrazol with consequent reduction of the concentration of monoamines and the reactive substances of thiobarbituric acid, elements whose increase is associated with the epileptogenesis phenomenon.

Key words: Convulsion, Eucalyptol, Monoamines, Nitrite, Pentilenotetrazole, TBARs.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

5-HT	5-Hidroxitriptamina (serotonina)
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AMPA	Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
ATP	Adenosina Trifosfato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COX-2	Ciclooxigenase 2
DA	Doença de Alzheimer
DA	Dopamina
DAG	Diacilglicerol
DL ₅₀	Dose Letal para 50% dos Animais
DZP2	Diazepam 2 mg/Kg
E100	Eucaliptol 100 mg/Kg
E200	Eucaliptol 200 mg/Kg
E400	Eucaliptol 400 mg/Kg
EEG	Eletroencefalograma
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FGF-2	Fator de Crescimento de Fibroblasto
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GC	Guanilil Ciclase
GDNF	Fator Neurotrófico Derivado das Células Gliais
Glu	Glutamato
GSH	Glutathiona Reduzida
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HCH	Hexaclorocicloexano γ
HOCl	Ácido Hipoclorídrico
ILAE	International League Against Epilepsy

IP ₃	1,4,5-trifosfato de inositol
LC	Locus Coeruleus
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
LGD	L-ácido Glutâmico Descarboxilase
L-NAME	N-Nitrito-L-arginina Metil Éster
LPC	Latência para Primeira Convulsão
MDA	Malonildialdeído
NA	Noradrenalina
NCC	Neurocisticercose
NF _κ B	Fator Nuclear Kappa B
NFT	Novelos Neurofibrilares
NGF	Fator de Crescimento Neuronal
NMDA	N-metil D-Aspartato
NO	Oxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
O ₂	Oxigênio Molecular
O ₂ ⁻	Radical Superóxido
OH	Hidroxila
ONOO ⁻	Peróxido Nítrico
PKC	Proteína Cinase Dependente de Cálcio
PKG	Proteína Cinase G
PTZ	Pentilenotetrazol
PTZ80	Pentilenotetrazol 80 mg/Kg
ROO ⁻	Radical Peróxido
SE	Status Epilepticus
SNC	Sistema Nervoso Central
SOS	Ácido Octanosulfônico Sódico
TBARs	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TCDD	2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-doxin
TGFβ	Fator e Transformação do Crescimento
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral

UFPB Universidade Federal da Paraíba
v.o. Via Oral
VEGF Fator de Crescimento Endotelial Vascular

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Prevalência da epilepsia por grupo em São José do Rio Preto.....	20
Tabela 2	Distribuição de número de casos e tipos de convulsão.....	21
Tabela 3	Fatores de risco para desenvolvimento da epilepsia.....	25
Tabela 4	Infecções parasitárias comuns associadas à epilepsia.....	26
Tabela 5	Principais fármacos utilizados no tratamento das crises epiléticas.....	34
Tabela 6	Fármacos atualmente utilizados em estudo para o tratamento da epilepsia....	35
Tabela 7	Lista de drogas e reagentes utilizados nos experimentos.....	42
Tabela 8	Escala de Racine modificada por Itzhak e Martin.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificação expandida das crises convulsivas segundo ILAE 2017.....	23
Figura 2	Alvos moleculares dos fármacos antiepiléticos.....	33
Figura 3	Estrutura do isopreno, molécula base dos terpenos.....	37
Figura 4	Estrutura molecular do eucaliptol (1,8-Cineol).....	38
Figura 5	Esquema dos modelos animais para epilepsia e convulsão epilética.....	41
Figura 6	Estimativa da DL ₅₀ para o eucaliptol.....	44
Figura 7	Protocolo Experimental.....	45
Figura 8	Intensidade das convulsões em animais tratados com eucaliptol e submetidos ao teste das convulsões induzidas por PTZ.....	51
Figura 9	Latência para o aparecimento da primeira convulsão em animais tratados com eucaliptol e submetidos ao teste das convulsões induzidas por PTZ.....	52
Figura 10	Tempo de morte em animais tratados com eucaliptol e submetidos ao teste das convulsões induzidas por PTZ.....	53
Figura 11	Determinação da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) em hipocampo de animais tratados com eucaliptol e submetidos ao teste das convulsões induzidas por PTZ.....	56
Figura 12	Determinação da concentração de nitrito em hipocampo de animais tratados com eucaliptol e submetidos ao teste das convulsões induzidas por PTZ.....	58
Figura 13	Determinação da concentração de monoaminas (NA, DA e 5-HT) em corpo estriado de animais tratados com eucaliptol e submetidos ao teste das convulsões induzidas por PTZ.....	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1	PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO.....	19
3.2	CLASSIFICAÇÃO.....	22
3.3	FATORES DE RISCO.....	24
3.4	FISIOPATOLOGIA.....	26
3.5	BASES MOLECULARES DA CONVULSÃO.....	28
3.6	TRATAMENTO.....	33
3.7	EUCALIPTOL.....	36
3.8	MODELOS ANIMAIS PARA A EPILEPSIA E CONVULSÃO.....	39
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1	ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS.....	42
4.2	DROGAS E REAGENTES.....	42
4.3	DETERMINAÇÃO DA DL ₅₀ ESTIMADA PARA O EUCALIPTOL.....	43
4.4	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	44
4.5	TESTES NEUROQUÍMICOS.....	46
4.5.1	Determinação da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico	47
4.5.2	Determinação da concentração de nitrito.....	47
4.5.3	Determinação da concentração de monoaminas.....	48
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1	DETERMINAÇÃO DA DL ₅₀ ESTIMADA PARA O EUCALIPTOL.....	49
5.2	TESTES COMPORTAMENTAIS.....	50
5.3	TESTES NEUROQUÍMICOS.....	54
5.3.1	Determinação da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	55
5.3.2	Determinação da concentração de nitrito.....	57
5.3.3	Determinação da concentração de monoaminas.....	59
6	CONCLUSÕES.....	62
	REFERENCIAS.....	63
	Anexo 1 Certidão de aprovação do comitê de ética	72

1 INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma condição neurológica que afeta pessoas de todas as idades e não possui limites geográfico, social ou racial. A palavra epilepsia é de origem grega, que significa ser tomado, atacado. As convulsões podem manifestar-se de diferentes formas, podendo haver atividade motora sensorial, psíquica e autonômica ou mesmo a combinação de todas elas. As convulsões são definidas como uma alteração passageira no estado clínico do paciente devido despolarização neuronal excessiva, as quais podem ser provocadas ou espontâneas (SINGH e TREVICK, 2016).

Estima-se que aproximadamente 70 milhões de pessoas possuem epilepsia, dos quais 90% estão em países subdesenvolvidos (SINGH e TREVICK, 2016), Onde esta doença está majoritariamente relacionada a doenças parasitárias como malária e neurocisticercose. Nestes países a epilepsia está distribuída de forma significativa na parcela adulta da população, enquanto que em países desenvolvidos a epilepsia é mais frequente em crianças, devido a problemas durante o parto, e na população idosa, como consequência de acidente vascular cerebral (AVC) (BRODIE *et al.*, 2009).

Estudos eletrofisiológicos mostram que as convulsões refletem a hiperatividade transitória, anormal e sincrônica de uma população de neurônios no cérebro que pode ser gerada em resposta a uma perda do equilíbrio entre neurotransmissores excitatórios e inibitórios, resultando em um padrão de despolarizações repetidas e rítmicas (MCCORMICK e CONTRERAS, 2001). O aumento da excitabilidade neuronal, por sua vez, pode levar à lesão e morte celular como resultado da formação excessiva de radicais livres (FLOYD, 1990) e aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias (CRESPER *et al.*, 2002; LEHTIMÄKI *et al.*, 2007; RAVIZZA *et al.*, 2008) que podem modificar a transmissão neuronal e inibir a recaptação de glutamato por astrócitos, o que leva a um aumento da concentração extracelular desse neurotransmissor e a ocorrência do fenômeno de excitotoxicidade (VIVIANI *et al.*, 2003; BALOSSO *et al.*, 2009) .

Segundo a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE), a as crises epilépticas são classificadas em três categorias: focais, generalizadas e de início desconhecido, sendo cada uma delas subdivididas em motora e não motora (FISHER *et al.*, 2017). Os fármacos utilizados no tratamento das crises convulsivas desenvolvem suas ações através do aumento da neurotransmissão

GABAérgica, redução dos efeitos de aminoácidos excitatórios como o glutamato, ou do bloqueio de canais iônicos (SMITH *et al.*, 2007). Pesquisas recentes têm sido desenvolvidas no intuito de obter fármacos antiepilépticos com novos mecanismos de ação (KAUR *et al.*, 2016).

Nesta perspectiva, as plantas medicinais surgem como uma alternativa promissora para o desenvolvimento de novos fármacos antiepilépticos. Muitas espécies de plantas aromáticas possuem atividade no Sistema Nervoso Central (SNC), a saber: anticonvulsivante, ansiolítica, antidepressiva e analgésica. Os monoterpenos, compostos presentes nos óleos essenciais de plantas aromáticas, possuem reconhecida atividade no SNC. Linalool, limoneno, citronelol e eucaliptol (1,8-cineol) são exemplos de monoterpenos dotados de atividade anticonvulsivante (PASSOS *et al.*, 2009). No entanto, o mecanismo de ação anticonvulsivante desses compostos ainda não é totalmente esclarecido. Desta forma, o presente trabalho visa analisar o efeito da administração aguda do eucaliptol sobre as alterações comportamentais e neuroquímicas observadas em animais submetidos à convulsão induzida por pentilenotetrazol, com o intuito de melhor esclarecer o efeito anticonvulsivante do referido monoterpeno.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do eucaliptol nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar os efeitos gerais e tóxicos, além da DL_{50} estimada para a administração oral do eucaliptol;

Avaliar o efeito comportamental de camundongos tratados com eucaliptol e submetidos às convulsões induzidas por pentilenotetrazol;

Determinar a concentração das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico em hipocampo de camundongos tratados com eucaliptol e submetidos às convulsões induzidas por pentilenotetrazol;

Determinar a concentração de nitrito em hipocampo de camundongos tratados com eucaliptol e submetidos às convulsões induzidas por pentilenotetrazol;

Determinar a concentração de monoaminas em corpo estriado de camundongos tratados com eucaliptol e submetidos às convulsões induzidas por pentilenotetrazol.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Os primeiros relatos acerca da epilepsia encontram-se documentados em manuscritos mesopotâmicos e indianos, que datam de 4000 anos a.C. Na antiguidade atribuía-se a essa condição manifestações mágicas, demoníacas ou de influência astrológica (SINGH e TREVICK, 2016). A partir de Hipócrates, outros estudiosos começaram a compreender a epilepsia como sendo um evento de causa natural, porém desconhecida. Por volta de 1800, Jackson e Todd realizaram experimentos que serviram de base para o entendimento da epilepsia como uma desordem elétrica cerebral, que ocorre de modo ocasional e repentino (REYNOLDS, 2001).

3.1 PANORAMA EPIDEMIOLÓGICO

Os dados epidemiológicos sobre a epilepsia são imprecisos. Estima-se que aproximadamente 70 milhões de pessoas no mundo possuem epilepsia e, deste montante, 90% são encontrados em países subdesenvolvidos (NGUGI *et al.*, 2010), especialmente em áreas rurais, devido à grande incidência de doenças endêmicas como malária e neurocisticercoses (NCC), além de traumas cerebrais relacionados a dificuldades durante o parto (NEWTON e GARCIA, 2012).

A prevalência de epilepsia de países em desenvolvimento parece maior em pessoas adultas (SINGH e TREVICK, 2016). Um estudo populacional desenvolvido em São José do Rio Preto, SP, mostrou que a prevalência da epilepsia é consideravelmente alta (18,8/1000 habitantes), distribuída de forma diferenciada por faixa etária, onde a prevalência em idosos é a maior (32,8/1000 habitante) (BORGES *et al.*, 2004) (tabela 1). Em países desenvolvidos a incidência da epilepsia é maior entre crianças e idosos (SINGH e TREVICK, 2016), com prevalência de 4 a 6 casos por 1000 crianças.

Tabela 1 – Prevalência da epilepsia por grupos etários em São José do Rio Preto.

Variação de idade (anos)	Prevalência	
	/1000 habitantes	95% ;IC
0 a 4	4,9	3,9 – 6,0
5 a 14	11,7	10 – 13,3
15 a 64	20,3	18,2 – 24,4
65 ou mais	32,8	30,1 – 35,4
Ausência	18,6	16,6 – 20,6

Fonte: (BORGES *et al.*, 2004)

Um estudo realizado na Turquia avaliou a incidência dos diversos tipos de epilepsia em crianças (tabela 2) (ÜNVER *et al.*, 2015). Os dados mostram que as convulsões parciais ocorrem de forma predominante, da qual, as convulsões de generalização secundária e complexa parcial aparecem majoritariamente. Em contrapartida as convulsões generalizadas estão presentes em 43,5% dos pacientes selecionados, sendo as tônico-clônica observada com mais frequência, seguido dos espasmos infantis e convulsão Mioclônica. As convulsões parciais são caracterizadas por ocorrem mais tardiamente, principalmente em crianças de 7 a 15 ano de idade. Já as convulsões generalizadas aparecem de principalmente em crianças de idade entre 1 a 12 meses, assim como as síndromes epilépticas que se desenvolvem precocemente em crianças até 12 meses (ÜNVER *et al.*, 2015).

Os dados observados podem ser decorrentes da má formação durante o desenvolvimento cortical do feto seguido de asfixia perinatal, fatores que induzem o desenvolvimento da epilepsia. Em países subdesenvolvidos, por falta de adequada estrutura hospitalar esses números tendem a aumentar, especialmente em casos de danos durante o parto (SAMPAIO *et al.*, 2010; ÜNVER *et al.*, 2015).

Tabela 2 – Distribuição de número de casos e tipos de convulsão.

Tipos de convulsão	N	%
Convulsão parcial	301	56,5
Parcial simples	25	4,7
Complexa parcial	127	23,8
Com generalização secundária	149	28
Convulsão generalizada	232	43,5
Ausência	18	3,4
Ausência atípica	12	2,3
Mioclônica	34	6,3
Clônica	13	2,4
Tônica	33	6,2
Tônico-Clônica	66	12,3
Atônica	10	1,9
Espasmo infantil	44	8,3
Convulsão gelástica	2	0,4
Total	533	100

Fonte: Adaptada de ÜNVER *et al.* (2015)

A epilepsia em pacientes idosos possui grande incidência e prevalência, sendo frequentemente sub diagnosticada (ASSIS *et al.*, 2015). Dados demográficos mostram que a expectativa de vida em países desenvolvidos e subdesenvolvidos está aumentando de forma considerável ao longo dos anos. Com o aumento da população idosa os casos de epilepsia também se elevam. Estima-se que 50% dos casos de epilepsia serão diagnosticados em idosos até 2020; no entanto, no ano de 2013 o surgimento de novos casos de epilepsia em idosos encontra-se em torno de 25 a 30% (HUBER *et al.*, 2013).

Os fatores de risco para o desenvolvimento de epilepsia variam com a idade. Em idosos as doenças cerebrovasculares figuram-se entre os principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença (BRODIE *et al.*, 2009). Um estudo com 120 pacientes idosos hospitalizados elencou os principais fatores que induzem o aparecimento da epilepsia em pacientes dessa faixa etária. O Acidente Vascular Cerebral (AVC) isquêmico é o fator etiológico mais importante, observado em 37% dos casos, seguido de neoplasias intracranianas (13%), AVC

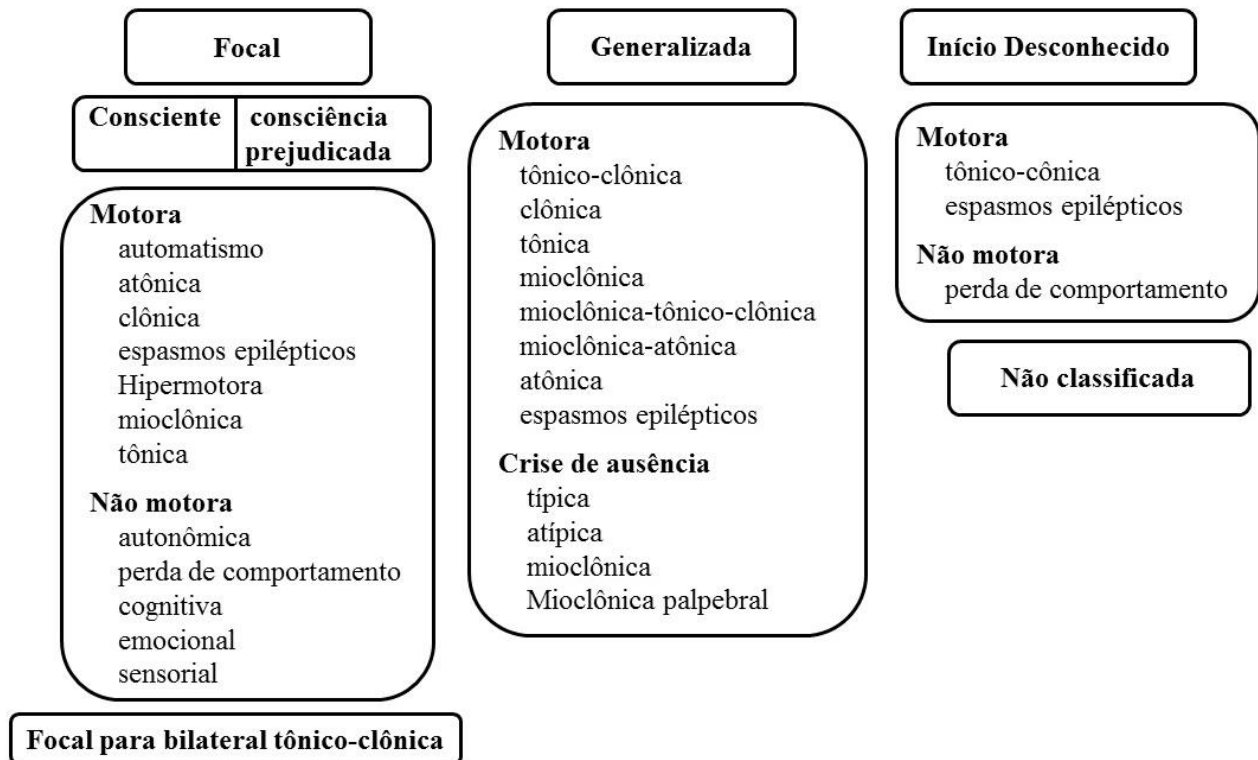
hemorrágico (12%), doença de Alzheimer (6,7%), outras demências (4.7%) e distúrbios metabólicos (5,5%) (ASSIS *et al.*, 2015). Lesões traumáticas cerebrais também são importantes fatores etiológicos de convulsões em idosos, chegando a 20% dos casos de epilepsia nesse grupo. (VERELLEN e CAVAZOS, 2014).

