



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA - *CAMPUS* SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

LUCAS DIOGO ROSA

**ESTUDO COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICO DO β -CARIOFILENO NO
MODELO DE EPILEPITOGÊNESE INDUZIDA POR PILOCARPINA EM
CAMUNDONGOS**

SOBRAL
2020

LUCAS DIOGO ROSA

ESTUDO COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICO DO β -CARIOFILENO NO
MODELO DE EPILEPITOGÊNESE INDUZIDA POR PILOCARPINA EM
CAMUNDONGOS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Neurociências

Orientadora: Prof. Dra. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo

SOBRAL

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R695e Rosa, Lucas Diogo.
ESTUDO COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICO DO BETA-CARIOFILENO NO MODELO
DE EPILEPTOGÊNESE INDUZIDA POR PILOCARPINA EM CAMUNDONGOS / Lucas Diogo Rosa.
– 2020.
62 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia, Sobral, 2020.

Orientação: Profa. Dra. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo.

1. Epilepsia. 2. Pilocarpina. 3. Beta-cariofileno. 4. Neuroproteção. I. Título.

CDD 660.6

LUCAS DIOGO ROSA

ESTUDO COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICO DO β -CARIOFILENO NO
MODELO DE EPILEPITOGÊNESE INDUZIDA POR PILOCARPINA EM
CAMUNDONGOS

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Neurociências

Orientadora: Prof. Dra. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo

Aprovado em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Dra. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo
Universidade Federal do Ceará – UFC (Orientadora)

Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
Universidade Federal do Ceará – UFC (Membro interno)

Dra. Maria Gleiciane de Queiroz Martins
Centro Universitário INTA – UNINTA (Membro externo)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com meus objetivos, sempre de cabeça erguida sem desanimar com as dificuldades e sempre me fortalecer com cada etapa vencida.

À minha mãe, Eurides Diogo e minha avó Florentina Alves (*in memoriam*) pela educação e todos os bons modos ensinados na minha vida, por toda motivação e incentivo ao estudo, mesmo não tendo elas a mesma oportunidade no passado.

Aos meus irmãos Lara Diogo e Elias Júnior pelas palavras de apoio e encorajamento nos dias difíceis.

À professora Dra. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo, por toda orientação e aprendizado, seu apoio e dedicação foi fundamental no desenvolvimento desta pesquisa, gratidão por todos os momentos compartilhados durante os dois anos de mestrado.

À professora Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar, por todas as palavras de incentivo e paciência frente à introdução desse novo modelo no laboratório além da atenção e esclarecimentos das dúvidas que surgiram no decorrer da pesquisa.

À professora Dra. Maria Isabel Linhares pela contribuição com seus ensinamentos frente ao modelo da pesquisa, sempre esclarecendo dúvidas sobre as técnicas de indução da epilepsia.

À pós-doutoranda Cleane Moreira, que teve grande contribuição no desenvolvimento dos protocolos de pesquisa e sempre esteve presente no acompanhamento dos experimentos, além de sempre estar à disposição para às dúvidas mesmo nos momentos extra Universidade.

Aos colegas de Mestrado, Valéria, Erlândia, Efigênia, Sandro, Hayde, Francisco, Renan, por todos os momentos de alegria e dificuldades compartilhadas no decorrer das disciplinas, a cumplicidade de vocês deixaram os dias mais leves e felizes.

A todos os alunos de Iniciação Científica do Laboratório de Fisiologia e Neurociência pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos, mesmo com o tempo corrido sempre estiveram empenhados na pesquisa, sem vocês teria sido bem mais árdua a caminhada.

Aos meus amigos Farmacêuticos Jorgiane Macêdo, Janaína Gomes, Alana Duarte, Jailda Chaves e Mylla Christye que compartilharam os momentos de angústias e alegrias sempre apoiando para seguir em frente mesmo com as dificuldades do cotidiano.

A professora Gleiciane Queiroz por todo incentivo no mundo da pesquisa científica, sua experiência, apoio e acolhida somaram para construção desse trabalho.

Ao técnico do Laboratório de Fisiologia e hoje amigo, Francisco Gomes, por toda paciência no desenvolvimento de todas as técnicas envolvendo os animais, desde os comportamentos as dissecações. Sua ajuda foi fundamental.

Ao técnico de Laboratório do Centro Universitário INTA, Mateus Gomes que sempre esteve de portas abertas para realização das leituras dos testes neuroquímicos no laboratório de pesquisa NUBEM.

A equipe do Biotério da Universidade Federal do Ceará Campus- Sobral, por sempre dispor de animais em tempo hábil para o desenvolvimento dos experimentos.

À Universidade Federal do Ceará Sobral pela Infraestrutura e por todo conhecimento compartilhado ao longo desses dois anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal e Nível Superior (CAPES) pelo fomento da pesquisa e bolsa de estudo.

“Viver um dia de cada vez, sem pressa, sem atropelar os outros, mas sempre valorizando o tempo e as pequenas coisas”.

Cris Westphal

RESUMO

A epilepsia é uma desordem neurológica de ampla distribuição no mundo que afeta diversos grupos etários e prejudica a qualidade de vida dos indivíduos. As terapias disponíveis, em alguns casos, não apresentam resposta terapêutica satisfatória ou apresentam muitos efeitos colaterais. Desta forma, o desenvolvimento de novos agentes antiepiléticos capazes de modificar a patogênese da epilepsia ainda são urgentemente necessários. Atualmente, pesquisas apontam como alternativas medicamentosas, drogas de origem vegetal por possuírem baixos efeitos colaterais e eficácia comprovada. Neste contexto, o composto beta-cariofileno vem a ser uma alternativa plausível para estudos, podendo este composto ser uma futura alternativa para tratamento de crises epiléticas, já que muitas propriedades biológicas já foram descritas usando este composto em diversos modelos experimentais. Sendo assim, o objetivo do estudo foi avaliar o efeito do beta-cariofileno (BCF) em modelo de epileptogênese induzida por pilocarpina em camundongos. Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará, *Campus Sobral* e aprovado sob número de protocolo 08/2018. Camundongos *Swiss* machos, jovens, com peso entre (20-25g), foram divididos em dois grupos, a saber: epiléticos (GE) e não epiléticos (GNE). O GE foi submetido ao protocolo de indução da epileptogênese por pilocarpina. Para este grupo, os animais foram previamente tratados com metilescopolamina (1mg/kg, i.p), e, em seguida, receberam pilocarpina em doses fracionadas de 100 mg/kg, i.p, não ultrapassando quatro administrações (400mg/kg) com intervalos de 20 minutos, para a indução do *status epilepticus* (SE). Após 2 horas da última administração de pilocarpina o SE foi abortado pela administração de diazepam (10mg/kg, i.p). O GNE seguiu o mesmo protocolo, porém a pilocarpina foi substituída por solução salina (NaCl 0,9%), configurando ausência do SE. Após 24 horas, os dois grupos iniciaram tratamento com BCF nas concentrações de (50 mg/kg ou 100mg/kg, v.o) ou salina 0,9% durante 14 dias. Nos 12º, 13º e 14º dias de tratamento foram realizados os testes comportamentais (campo aberto, reconhecimento de objetos e rotarod). Ao final dos testes, no décimo quarto dia de tratamento e após 60 minutos da última administração de BCF, os animais foram eutanasiados e as áreas cerebrais hipocampo (HC), córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CPE) foram dissecadas para os ensaios neuroquímicos a fim de investigar a peroxidação lipídica (TBARS), níveis de glutatona reduzida (GSH) e nitrito/nitrato. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguido por teste de comparações múltiplas de Tukey. O nível de significância de 95% ($p < 0,05$) foi aplicado para todos os testes estatísticos. No teste de rotarod, as concentrações BCF 50 mg/kg e 100 mg/kg do GNE aumentaram o tempo de latência de queda (850% e 1073%, respectivamente) comparado com os grupos salina. Em relação ao número de quedas, 100 mg/kg de β CF em GNE diminuiu 73,36% comparado a salina. Em GE, 50 e 100 mg/kg de β CF reduziram o número de quedas em 64,78% e 56,45%, respectivamente. Em relação ao tempo total de permanência, os animais do GE tratados com BCF 50 e 100 mg/kg apresentaram maior tempo na haste (26,24% e 28,99%, respectivamente) comparado com grupo salina. Quanto às análises neuroquímicas, GSH aumentou significativamente em GE na dose 100mg/kg em HC (11,9%) em relação ao grupo salina. Em GNE, houve aumento na dose de 50 mg/kg no HC (83,72%) ao comparar com salina. As análises dos níveis de nitrito e nitrato, somente a dose de 50 mg/kg em corpo estriado do grupo experimental GE apresentou diferença estatística, aumentando 162% em relação ao grupo salina GE. Em relação à peroxidação lipídica somente houve diferença significativa em relação ao grupo experimental GNE, onde nas duas doses testadas (50 mg/kg e 100 mg/kg) apresentaram diminuição significativa no HC (36,2% e 29,73%, respectivamente) e CPF (30,42% e 21,26%, respectivamente). Desta forma, é possível observar que o BCF melhora a condição motora e diminui o estresse oxidativo dos animais que foram submetidos ao SE nas concentrações testadas, sendo capaz de reduzir o número de quedas, aumentado à latência de queda e tempo de permanência no rotarod além de aumentar os níveis de GSH e diminuir os níveis de TBARS, mostrando possível atividade neuroprotetora.