3.2 CLASSIFICAÇÃO

A primeira classificação das epilepsias foi realizada em 1981 pela *International League Against Epilepsy* (ILAE) com base em padrões de EEG (FISHER *et al.*, 2017). Ao longo dos anos essa classificação sofreu modificações; em 2010 a ILAE revisou a classificação com o intuito de facilitar o entendimento desses conceitos e assim abrir espaço para a inserção de novas definições, a medida que novos avanços foram produzidos, facilitando assim o diálogo sobre a convulsão na clínica, no ensino e na pesquisa (BERG *et al.*, 2010; FISHER *et al.*, 2017).

A classificação das epilepsias segundo a ILAE dá-se primeiramente na diferenciação entre convulsões focais, generalizadas ou de início indefinido (figura 1 próxima página). As focais assim como as de início desconhecido dividem-se em motora e não motora, e ainda pela presença ou ausência de consciência e responsividade (FISHER *et al.*, 2017). Já as generalizadas dividem-se entre motora e crise de ausência. Pelo fato de ainda não ser uma condição totalmente elucidada, existem ainda as convulsões que fogem a esse padrão por não terem especificações sobre a causa inicial, presença de atividade motora ou não motora, bem como detalhes sobre o nível de consciência do paciente no momento da convulsão. A esses tipos de convulsões atribuiu-se o termo não classificada (HIRSCH *et al.*, 2016; FISHER *et al.*, 2017).

Figura 1 – Classificação expandida das crises convulsivas segundo a ILAE 2017.



Fonte: Adaptado de FISHER *et al.* (2017).

Os dois principais tipos de convulsões são, pela nova terminologia, focal e generalizada. O termo focal foi introduzido no lugar do parcial, sugerindo que o ponto de origem esteja localizado e limitado a apenas um hemisfério cerebral, envolvendo uma pequena região do mesmo. Por outro lado, o termo generalizado sugere uma origem em um dos hemisférios seguido de rápida distribuição por todo o encéfalo. Neste último caso, o padrão eletroencefalográfico pode não se manifestar igualmente em todas as partes do cérebro, o que caracterizaria uma convulsão bilateral sem o envolvimento de todas as redes neuronais (HIRSCH *et al.*, 2016; FISHER *et al.*, 2017).

As crises de ausência são caracterizadas pela perda abrupta da consciência, apresentando ainda olhar fixo, rápidos reflexos palpebrais e movimento dos olhos. Esses episódios duram em torno de 10 segundos e podem ocorrer várias vezes ao dia. As convulsões mioclônicas são caracterizadas pelo paciente apresentar movimento repentinos, involuntários e irregulares da cabeça, pescoço, membros ou combinação entre esses. Já as convulsões tônico-clônicas desenvolvem um perfil de perda de consciência, apresentando uma fase tônica, evidenciada pelo enrijecimento da

musculatura esquelética, seguida a fase clônica a qual se apresenta por movimentos rítmicos e tremores. Durante a convulsão o paciente pode morder a própria língua e apresentar incontinência urinária e fecal. Logo após essa fase quando o paciente está se recuperando, pode ocorrer confusão mental, agressividade e cansaço (ANGUS-LEPPAN e PARSONS, 2008).

3.3 FATORES DE RISCO

São conhecidos vários fatores de risco que levam ao desenvolvimento da epilepsia (tabela 3). Eles abrangem uma considerável variedade de condições que incluem desde lesões cerebrais em neonatos, dificuldades no parto, problemas metabólicos congênitos até síndromes cromossômicas, tumores no SNC e infecções. No entanto as causas mais comuns de epilepsia em países pobres e subdesenvolvidos são advindas de processos infecciosos causados por helmintos e protozoários (SINGH e TREVICK, 2016).

Infecções parasitárias podem contribuir com o aparecimento de convulsões e da epileptogênese (tabela 4). Doenças como neurocitocercose (NCC), estão entre as causas mais comuns de epilepsia. Aproximadamente um terço da população com epilepsia que vive em áreas endêmicas de *Taenia solium*, tem sua condição associada à NCC (NDIMUBANZI *et al.*, 2010).

Outras doenças causadas por protozoários também originam a epilepsia. Infecções por *Plasmodium falciparum*, induzem o paciente a quadros de encefalites, convulsões e até mesmo *status epilepticus*, podendo apresentar como seqüela neurológica epilepsia residual, problemas cognitivos e de fala, cegueira cortical e hemiplegia. Infecções oportunistas como toxoplasmose, citomegalovírus, tuberculose e criptococose, podem comumente causar encefalites e convulsões parciais em pacientes imunodeprimidos (SINGH e TREVICK, 2016). Os principais fatores de risco para o acometimento dessas parasitoses são principalmente o contato com solo e ingestão de água e alimentos contaminados e malcozidos.

Tabela 3 – Fatores de risco para desenvolvimento da epilepsia.

Fatores de risco para epilepsia	
Fatores de risco	Comentários
Convulsão febril	-
Histórico familiar de convulsão	-
Congênita/de desenvolvimento	Erros congênitos de metabolismo, síndrome de Angelman, síndrome de Prader-Willi, síndrome de Rett.
Neurofibromatose	Esclerose tuberosa, síndrome de Sturge-Weber.
Infecções do SNC	Meningite, encefalite, infecções parasitárias como: NCC e <i>Plasmódium falciparum</i> em áreas endêmicas, <i>Toxocara canis</i> e <i>Onchocerca volvuls</i> .
Trauma encefálico	Hemorragias subdural/epidural/intraparenquimal, injúrias durais penetrantes, fraturas cranianas.
Doenças neurodegenerativas	Demências variáveis, síndrome de Ratt, epilepsia mioclônica progressiva, lipofusinoze ceróide neuronal.
Acidente Vascular Cerebral	Congênito e adquirido.
Má formação vascular	Cavernomas, má formação arteriovenosa.
Tumores do SNC	Gangliogliomas, ganglioneurocitomas, DNETs, meningiomas, outros tumores malignos e benignos.
Desordem migratório neuronal	Displasia cortical focal, lisencefalia, hemimegalencefalia, esquizecefalia, henterotopia periventricular nodular, heterotropia subcortical.
Outras desordens neurológicas	Autismo, dificuldade de aprendizado, enxaqueca, depressão, paralisia cerebral.

Fonte: adaptada de (SINGH e TREVICK, 2016)

Tabela 4 – Infecções parasitárias comuns associadas à epilepsia.

Infecções parasitárias comumente associadas à epilepsia	
Protozoa	
<i>Plasmodium falciparum</i>	Malária
<i>Trypanosoma rhodesiense</i>	Doença do sono africana
<i>Trypanosoma gambiense</i>	Doença do sono africana
<i>Toxoplasmosis gondii</i>	Toxoplasmose
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Doença de chagas
<i>Naegleria fowleri</i>	Encefalite amebiana primária
<i>Acanthamoeba spp</i>	Encefalite amebiana granulomatosa
Nematóide	
<i>Strongyloides stercoralis</i>	Estrongiloidíase disseminada
<i>Toxocara canis</i>	Meningoencefalite, mielite, vasculite cerebral
<i>Trichinella</i>	Triquinose
Trematoda	
<i>Schistosoma mansoni</i>	Esquistosomiase
<i>Schistosoma haematobium</i>	Esquistosomiase
<i>Schistosoma japonicum</i>	Esquistosomiase
Cestoda	
<i>T solium</i>	Cisticercose
<i>T multiceps</i>	Coenurose
<i>E granulosus</i>	Hidatidose
<i>Spirometra</i>	Esparganose

Fonte: adaptada de (SINGH e TREVICK, 2016).

3.4 FISIOPATOLOGIA

Epilepsia é uma desordem neuronal paroxística onde o indivíduo desenvolve, segundo a ILAE 2017: a) duas ou mais convulsões não provocadas em espaço de tempo maior que 24 horas entre elas; b) uma convulsão não provocada ou reflexa, sendo a probabilidade da ocorrência de mais convulsões similares ao risco de recorrência (mínimo de 60%) após duas convulsões não provocadas, num período de 10 anos; c) diagnóstico de síndrome epiléptica (FISHER *et al.*, 2014). A epilepsia é uma condição multifatorial, estando ligada a desordens de desenvolvimento, cognição e comportamento. Cada uma dessas condições possui diferentes causas, mecanismos e tratamentos,

reforçando o conceito de que epilepsia é uma doença relacionada à função cerebral, e não tão somente responsável por induzir convulsão (LINEHAN *et al.*, 2011).

Acredita-se que, apesar da grande variedade de patologias responsáveis por induzir as síndromes epiléticas e as várias manifestações clínicas que elas apresentam, a geração de muitas das diferentes convulsões tem base em mecanismos celulares e conexões neuronais comuns. Os estudos sobre tais mecanismos e interconexões celulares da epilepsia apontam a participação de três áreas principais do cérebro no desenvolvimento das crises epiléticas: o córtex cerebral, hipocampo e o tálamo. No entanto, estudos dos possíveis mecanismos responsáveis pela geração dessa doença, nessas regiões cerebrais, demonstram que vários aspectos da função neuronal e glial, desde genes até as conexões neuronais possuem pelo menos influência modulatória nos mecanismos de geração da epilepsia (MCCORMICK e CONTRERAS, 2001).

Desse modo, o processo fisiopatológico da epilepsia está intimamente relacionado a alta interconexão cerebral, mais especificamente do prosencéfalo, as quais geram ampla variedade de atividades elétricas sincronizadas nas regiões cerebrais mencionadas. Essas atividades cerebrais sincronizadas surgem como uma transformação do ritmo elétrico normal do cérebro, sendo portanto, o processo de convulsão caracterizado por disfunções eletrofisiológicas que induzem hiperatividade anormal, rítmicas e passageira de um conjunto de neurônios principalmente das regiões do córtex e do hipocampo (MCCORMICK e CONTRERAS, 2001).

Essas disfunções podem ser geradas de duas formas: primeira, um pico interictal, aumento sincronizado do potencial de ação neuronal, devido excitações recorrentes, seguidas de períodos de hiperpolarização das células neuronais nas regiões citadas. Segunda, também podem ser causadas devido uma resposta ao desequilíbrio entre neurotransmissores excitatório e inibitórios, mediada pelas propriedades elétricas intrínsecas das membranas e pelas interações sinápticas que propagam essas descargas. Dessa forma os mecanismos celulares responsáveis pela geração das convulsões podem ser diferenciados em duas categorias: rítmicas (iniciadas por um pico interictal) e pelo desbalanço excitatório e inibitório de neurotransmissores (MCCORMICK e CONTRERAS, 2001).

3.5 BASES MOLECULARES DA CONVULSÃO

Como citado anteriormente, os neurotransmissores apresentam papel essencial na gênese, modulação, propagação e manutenção das convulsões tanto epiléticas quanto não epiléticas. Além das regiões cortical, hipocámpal e talâmica, outras também são afetadas, substância negra, corpo estriado e amígdala. Essas estruturas são continuamente deterioradas devido a morte neuronal durante o processo de convulsão, observados em modelos animais como o da pilocarpina. Convulsões geradas por esse modelo estão associadas a diferentes sistemas de neurotransmissão como GABAérgico, noradrenérgico, serotoninérgico e dopaminérgico, glutamatérgico (FREITAS, 2011).

Vários estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram elevada atividade de monoaminas como noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), dopamina (DA), acetilcolina (ACh), bem como neurotransmissores gasosos como o Óxido nítrico (NO) associadas a alterações no eletroencefalograma e em testes comportamentais de convulsão (APPLEGATE *et al.*, 1986; APPLEGATE e TECOTT, 1998; HRNČÍČ *et al.*, 2012). Há evidências de que a neurotransmissão colinérgica também está envolvida na instalação de crises convulsivas (FREITAS, 2011). A elevada concentração dessas monoaminas estão associadas a intermitentes descargas neuronais, as quais caracterizam as convulsões, seja ela focal ou generalizada em regiões do cérebro como amígdala e *locus coeruleus* (LC) (SHOUSE *et al.*, 2001). Portanto todos esses neurotransmissores atuam em conjunto na manutenção dos impulsos elétricos normais dos neurônios, bem como nos processos fisiopatológicos relacionados a convulsão (HRNČÍČ *et al.*, 2012).

Estudos realizados com o intuito de determinar concentrações de monoaminas no LC e amígdala em modelo felino de epilepsia lobo temporal, o qual utiliza descargas elétricas para gerar convulsões focais e generalizadas, mostraram que a baixa concentração de monoaminas nessas regiões aumenta consideravelmente a susceptibilidade de desenvolver convulsão. No entanto as concentrações de NA, 5-HT e DA no LC e amígdala aumentam durante as convulsões focal e generalizada. De forma individual, NA e 5-HT são encontradas em maior concentração no LC durante convulsão generalizada, enquanto que DA tem concentração maior na amígdala durante convulsão generalizada, apesar de ter expressivo aumento também na convulsão focal. Tais achados indicam que, além de haver grande quantidade de células noradrenérgicas e serotoninérgicas nessas regiões, elas possuem importante papel na epileptogênese (SHOUSE *et al.*,

2001; FREITAS *et al.*, 2006b). Uma abordagem mais detalhada da atividade desses neurotransmissores e suas funções na epileptogênese será mostrada ao longo desse tópico.

Ácido- γ - aminobutírico (GABA)

O ácido- γ - aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do Sistema Nervoso Central (SNC), sendo produzido a partir do glutamato, pela enzima L-ácido glutâmico descarboxilase (LGD) e o co-fator piridoxal fosfato. Promove seu poder inibitório induzindo o influxo de íons cloreto (Cl^-), através dos receptores ionotrópicos (GABA_A), os quais são ativados pela própria ligação do GABA a regiões específicas dos receptores. A entrada de íons cloreto induz hiperpolarizando das células neuronais, e conseqüentemente aumento do limiar do potencial de ação neuronal, impedindo que uma resposta excitatória ocorra de forma exacerbada, dessa forma a epilepsia está relacionada a falta do controle inibitório dos neurônios (HUNT *et al.*, 2013).

Esse descontrole nos circuitos GABAérgicos estão associados a fatores que afetam a atividade do neurotransmissor GABA, os quais incluem liberação isuficiente de GABA, perda e mudança no circuito dos interneurônios GABAérgicos, alterações na expressão de receptores GABA, bem como deficiência nas enzima responsáveis pela síntese desse. A atividade insuficiente da LGD resulta num desbalço entre glutamato (excitatório) e GABA (inibitório), tendo em vista que o primeiro é o substrato enzimático para produção do segundo neurotransmissor (KANG *et al.*, 2008). Portanto, todo esse conjunto de alterações, promove desequilíbrio entre os neurotransmissores excitatório e inibitórios, levando a uma instabilidade e deficiência na condução dos sinais neuronais (KAUL *et al.*, 2011).

Noradrenalina (NA)

Estudos apontam que a neurotransmissão noradrenérgica é de grande importância para a gênese das convulsões induzidas pelo modelo animal de convulsão induzido por PTZ *kindling*, tendo em vista o aumento dos níveis de noradrenalina no LC. Também foi observado o aumento desse neurotransmissor durante convulsões focais e generalizada, na região do LC. Analisando a concentração da NA em comparação com outros neurotransmissores (5-HT, DA), notou-se que os

níveis do NA se sobressai mediante as outras monoaminas. Com relação as regiões cerebrais, a os níveis de NA se apresentaram mais elevada no LC do que na amígdala (SHOUSE *et al.*, 2001).

No entanto, o contrário foi visto em estudo que mostra uma diminuição na concentração de NA no LC durante as fases agudas das convulsões. Havendo assim, além da diminuição da concentração desse neurotransmissor, um aumento na taxa de metabolização da noradrenalina (DE FREITAS *et al.*, 2005).

Acetilcolina (ACh)

A neurotransmissão colinérgica apresenta importante influencia no desenvolvimento de crises convulsivas e *status epilepticus*, essa relação é observadas pela administração de altas doses de agonistas colinérgicos muscarínicos, em modelo animal da pilocarpina (FREITAS, 2011). Esse processo envolve a ativação de receptores muscarínicos colinérgicos M₁, presente majoritariamente nas células neuronais do hipocampo. Esses receptores possuem acoplamento a proteína Gq/11 aumenta a atividade da fosfolipase C, que por sua vez induz a hidrólise dos fosfoinosítídeos presentes na membrana e a síntese de diacilglicerol (DAG). O DAG juntamente com o cálcio liberado pela ação do 1,4,5 trifosfato de inositol (IP₃), resulta na ativação da Proteína-quinase dependente de cálcio (PKC). Esse processo tem como resultado final a despolarização dos neurônios bem como liberação de vesículas na fenda sináptica, para a propagação do potencial de ação (VENTURA *et al.*, 2010).

O envolvimento do sistema colinérgico na epileptogênese e convulsões é bem visualizada, pelo uso da atropina, droga antagonista de receptores M₁. Ela promove o bloqueio desses receptores inibindo o aparecimento de sinais colinérgicos periféricos (movimentos estereotipados e tremores) induzidos pelo modelo animal de convulsão da pilocarpina. (DORANDEU *et al.*, 2005). Outro estudo mostra que uma recente droga utilizada no tratamento da epilepsia (Levetiracetam), demonstrou um aumento considerável na latência para primeira convulsão e de morte, bem como significativa diminuição na ocorrência de convulsão, *status epilepticus* e morte, em animais submetidos ao modelo da pilocarpina (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Estudos mostram que os receptores M₁ também sofrem diminuição em sua densidade no hipocampo (41%) e corpo estriado (51%). A diminuição observada nessas regiões cerebrais é

causada por um mecanismo compensatório imediato, devido ao aumento na concentração de acetilcolina produzida pela pilocarpina durante a fase aguda da convulsão e *status epilepticus* (DE FREITAS *et al.*, 2005). Outros estudos também demonstraram diminuição considerável na atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), (responsável pela degradação da acetilcolina (ACh) na fenda sináptica), no hipocampo (63%), corpo estriado (35%) e no corte frontal (27%), durante convulsões. Essa diminuição pode ser responsável pela regulação na concentração de ACh durante o desenvolvimento do *status epilepticus* induzido por pilocarpina (FREITAS *et al.*, 2006a).

Dopamina (DA)

A neurotransmissão dopaminérgica parece estar bem implicada na propagação e manutenção das crises convulsivas induzidas tanto pelo PTZ quanto pela pilocarpina. De modo que a depleção da dopamina aumenta a resistência as convulsões, enquanto que seus níveis elevados no cérebro podem induzi-las em diferentes modelos animais. É importante notar que a dopamina no processo convulsivo pode desenvolver respostas contrárias dependendo de qual receptor estiver mais proeminente D₁ ou D₂. Esses dois tipos de receptores interagem de forma cooperativa no sentido de controlar o comportamento motor. No entanto, apesar de a estimulação dos receptores D₁ potencializar e o bloqueio deles diminui[ri]as convulsões, o papel da via dopaminérgica junto a propagação do processo convulsões ainda não está totalmente elucidado (DE FREITAS *et al.*, 2005).

Glutamato (Glu)

Várias evidências mostram a efetiva participação do glutamato no desenvolvimento de convulsões bem como a manutenção e propagação delas. Após injúria cerebral (trauma físico, hipóxia entre outros) ocorrem mudanças moleculares, bioquímicas e estruturais que como o passar do tempo resulta no desenvolvimento de convulsões motoras recorrentes, dessa forma, dar-se a epileptogênese (ACHARYA *et al.*, 2008). Dentre as mudanças, está a liberação anormal de glutamato na região extracelular do hipocampo, e aumento de radicais livres, responsáveis pelo estresse oxidativo, juntos, esses fatores são indutores da neurotoxicidade e consequente morte celular.

A morte neuronal é mais provavelmente um resultado da neurotoxicidade mediada pelo glutamato e o aumento de radicais livres, sendo eles responsáveis pela manutenção da excitabilidade neuronal, a qual leva a convulsões motoras recorrente e ao *estatus epilepticus* (KONG *et al.*, 2012). É sabido que o aumento na concentração de glutamato liberado pelos astrócitos, tem papel importante na descarga sincronizada de grande população de neurônios durante as convulsões (BENARROCH, 2009). Portanto, a redução do glutamato na indução de citotoxicidade surge como uma importante alternativa na prevenção da morte neuronal induzida por convulsão, bem como as convulsões recorrentes provenientes do processo de morte neuronal (KONG *et al.*, 2012).

Estudo realizado em animais transgênicos com intuito de investigar as consequências do aumento da expressão da proteína EAAT₂, um captador de glutamato, mostrou que o aumento dessa proteína em ratos transgênicos atenua o processo de epileptogênese e de convulsões motoras recorrentes, pelo modelo de epilepsia lobo temporal induzida por pilocarpina. A alta estimulação colinérgica promovida pela pilocarpina, induz influxo de Ca²⁺ e consequente liberação exacerbada de glutamato, favorecendo o *status epilepticus*, pelo disparo sincronizado de grupo de neurônios. No entanto, a alta expressão de EAAT₂ inibe o disparo sincrônico neuronal pela redução da tóxica concentração de glutamato extracelular, protegendo assim, contra o desenvolvimento do *status epilepticus* e morte neuronal aguda (KONG *et al.*, 2012).

Oxido nítrico (NO)

Oxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa que possui atividade em quase todos os tecidos, inclusive no SNC onde desempenha papel imprescindível como neurotransmissor gasoso. Possui grande versatilidade e distribuição nos tecidos devido características físico-químicas como: pequeno tamanho molecular, alta permeabilidade em membranas biológicas, produzida endogenamente em processos que podem ser regulados, funções fisiológicas bem estabelecidas, efeitos mediados ou não por segundo mensageiros (ITOH e WATANABE, 2009). A atividade no SNC está relacionada a importantes processos fisiológicos incluindo aprendizagem e memória, via potenciação de longo prazo (GUIX *et al.*, 2005). Há grandes evidências também da participação desse neurotransmissor tanto em mecanismos pró-convulsivantes quanto anticonvulsivantes, tendo

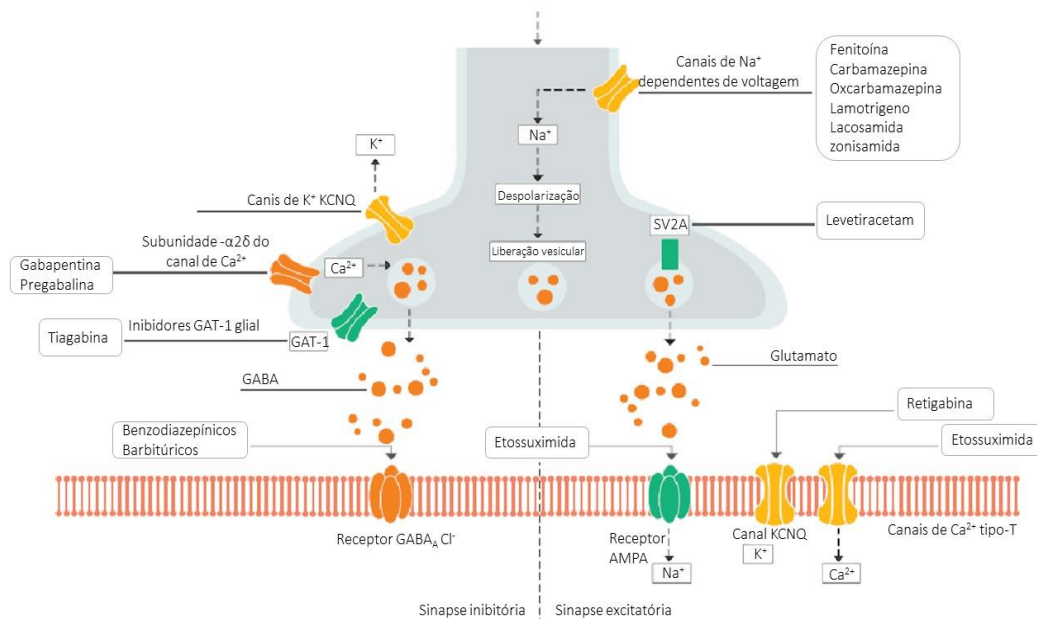
assim a necessidade de mais estudos relacionados ao papel do NO na epilepsia (ITOH e WATANABE, 2009).

3.6 TRATAMENTO

Os fármacos empregados no tratamento das epilepsias desempenham papel importante no controle das crises. No entanto apenas 20-40% dos pacientes apresentam resposta excelente ao tratamento, enquanto 30-40% apresentam resposta satisfatória, 10-20% incerta e 20% insatisfatória (SILLANPÄÄ e SCHMIDT, 2017). De forma ideal as drogas anticonvulsivantes deveriam controlar totalmente as convulsões, serem seguras ao uso crônico, não desenvolvendo assim efeitos colaterais ou adversos (teratogenicidade, hipersensibilidade ou toxicidade), ser de fácil prescrição e adesão do paciente ao tratamento (SCHMIDT e SCHACHTER, 2014).

Os fármacos utilizados no tratamento das crises convulsivas desenvolvem suas ações através do aumento da neurotransmissão GABAérgica, redução dos efeitos de aminoácidos excitatórios como o glutamato, ou do bloqueio de canais iônicos (figura 2) (SMITH *et al.*, 2007).

Figura 2 – Alvos moleculares dos fármacos antiepilépticos.



Fonte: Adaptada de SCHMIDT e SCHACHTER (2014)

A tabela 5 mostra a primeira linha de fármacos utilizados no tratamento das convulsões, seus mecanismos de ação e principais indicações.

Tabela 5 – Principais fármacos utilizados no tratamento das crises epiléticas.

Fármaco	Mecanismo de ação	Principal indicação na convulsão
Carbamazepina	Bloqueador de canais de Na ⁺	Convulsões focais, generalizadas com início focal (nenhum dos fármacos novos tem melhor eficácia)
Gabapentina	Bloqueador de canais de Ca ²⁺	Convulsões focais e generalizadas sem início focal
Lamotrigina	Bloqueador de canais de Na ⁺	Convulsão focal e generalizada
Levetiracetam	Modulador da SV2A	Convulsões focais, generalizadas sem início focal e mioclônica
Oxcarbamazepina	Bloqueador de canais de Na ⁺	Convulsões focais, generalizadas com início focal
Topiramato	Potenciação do GABA; bloqueio de canais de Na ⁺ e Ca ²⁺	Convulsões focais e generalizadas, síndrome de Lennox-Gastaut
Valproato	Potenciação do GABA, bloqueador de canais de Na ⁺ e Ca ²⁺	Convulsões focais, generalizadas (nenhum dos fármacos novos tem melhor eficácia)
Lacosamida	Aumenta a inativação lenta de canais de Na ⁺ dependentes de voltagem	Convulsões focais e generalizadas com início focal (sem hepatotoxicidade)
Pregabalina	Bloqueador de canais de Ca ²⁺	Convulsões focais e generalizadas com início focal (sem hepatotoxicidade)
Zonisamida	Bloqueador de canais de Na ⁺	Convulsões focais e generalizadas (não inferior a carbamazepina, sem hepatotoxicidade)
Parampanel	Antagonista do receptor AMPA	Convulsões focais e generalizadas com início focal
Clobazam	Potenciação do GABA	Convulsões focais e generalizadas (sem hepatotoxicidade)
Etossuximida	Bloqueador de canais de Ca ²⁺	Crise de ausência (primeira droga antiepilética, sem hipersensibilidade na pele)
Fenitoína	Bloqueador de canais de Na ⁺	Convulsões focais e generalizadas com início focal (eficácia similar a carbamazepina)
Diazepam	Modulação alostérica do GABA	Convulsões focais e generalizadas (sem hepatotoxicidade e hipersensibilidade da pele)

Fonte: Adaptada de SCHMIDT e SCHACHTER (2014).

As pesquisas para o desenvolvimento de medicamentos antiepiléticos têm focado em alvos relacionados aos mecanismos da epileptogênese, bem como no desenvolvimento de fármacos com novos mecanismos de ação (KAUR *et al.*, 2016) (tabela 6, página seguinte). As estratégias neuroprotetoras mais frequentemente utilizadas consistem no manejo adequado do estresse

oxidativo, excitotoxicidade e neuroinflamação, devido à direta relação desses processos com morte neuronal e consequente neurodegeneração.

Tabela 6 – Fármacos atualmente em estudo para o tratamento da epilepsia

Fármaco	Alvo Terapêutico	Condição	Fase Clínica
Muscimol	Receptor GABA _A	Epilepsia	Fase 1
Bumetanida	Inibidor NKCC1	Convulsão neonatal	Fase 1
Selurampanel	Receptor AMPA/Cainato	Convulsão refratária parcial	Fase 2
Ganaxolone	Receptor GABA _A	Convulsões parciais não controladas	Fase 2
Buspirona	Receptor 5-HT _{1A}	Epilepsia localizada	Fase 2
Canabidiol	Ainda não elucidado	Síndrome de Dravet e Lennox Gastaut	Fase 2
Carisbamato	Ainda não elucidado	Epilepsia parcial	Fase 3
VX-765	Caspase-1	Epilepsia parcial resistente	Fase 2
Seletracetam	Canais Ca ²⁺ pré-sinápticos	Convulsões de início focal	Fase 3
Everolimus	Inibidor mTOR	Convulsão refratária (esclerose tuberosa)	Fase 3

Fonte: adaptada de KAUR *et al.* (2016).

Apesar do grande arsenal medicamentoso existente, a maioria dos fármacos antiepilépticos possui efeitos adversos sérios, os quais debilitam o paciente, impedindo-o de realizar tarefas diárias simples. Essa característica interfere significativamente na adesão do paciente ao tratamento, dificultando assim o controle da doença (KAUR *et al.*, 2016). Como foi discutido em parágrafos anteriores, existe uma necessidade de drogas com novos mecanismos de ação, capazes de modificar o progresso fisiopatológico da doença. É importante também que esses novos fármacos possuam ação menos nociva ao paciente, permitindo a ele uma melhor qualidade de vida e melhor adesão ao tratamento (KAUR *et al.*, 2016). Visto que algumas plantas medicinais apresentarem atividade no SNC, o direcionamento das pesquisas em produtos naturais bioativos surge como um potencial campo de pesquisa, tendo em vista que a maioria dos medicamentos existentes para o tratamento dessa desordem é proveniente de síntese química (CARLINI e MENDES, 2011) e apresenta algumas limitações.

Seguindo essa premissa, para se obter compostos que atuem modificando o processo patofisiológico da epilepsia, é importante também haver um olhar direcionado aos fatores genéticos que regulam a epileptogênese. Descobertas recentes mostram que a formação das espinhas dendríticas, que são protuberâncias existentes nos dendritos, responsáveis pela formação de

sinapses, exercem papel importante no desenvolvimento da epilepsia. A formação dessas estruturas é independente da atividade neuronal, no entanto a sua maturação e especialização não o são. Diferente das outras células, os neurônios são capazes de sintetizar proteínas em regiões específicas do citoplasma, como por exemplo nas mediações das espinhas dendríticas. Essa produção é mediada por mRNAs específicos que são transportados em forma de ribonucleoproteínas (RNPs) de forma inativa para a região das espinhas dendríticas, onde são traduzidas proteínas responsáveis pela formação e maturação das sinapses (FIORE e SCHRATT, 2007).

Os microRNAs (miR-134) são moléculas endógenas pequenas advindas de RNAs não codificados, responsáveis por regular os níveis de proteínas nas células pelo controle da estabilidade e tradução de mRNAs, nesse caso, das regiões espinhais dendríticas. A regulação ocorre pela ligação do miR-134 as bases complementares do mRNA alvo, impedindo fisicamente que a tradução local da proteína LimK1 responsáveis pelo crescimento dos espinhos dendríticas e a formação de sinapses excitatórias ocorra (FIORE e SCHRATT, 2007; RESCHKE *et al.*, 2017).

No entanto, o processo de formação sináptica é bastante dinâmico, e varia entre a inibição e ativação da tradução, dependendo do tipo de sinalização presente. Para a inibição, é imprescindível o aumento na concentração de miR-134, enquanto que na ativação é necessário o aumento na concentração de BDNF (o qual é liberado na ativação sináptica) que neutraliza a inibição do miR-134. Dessa forma o miR-134 têm papel chave na regulação excitatória neuronal (FIORE e SCHRATT, 2007; RESCHKE *et al.*, 2017). Estudo realizado utilizando modelo animal de convulsão induzida por PTZ, mostrou o potencial anticonvulsivante e modificador do processo patológico do silenciador do miR-134 (Ant-134), que são moléculas capaz de antagonizar as bases complementares no gene responsável pela produção do miR-134, diminuindo sua expressão, impedindo-o assim que se liga ao mRNA alvo. (RESCHKE *et al.*, 2017).