Palavras-chave: Epilepsia. Pilocarpina. Beta-cariofileno. Neuroproteção.

ABSTRACT

Epilepsy is a neurological disorder of wide distribution in the world that affects different age groups and affects the quality of life of individuals. The available therapies, in some cases, do not have a satisfactory therapeutic response or have many side effects. Thus, the development of new antiepileptic agents capable of modifying the pathogenesis of epilepsy is still urgently needed. Currently, research points out that alternative medicinal drugs are of vegetable origin because they have low side effects and proven efficacy. In this context, the beta-karyophyllene compound is a plausible alternative for studies, and this compound may be a future alternative for the treatment of epileptic seizures, since many biological properties have already been described using this compound in several experimental models. Thus, the objective of the study was to evaluate the effect of beta-karyophyllene (BCF) in a model of epileptogenesis induced by pilocarpine in mice. This study was submitted to the Animal Use Ethics Committee of the Federal University of Ceará, Campus Sobral and accepted under protocol number 08/2018. Swiss male mice, young, weighing (20-25g), were divided into two groups, namely: epileptic (GE) and non-epileptic (GNE). The EG was submitted to the pilocarpine epileptogenesis induction protocol. For this group, the animals were previously treated with methyl scopolamine (1mg / kg, ip), and then received pilocarpine in fractionated doses of 100 mg / kg, ip, not exceeding four administrations (400mg / kg) at intervals of 20 minutes, for the induction of status epilepticus (SE) 2 hours after the last administration of pilocarpine, the SE was aborted by the administration of diazepam (10mg / kg, ip). The GNE followed the same protocol, but pilocarpine was replaced by saline (NaCl 0.9%), configuring the absence of SE. After 24 hours, the two groups started treatment with BCF at concentrations of (50 mg / kg or 100 mg / kg, v.o) or 0.9% saline for 14 days. On the 12th, 13th and 14th days of treatment, behavioral tests (open field, object recognition and rotarod) were performed. At the end of the tests, on the fourteenth day of treatment and 60 minutes after the last administration of BCF, the animals were euthanized and the brain areas of the hippocampus (HC), prefrontal cortex (CPF) and striatum (CPE) were dissected for neurochemical tests to investigate lipid peroxidation (TBARS), reduced glutathione (GSH) and nitrite / nitrate levels. The results were analyzed by analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison test. The 95% significance level ($p < 0.05$) was applied to all statistical tests. In the rotarod test, BCF 50 mg / kg and 100 mg / kg GNE concentrations increased the fall latency time (850% and 1073%, respectively) compared with the saline groups, in relation to the number of falls, 100 mg / kg of β CF in GNE decreased 73.36% compared to saline. In GE, 50 and 100 mg / kg of β CF reduced the number of falls by 64.78% and 56.45%, respectively. In relation to the total length of stay, the GE animals treated with BCF 50 and 100 mg / kg showed longer time on the nail (26.24% and 28.99%, respectively) compared to the saline group. As for neurochemical analyzes, GSH increased significantly in EG at the dose of 100mg / kg in HC (11.9%) in relation to the saline group. In GNE, there was an increase in the dose of 50 mg / kg in HC (83.72%) when compared to saline. The analysis of nitrite and nitrate levels, only the dose of 50 mg / kg in striatum of the experimental group GE showed a statistical difference, increasing 162% in relation to the saline group GE. Regarding lipid peroxidation, there was only a significant difference in relation to the experimental group GNE, where in the two doses tested (50 mg / kg and 100 mg / kg), there was a significant decrease in HC (36.2% and 29.73%, respectively) and CPF (30.42% and 21.26%, respectively). Thus, it is possible to observe that the BCF improves the motor condition and decreases the oxidative stress of the animals that were submitted to the SE in the tested concentrations, being able to reduce the number of falls, increasing the fall latency and time of stay in the rotarod in addition to increase GSH levels and decrease TBARS levels, showing possible neuroprotective activity.

Keywords: Epilepsy. Pilocarpine. Beta-caryophyllene. Neuroprotection.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Estrutura química molecular e tridimensional do beta-cariofileno $C_{15}H_{24}$	22
Quadro 2	Drogas e reagentes que foram utilizados durante a execução dos protocolos experimentais.	25
Quadro 3	Escala de Racine para intensidade de respostas motoras dos animais à injeção de pilocarpina.	26
Quadro 4	Delineamento experimental cronológico da realização do protocolo de tratamento do grupo epiléptico (GE) e administração repetida de beta-cariofileno durante 14 dias.	28
Quadro 5	Delineamento experimental cronológico da realização do protocolo de tratamento do grupo não epiléptico (GNE) e administração repetida de beta-cariofileno durante 14 dias.	28
Quadro 6	Representação esquemática do teste comportamental do campo aberto. Foram avaliados, durante 5 minutos, o número de cruzamentos, <i>rearing</i> , <i>grooming</i> e tempo de imobilidade de camundongos tratados com BCF (beta-cariofileno) ou Salina 0,9 %.	29
Quadro 7	Representação esquemática do teste comportamental de reconhecimento de objetos. Foram avaliados, durante 10 minutos, o tempo de exploração no objeto novo e objeto familiar de camundongos tratados com BCF (beta-cariofileno) ou Salina 0,9 %.	30
Quadro 8	Representação esquemática do teste comportamental Rotarod. Foram avaliados, durante 5 minutos, a latência para queda, tempo de permanência e número de quedas de camundongos tratados com BCF (beta-cariofileno) ou Salina 0,9 %.	31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Análise da atividade motora no Teste do Campo Aberto em camundongos não epiléticos (GNE) e epiléticos (GE) tratados por 14 dias com β -cariofileno e salina.	36
Gráfico 2 -	Análise do Teste de Reconhecimento de Objeto em camundongos não epiléticos (GNE) e epiléticos (GE) tratados por 14 dias com β -cariofileno e salina.	38
Gráfico 3 -	Análise da atividade locomotora através do teste de RotaRod em camundongos não epiléticos(GNE) e epiléticos (GE) tratados por 14 dias com β -cariofileno e salina.	40
Gráfico 4 -	Níveis de Peroxidação Lipídica nas áreas cerebrais de camundongos tratados por 14 dias com com β -cariofileno e salina.	42
Gráfico 5 -	Níveis de Nitrito (NO_2) / Nitrato (NO_3) nas áreas cerebrais de camundongos tratados por β -cariofileno e salina.	43
Gráfico 6 -	Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) nas áreas cerebrais de camundongos tratados por 14 dias com β -cariofileno e salina.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
BCF	Beta-cariofileno
CEUA	Comissão de Ética em Uso de Animais
CPE	Corpo Estriado
CPF	Córtex Pré-Frontal
DAE's	Drogas Antiepiléticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DZ	Diazepam
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GSH	Glutathiona Reduzida
HC	Hipocampo
IP	Intraperitoneal
MS	Metilescopolamina
PCR	Reação em cadeia polimerase
PILO	Pilocarpina
qPCR	PCR quantitativa em tempo real
cDNA	DNA complementar
RNA	Ácido ribonucleico
RPM	Rotações por Minuto
SE	<i>Status Epilepticus</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TBARS	Substâncias Reativas do Ácido Tiobarbitúrico
VO	Via Oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Epilepsia	15
1.2	Drogas antiepilépticas	17
1.3	Modelos de epileptogênese induzido por pilocarpina	18
1.4	Estresse oxidativo	19
<i>1.4.1</i>	<i>Escolha dos animais</i>	<i>21</i>
1.5	Beta-cariofileno	21
1.6	Justificativa e relevância	23
2	OBJETIVOS	24
2.1	Objetivo geral	24
2.2	Objetivos específicos	24
3	METODOLOGIA	25
3.1	Animais	25
3.2	Aspectos éticos	25
3.3	Obtenção e preparo das drogas	25
3.4	Protocolo de tratamento e grupos experimentais	26
<i>3.4.1</i>	<i>Protocolo de tratamento do grupo epilético</i>	<i>26</i>
<i>3.4.2</i>	<i>Protocolo de tratamento do grupo não epilético</i>	<i>28</i>
3.5	Testes comportamentais	29
<i>3.5.1</i>	<i>Teste campo aberto</i>	<i>29</i>
<i>3.5.2</i>	<i>Teste de reconhecimento de objetos</i>	<i>30</i>
<i>3.5.3</i>	<i>Teste Rotarod</i>	<i>31</i>
3.6	Dissecação das áreas cerebrais e descarte dos animais	31
3.7	Testes Neuroquímicos	32
<i>3.7.1</i>	<i>Determinação dos níveis de peroxidação lipídica TBARS</i>	<i>32</i>
<i>3.7.2</i>	<i>Determinação da Concentração de Nitrito (NO₂) / Nitrato (NO₃)</i>	<i>32</i>
<i>3.7.3</i>	<i>Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)</i>	<i>33</i>
3.8	Análise estatística	34
4	RESULTADOS	--
4.1	Avaliação comportamental	
<i>4.1.1</i>	<i>Teste do campo aberto</i>	<i>35</i>
<i>4.1.2</i>	<i>Teste de reconhecimento de objetos</i>	<i>37</i>