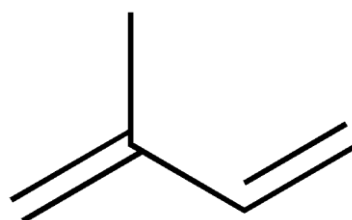
3.7 EUCALIPTOL

Os conhecimentos milenares acumulados sobre as plantas e o uso empírico delas como remédios na antiguidade por diferentes povos e culturas nortearam todo o conhecimento científico atual a respeito das plantas medicinais e de suas propriedades farmacológicas (NÓBREGA DE ALMEIDA *et al.*, 2011). Inúmeras espécies de plantas aromáticas são utilizadas na medicina devido às atividades farmacológicas apresentadas pelos óleos essenciais (LIMA-ACCIOLY *et al.*,

2006), tais como atividades antiespasmódica, antioxidante, antiparasitária (LIMA-ACCIOLY *et al.*, 2006; CIFTCI, O. *et al.*, 2011), ansiolítica, analgésica, antidepressiva, anticonvulsivante e antiepiléptica. É importante ressaltar que muitos desses compostos também podem causar alucinações, tremores, paralisia e convulsões (BLANCO *et al.*, 2009; PASSOS *et al.*, 2009; ZERAATPISHEH e VATANPARAST, 2015).

Os óleos essenciais são uma mistura de diferentes compostos químicos, dentre os quais se destacam os terpenos e os fenilpropanóides (NÓBREGA DE ALMEIDA *et al.*, 2011). Os terpenos são formados por unidades de isopreno, estruturas compostas por cinco átomos de carbono (figura 3).

Figura 3 – Estrutura de isopreno, molécula base dos terpenos.

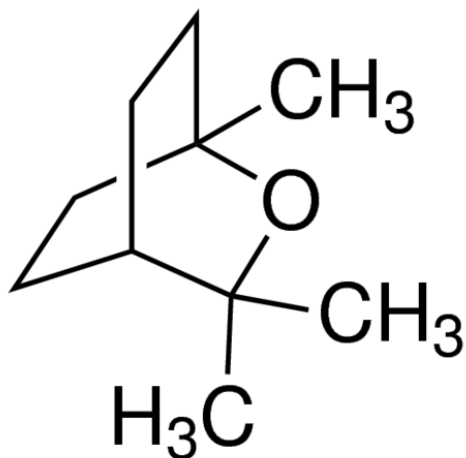


Fonte: <https://es.wikipedia.org/wiki/Terpeno#/media/File:Isoprene.svg>, 2017

A ligação entre duas unidades isoprênicas caracteriza a formação de um monoterpreno (C₁₀), enquanto que a ligação entre três delas (C₁₅) constituem os sesquiterpenos e assim sucessivamente. Dependendo da cadeia carbônica, os terpenos podem ser classificados em acíclicos, cíclicos e monocíclicos, o que infere uma variedade de combinações e assim grande diversidade de atividades farmacológicas (REALDON, 1960; PASSOS *et al.*, 2009).

O eucaliptol (1,3,3-trimetil-2-oxabicyclico[2.2.2]octano), também conhecido como 1,8-cineol, é um monoterpreno de fórmula molecular C₁₀H₁₈O e peso molecular 154,25 g/mol comumente encontrado como principal constituinte de óleos essenciais de algumas espécies de plantas aromáticas (SANTOS e RAO, 2000) (figura 4). Este composto apresenta-se como um líquido incolor insolúvel em água, com aroma canforado, miscível em álcool, clorofórmio, dissulfeto de carbono, ácido acético glacial e óleos vegetais. É opticamente inativo e apresenta ponto de ebulição entre 176 – 177 °C e ponto de fusão entre 1 – 2 °C (SIGMA-ALDRICH, 2015).

Figura 4 – Molécula estrutural do eucaliptol (1,8-cineol)



Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com>, 2017

O eucaliptol é muito valorizado pela indústria farmacêutica devido as suas propriedades farmacológicas, tais como antitussígena e descongestionante nasal, sendo utilizado para o tratamento de bronquites e sinusites (SANTOS e RAO, 2000). Além disso, o composto apresenta considerável atividade antibacteriana, antifúngica, sedativa, anticonvulsivante (MONFORTE *et al.*, 2010), hipnótica e analgésica (SANTOS e RAO, 2000; TAKAISHI *et al.*, 2012). Este último efeito parece envolver inibição do receptor TRPA1 e ativação do receptor TRPM8, revertendo a sensibilização provocada pela injúria de nervos periféricos (TAKAISHI *et al.*, 2012).

LIMA-ACCIOLY *et al.* (2006) mostram que o eucaliptol, quando testado em nervo ciático de ratos, é capaz de reduzir o potencial de ação e a velocidade de condução do impulso no nervo, aumentando o limiar necessário para gerar o potencial de ação. Um efeito semelhante foi observado sobre a redução da excitabilidade neuronal simpática e o mecanismo de ação parece envolver o bloqueio dos canais de Na⁺ dependentes de voltagem (FERREIRA-DA-SILVA *et al.*, 2009) e dos canais de K⁺, responsáveis pela repolarização da membrana neuronal (ZERAATPISHEH e VATANPARAST, 2015). Este último efeito foi potencializado na presença de baixas concentrações de fármacos bloqueadores dos canais de potássio.

O eucaliptol apresentou atividade anti-inflamatória considerável, tendo assim importante atividade em doenças neurodegenerativas relacionadas a inflamação como a doença de Alzheimer (DA). É sabido que o desenvolvimento dessa doença está também relacionado a dois marcadores neuropatológicos principais, as placas beta-amilóides (A β) (proteínas que se agrupam formando as

placas, bloqueando a sinalização entre as células nas sinapses) e a formação de novos neurofibrilares (NFT). Estudos mostram que o aumento de A β é responsável pela indução da inflamação na DA. O processo inflamatório induz o aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucinas 1 β e 6 pelas células imunológicas, as quais induzem o aumento na atividade das enzimas ciclooxigenase 2 (COX-2), óxido nítrico sintetase (NOS-2) e o fator nuclear tor-kB (COUTURIER *et al.*, 2011). O aumento dessas interleucinas promove também a produção de mais A β , pela modulação das γ -secretases, piorando a condição do paciente (BAKSHI *et al.*, 2008).

Nesse sentido, estudo conduzido por KHAN *et al.* (2014) mostrou que em linhagens de células PC12 modificadas geneticamente, pré-tratadas com Eucaliptol e posteriormente adicionadas de beta-amilóide 25 – 35 (A β ₂₅₋₃₅), com o intuito de promover a inflamação, reduziu significativamente o potencial de membrana mitocondrial, concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e NO, bem como os níveis das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6. Além disso o uso do Eucaliptol também foi responsável pela diminuição da expressão das enzimas responsáveis por produzir moléculas pró-inflamatórias NOS-2, COX-2 e NF-kB. Dessa forma o eucaliptol mostra grande potencial anti-inflamatório capaz de prevenir e diminuir os efeitos tóxicos causados pelo estresse oxidativo e a inflamação em doenças neurodegenerativas.

Eucaliptol também se mostrou potencialmente eficaz como antioxidante. Estudo utilizando o 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-*p*-doxin (TCDD), um constituinte importante no mecanismo do estresse oxidativo usado em animais para induzir o processo de oxidação. Esses animais quando tratados com TCDD apresentam aumento de substância reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em tecidos como fígado, rins e cérebro. O tratamento desses animais utilizando eucaliptol infere que os níveis de TBARS bem como enzimas responsáveis pela produção de radicais livres como catalase, glutatona peroxidase, diminuem significativamente ao longo do tempo de uso do eucaliptol. Apesar da relevância desse monoterpene, poucos estudos vêm sendo feitos em relação ao seu potencial antioxidante (CIFTCI, O. *et al.*, 2011).

3.8 MODELOS ANIMAIS PARA EPILEPSIA E CONVULSÃO

Modelos animais de epilepsia e convulsão vem sendo utilizados para se testar o potencial de diversas substância tanto sintéticas quanto naturais, e tem promovido grandes avanços no

entendimento dos mecanismos moleculares pelos quais a epilepsia e a convulsão se manifestam. Os modelos animais dão assim o suporte instrumental para a descoberta de novos compostos terapêuticos antiepilépticos e anticonvulsivantes.

Apesar desses modelos animais terem ajudado no desenvolvimento dos medicamentos antiepilépticos até então lançados, a eficácia deles no tratamento de algumas epilepsias ainda não é alcançada. Isso se deve em grande parte ao fato de os modelos animais em uso para o desenvolvimento de novos medicamentos serem antigos, fazendo com que as novas drogas compartilhem as mesmas características farmacológicas, como por exemplo a inibição de canais iônicos, que não surtem efeito, por exemplo, em casos de epilepsia refratária (LÖSCHER, 2011).

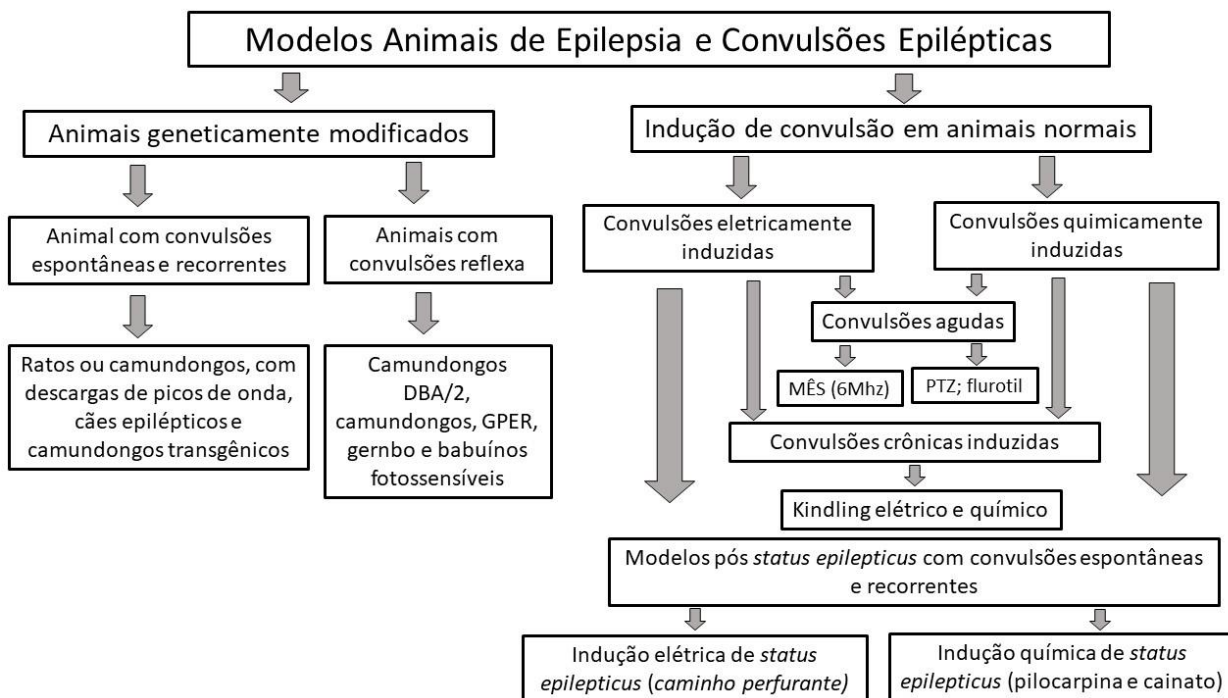
São vários os modelos animais para a epilepsia e convulsão, eles se diferenciam devido a epilepsia ser caracterizada pela cronicidade das convulsões devido a processos epileptogênicos, enquanto que as convulsões não epiléticas não possuem a característica da cronicidade. Modelos animais para epilepsia utilizam animais mutantes e transgênicos que apresentam convulsões espontâneas e recorrentes, ou pode ser obtida pela indução química e elétrica (abrasamento ou Kindling) induzindo assim a epileptogênese. Enquanto que as convulsões não epiléticas podem ser geradas por eletrochoque máximo e o PTZ os quais induzem convulsões semelhantes as apresentadas na epilepsia, entretanto não representam reproduzem a cronicidade da epilepsia (LÖSCHER, 2011).

O mecanismo de ação pelo qual o PTZ induz convulsão é bem estabelecido e envolve a interação do PTZ ao sítio de ligação da picrotoxina, bloqueando o receptor ionotrópico GABA_A, que são canais de Cl⁻. Esse bloqueio do receptor inibe a atividade dos neurônios inibitórios GABAérgicos, pela diminuição na frequência de abertura do GABA_A e conseqüente diminuição na condutância de Cl⁻. Esse processo é responsável por gerar desregulação excitatória, tendo como resultado a convulsão (LÖSCHER, 2011).

Outros exemplos de ferramentas farmacológicas incluem pilocarpina, cainato (modelos quipímicos) e eletrochoque que se apresenta como ferramenta não-farmacológica. Todos esses modelos são largamente utilizados para induzir tanto convulsões epiléticas como também modelos de epilepsia propriamente dita. Esses modelos estão melhor detalhados na figura na figura 5. Devido alguns tipos de convulsão não serem adequadamente mimetizadas pelo modelo do PTZ surgiu a necessidade do desenvolvimento de outros modelos incluindo a modificação genética, a qual é específica para modelos de epilepsia (LÖSCHER, 2011). Nesse estudo utilizou-se o modelo

animal do PTZ como o intuito de obter dados pré-clínicos sobre o efeito anticonvulsivante do terpeno Eucaliptol (1,8-Cineol) em camundongos, por meio de testes comportamentais e neuroquímicos.

Figura 5 – Esquema dos modelos animais para Epilepsia e convulsão epilética.



Fonte: Adaptado de LÖSCHER (2011)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (*Mus musculus*), machos, com peso médio de 30 g, provenientes do Biotério Prof. George Thomas, da universidade Federal da Paraíba – UFPB. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polipropileno e mantidos em ambiente com temperatura de 23 ± 2 °C, livre de ruídos, com ciclo claro/escuro de 12 h, recebendo água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados em horário padronizado (12h00min as 16h00min), no Laboratório de Farmacologia e Bioquímica Experimental (LAFABE/DBM). Os protocolos experimentais foram desenvolvidos após a aprovação do Comitê de Ética de Uso de Animais – CEUA /UFPB, sob número de protocolo 173/2015, em estrita obediência com as normas e diretrizes bioéticas vigentes para ensaios envolvendo animais não-humanos (Anexo 1).

Os procedimentos adotados estão de acordo com: a) Decreto n°. 24.645 de 10 de julho de 1934 que asseguram os direitos dos animais, estabelecendo medidas de proteção aos mesmos; b) Lei n°. 6.638 de 8 de maio de 1979, que normatiza as práticas didático-científicas da vivisseção de animais (BRASIL, 1934; BRASIL, 1979) e c) Lei 11.794, de 08 de outubro de 2008 (Lei Arouca), que dispõe sobre procedimentos para o uso científico de animais. No presente estudo, todos os animais foram eutanasiados com uma injeção intraperitoneal de tiopental (150 mg/kg) + lidocaína (10 mg/mL), como recomendado pelas Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA, de 2013.

4.2 DROGAS E REAGENTES

Tabela 7 – Lista de drogas e reagentes utilizados nos experimentos

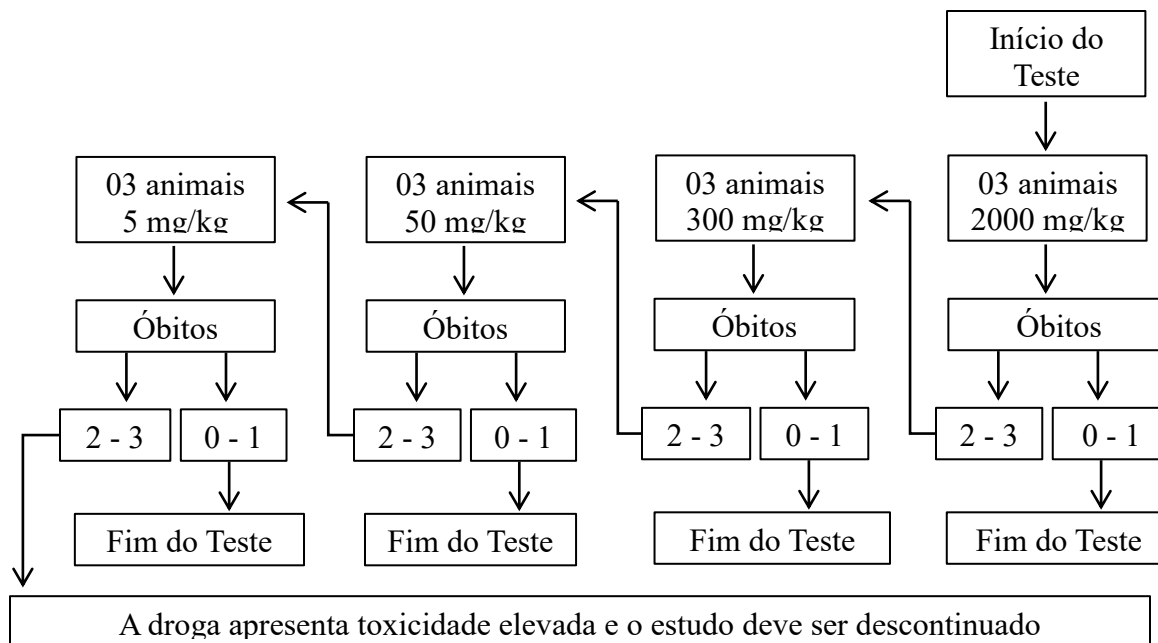
Drogas e reagentes	Procedência
Acetonitrila	SIGMA-ALDRICH®
Ácido cítrico	Synth
Ácido fosfórico	Synth
Ácido octanosulfônico sódico	SIGMA-ALDRICH®
Ácido perclórico	SIGMA-ALDRICH®

Ácido tiobarbitúrico	SIGMA-ALDRICH [®]
Ácido tricloroacético	Synth
Cloreto de potássio	Synth
Diazepam	Teuto [®]
Eucaliptol	SIGMA-ALDRICH [®]
Hidróxido de sódio	Synth
Lidocaína	EMS [®]
N-1-naftiletilenodiamina	SIGMA-ALDRICH [®]
Padrão de dopamina	SIGMA-ALDRICH [®]
Padrão de noradrenalina	SIGMA-ALDRICH [®]
Padrão de serotonina	SIGMA-ALDRICH [®]
Pentilenotetrazol	SIGMA-ALDRICH [®]
Soro fisiológico 0,9%	Teuto [®]
Sulfanilamida	SIGMA-ALDRICH [®]
Tetrahidrofurano	SIGMA-ALDRICH [®]
Tiopental	Teuto [®]
Tween 80	SIGMA-ALDRICH [®]

Fonte: Pesquisa direta

4.3 DETERMINAÇÃO DA DL₅₀ ESTIMADA PARA O EUCALIPTOL

Este teste foi realizado segundo o protocolo 423 da OECD 2001. A metodologia baseou-se em avaliações biométricas com doses fixas e adequadamente espaçadas. O procedimento foi realizado de forma escalonada com a utilização de 3 animais de um sexo único por fase. Dependendo da mortalidade e/ou do estado moribundo dos animais, podem ser necessários, em média, 2 - 4 passos para permitir a avaliação da toxicidade aguda da substância em estudo (figura 6).