4.1.3	<i>Teste Rotarod</i>	39
4.2	Testes Neuroquímicos	41
4.2.1	<i>Determinação dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS)</i>	41
4.2.2	<i>Determinação da concentração de nitrito (NO₂) / nitrato (NO₃)</i>	43
4.2.3	<i>Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)</i>	44
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53
	ANEXO	62

1. INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma desordem neurológica de ampla distribuição no mundo e afeta diversos grupos etários. As crises convulsivas podem prejudicar substancialmente a qualidade de vida dos pacientes, tendo como consequência alterações no humor, déficits cognitivos, transtornos psiquiátricos e até efeitos adversos as terapias empregadas no controle de crises epiléticas (DEVINSKY et al., 2018).

Esta desordem afeta ambos os sexos e todas as idades, porém, os homens apresentam maior incidência/prevalência em comparação as mulheres, e a frequência de crises aumentam com o passar da idade (BEGHI, E. 2019). A etiologia da epilepsia é pouco conhecida entretanto, sabe-se que quaisquer insultos cerebrais, como traumático, cerebrovascular, inflamatório, tóxico ou infeccioso, além de uma infinidade de distúrbios sistêmicos podem causar o *Status Epilepticus* (NELIGAN, et al., 2010; TRINKA, et al., 2015).

Segundo a OMS (2019), pelo menos 50 milhões de pessoas ao redor do globo são afetadas pela epilepsia. Em um estudo de metanálise foi observado que a taxa de incidência de epilepsia foi de 61,4 casos em cada 100.000 pessoas/ano e em países de baixa e média renda *per capita*, esses números tendem a aumentar em relação aos países de alta renda (MEGIDO et al., 2016). Ao levar em consideração a prevalência, a taxa geral de epilepsia ao longo da vida foi de 7,60 por 1.000 habitantes, também sendo maior nos países de baixa e média renda (8,75 por 1.000) em relação aos países de alta renda (5,18 por 1.000) (FIEST et al., 2017).

A epilepsia apresenta implicações econômicas e gera um onus aos cofres públicos, sendo muitas vezes considerado um problema de saúde pública negligenciado. Embora seja um tratamento considerado de baixo custo financeiro ainda existe uma lacuna no tratamento de pessoas que sofrem com esta patologia (WHO, 2019).

Devido esta desordem afetar uma grande parcela da população, muitos estudos em modelos animais de epilepsia vêm sendo explorados na busca de novos compostos com propriedades terapêuticas. Embora já exista um grande arsenal de drogas antiepiléticas (DAE's), ainda são relatados bastantes efeitos colaterais e refratariedade associados à terapia que reduzem a qualidade de vida dos pacientes, levando a continuidade das buscas de novos fármacos com melhor resposta terapêutica (GAO et al., 2018).

Os modelos clássicos de epileptogênese têm em comum a indução elétrica ou química de um *Status Epilepticus* (SE), que persiste por várias horas. As crises convulsivas prolongadas favorecem um desequilíbrio metabólico, seguido da liberação de substâncias excitatórias, e posterior lesão de estruturas cerebrais sensíveis. Essa lesão é caracterizada pela

morte celular, rearranjo das conexões sinápticas e alterações nas propriedades das células nervosas. Após a fase latente, denominada a fase de recuperação da crise, os arranjos neuronais tornam-se epileptogênicos, tornando-os capazes de gerar crises posteriores (SILVA; CABRAL, 2008).

Desta forma, a pesquisa de propriedades terapêuticas em compostos naturais tem ganhado grande espaço nas pesquisas científicas, uma vez que esses compostos atuam de diversas formas nos sistemas biológicos. O beta-cariofileno (BCF) é um sesquiterpeno bicíclico natural distribuído em diferentes concentrações em uma vasta variedade de plantas. Estudos evidenciaram a sua presença no óleo essencial de espécies vegetais como orégano (*Origanum vulgare* L.), canela (*Cinnamomum* spp.), cravo (*Syzygium aromaticum*), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), tomilho (*Thymus serpyllum*), maconha (*Cannabis sativa*) e pimenta preta (*Piper nigrum*) (MOCKUTE; BERNOTIENE; JUDZENTIENE, 2001; FIDYT et al., 2016).

Devido sua ampla distribuição fitoquímica, esse composto vem sendo alvo de pesquisas a fim de explorar as propriedades biológicas em modelos animais. Estudos evidenciaram atividade antiinflamatória (GERTSCH et al., 2008), antinociceptiva (KATSUYAMA et al., 2013), ansiolítica e antidepressiva (BAHI et al. 2014), neuroprotetora (CHOI et al., 2013) e anticonvulsivante (LIU et al., 2015).

1.1 Epilepsia

As crises epiléticas causam efeitos graves e duradouros sobre a arquitetura do cérebro, levando a morte neuronal celular. As epilepsias podem resultar de um conjunto de mudanças bioquímicas no cérebro, que afetam a liberação e transporte dos neurotransmissores, as propriedades dos canais iônicos e dos receptores, a regulação da expressão de genes, a reorganização sináptica e a atividade dos astrócitos (PAREDES, 2008).

Apresenta como características uma mudança comportamental, tendo como causa uma excitabilidade neuronal desordenada no cérebro que prejudica a homeostasia sináptica. Um elemento essencial que gera e condiciona a atividade do sistema nervoso é o potencial de ação, desta forma sistemas de condutividade iônica envolvendo íons cloreto, sódio, potássio e cálcio estão intimamente ligados nesse processo (SENDROWSKI; SOBANIEC, 2013).

Estudos sugerem que alguns neurotransmissores podem estar envolvidos na crise epilética, como por exemplo, um desequilíbrio entre a atividade de aminoácidos excitatórios glutamatérgicos e inibitórios GABAérgicos no sistema nervoso central - SNC

(MCNAMARA, 1994; BEN-ARI et al., 2012). Outras vias como a dopaminérgica, serotoninérgica e adrenérgica podem estar associadas (MARES; KUBOVÁ, 2008).

O ácido γ -aminobutírico – GABA, é o principal neurotransmissor inibitório em estruturas cerebrais, possuem sítios de ligação em seu receptor GABA_A, para seus agonistas e antagonistas, além de sítios halostéricos para fármacos que atuam por via GABAérgica que quando ativados podem levar a despolarização neuronal (THOMAS; BERKOVIC, 2014).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central e, durante o desenvolvimento, há uma alta concentração de glutamato em regiões neurogênicas do cérebro, onde estão localizadas células progenitoras neurais, estando envolvido em processos de promoção e/ou inibição da proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação destas células. (JANSSON; AKERMAN, 2014).

Além do desequilíbrio da atividade de aminoácidos inibitório (ácido γ -aminobutírico - GABA) e excitatório (glutamato) o processo de hiperexcitação neuronal favorece o estresse oxidativo podendo estar relacionado à gênese da epilepsia. Estudos evidenciaram uma elevação da peroxidação lipídica, diminuição de enzimas antioxidantes e superprodução de espécies reativas de oxigênio, e associaram esses achados à piora da crise convulsiva e progressão da epilepsia (LIU et al., 2010; PAHUMA et al., 2013).

O estresse oxidativo induz uma variedade de danos celulares que podem levar à disfunção mitocondrial, e a acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e não só contribui para a lesão de macromoléculas, como lipídios, proteínas, mas também afeta a bioenergética, excitotoxicidade por glutamato e o ácido desoxirribonucleico (DNA), com indução de sinais apoptóticos. Estudos em animais demonstraram que tanto o SE quanto as convulsões recorrentes podem alterar o cérebro e causar estresse oxidativo, levando à apoptose. Portanto, o estresse oxidativo é um importante componente da epileptogênese (ARMENTA, 2014).