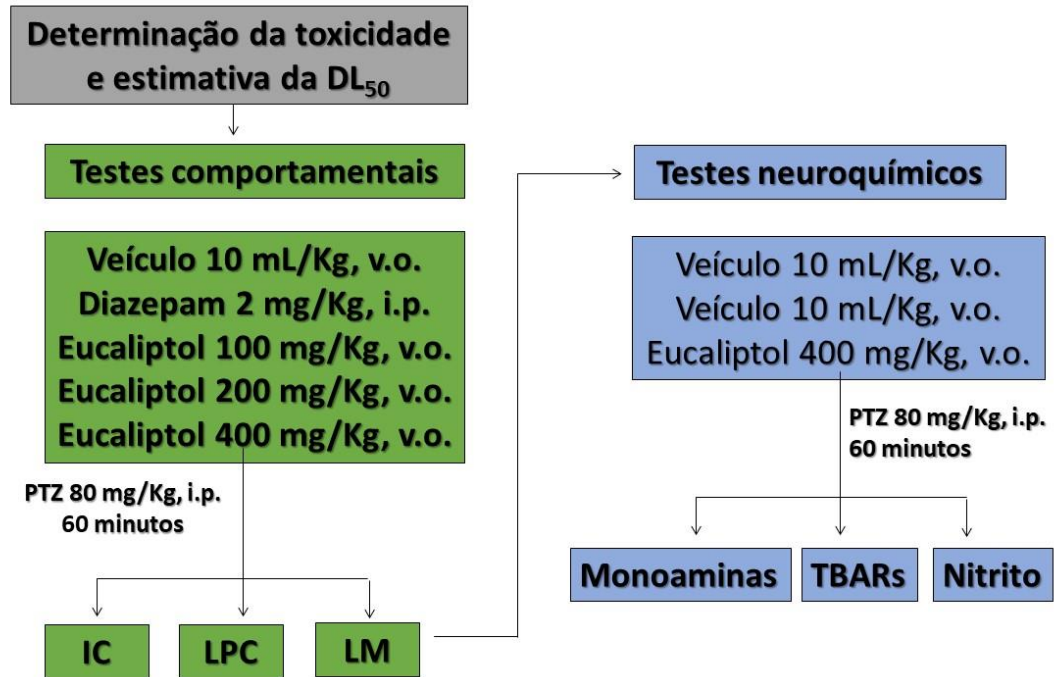
Figura 6 – Estimativa da DL₅₀ para o eucaliptol

Fonte: Adaptado da OECD 2001

4.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

Camundongos machos com peso médio de 30 g foram selecionados aleatoriamente, pesados, divididos em cinco grupos compostos por seis animais e ambientados às condições laboratoriais por 24h. Decorrido este período de tempo, todos os grupos foram submetidos a um jejum de 3 – 4 horas prévias ao início do teste. Após o período de jejum, os animais foram tratados por via oral com veículo (Tween 80 a 0,5% em solução salina) e eucaliptol (100, 200 e 400 mg/kg, emulsificado em salina com Tween 80 a 0,5%) e, por via intraperitoneal, com diazepam (2 mg/kg, diluído em salina). Decorridos 30 – 60 minutos após a administração das drogas, cada animal recebeu uma injeção intraperitoneal de pentilenotetrazol (80 mg/kg) para indução das convulsões químicas. Todos os testes foram realizados seguindo o protocolo experimental da figura 7.

Figura 7 – Protocolo experimental



Fonte: Pesquisa direta

Durante trinta minutos os animais foram analisados quanto aos seguintes parâmetros comportamentais: intensidade das convulsões, segundo a escala de RACINE (1972), modificada por Itzhak e Martin (2000) na qual pontuações de 1 a 5 indicam qual a intensidade do comportamento apresentado pelo animal, sendo o nível 1 de menor intensidade e o nível 5 de maior intensidade; a latência (em segundos) para o aparecimento da primeira convulsão tônico-clônica e a latência de morte (também em segundos) (tabela 8). Ao final do teste, e decorridas 24 horas, registrou-se o número de animais que não convulsionaram, o número de animais que convulsionaram e não morreram e o número de animais que convulsionaram e morreram (LOWSON *et al.*, 1990).

Tabela 8 – Escala de Racine modificada por Itzhak e Martin.

ESCALA	
ESTÁGIO DA CONVULSÃO	COMPORTAMENTO DO ANIMAL
1	Normal
2	Hiperatividade
3	Movimentos verticais repetidos e estereotípias
4	Clonia nas patas dianteiras
5	Ataque motor completo

Fonte: adaptada de RACINE (1972).

4.5 TESTES NEUROQUÍMICOS

Camundongos machos com peso médio de 30 g foram selecionados aleatoriamente, pesados, divididos em cinco grupos compostos por seis animais e ambientados às condições laboratoriais por 24h. Decorrido este período de tempo, todos os grupos foram submetidos a um jejum de 3 – 4 horas prévias ao início do teste. Após o período de jejum, os animais foram tratados por via oral com veículo (Tween 80 a 0,5% em solução salina) e eucaliptol 400 mg/kg, emulsificado em salina com Tween 80 a 0,5%). Decorridos 60 minutos após a administração das drogas, cada animal, exceto aqueles do grupo controle, recebeu uma injeção intraperitoneal de pentilenotetrazol (80 mg/kg) para indução das convulsões químicas. À medida que os óbitos foram ocorrendo nos grupos experimentais, os animais mortos foram imediatamente decapitados com uma tesoura cirúrgica para remoção dos encéfalos. Os animais que eventualmente não vieram a óbito foram eutanasiados com uma injeção intraperitoneal de tiopental (150 mg/kg) + lidocaína (10 mg/mL), seguido por deslocamento cervical para facilitar a dissecação do encéfalo e retirada do hipocampo (destinado à determinação da concentração de TBARs e nitrito) e do corpo estriado (destinado à determinação da concentração de monoaminas). Todo o material foi armazenado a –80°C e posteriormente encaminhado ao Laboratório de Biofisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina Estácio de Juazeiro do Norte – Estácio/FMJ para a realização das análises neuroquímicas.

4.5.1 Determinação da concentração das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico

A peroxidação lipídica foi avaliada pela determinação da concentração das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARs), conforme o método de Draper e Hadley (1990). Para tanto, foram preparados homogenatos de hipocampo a 10% p/v, utilizando tampão de cloreto de potássio a 1,15% p/v. Posteriormente, 50 μ L dos homogenatos foram misturados a 200 μ L de uma solução de ácido tiobarbitúrico a 0,6% p/v em hidróxido de sódio 0,5 N e 200 μ L de ácido tricloroacético a 10% p/v. A mistura foi submetida à agitação e posterior incubação em banho-maria (95 – 100°C) por 15 minutos. Decorrido este tempo, os tubos foram introduzidos em um banho de gelo para cessar a reação. O material resfriado foi, então, centrifugado por 5 minutos a 4.000 rpm; 100 μ L dos sobrenadantes foram transferidos para uma placa de Elisa onde se determinou a absorbância do produto da reação, em um comprimento de onda de 540 nm. Os valores das absorbâncias foram interpolados em uma curva-padrão de malonildialdeído e os resultados expressos em micromol (μ mol) de malonildialdeído (MDA) por grama de tecido. Para a curva-padrão, preparou-se uma solução de malonildialdeído a 326,4 μ mol/L em KCl 1,15% p/v.

4.5.2 Determinação da concentração de nitrito

A concentração de nitrito foi determinada conforme o método descrito por Green, 1981. Para tanto, foram utilizados os sobrenadantes de homogenatos de hipocampo a 10% p/v em tampão de cloreto de potássio a 1,15% p/v, previamente centrifugados por 15 minutos a 4° C e 15.000 rpm. Para a técnica foi utilizado o reagente de Griess (N-1-naftiletilenodiamina a 0,1%, água bidestilada, sulfanilamida a 1% e ácido fosfórico a 5%, na proporção de 1:1:1:1). Este reagente revela a presença de nitrito em amostras biológicas por meio de uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor rósea, com um pico de absorbância em 560 nm). A 100 μ L do reagente de Griess foram adicionados 100 μ L do sobrenadante homogenato. Da mistura resultante foram transferidos 100 μ L para uma placa de Elisa onde foi determinada a absorbância do produto da reação, em um comprimento de onda de 540 nm. Os valores das absorbâncias foram interpolados em uma curva-padrão de nitrito de sódio e os resultados expressos em micromolar (μ M). Para a curva-padrão, preparou-se uma solução de nitrito 10 mM.

4.5.3 Determinação da concentração de monoaminas

Para a determinação da concentração de monoaminas foi utilizado o método de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE com detecção eletroquímica. Inicialmente foram preparados homogenatos de corpo estriado a 10% p/v em ácido perclórico (HClO₄). Os homogenatos foram posteriormente centrifugados por 15 minutos a 4° C e 15.000 rpm. Uma alíquota de 20 µL do sobrenadante foi filtrado através de uma membrana (millipore- 0,2 µm) e posteriormente injetada no equipamento de CLAE para análise química, como descrita a seguir: para a análise das monoaminas, foi utilizada uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 25 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro de partícula de 3µm. A fase móvel foi composta por tampão de ácido cítrico 0,163 M pH 3.0, contendo ácido octanosulfônico sódico 0,69 M (SOS) como reagente formador do par iônico; acetonitrila 4% v/v e tetrahidrofurano 1,7% v/v. Os padrões utilizados foram preparados em uma concentração final de 4ng de NA, DA e 5-HT. A partir da altura ou área dos picos destes padrões, as amostras foram calculadas em uma planilha no programa Microsoft Excel e os resultados foram expressos em ng/g de tecido.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados que obedeceram a uma distribuição paramétrica foram representados pela Média ± Erro Padrão da Média (EPM) e analisados por Análise de Variância (ANOVA), seguido pelo teste de Student-Newman-Keuls (*post hoc*). Os resultados não-paramétricos, quantificados por meio de escores foram representados por Mediana (percentil 25 – percentil 75), analisados por Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunns (*post hoc*). Em ambos os casos foi considerado o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade os valores menores que 0,05 (p<0,05).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DETERMINAÇÃO DA DL₅₀ ESTIMADA PARA O EUCALIPTOL

A determinação da dose letal para 50% (DL₅₀) permite a avaliação da toxicidade de uma substância, sendo realizada com o objetivo de prever os efeitos nocivos que a mesma poderá desencadear quando da exposição por diferentes vias. Dessa forma, utilizam-se modelos animais para a realização dos testes, sendo camundongos e ratos os mais utilizados. O teste realizado no presente estudo seguiu o protocolo 423 da OECD 2001, o qual preconiza que seja administrada uma dose padrão a um determinado número de animais e, dependendo do comportamento apresentado por eles e da quantidade de óbitos (quando maior que 50% da população), o teste deverá ser repetido com uma dose menor da substância até que o número de óbitos observados seja igual ou inferior a um animal (CAZARIN *et al.*, 2004).

Após a administração do Eucaliptol (2000 mg/kg, v.o.), foi observada uma discreta redução da atividade central, caracterizada por: redução da atividade locomotora e perda do reflexo de fuga. Esta manifestação teve início após 60 min da administração do monoterpeno. Durante a realização do teste e ao longo dos 14 dias de observação não foram registrados óbitos nos animais tratados. Dessa forma, segundo o protocolo utilizado, o eucaliptol possui baixa toxicidade oral e sua DL₅₀ estimada é superior a 2000 mg/kg. Além disso, a estimativa da DL₅₀ do eucaliptol norteou a escolha das doses utilizadas nos testes comportamentais e neuroquímicos. Para tanto, foram utilizadas doses correspondentes a 5, 10 e 20 % da dose letal estimada.

Os resultados obtidos são reforçados, em parte, por XU *et al.* (2014) ao mostrarem que a DL₅₀ oral do eucaliptol em camundongos foi de 3849 mg/kg. De acordo com os autores, nesta dose os animais apresentaram hipoatividade e alteração da frequência respiratória. Por outro lado, CALDAS *et al.* (2016) mostraram que a administração oral de eucaliptol na dose de 2000 mg/kg possui alta toxicidade em camundongos, causando sedação, alteração da frequência respiratória, tremores e diarreia que se intensificam com o tempo, culminando na morte dos animais antes do período de 24h. Neste estudo, a DL₅₀ do monoterpeno estaria em um intervalo de doses entre 1500 e 1750 mg/kg.

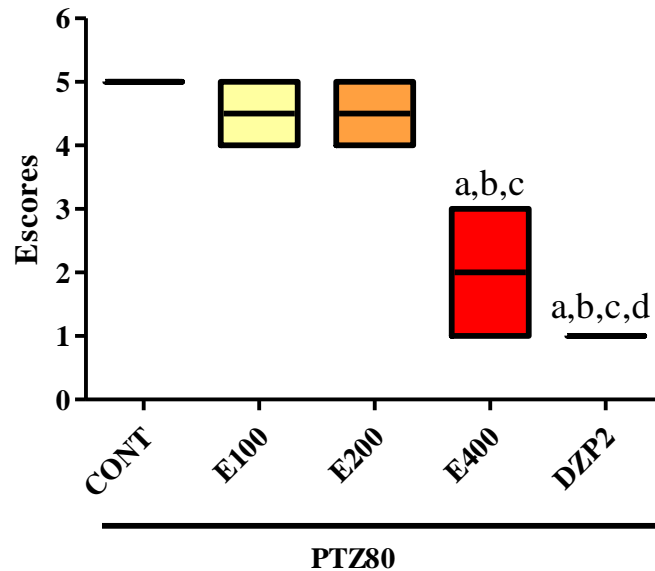
5.2 TESTES COMPORTAMENTAIS

O modelo animal de convulsão induzido por PTZ é um dos mais utilizados no *screening* farmacológico de substâncias com potencial anticonvulsivante. Este modelo teve seu ponto alto na década de 1960 quando as drogas anticonvulsivantes de primeira geração foram desenvolvidas e testadas. Este modelo tem sido desenvolvido em ratos, camundongos, gatos, cães e primatas, mas as duas primeiras espécies são as mais utilizadas. A dose administrada do PTZ está diretamente relacionada ao tipo e a gravidade da crise convulsiva que o animal irá desenvolver. Dessa forma, doses baixas (20-30 mg/Kg) induzem crises convulsivas semelhantes à crise de ausência, a administração de 40-60 mg/Kg induzem crises clônicas e doses maiores são responsáveis por induzir crises tônico-clônicas (CARLINI e MENDES, 2011).

O efeito anticonvulsivante do Eucaliptol em camundongos submetidos às convulsões induzidas por PTZ foi analisado através de três parâmetros comportamentais, a saber: intensidade das convulsões segundo a escala de Racine modificada por Itzhak e Martin (2000), tempo de latência para a primeira convulsão (em segundos), tempo de morte (em segundos) e percentual de animais vivos após 24h.

No primeiro parâmetro analisado (figura 8), os animais do grupo controle apresentaram ataque motor completo 5 (5 - 5). O pré-tratamento com diazepam impediu a geração da crise convulsiva e os animais apresentam comportamento normal 1 (1 - 1), com redução significativa da intensidade da convulsão, quando comparado ao grupo controle. Diferentemente, o pré-tratamento com eucaliptol nas doses de 100 e 200 mg/Kg não protegeu os animais do efeito pró-convulsivante do PTZ, os quais apresentaram clonia nas patas dianteiras 4,5 (4 - 5) e o resultado não apresentou diferença estatisticamente significante em relação ao grupo controle. Por outro lado, o pré-tratamento com eucaliptol na dose de 400 mg/Kg reduziu significativamente intensidade das convulsões nos animais, os quais apresentaram hiperatividade 2 (1 - 3), de acordo com a escala utilizada.