As crises epilépticas são classificadas de acordo com as manifestações clínicas apresentadas. Após o diagnóstico do tipo de crise, que pode ser focal, generalizada ou desconhecida, o próximo passo é a classificação do tipo de epilepsia, que inclui os subtipos: epilepsias focais, epilepsias generalizadas, epilepsias focais e generalizadas combinadas e também um grupo de epilepsias desconhecidas. O terceiro nível é o das síndromes epilépticas no qual um diagnóstico sindrômico específico pode ser feito. A nova classificação incorpora a etiologia em cada um destes estágios, enfatizando a necessidade de considerar a etiologia em cada um dos passos diagnósticos, uma vez que ela frequentemente carrega implicações terapêuticas significantes (FISHER, et al., 2017).

Sua origem pode ser focal, quando a atividade neuronal anormal surge em áreas cerebrais localizadas e se dissemina por mais regiões localizadas no mesmo hemisfério cerebral, ou de origem generalizada que possui ampla distribuição para todos os hemisférios cerebrais (DEVINSKY et al., 2018).

Estudos apontam que cerca de 80% dos 50 milhões de pessoas no mundo que têm epilepsia vivem em baixa e média renda. Na Índia, um país com condições de saúde precárias, estima-se que de 6-10 milhões de pessoas vivem com epilepsia ativa, mas menos da metade recebe tratamento adequado e suficiente (MEGIDDO et al., 2016).

No Brasil, há poucos estudos sobre prevalência da epilepsia. Um estudo populacional realizado em Porto Alegre estimou que 0,2 a 2% da população devem apresentar uma ou mais crises durante a vida (COSTA, OLIVEIRA, PANTA, 1982), outros pesquisadores encontraram uma taxa de prevalência de epilepsia ativa de 1,65% e 2,03% inativa na referida cidade (FERNANDES et al., 1992). Na cidade de São Paulo foi observada uma taxa de prevalência de epilepsia de 1,19% (MARINO, CUKIERT, PINHO, 1986).

Outro estudo realizado em três áreas de duas cidades do sudeste do Brasil, com uma população de 96.300 habitantes evidenciou que a prevalência ao longo da vida foi de 9,2 / 1.000 pessoas, já prevalência de epilepsia ativa foi de 5,4 / 1.000 pessoas. A prevalência também foi maior em idosos (8,5 / 1.000), 38% dos pacientes com epilepsia ativa tiveram tratamento inadequado e 19% sem medicação; os números foram semelhantes nos diferentes grupos socioeconômicos (NORONHA et al., 2007).

1.2 Drogas Antiepiléticas

As drogas antiepiléticas DAE's são à base do tratamento, elas agem suprimindo e controlando as crises epiléticas, porém não são capazes de reverter à neuropatologia subjacente ao processo de epileptogênese, desta forma as pessoas necessitam geralmente de um longo tratamento com DAE's. Outras alternativas terapêuticas adicionais englobam processos cirúrgicos, terapia dietética e estimulação cerebral (CHEN, et al. 2018).

De modo geral os mecanismos de ação dos fármacos utilizados no tratamento das crises epiléticas enquadram-se em três categorias. A primeira é a redução das deflagrações repetitivas e persistentes dos neurônios, um efeito mediado pela promoção do estado inativo dos canais de Na^+ ativados por voltagem, seguido do aumento da inibição sináptica mediada pelo ácido γ -aminobutírico (GABA), e um efeito mediado por ação pré-sináptica ou pós-

sináptica e inibição dos canais de Ca^+ ativados por voltagem, que são responsáveis pelas correntes de Ca^{2+} do tipo T (GOODMAN, GILMAN, 2015).

Muitas drogas já foram descobertas com essa finalidade, entretanto cerca de 30% dos pacientes não apresentam resposta terapêutica satisfatória ou apresentam efeito adverso severo aos fármacos disponíveis nas doses terapêuticas. Diante disso pesquisadores buscam descobrir novos compostos que sejam capazes de diminuir as frequências e propagação das crises epiléticas (WAHAB, 2010).

A emergência de novas drogas é necessária, uma vez que existem muitos relatos de resistência aos DAE's disponíveis na clínica. Além disso, é importante considerar parâmetros dinâmicos e cinéticos que possibilitem uma combinação sinérgica de drogas, bem como redução de efeitos colaterais que possam otimizar as terapias atualmente empregadas. Desta forma, é essencial a compreensão da eficácia no tratamento da epilepsia, os mecanismos de ação e a ocorrência de eventos adversos de novas drogas e interação medicamentosa da associação de fármacos, que desempenham um papel importante em terapia eficaz de combinação (LEE, 2014).

Nesse sentido, as pesquisas atuais estão com foco inovador no desenvolvimento de abordagens terapêuticas alternativas que sejam capazes de prevenir epileptogênese após SE e suas consequências deletérias, incluindo estresse oxidativo e agravamento de funções cognitivas. Durante a última década, muitas drogas vem sendo exploradas na perspectiva do seu uso como adjuvantes à terapia anticonvulsivante melhorando a resposta terapêutica (TCHEKALAROVA, et al., 2018).

1.3 Modelo de epileptogênese induzido por pilocarpina

O termo epileptogênese compreende o intervalo da primeira injúria ao tecido cerebral como, por exemplo, acidente vascular cerebral ou um trauma, até o desenvolvimento da primeira crise epilética (SENDROWSKI; SOBANIEC, 2013).

Os modelos clássicos de epileptogênese têm em comum a indução elétrica ou química de um *status epilepticus* - SE, que persiste por várias horas. As crises convulsivas prolongadas favorecem um desequilíbrio metabólico, seguido da liberação de substâncias excitatórias, e posterior lesão de estruturas cerebrais sensíveis. Essa lesão é caracterizada pela morte celular, rearranjo das conexões sinápticas e alterações nas propriedades das células nervosas. Após a fase latente que é denominada a fase de recuperação da crise, os arranjos neuronais tornam-se epileptogênicos, tornando-os capazes de gerar crises posteriores (SILVA; CABRAL, 2008).

A fisiopatologia do processo convulsivo é estudada em diversos modelos animais, nos quais mimetizam as alterações comportamentais, neuroquímicas e eletroencefalográficas semelhantes à epilepsia do lobo temporal em humanos. O modelo de epilepsia induzido por pilocarpina induz perda neuronal em algumas áreas cerebrais: o hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal podem estar relacionados com o mecanismo de propagação da neurotransmissão e manutenção da epileptogênese. A ativação de receptores muscarínicos, alteração na atividade de sistemas antioxidantes e a participação de sistemas de neurotransmissão dopaminérgica, noradrenérgica, serotoninérgica, GABAérgico e glutamatérgico estão envolvidos nesse modelo (FREITAS, 2011).

A pilocarpina, é um alcalóide extraído das folhas do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*), farmacologicamente é um agonista colinérgico muscarínico e quando administrado sistemicamente, atua na ativação de receptores muscarínicos do tipo M1, tendo como sinalização celular o influxo de cálcio, despolarização de membrana e disparos neuronais acompanhados de atividade pós-sináptica, sendo ausentes seus efeitos via receptores nicotínicos (KLINK; ALONSO, 1997; SANABRIA; CAVALHEIRO, 2000; GUARNIERE, 2013).

Quando administrado em doses acima de 300 mg/Kg (única ou fragmentada), é capaz de induzir SE, culminando com lesões encefálicas específicas e movimentos estereotipados convulsivos. As crises convulsivas motoras e límbicas iniciam-se cerca de 20 minutos após a administração e os animais evoluem para um estado de crises contínuas (clônicas), que caracterizam o estado epilético (SANABRIA; CAVALHEIRO, 2000). O animal que sobrevive ao quadro agudo passa por um período latente, livre de crises comportamentais que tem duração média de 14 dias, que termina no momento em que o animal manifesta a primeira crise espontânea que persiste por toda a vida (LEITE *et al.*, 1990).

1.4 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes resultantes do metabolismo do oxigênio e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante do organismo (BARBOSA, 2010). A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), principais substâncias pró-oxidantes, se dá por meio da reação de elétrons livres com o oxigênio molecular. As EROs são capazes de reagir com DNA, proteínas e lipídeos, resultando em perturbação do funcionamento celular normal e, conseqüentemente, dano e morte celular. A peroxidação lipídica decorrente desse processo causa alterações estruturais

na membrana celular, afetando sua permeabilidade e funcionalidade em relação às proteínas (GROSSO, 2014).

O cérebro é um órgão particularmente susceptível ao estresse oxidativo, visto que é responsável pelo consumo de 20% de todo o oxigênio advindo da respiração, fato justificado pela sua alta atividade metabólica e demanda energética. Além disso, o sistema nervoso central é repleto de ácidos graxos insaturados e é rico em ferro, o que resulta em um ambiente molecular propício à peroxidação lipídica. Logo, o controle estrito dos níveis de EROs no sistema nervoso central é essencial para a manutenção do funcionamento normal dos neurônios e células gliais (GROSSO, 2014).

O papel do estresse oxidativo na fisiopatogênese e nas repercussões neurológicas da epilepsia tem recebido grande atenção da comunidade científica nos últimos anos. Numerosos estudos fornecem forte evidência de que o estado prolongado de excitação neuronal causado pelas crises epiléticas resulta em uma produção elevada de EROs, o que seria um importante fator contribuinte para o dano neuronal causado pelas convulsões a curto e longo prazo, além do aumento da suscetibilidade a futuras crises (ASHRAFI et al, 2007).

As hipóteses que correlacionam o estresse oxidativo e a epilepsia têm se confirmado em estudos experimentais humanos e animais (GROSSO, 2014). Em modelos animais, um aumento na peroxidação lipídica foi encontrado em diversas áreas cerebrais de ratos induzidos à epilepsia (CANDELARIO-JALIL et al, 2000). Estudos em animais transgênicos corroboram com a hipótese de que os radicais livres são fatores importantes no processo de epileptogênese, visto que ratos transgênicos que expressam mais superóxido dismutase (enzima que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio) do que um rato normal apresentam resistência à indução de epilepsia por estados neurodegenerativos epileptogênicos (PATEL et al, 2004). Já em estudos clínicos, não obstante as dificuldades de dosar marcadores de estresse oxidativo no sistema nervoso central in vivo, há evidências semelhantes, como o pior prognóstico de pacientes com níveis altos de marcadores de estresse oxidativo no sangue e no líquido cefalorraquidiano (AKARSU et al, 2007) e aumento de nitrito e nitrato no líquido cefalorraquidiano de pacientes com Síndrome de West, uma síndrome epilética típica (VANHATALO et al, 2000).

1.4.1 Escolha dos animais

Cada espécie tem semelhanças e diferenças particulares dos seres humanos que influenciam na escolha do modelo animal mais adequado, assim deve-se ter em mente que é de essência comparativa, uma vez que pode revelar aspectos clinicamente relevantes em seres humanos (BRIAN; BARABAN, 2015).

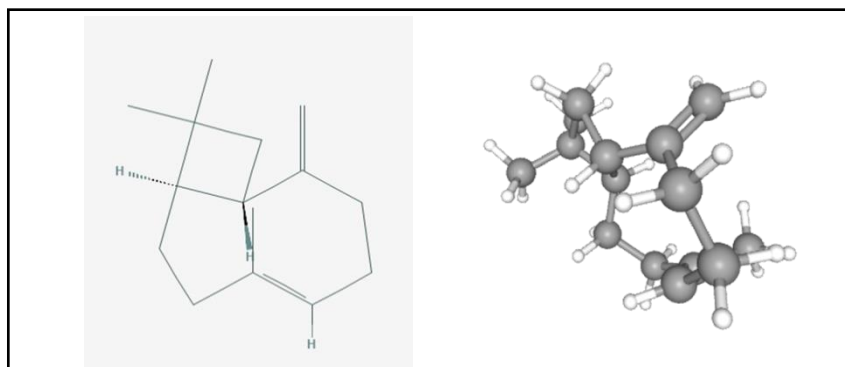
Os murinos são espécies importantes para a investigação da epilepsia, devido seu desenvolvimento neurológico amplo. A ascendência do uso de camundongos esta ligada ao seu pequeno tamanho, docilidade e reprodução rápida em cativeiro (PITANEN; SCHWARTZKROIN; MOSHE, 2005). Diante da maior prevalência de crises epiléticas no gênero masculino, optou-se pelo uso de camundongos machos na pesquisa (MEGIDO, et al. 2016).

A escolha de camundongos jovens justifica-se pela diferença do grau e função da neurogênese adulta, sendo um fator crítico no processo epileptogênico devido à injúria prolongada causada na região subventricular do hipocampo. Desta forma é de importância clínica interromper esses danos de forma precoce, após confirmação da indução do processo epilético. (PARENT, et al. 1997; SNYDER, et al. 2009).

É sabido que a administração de pilocarpina mimetiza de forma semelhante episódios do estado epilético em camundongos, e com o tempo os animais apresentam manifestações comportamentais claras e de fácil reprodução sendo considerado adequado para estudar mecanismos e biomarcadores da epileptogênese ou validação de novas descobertas de drogas com propriedades antiepiléticas (LOSCHER, 2011).

1.5 Beta-cariofileno

O beta-cariofileno (Quadro 01) é um sesqui-terpeno bicíclico natural distribuído em diferentes concentrações em uma vasta variedade de plantas, estudos evidenciaram a sua presença no óleo essencial de espécies vegetais como orégano (*Origanum vulgare* L.), canela (*Cinnamomum* spp.), cravo (*Syzygium aromaticum*), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), tomilho (*Thymus serpyllum*), maconha (*Cannabis sativa*) (FIDYT et al., 2016).

Quadro 01- Estrutura química molecular e tridimensional do beta-cariofileno C₁₅H₂₄

Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281515#section=2D-Structure>
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281515#section=3D-Conformer>

Recentemente muitos estudos apontaram que numerosos compostos sintéticos e naturais apresentam alta afinidade por receptores canabinóides do tipo 2 – CB2, e que essa via é promissora para futuras drogas convencionais utilizadas em distúrbios do SNC (GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2010; GARCÍA-GUTIÉRREZ et al., 2012; BAHÍ et al., 2014). Entre eles o BCF, componente comum em óleos essenciais de especiarias possui alta afinidade por receptor CB2, exercendo efeito agonista, sendo um composto de alta relevância para o tratamento de convulsões, porém poucos testes foram relatados em animais em modelos de convulsão, merecendo sua maior exploração (CARVALHO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016; HUIZENGA et al., 2017).

Como características físico-químicas, a baixa solubilidade em água é a mais citada, o que sugere sua elevada afinidade pela membrana celular e capacidade de transposição da barreira hematoencefálica (FIDYT *et al.*, 2016). Como resultado do seu amplo emprego, a toxicidade do beta-cariofileno vem sendo estudada *in vivo* e *in vitro*. Com base em muitos estudos de toxicidade, esta substância, atualmente, é considerada não mutagênica, não genotóxica e a dose letal oral aguda (DL50) em ratos é relatada como maior que 5000 mg/kg de peso corporal (SCHMITT; LEVY; CARROLL, 2016).

Nos últimos anos, diversos estudos utilizando o beta-cariofileno foram desenvolvidos e devido às suas inúmeras atividades biológicas, este vem sendo considerado um potencial agente terapêutico em múltiplos distúrbios (SHAN; CHEN; LU, 2017). Dentre as atividades farmacológicas descritas na literatura destacam-se a atividade antiproliferativa (LOIZZO *et al.*, 2008), anestésica (GHELARDINI *et al.*, 1999), antiviral (DUKINC; BENZIC; VUKO,

2011), antifúngica (HO *et al.*, 2011), antibacteriana (SHAFAGHAT, 2011), anti-inflamatória (KOBAYASHI *et al.*, 2011), antioxidante (CALLEJA *et al.*, 2013) e os efeitos neuroprotetores em modelos de isquemia cerebral (CHOI *et al.*, 2013), epilepsia (LIU *et al.*, 2015), hipóxia em células da glia (GUO *et al.*, 2014), doença de Alzheimer (CHENG *et al.*, 2014), ansiedade e depressão (GARCIA-GUTIERREZ *et al.*, 2010).

1.6 Justificativa e relevância

Levando em consideração a grande prevalência mundial da epilepsia e a limitação das alternativas terapêuticas disponíveis para o tratamento das crises, ainda há a necessidade de buscar novos compostos com propriedades antiepilépticas (DEVINSKY *et al.*, 2018; GAO *et al.*, 2018).

Atualmente são relatados muitos efeitos colaterais aos tratamentos disponíveis na clínica, e em alguns casos estes não apresentam resposta terapêutica positiva configurando uma refratariedade ao tratamento que interferem na qualidade de vida dos pacientes, sendo necessária uma terapia combinada para obter o controle das crises (SANKARANI; LACHHWANI, 2015).

A utilização de plantas medicinais tem se mostrado fonte potencial de novos compostos com propriedades terapêuticas. Nos últimos anos, diversos estudos utilizando o beta-cariofileno foram desenvolvidos, devido às suas inúmeras atividades biológicas como, por exemplo: anticarcinogênico, antimicrobiano e antioxidante (DAHAM. *et al.*, 2015), antidepressivo (OLIVEIRA *et al.*, 2018) e anti-inflamatório (OLIVEIRA-TINTINO. *et al.*, 2018), Assim esta molécula vem sendo considerado um potencial agente terapêutico em múltiplos distúrbios (SHAN; CHEN; LU, 2017).