Figura 8 – Intensidade das convulsões em animais tratados com eucaliptol e submetidos ao teste das convulsões induzidas por PTZ



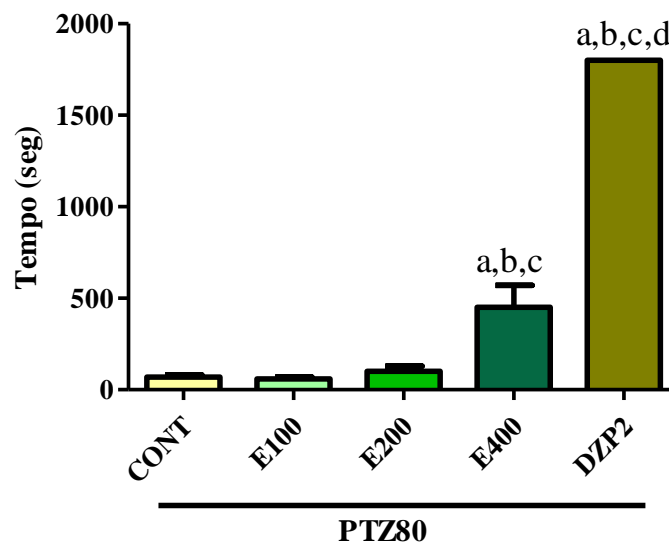
As colunas representam a mediana (percentil 25 – percentil 75), analisado por Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn (*post hoc*); Valores significativos: “a”, “b”, “c”, “d” vs CONT, E100, E200 e E400 respectivamente, quando $P < 0,05$ para $n=6$. CONT = controle, E100 = Eucaliptol 100 mg/kg, E200 = Eucaliptol 200 mg/kg, E400 = Eucaliptol 400 mg/kg, DZP2 = Diazepam 2mg/kg.

Os resultados acima descritos são corroborados por KOUTROUMANIDOU *et al.* (2013) que estudaram o efeito óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, constituído majoritariamente de eucaliptol (44,9%), em animais submetidos à convulsão induzida por PTZ. Os autores mostraram que o óleo essencial diminuiu a intensidade das convulsões, ora generalizadas, para ataques caracterizados por movimentos verticais repetitivos e estereotipados (estágio 3 na escala de Racine). É importante ressaltar que, devido à escassez de dados referentes ao efeito isolado do eucaliptol em testes comportamentais de convulsão, os trabalhos que estudam os óleos essenciais e que possuem esse composto como componente majoritário foram utilizados como referência. Isto reflete a necessidade da realização de mais estudos com componentes majoritários dos óleos essenciais com a finalidade de relacionar a presença de tais compostos aos efeitos farmacológicos desenvolvidos pelos óleos voláteis.

No segundo parâmetro analisado (figura 9) o grupo controle apresentou a primeira convulsão em um tempo médio de $68,8 \pm 11,9$ segundos. O pré-tratamento com diazepam impediu

a geração da crise convulsiva e os animais não apresentam convulsão durante a realização do teste, o qual durou $1800 \pm 0,0$ segundos (30 minutos). Diferentemente, o pré-tratamento com eucaliptol nas doses de 100 e 200 mg/kg não protegeu os animais do efeito pró-convulsivante do PTZ, os quais apresentaram a primeira convulsão aos $59,5 \pm 10,0$ segundos e $101,7 \pm 27,1$ segundos, respectivamente. Tal resultado não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Por outro lado, os animais tratados com eucaliptol na dose de 400 mg/kg apresentaram a primeira convulsão aos $450,2 \pm 121,4$ segundos, tempo superior e estatisticamente significativo em relação ao controle.

Figura 9 – Latência para o aparecimento da primeira convulsão em animais tratados com eucaliptol e submetidos ao teste das convulsões induzidas por PTZ



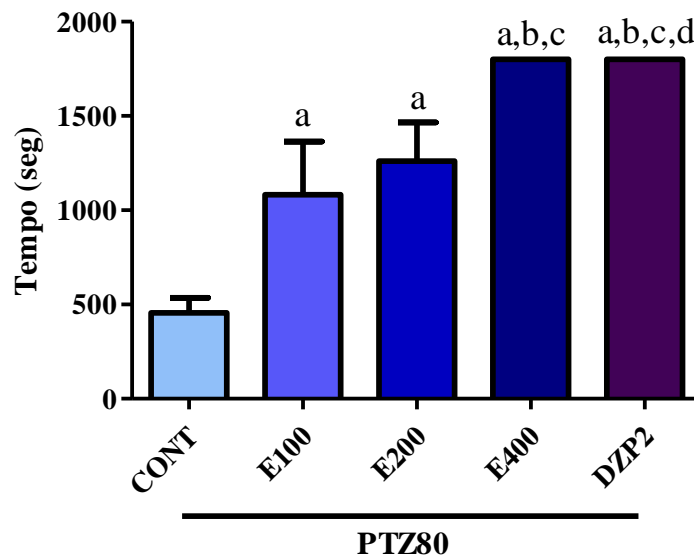
As colunas representam a média \pm o erro padrão da média, analisado através da ANOVA seguido pelo teste de *Student-Newman-Keuls (post hoc)*; Valores significativos: “a”, “b”, “c”, “d” vs CONT, E100, E200 e E400 respectivamente, quando $p < 0,05$ para $n=6$. CONT = controle, E100 = Eucaliptol 100 mg/Kg, E200 = Eucaliptol 200 mg/Kg, E400 = Eucaliptol 400 mg/Kg, DZP2 = Diazepam 2mg/Kg.

Esses achados estão em concordância com MASOUMI-ARDAKANI *et al.* (2016) que estudaram o óleo essencial de *Elettaria cardamomum*, cujo componente majoritário é o eucaliptol (45,6%). Nesse estudo os autores observaram que o óleo essencial testado aumentou a latência para a primeira convulsão em animais submetidos ao modelo de convulsões químicas induzidas por PTZ. Além disso, de acordo com MONFORTE *et al.* (2010), o óleo essencial de *Calamintha*

officinalis, cujo componente majoritário é o eucaliptol (6,4%), também apresentou efeito anticonvulsivante caracterizado por aumento do tempo de latência para primeira convulsão, redução no número de animais que exibiram convulsão e da mortalidade, nas doses de 50 e 100 mg/kg.

No terceiro parâmetro analisado (figura 10), os animais do grupo controle vieram a óbito em um tempo médio de $456,5 \pm 79,3$ segundos. O pré-tratamento com diazepam impediu a geração da crise convulsiva e, conseqüentemente, os animais não vieram a óbito durante a realização do teste, o qual durou $1800 \pm 0,0$ segundos (30 minutos). Diferentemente, os animais pré-tratados com eucaliptol nas doses de 100 e 200 mg/Kg vieram a óbito em um tempo médio de $1082 \pm 282,4$ segundos, $1260 \pm 205,8$ segundos, respectivamente. Os animais tratados com a dose maior do monoterpeno, de maneira semelhante ao diazepam, não vieram a óbito durante o tempo de realização do teste ($1800 \pm 0,0$ segundos).

Figura 10 – Tempo de morte em animais tratados com eucaliptol e submetidos ao teste das convulsões induzidas por PTZ



As colunas representam a média \pm o erro padrão da média, analisado através da ANOVA seguido pelo teste de *Student-Newman-Keuls (post hoc)*; Valores significativos: “a”, “b”, “c”, “d” vs CONT, E100, E200 e E400 respectivamente, quando $p < 0,05$ para $n=6$. CONT = controle, E100 = Eucaliptol 100 mg/Kg, E200 = Eucaliptol 200 mg/Kg, E400 = Eucaliptol 400 mg/Kg, DZP2 = Diazepam 2mg/Kg.

È importante ressaltar que os resultados descritos anteriormente apresentam diferença estatística em relação ao controle e entre si (relação dose-efeito). Com base nos resultados anteriormente descritos, é notória a atividade anticonvulsivante do eucaliptol, o qual apresentou maior efetividade na dose de 400 mg/kg. Sabe-se que o PTZ desempenha atividade pró-convulsivante pelo bloqueio não competitivo dos receptores GABA_A por interação alostérica com o mesmo, no sítio de ligação da picrotoxina. Os receptores GABA_A são canais iônicos que permitem a passagem de Cl⁻ pela membrana celular. Quando bloqueados, o influxo de Cl⁻ é diminuído, causando assim despolarização exacerbada levando, conseqüentemente à convulsão aguda (LÖSCHER, 2011).

Dessa forma pode-se inferir que, a atividade anticonvulsivante do eucaliptol esteja relacionada, possivelmente, a sua interação nos canais de cloreto do receptor GABA_A. No entanto mais experimentos seriam necessários para a confirmação de tal hipótese. O uso do flumazenil, um antagonista benzodiazepínico, seria uma estratégia útil para tal finalidade.

5.3 TESTES NEUROQUÍMICOS

Os testes neuroquímicos foram realizados com o intuito de avaliar o impacto do tratamento com eucaliptol sobre eventuais alterações da concentração de monoaminas e de marcadores de estresse oxidativo induzidas durante a crise convulsiva provocada por pentilenotetrazol. Já foi mencionado em parágrafos anteriores que o PTZ é capaz de induzir dano neuronal devido à hiperexcitabilidade decorrente de sua ação sobre os receptores GABA_A; como consequência, uma variedade de respostas neuroquímicas são desencadeadas, dentre as quais destaca-se o estresse oxidativo.

De acordo com OBAY *et al.* (2008), durante o processo pode ocorrer: liberação de radicais livres que podem induzir convulsão pela direta inativação das enzimas glutamina sintetase (responsável pela transformação do glutamato em em glutamina) e glutamato descarboxilase (atua degradando o glutamato), promovendo assim um aumento anormal de neurotransmissor excitatório (glutamato); depleção da glutathiona reduzida (GSH), um tripeptídio presente em todas as células de mamíferos, que desempenha um papel fundamental na citoproteção como cofator de algumas enzimas antioxidantes, sendo esta função de grande importância para a defesa conta o estresse oxidativo e indução do metabolismo de fosfolipídeos de membrana e liberação de radicais livres,

os quais resultam em peroxidação lipídica e liberação de marcadores do estresse oxidativo como o malondialdeído (MDA), sendo os radicais livres, tanto causadores como também uma resposta do processo convulsivo.

Os radicais livres acima citados são moléculas altamente reativas, formadas por elétrons desemparelhados em sua última camada de valência. Como exemplo dessas moléculas tem-se as espécies reativas de oxigênio (EROs) como oxigênio molecular (O_2), os radicais superóxido (O_2^-), hidroxila (OH), peróxido (ROO^-), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), além das espécies reativas de nitrogênio como óxido nítrico (NO), peroxinitrito ($ONOO^-$), bem como espécies reativas de cloro, como o ácido hipoclorídrico (HOCl). O estresse oxidativo é decorrente de um desequilíbrio entre a produção em excesso dos radicais livres e os sistemas de defesa antioxidantes (BERK *et al.*, 2011).

Durante a peroxidação lipídica ocorre a formação de metabólitos secundários tóxicos incluindo alcanos, aldeídos e isoprostanos, através da reação entre ácidos graxos, esteróides e fosfolípidos de membrana com as espécies reativas de oxigênio. A metodologia de determinação desses metabólitos tem como princípio o fato de que muitos produtos da peroxidação lipídica são reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBA). Assim, quando se adiciona o TBA a alguma amostra biológica, pode-se detectar esses compostos conhecidos coletivamente como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs, do inglês *thiobarbituric acid-reactive substances*) (COSTA, 2014).

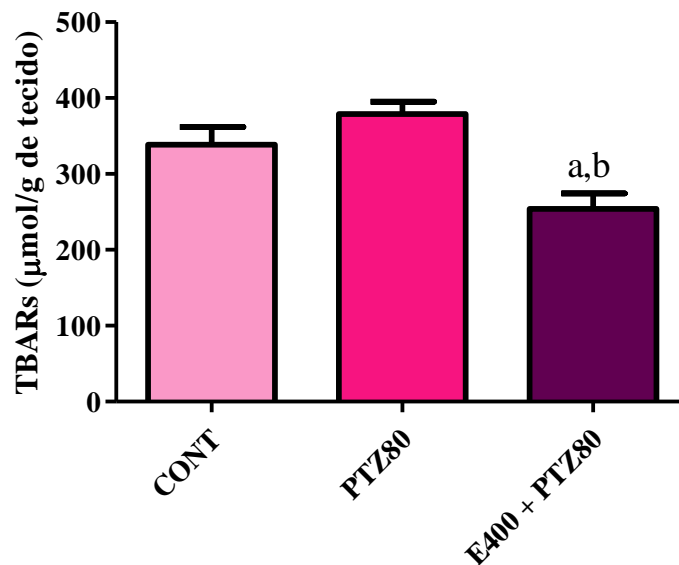
São diversas as substâncias que são formadas durante a peroxidação lipídica, no entanto a principal e mais utilizada é o malonildialdeído (MDA), o qual é um dos produtos finais do processo de oxidação dos ácidos graxos polinsaturados da membrana plasmática. Nesta reação cada molécula de MDA se liga a duas moléculas de TBA, formando um complexo pode ser detectado e quantificado por espectrofotometria. A presença dessas substâncias indica a ocorrência de peroxidação lipídica servindo assim como importantes marcadores do estresse oxidativo (OBAY *et al.*, 2008; CIFTCI, O. *et al.*, 2011).

5.3.1 Determinação da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

De acordo com a figura 11, a ocorrência do fenômeno da peroxidação lipídica associado à convulsão induzida por PTZ não mostrou-se muito evidente visto que a concentração de TBARs

dos grupos controle ($338 \pm 23,5$) e PTZ ($378 \pm 16,1$) não apresentaram diferença do ponto de vista estatístico. Entretanto, o grupo tratado com eucaliptol na dose de 400 mg/kg, v.o. apresentou uma redução significativa na concentração do parâmetro em questão ($253 \pm 20,4$). Diante deste resultado não é possível inferir se o efeito observado com o eucaliptol está associado ou não à ação anticonvulsivante previamente discutida, visto que a o fenômeno da peroxidação lipídica não ficou evidente neste teste.

Figura 11 – Determinação da concentração das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs) em hipocampo de animais tratados com eucaliptol e submetidos ao teste das convulsões induzidas por PTZ



As colunas representam a média \pm o erro padrão da média, analisado através da ANOVA seguido pelo teste de *Student-Newman-Keuls (post hoc)*; Valores significativos: “a”, “b”, vs CONT, PTZ 80 e E400, respectivamente, quando $p < 0,05$ para $n=6$. CONT= controle, PTZ 80 = Pentilenotetrazol 80 mg/kg, E400 = Eucaliptol 400 mg/kg.

Apesar de o resultado anterior ser inconclusivo quanto à relação entre os efeitos anticonvulsivante e antioxidante do eucaliptol no modelo do PTZ, o monoterpeno diminuiu a formação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico durante o processo da peroxidação lipídica, sugerindo que o mesmo é dotado de atividade antioxidante e este achado está em concordância com dados da literatura. O efeito antioxidante do eucaliptol também foi observado por CIFTCI, OSMAN *et al.* (2011) em fígado de ratos submetidos ao estresse oxidativo induzido pelo poluente ambiental 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCD), ao longo de 60 dias. O efeito

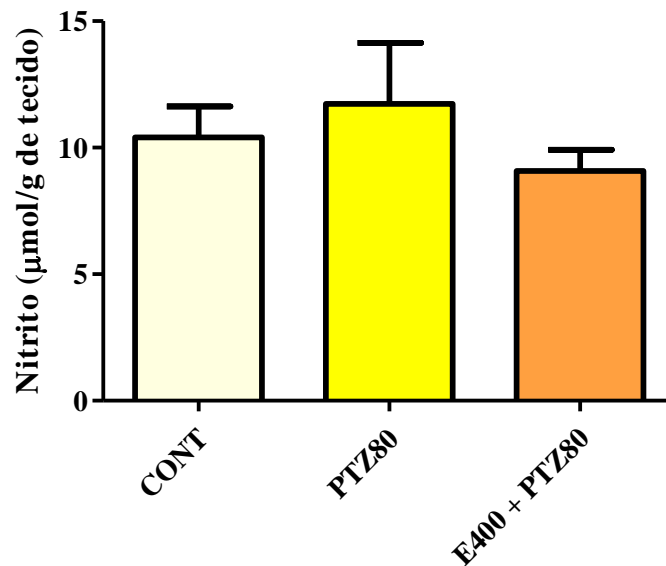
antioxidante *in vitro* do eucaliptol também foi observado por CANDAN *et al.* (2003) ao estudarem o comportamento do óleo essencial de *Achillea millefolium* frente a diversos radicais como DPPH, superóxido, hidroxil, além das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico. Neste estudo, o óleo essencial rico em eucaliptol foi capaz de sequestrar todos os compostos anteriormente citados.