Embora sejam relatados resultados positivos desse composto frente a múltiplos distúrbios biológicos, poucos estudos foram descritos com o uso do beta-cariofileno no modelo de epilepsia, há evidência que o BCF melhora a atividade motora dos animais, uma vez que apresenta uma atividade neuroprotera, entretanto ainda torna-se necessário estudos complementares para elucidar uma possível via de sinalização celular responsável pela melhora clínica dos sintomas motores e bioquímicos, o que justifica a necessidade de maior investigação desse composto no presente modelo animal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do beta-cariofileno (BCF) em modelo de epileptogênese induzido por pilocarpina em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do tratamento com BCF sobre as alterações comportamentais nos testes de campo aberto, reconhecimento de objetos e rotarod em modelo de epileptogênese induzidos por pilocarpina em camundongos.
- Verificar o efeito do tratamento com BCF sobre o estresse oxidativo através das concentrações de nitrito/nitrato no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em modelo de epileptogênese induzido por pilocarpina em camundongos.
- Analisar o efeito do tratamento com BCF sobre a peroxidação lipídica (TBARS), no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em modelo de epileptogênese induzido por pilocarpina em camundongos.
- Determinar o efeito do tratamento com BCF sobre os sistemas antioxidantes endógenos através dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em modelo de epileptogênese induzido por pilocarpina em camundongos.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos *Swiss*, com peso variando entre (20-25 gramas), provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral. Os animais foram preservados em gaiolas de propileno em ambiente com umidade e temperatura controladas (25 ± 2 °C), com ciclo claro/ escuro alternado de 12 horas, recebendo ração padrão e água *ad libitum*.

3.2 Aspectos éticos

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA, da Universidade Federal do Ceará – UFC, *Campus* Sobral sob número de protocolo 08/2018 (Anexo 01). Embora alguns animais tenham sido submetidos a protocolos estressantes, foram seguidas as recomendações do manejo de animais objetivando reduzir o sofrimento e os possíveis danos que estes viessem a sofrer. Todos os procedimentos experimentais seguiram de forma estrita as normas estabelecidas na Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, denominada de Lei Arouca 2008 (BRASIL, 2008), que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais.

3.3 Obtenção e preparo das drogas

As drogas e reagentes que foram utilizados para a realização dos experimentos estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2 – Drogas e reagentes que foram utilizados durante a execução dos protocolos experimentais.

DROGA/REAGENTE	PREPARO
Cloridrato de pilocarpina (<i>Sigma Chemical Co, USA</i>)	100 mg/kg, via intraperitoneal. Foi dissolvida em solução salina.
Beta-cariofileno (<i>Sigma Chemical Co, USA</i>)	50, 100 mg/kg, via oral. Foi dissolvido em solução salina, contendo 0,5 % de Tween 80.
Metilescopolamina (<i>Sigma Chemical Co, USA</i>)	1 mg/kg, via intraperitoneal. Foi dissolvida em solução salina.
Diazepam (<i>Cristália</i>)	10mg/kg, via intraperitoneal. Foi dissolvido em solução salina.

Fonte: Próprio Autor

3.4 Protocolos de tratamento e grupos experimentais

3.4.1 Protocolo de tratamento do grupo epilético

A Epileptogênese foi induzida por *Status Epilepticus* (SE) baseado nos experimentos de Oliveira e colaboradores (2018), adaptado. Os animais receberam doses múltiplas de pilocarpina na concentração de 100mg/kg via i.p., com dose máxima de 400 mg/kg, sendo permitida apenas quatro administrações. Devido aos efeitos colinérgicos adversos associados à pilocarpina os camundongos foram previamente tratados com metilscopolamina (1 mg/kg; i.p.), este fármaco é um antagonista dos receptores muscarínicos M₃, que age atenuando a atividade colinérgica periférica na musculatura lisa. Após um intervalo de 30 minutos, foi iniciado a administração de pilocarpina com intervalos de 20 minutos entre cada administração até indução do SE, não ultrapassando a dose de 400 mg/kg.

Durante este período de fase aguda, a intensidade das alterações comportamentais decorrentes do distúrbio epilético, logo após a injeção de pilocarpina, foi classificada de acordo com a escala de Racine (Quadro 2), (CAVALHEIRO et al., 1991).

O critério para classificação do SE foi baseado na persistência de crises contínuas, e estágio 5 da escala de Racine (elevação e queda). No período de indução do SE as alterações comportamentais decorrentes das crises epiléticas foram observadas e classificadas de acordo com o quadro 3.

Os animais que entraram no SE antes do término do período de observação (2 horas), receberam DZ 10mg/kg, i.p. imediato para abortar a crise convulsiva. Os animais que não entraram no SE ao final da observação de duas horas também foi aplicado o DZ a fim de manter as mesmas condições experimentais em todos os animais.

Quadro 3 - Escala de Racine para intensidade de respostas motoras dos animais à injeção de pilocarpina.

Estágio	Comportamento
0	Imobilidade
1	Automatismo faciais
2	Mioclonias de cabeça e pescoço
3	Clonias de patas anteriores
4	Clonias de patas posteriores
5	Elevação e queda

Fonte: (RACINE, 1972).

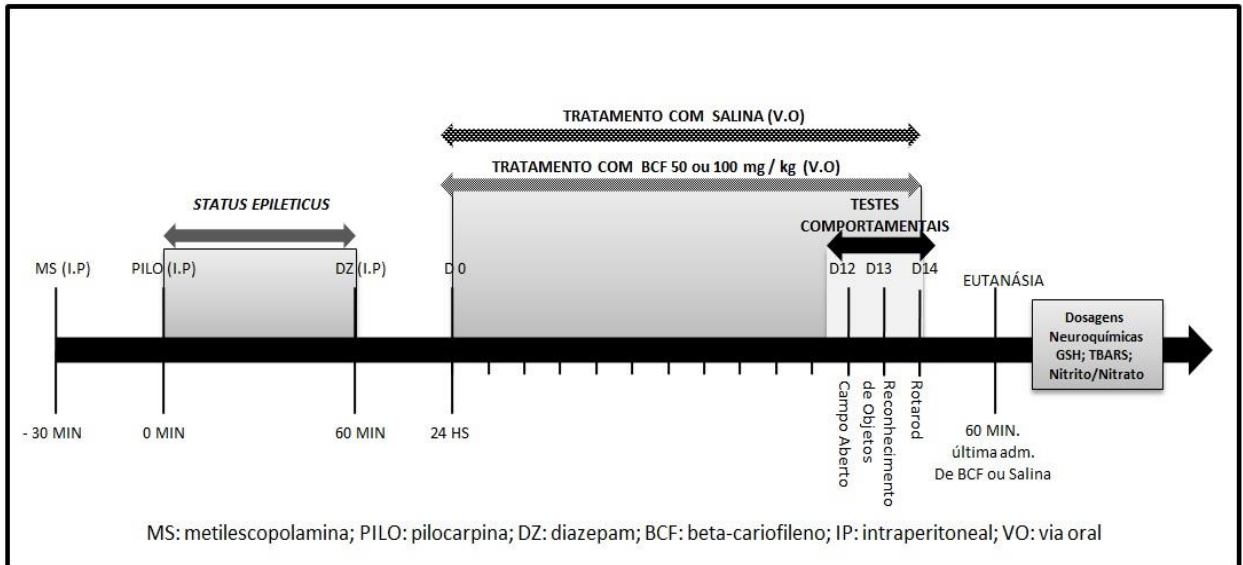
Uma vez cessado as crises, os animais foram divididos em caixas plásticas, grupos de 8 animais, com dieta livre suplementada com potássio, baseada na ingestão de frutas (banana/maça), mixada com solução de ringer lactato e dextrose 5 % por gavagem, os animais foram observados durante as primeiras 12 horas após indução do SE até o desenvolvimento de crises espontâneas.

Os canais de potássio controlam diversos processos fisiológicos celulares durante a função cerebral normal como por exemplo, a regulação da excitabilidade celular do potencial de membrana em repouso, a disfunção desses canais podem levar a distúrbios neurológicos associados a epilepsia (JAN; JAN, 2012; KOLE; STUART, 2012; BRENNER; WILCOX, 2012; KOHLING; WOLFART, 2016).

O tratamento com BCF iniciou 24 horas após a administração do diazepam, e seguiu com doses diárias durante 14 dias, nas concentrações 50 e 100 mg/kg ou seu veículo por gavagem de acordo com cada grupo experimental, foi conservado o mesmo horário no tratamento durante esse período.

A análise dos parâmetros comportamentais foi realizada entre os dias 12 e 14 de tratamento, os ensaios realizados seguirão a sequência, D12 – campo aberto, D13 – reconhecimento de objetos e D14- rotarod. Os animais que não sobreviveram antes de completar todos os ensaios foram excluídos da análise. No décimo quarto dia de tratamento após a realização dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados, seguido de dissecação imediata das áreas cerebrais hipocampo (HC), córtex pré-frontal (CPF) e corpo estriado (CPE), e armazenamento em freezer - 80° C até realizar as dosagens neuroquímicas. Foram realizados três ensaios neuroquímicos por grupo experimental, peroxidação lipídica (TBARS), glutathiona reduzida (GSH) e dosagem de (nitrito/nitrato). O quadro 4 ilustra o protocolo experimental descrito acima.

Quadro 4 – Delineamento experimental cronológico da realização do protocolo de tratamento do grupo epiléptico (GE) e administração repetida de beta-cariofileno durante 14 dias.

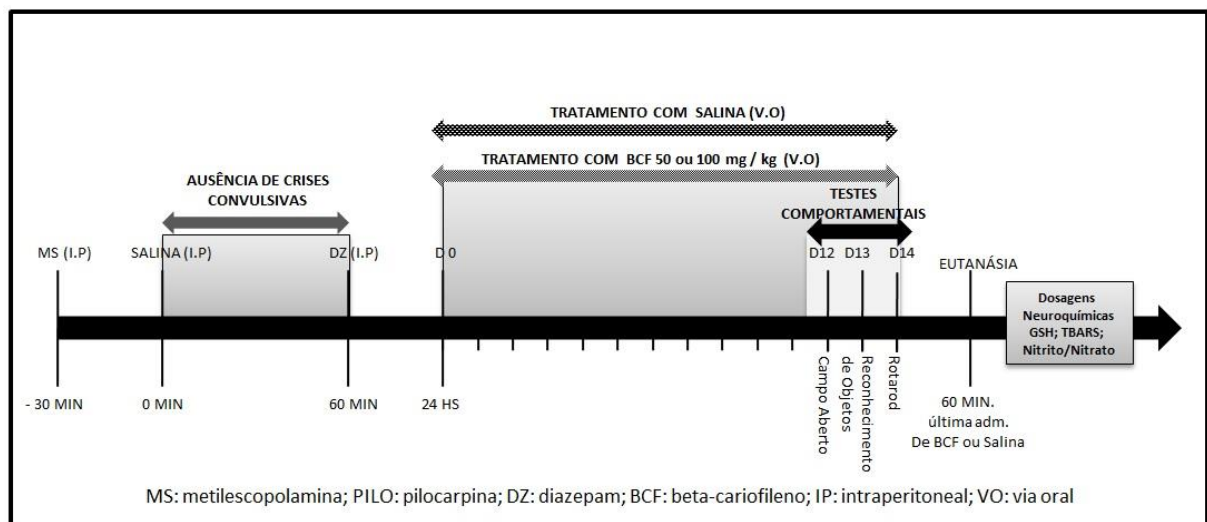


Fonte: próprio autor

3.4.2 Protocolo de tratamento do grupo não epiléptico

Os animais do grupo não epiléptico seguiram o mesmo protocolo, foi administrado metilescopolamina e diazepam, porém em substituição a pilocarpina, foi administrado o veículo (NaCl 0,9%), configurando a ausência de crises convulsivas (Quadro 5).

Quadro 5 – Delineamento experimental cronológico da realização do protocolo de tratamento do grupo não epiléptico (GNE) e administração repetida de beta-cariofileno durante 14 dias.



Fonte: próprio autor

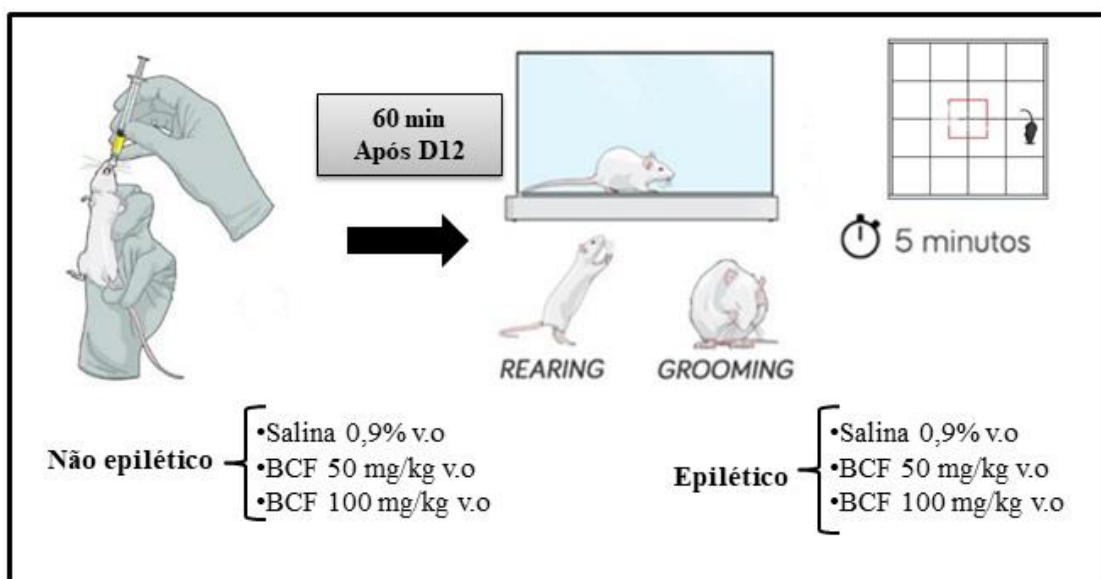
3.5 Testes comportamentais

Para investigação dos efeitos do BCF no comportamento exploratório e atividade motora após indução da epileptogênese serão avaliados o desempenho dos animais nos testes de campo aberto, reconhecimento de objetos e rotarod.

3.5.1 Campo aberto

O teste de campo aberto foi realizado para avaliar atividade exploratória do animal baseado na metodologia validada por Archer (1973). Os animais individualmente foram colocados no centro de um aparato de madeira com regiões centrais e periféricas delimitadas em sua base (paredes brancas e piso preto) medindo (30 x 30 x 15 cm) e divididas em nove quadrantes iguais. Após 60 min. do 12º dia de tratamento com salina ou beta-cariofileno por gavagem, os animais foram colocados no centro do campo aberto e observados durante 5 minutos o número de cruzamentos com as quatro patas (atividade locomotora espontânea), o número de levantamentos com as patas traseiras sem encostar nas paredes do campo do campo (*rearing*), o número de movimentos de auto-limpeza (*grooming*) e o tempo de imobilidade.

Quadro 6 – Representação esquemática do teste comportamental do campo aberto. Foram avaliados, durante 5 minutos, o número de cruzamentos, *rearing*, *grooming* e tempo de imobilidade de camundongos tratados com BCF (beta-cariofileno) ou Salina 0,9 %.

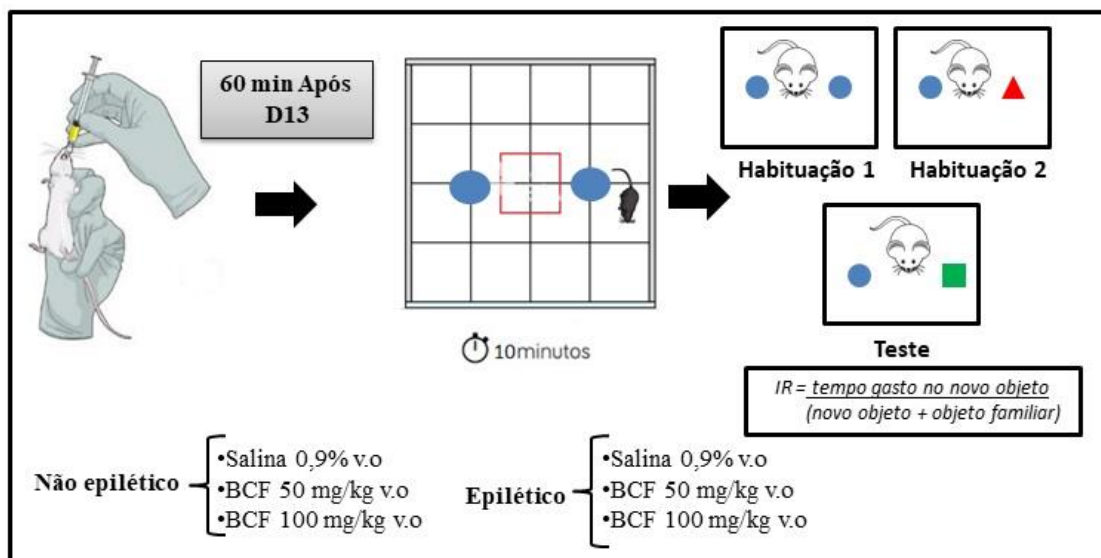


Fonte: Próprio autor, imagens retiradas do banco de dados <https://mindthegraph.com>