5.3.2 Determinação da concentração de nitrito

O óxido nítrico (NO) é uma molécula que também está ligada ao mecanismo de indução do estresse oxidativo. O NO é um composto altamente reativo devido à característica eletrônica de sua estrutura, a qual apresenta 11 elétrons de valência, sendo seis advindos do oxigênio e cinco do nitrogênio, e ainda um elétron não pareado na última camada de valência. Todas essas características químicas conferem-no grande atividade pró-oxidante, estando ele e seus derivados nitrito (NO_2^-), nitrato (NO_3^-) e peroxinitrito (ONOO^-) presentes nos processos de estresse oxidativo. Por ser uma molécula muito instável, o NO é difícil de ser detectado, sendo então sua determinação em amostras biológicas realizadas indiretamente pelos seus derivados (GUIX *et al.*, 2005).

A importância da determinação do NO pelos seus metabólitos está relacionada ao seu grande potencial de oxidação, contribuindo com o processo de convulsão. KANEKO *et al.* (2002) afirmam que há aumento nos níveis de NO durante e após a convulsão tônica e clônica induzida por PTZ, e esse aumento é proporcional a intensidade das manifestações. Este achado, no entanto, não foi observado no protocolo realizado no presente trabalho. De acordo com a figura 12 não foram observadas alterações significativas na concentração de nitrito entre os grupos tratados com PTZ na dose de 80 mg/kg ($11,7 \pm 2,4$), eucaliptol na dose de 400 mg/kg ($9,05 \pm 0,84$) e o grupo controle ($10,4 \pm 1,2$).

Figura 12 – Determinação da concentração de nitrito em hipocampo de animais tratados com eucaliptol e submetidos ao teste das convulsões induzidas por PTZ



As colunas representam a média \pm o erro padrão da média, analisado através da ANOVA seguido pelo teste de *Student-Newman-Keuls (post hoc)* quando $p < 0.05$ para $n = 6$. CONT = controle, PTZ 80 = Pentilenotetrazol 80 mg/kg, E400 = Eucaliptol 400 mg/kg.

Estudos sugerem a participação do NO como agente pró-convulsivante em modelos experimentais utilizando lindano (hexaclorociclohexano- γ ou HCH), organoclorado muito usado como inseticida, pesticida e escabicida. Este composto desenvolve sua ação pró-convulsivante ao ligar-se ao receptor GABA_A, na mesma subunidade de ligação da picrotoxina, impedindo o influxo de cloreto levando ao aumento da atividade neuronal (VUČEVIĆ *et al.*, 2008). A administração de L-arginina, um precursor do NO, promove aumento das convulsões e diminuição no tempo de latência para primeira convulsão, quando doses subconvulsivantes de lindano são administradas (HRNČIĆ *et al.*, 2011). Por outro lado, o N-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), um inibidor não seletivo da NOS, diminui a incidência e prolonga o tempo de latência para a primeira convulsão em animais tratados com HCH (HRNČIĆ *et al.*, 2012). O mecanismo através do qual o NO atuaria nas convulsões induzidas por lindano parece envolver a ativação da guanilil ciclase (GC) aumentando, por conseguinte, os níveis de cGMP; este por sua vez ativa a proteína cinase G (PKG), responsável por fosforilar o receptor GABA_A, inativando-o (ROBELLO *et al.*, 1996). Assim, pode-

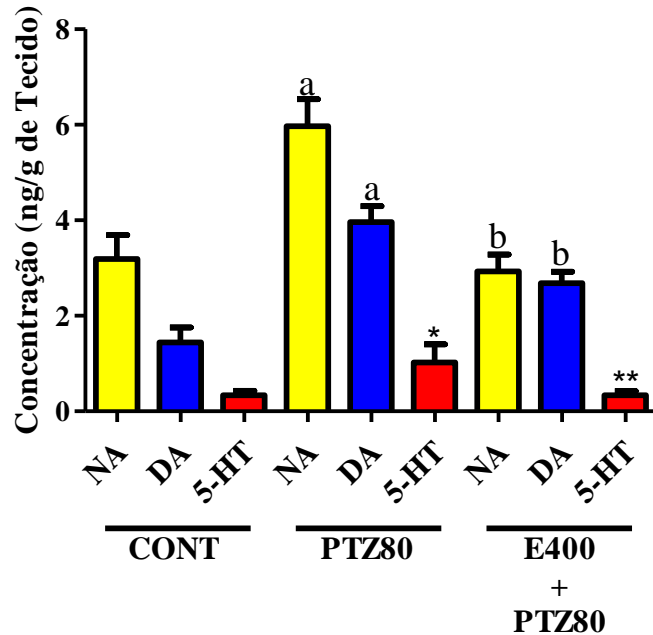
se inferir que a resposta pró-convulsivante do NO no modelo de convulsões induzidas por lindano deve-se ao sinergismo da inativação do receptor GABA_A, promovida tanto pelo NO quanto pelo lindano (ROBELLO *et al.*, 1996). Além disso o NO é responsável por elevar os níveis intracelulares de Ca²⁺, da mesma forma que o lindano (HORN *et al.*, 2002). Esse sinergismo induz a liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato, o qual é também responsável por induzir convulsões (MARCOLI *et al.*, 2006).

5.3.3 Determinação da concentração de monoaminas

As monoaminas estão intimamente envolvidas no processo de convulsões; quando em níveis basais, estudos mostram que há um aumento da susceptibilidade de convulsão. Entretanto, quando em níveis elevados, as monoaminas estão associadas a convulsões intermitentes com descargas iniciadas no *locus coeruleus* (LC) (SHOUSE *et al.*, 2001). De acordo com a figura 13, a administração de PTZ promoveu um aumento significativo na concentração de NA ($5,9 \pm 0,5$), DA ($3,9 \pm 0,3$) e 5-HT ($1,0 \pm 0,3$) em relação ao grupo controle (NA $3,1 \pm 0,4$; DA $1,4 \pm 0,3$ e 5-HT $0,3 \pm 0,0$ respectivamente). Por sua vez, o pré-tratamento com eucaliptol na dose de 400 mg/Kg, v.o. reduziu significativamente a concentração de NA ($2,9 \pm 0,3$), DA ($2,6 \pm 0,2$) e 5-HT ($0,3 \pm 0,08$) em relação ao grupo tratado com PTZ.

É sabido que o aumento da concentração de noradrenalina está envolvido na geração, intensificação e aumento da duração das convulsões no corpo estriado de camundongos como mostrado por KUNIEDA *et al.* (2002). No presente trabalho, a administração de eucaliptol reduziu dos níveis de NA após o tratamento com PTZ, revelando uma possível atividade neuroprotetora do monoterpene. O receptor noradrenérgico α_1 está relacionado aos mecanismos responsáveis pela geração, intensificação e aumento da duração das convulsões. É sabido que a expressão exacerbada desse receptor em camundongos é responsável pela neurodegeneração apoptótica na região hipocampal (ZUSCIK *et al.*, 2000) e pela indução de convulsões espontâneas (ZUSCIK *et al.*, 2000; KUNIEDA *et al.*, 2002). Por outro lado, a não expressão dos receptores α_1 , tem ação protetora e anticonvulsivante mesmo na presença de ferramentas farmacológicas (cainato e pilocarpina) (BATTAGLIA *et al.*, 2003), além de suprimir a perda celular e a neurodegeneração hipocampal (BATTAGLIA *et al.*, 2003; PIZZANELLI *et al.*, 2009).

Figura 13 – Determinação da concentração de monoaminas (NA, DA e 5-HT) em corpo estriado de animais tratados com eucaliptol e submetidos ao teste das convulsões induzidas por PTZ



As colunas representam a média \pm o erro padrão da média, analisado através da ANOVA seguido pelo teste de *Student-Newman-Keuls (post hoc)* e teste *t* (* e **) para $n=6$. Valores significativos: “a”, “b”, “d”, “e”, “f”, “g”, “h”, “i” vs CONT (NA, DA, 5-HT), PTZ80 (NA, DA, 5-HT), E400 + PTZ80 (NA, DA, 5-HT) respectivamente, quando $p < 0,05$. CONT-NA = controle noradrenalina, CONT-DA = controle dopamina, CONT-5-HT = controle serotonina, PTZ 80-NA = Pentilenotetrazol 80 mg/kg noradrenalina, PTZ 80-DA = Pentilenotetrazol 80 mg/kg dopamina, PTZ 80-5-HT = Pentilenotetrazol 80 mg/kg serotonina, E400 + PTZ80 – NA = Eucaliptol 400 mg/kg + Pentilenotetrazol 80 mg/kg noradrenalina, E400 + PTZ80-DA = Eucaliptol 400 mg/kg + Pentilenotetrazol 80 mg/kg dopamina, E400 + PTZ80-NA = Eucaliptol 400 mg/kg serotonina+ Pentilenotetrazol 80 mg/kg dopamina.

De forma semelhante, a administração de eucaliptol reduziu dos níveis de DA após o tratamento com PTZ. OZSOY *et al.* (2014) afirmam que o neurotransmissor citado tem sua concentração elevada em animais tratados com pentilenotetrazol. Além disso, foi observado por SZYNDLER *et al.* (2002) um aumento nos níveis dopaminérgicos em animais submetidos ao abrasamento induzido baixas doses de PTZ em diferentes estruturas cerebrais incluindo núcleo acumbens. Dessa forma a ação do eucaliptol em diminuir os níveis de DA confirma seu papel neuroprotetor e anticonvulsivante, visto que o aumento de DA está envolvido com a atividade convulsiva, fato também observado por BARONE *et al.* (1991). A neurotransmissão dopaminérgica também está envolvida no processo de propagação e manutenção da convulsão no

modelo de convulsões químicas induzidas por pilocarpina. Os receptores D₁ e D₂ possuem respostas opostas, pró-convulsivante e anticonvulsivante respectivamente. Quando há diminuição na concentração da dopamina o limiar da convulsão aumenta, induzindo assim uma maior resistência a convulsão. Em contrapartida, grandes concentrações de dopamina no cérebro promovem convulsão em variadas espécies animais (BARONE *et al.*, 1991).

Dessa forma, estímulos dos receptores dopaminérgicos D₁ potencializam as convulsões induzidas pela pilocarpina, enquanto que o bloqueio desses receptores promove diminuição da ação convulsiva. Já os receptores D₂ funcionam de modo inverso aos mesmos estímulos. Esse fato é observado com antagonistas dos receptores dopaminérgicos D₂ que reduzem o tempo de latência para a primeira convulsão (LPC), latência de desenvolvimento para o estado epiléptico (LEP) e aumentam o número de animais que convulsionam. De modo contrário os antagonistas dos receptores D₁ aumentam a LPC e diminuem a quantidade de animais que convulsionam (BARONE *et al.*, 1991).

A transmissão serotoninérgica está associada também à manutenção das convulsões induzidas por pilocarpina. É sabido que o bloqueio dos receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A} propicia o surgimento de convulsão mediada pela pilocarpina, visto que estes receptores estão associados à inibição da estimulação colinérgica. Por outro lado, os receptores 5-HT₂ quando bloqueados reduzem a manutenção e propagação das convulsões e do estado epiléptico (YAN *et al.*, 1994). É sabido que há considerável aumento na concentração de 5-HT no hipocampo, na indução da convulsão pela pilocarpina. Não obstante, a relação da 5-HT com as convulsões é reforçada pelo fato de a fluoxetina, inibidor da receptação de 5-HT, potencializar convulsões induzidas pela pilocarpina.

Observa-se também que os efeitos epileptogênicos desse medicamento quando administrado em altas doses tanto em modelos animais quanto em humanos (FERRERO *et al.*, 2005). Por fim, foi observado que a administração de eucaliptol também reduziu dos níveis de 5-HT após o tratamento com PTZ. SZYNDLER *et al.* (2002) mostram o envolvimento direto da inervação serotoninérgica do hipocampo e córtex pré-frontal, e o efeito da mudança no comportamento emocional do animal submetido ao abrasamento químico induzido por PTZ. Este achado reforça a hipótese de que o eucaliptol apresente efeito anticonvulsivante e neuroprotetor, em parte, pela redução da concentração de monoaminas, neurotransmissores relacionados ao início, propagação e manutenção da crise convulsiva.

6 CONCLUSÕES

A administração oral de eucaliptol, na dose de 2000 mg/Kg, promoveu um efeito depressor central nos animais tratados, caracterizado por sedação e perda do reflexo de fuga;

A administração oral de eucaliptol apresentou baixa toxicidade e sua DL_{50} estimada foi superior a 2000 mg/Kg, v.o.;

No teste das convulsões induzidas por PTZ, administração oral de eucaliptol na dose de 400 mg/Kg reduziu de forma significativa a intensidade das convulsões, aumentou a latência para aparecimento da primeira convulsão e o tempo de morte dos animais tratados com PTZ;

A administração de PTZ promoveu um aumento significativo da concentração estriatal dos neurotransmissores monoaminérgicos, a qual foi reduzida pelo pré-tratamento com eucaliptol (400 mg/Kg, v.o.);

A administração de PTZ não alterou a concentração hipocampal das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico e de nitrito. No entanto, o pré-tratamento com eucaliptol (400 mg/Kg, v.o.) foi capaz de reduzir a concentração de TBARs, sugerindo que o mesmo é dotado de atividade antioxidante, que pode estar relacionada ou não ao seu potencial anticonvulsivante;

O eucaliptol reduziu a excitabilidade neuronal e conseqüentemente atenuou as convulsões induzidas quimicamente por PTZ. Este efeito teve como reflexo a redução da concentração estriatal de monoaminas, cujo aumento está associado a alterações no eletroencefalograma e em modelos animais de convulsão. Sabe-se que o aumento da excitabilidade neuronal também está envolvido na formação de radicais livres e no processo da peroxidação lipídica. A redução da concentração hipocampal das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico sugere que o eucaliptol também interferiu na geração de radicais livres e, conseqüentemente, no dano oxidativo, mostrando ser uma molécula anticonvulsivante promissora, o que demanda mais estudos que melhor esclareçam como este monoterpene desenvolve seu mecanismo de ação em modelos animais de convulsão.

REFERÊNCIAS

ACHARYA, M. M.; HATTIANGADY, B.; SHETTY, A. K. Progress in neuroprotective strategies for preventing epilepsy. **Progress in neurobiology**, v. 84, n. 4, p. 363-404, 2008. ISSN 0301-0082.

ANGUS-LEPPAN, H.; PARSONS, L. M. Epilepsy: epidemiology, classification and natural history. **Medicine**, v. 36, n. 11, p. 571-578, 2008. ISSN 1357-3039.

APPLEGATE, C. D.; BURCHFIEL, J. L.; KONKOL, R. J. Kindling antagonism: effects of norepinephrine depletion on kindled seizure suppression after concurrent, alternate stimulation in rats. **Experimental neurology**, v. 94, n. 2, p. 379-390, 1986. ISSN 0014-4886.

APPLEGATE, C. D.; TECOTT, L. H. Global increases in seizure susceptibility in mice lacking 5-HT 2C receptors: a behavioral analysis. **Experimental neurology**, v. 154, n. 2, p. 522-530, 1998. ISSN 0014-4886.

ASSIS, T. R. D. et al. Etiological prevalence of epilepsy and epileptic seizures in hospitalized elderly in a Brazilian tertiary center–Salvador-Brazil. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 73, n. 2, p. 83-89, 2015. ISSN 0004-282X.

BAKSHI, P. et al. Novel role of CXCR2 in regulation of γ -secretase activity. **ACS chemical biology**, v. 3, n. 12, p. 777-789, 2008. ISSN 1554-8929.

BALOSSO, S. et al. Molecular and functional interactions between tumor necrosis factor-alpha receptors and the glutamatergic system in the mouse hippocampus: implications for seizure susceptibility. **Neuroscience**, v. 161, n. 1, p. 293-300, 2009. ISSN 0306-4522.

BARONE, P. et al. Dopamine D1 and D2 receptors mediate opposite functions in seizures induced by lithium-pilocarpine. **European journal of pharmacology**, v. 195, n. 1, p. 157-162, 1991. ISSN 0014-2999.

BATTAGLIA, G. et al. Alpha-1B adrenergic receptor knockout mice are protected against methamphetamine toxicity. **Journal of neurochemistry**, v. 86, n. 2, p. 413-421, 2003. ISSN 1471-4159.

BENARROCH, E. E. Astrocyte-neuron interactions Implications for epilepsy. **Neurology**, v. 73, n. 16, p. 1323-1327, 2009. ISSN 0028-3878.

BERG, A. T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005–2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676-685, 2010. ISSN 1528-1167.

BERK, M. et al. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. **Neuroscience & biobehavioral reviews**, v. 35, n. 3, p. 804-817, 2011. ISSN 0149-7634.

BLANCO, M. M. et al. Neurobehavioral effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in mice. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2–3, p. 265-270, 3// 2009. ISSN 0944-7113. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711307000712> >.

BORGES, M. A. et al. Urban prevalence of epilepsy: populational study in Sao Jose do Rio Preto, a medium-sized city in Brazil. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 62, n. 2A, p. 199-204, 2004. ISSN 0004-282X.

BRODIE, M. J.; ELDER, A. T.; KWAN, P. Epilepsy in later life. **The Lancet Neurology**, v. 8, n. 11, p. 1019-1030, 2009. ISSN 1474-4422.

CALDAS, G. F. R. et al. Repeated-doses and reproductive toxicity studies of the monoterpene 1, 8-cineole (eucalyptol) in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 97, p. 297-306, 2016. ISSN 0278-6915.

CANDAN, F. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan.(Asteraceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 87, n. 2, p. 215-220, 2003. ISSN 0378-8741.

CARLINI, E.; MENDES, F. **Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental: um Guia para a Pesquisa de Drogas com Ação sobre o SNC, com Ênfase nas Plantas Medicinais**. Brasil: 2011. ISBN 978-85-61673-31-4.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289-299, 2004. ISSN 1809-4562.

CIFTCI, O. et al. Antioxidative effects of curcumin, beta-myrcene and 1,8-cineole against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver. **Toxicol Ind Health**, v. 27, n. 5, p. 447-53, Jun 2011. ISSN 1477-0393 (Electronic)

0748-2337 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21245202> >.

CIFTCI, O. et al. Antioxidative effects of curcumin, β -myrcene and 1, 8-cineole against 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver. **Toxicology and Industrial Health**, v. 27, n. 5, p. 447-453, 2011. ISSN 0748-2337.

COSTA, A. M. N. **Estudo do efeito neuroprotetor da N-Acetilcisteína em ratas periadolescentes submetidas a convulsão pelo abrasamento induzido por nicotina**. 2014.

COUTURIER, J. et al. Prevention of the β -amyloid peptide-induced inflammatory process by inhibition of double-stranded RNA-dependent protein kinase in primary murine mixed co-cultures. **Journal of neuroinflammation**, v. 8, n. 1, p. 72, 2011. ISSN 1742-2094.

CRESPEL, A. et al. Inflammatory reactions in human medial temporal lobe epilepsy with hippocampal sclerosis. **Brain Research**, v. 952, n. 2, p. 159-169, 10/18/ 2002. ISSN 0006-8993. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899302030500> >.

DE FREITAS, R. M. et al. Modifications in muscarinic, dopaminergic and serotonergic receptors concentrations in the hippocampus and striatum of epileptic rats. **Life sciences**, v. 78, n. 3, p. 253-258, 2005. ISSN 0024-3205.

DORANDEU, F. et al. Efficacy of the ketamine-atropine combination in the delayed treatment of soman-induced status epilepticus. **Brain research**, v. 1051, n. 1, p. 164-175, 2005. ISSN 0006-8993.

FERREIRA-DA-SILVA, F. W. et al. Effects of 1,8-cineole on electrophysiological parameters of neurons of the rat superior cervical ganglion. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 36, n. 11, p. 1068-73, Nov 2009. ISSN 1440-1681 (Electronic)

0305-1870 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19413602> >.

FERRERO, A. J. et al. Chronic treatment with fluoxetine decreases seizure threshold in naive but not in rats exposed to the learned helplessness paradigm: correlation with the hippocampal glutamate release. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 29, n. 5, p. 678-686, 2005. ISSN 0278-5846.

FIORE, R.; SCHRATT, G. MicroRNAs in vertebrate synapse development. **The Scientific World Journal**, v. 7, p. 167-177, 2007.

FISHER, R. S. et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475-482, 2014. ISSN 1528-1167.

FISHER, R. S. 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, n. 4, p. 522-530, 2017. ISSN 1528-1167.

FLOYD, R. A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. **The FASEB journal**, v. 4, n. 9, p. 2587-2597, 1990. ISSN 0892-6638.

FREITAS, R. Neurotransmitter Systems Involved in Epilepsy Model: A Literature Review. **Endereço para correspondência: Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas Centro de Ciências da Saúde Campus Ministro Petrônio Portela CEP**, p. 64049-550, 2011.

FREITAS, R. et al. Acetylcholinesterase activities in hippocampus, frontal cortex and striatum of Wistar rats after pilocarpine-induced status epilepticus. **Neuroscience letters**, v. 399, n. 1, p. 76-78, 2006a. ISSN 0304-3940.

_____. Effect of gabaergic, glutamatergic, antipsychotic and antidepressant drugs on pilocarpine-induced seizures and status epilepticus. **Neuroscience letters**, v. 408, n. 2, p. 79-83, 2006b. ISSN 0304-3940.

GUIX, F. et al. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress in neurobiology**, v. 76, n. 2, p. 126-152, 2005. ISSN 0301-0082.

HIRSCH, E. et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy. 2016.

HORN, T. F. et al. Nitric oxide promotes intracellular calcium release from mitochondria in striatal neurons. **The FASEB journal**, v. 16, n. 12, p. 1611-1622, 2002. ISSN 0892-6638.

HRNČIĆ, D. et al. Gaseous neurotransmitter nitric oxide: Its role in experimental models of epilepsy. **Archives of Biological Sciences**, v. 64, n. 3, p. 1207-1216, 2012.

HRNČIĆ, D. et al. The role of nitric oxide in convulsions induced by lindane in rats. **Food and chemical toxicology**, v. 49, n. 4, p. 947-954, 2011. ISSN 0278-6915.

HUBER, D. P.; GRIENER, R.; TRINKA, E. Antiepileptic drug use in Austrian nursing home residents. **Seizure**, v. 22, n. 1, p. 24-27, 2013. ISSN 1059-1311.

HUNT, R. F. et al. GABA progenitors grafted into the adult epileptic brain control seizures and abnormal behavior. **Nature neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 692, 2013.

ITOH, K.; WATANABE, M. Paradoxical facilitation of pentylenetetrazole-induced convulsion susceptibility in mice lacking neuronal nitric oxide synthase. **Neuroscience**, v. 159, n. 2, p. 735-743, 2009. ISSN 0306-4522.

KANEKO, K. et al. Consequences of nitric oxide generation in epileptic-seizure rodent models as studied by in vivo EPR. **Magnetic resonance in medicine**, v. 48, n. 6, p. 1051-1056, 2002. ISSN 1522-2594.

KANG, T. C. et al. Anticonvulsant characteristics of pyridoxyl-gamma-aminobutyrate, PL-GABA. **Neuropharmacology**, v. 54, n. 6, p. 954-64, May 2008. ISSN 0028-3908 (Print) 0028-3908 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18346762> >.

KAUL, S.; FAIMAN, M. D.; LUNTE, C. E. Determination of GABA, glutamate, dopamine and carbamathione in brain microdialysis samples by micellar electrokinetic chromatography and laser-induced fluorescence (MEKC-LIF). **Analytical Methods**, v. 3, n. 7, p. 1514, 2011. ISSN 1759-9660
1759-9679.

KAUR, H.; KUMAR, B.; MEDHI, B. Antiepileptic drugs in development pipeline: A recent update. **eNeurologicalSci**, v. 4, p. 42-51, 2016. ISSN 2405-6502.

KHAN, A. et al. 1,8-cineole (eucalyptol) mitigates inflammation in amyloid Beta toxicated PC12 cells: relevance to Alzheimer's disease. **Neurochem Res**, v. 39, n. 2, p. 344-52, Feb 2014. ISSN 1573-6903 (Electronic) 0364-3190 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24379109> >.

KONG, Q. et al. Increased glial glutamate transporter EAAT2 expression reduces epileptogenic processes following pilocarpine-induced status epilepticus. **Neurobiology of disease**, v. 47, n. 2, p. 145-154, 2012. ISSN 0969-9961.

KOUTROUMANIDOU, E. et al. Increased seizure latency and decreased severity of pentylenetetrazol-induced seizures in mice after essential oil administration. **Epilepsy research and treatment**, v. 2013, 2013. ISSN 2090-1348.

KUNIEDA, T. et al. Systemic Overexpression of the α 1B-Adrenergic Receptor in Mice: An Animal Model of Epilepsy. **Epilepsia**, v. 43, n. 11, p. 1324-1329, 2002. ISSN 1528-1167.

LEHTIMÄKI, K. et al. Increased plasma levels of cytokines after seizures in localization-related epilepsy. **Acta Neurologica Scandinavica**, v. 116, n. 4, p. 226-230, 2007. ISSN 1600-0404.

LIMA-ACCIOLY, P. M. et al. Essential oil of croton nepetaefolius and its main constituent, 1,8-cineole, block excitability of rat sciatic nerve in vitro. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 33, n. 12, p. 1158-63, Dec 2006. ISSN 0305-1870 (Print)

0305-1870 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17184495> >.

LINEHAN, C. et al. Future directions for epidemiology in epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 22, n. 1, p. 112-117, 2011. ISSN 1525-5050.

LÖSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, n. 5, p. 359-368, 2011. ISSN 1059-1311.

LOWSON, S.; GENT, J.; GOODCHILD, C. Anticonvulsant properties of propofol and thiopentone: comparison using two tests in laboratory mice. **British journal of anaesthesia**, v. 64, n. 1, p. 59-63, 1990. ISSN 0007-0912.

MARCOLI, M. et al. Nitric oxide-evoked glutamate release and cGMP production in cerebellar slices: Control by presynaptic 5-HT 1D receptors. **Neurochemistry international**, v. 49, n. 1, p. 12-19, 2006. ISSN 0197-0186.

MASOUMI-ARDAKANI, Y. et al. Chemical Composition, Anticonvulsant Activity, and Toxicity of Essential Oil and Methanolic Extract of *Elettaria cardamomum*. **Planta Medica**, v. 82, n. 17, p. 1482-1486, 2016. ISSN 0032-0943.

MCCORMICK, D. A.; CONTRERAS, D. On the cellular and network bases of epileptic seizures. **Annual review of physiology**, v. 63, n. 1, p. 815-846, 2001. ISSN 0066-4278.

MONFORTE, M. T. et al. Chemical Composition and Biological Activities of *Calamintha officinalis* Moench Essential Oil. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 3, p. 297-303, 2011/03/01 2010. ISSN 1096-620X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1089/jmf.2009.0191> >. Acesso em: 2016/08/30.

NDIMUBANZI, P. C. et al. A systematic review of the frequency of neurocytotoxicosis with a focus on people with epilepsy. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 11, p. e870, 2010. ISSN 1935-2735.

NEWTON, C. R.; GARCIA, H. H. Epilepsy in poor regions of the world. **The Lancet**, v. 380, n. 9848, p. 1193-1201, 2012. ISSN 0140-6736.

NGUGI, A. K. et al. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. **Epilepsia**, v. 51, n. 5, p. 883-890, 2010. ISSN 1528-1167.

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

OBAY, B. D. et al. Dose dependent effects of ghrelin on pentylentetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model. **Peptides**, v. 29, n. 3, p. 448-455, 2008. ISSN 0196-9781.

OLIVEIRA, A. et al. Evaluation of levetiracetam effects on pilocarpine-induced seizures: Cholinergic muscarinic system involvement. **Neuroscience letters**, v. 385, n. 3, p. 184-188, 2005. ISSN 0304-3940.

OZSOY, S.; AYDIN, D.; EKICI, F. Effects of modafinil on pentylentetrazol-induced convulsive epilepsy. **Bratislavske lekarske listy**, v. 116, n. 3, p. 162-166, 2014. ISSN 0006-9248.

PASSOS, C. D. S. et al. Terpenóides com atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC). **Revista brasileira de farmacognosia**. Vol. 19, n. 1A (Jan./Mar. 2009), p. 140-149, 2009. ISSN 0102-695X.

PIZZANELLI, C. et al. Lack of $\alpha 1b$ -adrenergic receptor protects against epileptic seizures. **Epilepsia**, v. 50, n. s1, p. 59-64, 2009. ISSN 1528-1167.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. **Electroencephalography and clinical neurophysiology**, v. 32, n. 3, p. 281-294, 1972. ISSN 0013-4694.

RAVIZZA, T. et al. Innate and adaptive immunity during epileptogenesis and spontaneous seizures: Evidence from experimental models and human temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of Disease**, v. 29, n. 1, p. 142-160, 1// 2008. ISSN 0969-9961. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0969996107001933> >.

REALDON, E. Modern classification of the terpenoids. **Bollettino chimico farmaceutico**, v. 99, p. 52, 1960. ISSN 0006-6648.

RESCHKE, C. R. et al. Potent anti-seizure effects of locked nucleic acid antagomirs targeting miR-134 in multiple mouse and rat models of epilepsy. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, v. 6, p. 45-56, 2017. ISSN 2162-2531.

REYNOLDS, E. Todd, Hughlings Jackson, and the electrical basis of epilepsy. **The Lancet**, v. 358, n. 9281, p. 575-577, 2001. ISSN 0140-6736.

ROBELLO, M. et al. NITRIC OXIDE AND GABA A RECEPTOR FUNCTION THE RAT CEREBRAL CORTEX AND CEREBELLAR GRANULE CELLS. **Neuroscience**, v. 74, n. 1, p. 99-105, 1996. ISSN 0306-4522.

SAMPAIO, L. P. et al. Prevalence of epilepsy in children from a Brazilian area of high deprivation. **Pediatric neurology**, v. 42, n. 2, p. 111-117, 2010. ISSN 0887-8994.

SANTOS, F.; RAO, V. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1, 8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. **Phytotherapy research**, v. 14, n. 4, p. 240-244, 2000. ISSN 0951-418X.

SCHMIDT, D.; SCHACHTER, S. C. Drug treatment of epilepsy in adults. **Bmj**, v. 348, n. 254, p. 130-136, 2014.

SHOUSE, M. N. et al. Monoamines and seizures: microdialysis findings in locus ceruleus and amygdala before and during amygdala kindling. **Brain research**, v. 892, n. 1, p. 176-192, 2001. ISSN 0006-8993.

SILLANPÄÄ, M.; SCHMIDT, D. Long-term outcome of medically treated epilepsy. **Seizure**, v. 44, p. 211-216, 2017. ISSN 1059-1311.

SINGH, A.; TREVICK, S. The Epidemiology of Global Epilepsy. **Neurologic Clinics**, v. 34, n. 4, p. 837-847, 2016. ISSN 0733-8619.

SMITH, M.; WILCOX, K. S.; WHITE, H. S. Discovery of antiepileptic drugs. **Neurotherapeutics**, v. 4, n. 1, p. 12-17, 2007. ISSN 1933-7213.

SZYNDLER, J. et al. Effects of pentylentetrazol-induced kindling of seizures on rat emotional behavior and brain monoaminergic systems. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 73, n. 4, p. 851-861, 2002. ISSN 0091-3057.

TAKAISHI, M. et al. 1, 8-cineole, a TRPM8 agonist, is a novel natural antagonist of human TRPA1. **Molecular pain**, v. 8, n. 1, p. 1, 2012. ISSN 1744-8069.

ÜNVER, O. et al. The Epidemiology of epilepsy in children: a report from a Turkish pediatric neurology clinic. **Journal of child neurology**, v. 30, n. 6, p. 698-702, 2015. ISSN 0883-0738.

VENTURA, A. L. et al. Sistema colinérgico: revisitando receptores, regulação e a relação com a doença de Alzheimer, esquizofrenia, epilepsia e tabagismo:[revisão]. **Arch. clin. psychiatry (São Paulo, Impr.)**, v. 37, n. 2, p. 66-72, 2010. ISSN 0101-6083.

VERELLEN, R. M.; CAVAZOS, J. E. Pathophysiological considerations of seizures, epilepsy, and status epilepticus in the elderly. **Aging and disease**, v. 2, n. 4, p. 278-285, 2014. ISSN 2152-5250.

VIVIANI, B. et al. Interleukin-1 β enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. **Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 25, p. 8692-8700, 2003. ISSN 0270-6474.

VUČEVIĆ, D. et al. Correlation between electrocorticographic and motor phenomena in lindane-induced experimental epilepsy in rats This article is one of a selection of papers published in the special issue Bridging the Gap: Where Progress in Cardiovascular and Neurophysiologic Research Meet. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 86, n. 4, p. 173-179, 2008. ISSN 0008-4212.

XU, J. et al. Acute and subacute toxicity study of 1, 8-cineole in mice. **Int. J. Clin. Exp. Pathol**, v. 7, p. 1495-1501, 2014.

YAN, Q.-S.; JOBE, P. C.; DAILEY, J. W. Evidence that a serotonergic mechanism is involved in the anticonvulsant effect of fluoxetine in genetically epilepsy-prone rats. **European journal of pharmacology**, v. 252, n. 1, p. 105-112, 1994. ISSN 0014-2999.

ZERAATPISHEH, Z.; VATANPARAST, J. Eucalyptol induces hyperexcitability and epileptiform activity in snail neurons by inhibiting potassium channels. **Eur J Pharmacol**, v. 764, p. 70-8, Oct 5 2015. ISSN 1879-0712 (Electronic)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26134504> >.

ZUSCIK, M. J. et al. Overexpression of the α 1B-adrenergic receptor causes apoptotic neurodegeneration: multiple system atrophy. **Nature medicine**, v. 6, n. 12, p. 1388-1394, 2000.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)**



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **“AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO TERPENO 1,8-CINEOL SOBRE PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS DE ESTRESSE OXIDATIVO E INFLAMAÇÃO EM ANIMAIS SUBMETIDOS À CONVULSÃO INDUZIDA POR PENTILENOTETRAZOL”**, protocolo nº **173/2015** sob a responsabilidade do pesquisador **Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe** – que envolve a produção, manutenção e/ou a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA-UFPB).

Vigência do Projeto	2016 – 2017
Espécie/linhagem	<i>Mus musculus -Swiss</i>
Número de animais	84
Idade/Peso	25 g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Thomas George - UFPB

Prof. Dr. Ricardo Romão Guerra
CEUA-UFPB