3.5.2 Reconhecimento de objetos

Os animais, um por vez, foram habituados para posterior avaliação da memória. O protocolo consistiu em três sessões, habituação 1 (primeira sessão de treinamento), nessa etapa dois objetos idênticos foram colocados equidistalmente no centro de um campo aberto com as dimensões descritas no teste anterior, e o tempo gasto na exploração de cada objeto será registrado por 10 minutos. A habituação 2 (segunda sessão de treinamento), foi realizada 4 horas após a primeira, onde um dos objetos foi substituído por um novo e o tempo de exploração será avaliado por mais 10 minutos. O teste (terceira sessão) foi realizado 24 horas após a segunda sessão, sendo que um dos objetos utilizados na segunda sessão foi substituído e o tempo de exploração foi observado por 10 minutos. Os animais que não completarem um tempo mínimo de exploração de 10 segundos foram excluídos da análise. O índice de reconhecimento foi calculado utilizando a fórmula: índice de reconhecimento = (tempo gasto no novo objeto) / (tempo gasto no novo objeto) + (tempo gasto no objeto familiar). (referencia)

Quadro 7 – Representação esquemática do teste comportamental de reconhecimento de objetos. Foram avaliados, durante 10 minutos, o tempo de exploração no objeto novo e objeto familiar de camundongos tratados com BCF (beta-cariofileno) ou Salina 0,9 %.

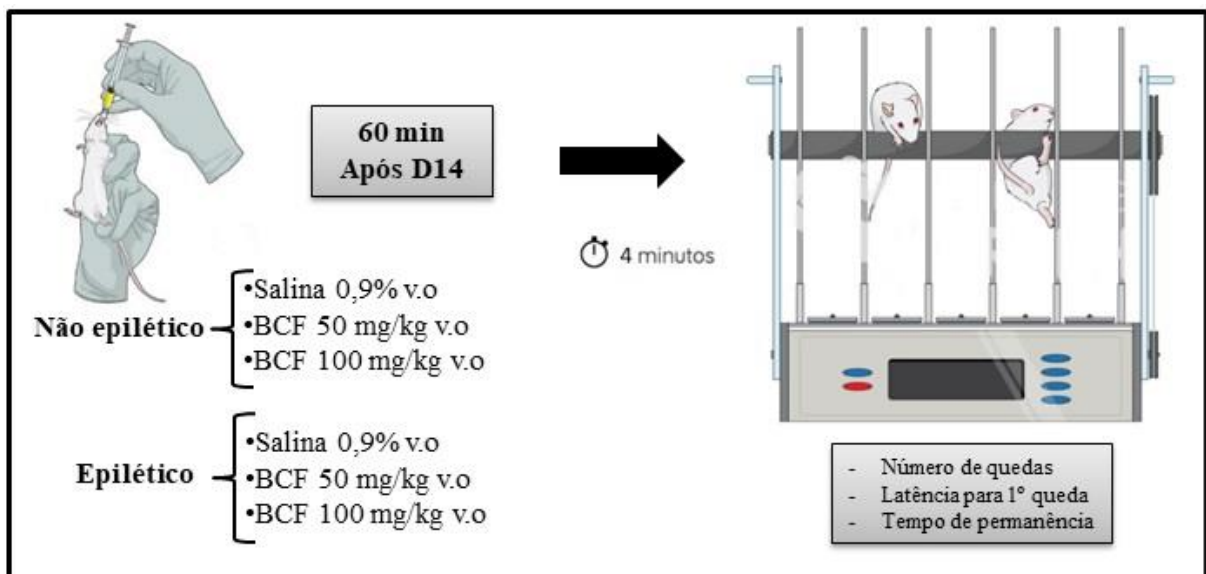


Fonte: Próprio autor, imagens retiradas do banco de dados <https://mindthegraph.com>

3.5.3 Teste rotarod

Este teste foi utilizado para avaliar a atividade motora dos camundongos epiléticos e não epiléticos. Os animais foram previamente submetidos a uma sessão de adaptação, nessa etapa foi realizado 10 tentativas com intervalo de 60 segundos, o animal foi colocado no aparelho rotarod (diâmetro de 7 cm), com rotação de 16 rpm, cada ciclo encerrou-se quando o camundongo caiu da haste, ou quando completou um tempo de corte de 60 segundos. Após 24 horas foi realizado o teste. Os animais foram observado por 4 minutos e foi registrado o número de quedas, a latência da primeira queda e o tempo de permanência na haste do rotarod.

Quadro 8 – Representação esquemática do teste comportamental Rotarod. Foram avaliados, durante 5 minutos, a latência para queda, tempo de permanência e número de quedas de camundongos tratados com BCF (beta-cariofileno) ou Salina 0,9 %.



Fonte: Próprio autor, imagens retiradas do banco de dados <https://mindthegraph.com>

3.6 Dissecção das áreas cerebrais e descarte dos animais

Os animais que sobreviverem até o 14º de tratamento com BCF, após todas as determinações comportamentais foram sacrificados por deslocamento cervical e decapitados. Em seguida, os encéfalos foram rapidamente removidos e colocados sobre papel alumínio em

uma placa de Petri contendo gelo, seguido de dissecação das áreas cerebrais a serem estudadas.

O córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e corpo estriado (CPE) foram isolados das demais áreas do encéfalo por divulsionamento com auxílio de uma pinça de microdissecação, cada área foi pesada, armazenada em papel alumínio e conservada a - 80 °C individualmente até sua análise. As carcaças dos animais foram acondicionadas em sacos plásticos, armazenadas em freezer e posteriormente o descarte ocorreu sob responsabilidade do Biotério da Universidade Federal do Ceará/ *campus* Sobral.

3.7 Dosagens neuroquímicas

3.7.1 Determinação da peroxidação lipídica por medição do conteúdo de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O grau de peroxidação lipídica foi determinado pelo método de Draper e Hadley (1990). A determinação das concentrações de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) foi avaliada nas áreas cerebrais (hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado) pelo protocolo a seguir. Foi preparado um homogenato com os tecidos cerebrais a 10% em solução tampão. Uma alíquota 63 uL do homogenato foi precipitado com 100 uL de ácido perclórico a 35 %, seguido de centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos em centrifuga refrigerada a 4°C. Após centrifugação, foi separado 150 uL do sobrenadante e adicionado 50 uL de ácido tiobarbitúrico 1,2 %. Posteriormente a mistura foi agitada e mantida em banho de água fervente (95-100°C) por 30 minutos. Após isso, foi transferido 200 µL da amostra para os poços de uma placa de poliestireno de 96 poços, a determinação do conteúdo de TBARS foi realizada por espectrofotômetro a 535 nanômetros (nm) em leitor de microplacas (*MOLECULAR DEVICES –Spectra Max Paradigm Multi-Mode*). Os resultados foram expressos em micromol (µmol) de malonildialdeído (MDA) por miligrama de proteína. A curva padrão de MDA foi preparada a partir de uma solução padrão nas concentrações 0,627; 1,247; 2,463; 4,8; 9,16 e 16,77 µmol e o branco foi feito com água destilada.

3.7.2 Determinação da concentração de nitrito/nitrato.

Para a determinação da produção de nitrito, primeiramente foi preparado uma curva padrão. Para isso, foram pesados 6,9 mg de NaNO₂ e dissolvidos em 10 mL de água

bidestilada (estoque-10mM) e feitas as diluições em série (10 e 20 x), ficando 1 μ M, 100 μ M, 10 μ M, 5 μ M, 2,5 μ M, 1,25 μ M, 0,625 μ M, 0,312 μ M. Foi realizada uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN et al.,1981). Para a determinação da concentração de nitrito em cada tecido, foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% (p/v) em solução tampão fosfato 150 mM. Após a centrifugação (11000 rpm/15 min °C) os sobrenadantes foram coletados e a produção de óxido nítrico (NO) determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100 μ L do sobrenadante foi incubada com 100 μ L do reagente de Griess [(sulfanilamida 1% em H₃PO₄/naftiletlenodiamino-bicloridrato 0,1%/H₃PO₄ 1%/diluído em água, na proporção de (1:1:1:1)] e foram distribuídos em uma placa de poliestireno de 96 poços sob a temperatura ambiente por 10 minutos. Após 10 minutos de reação a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 540 nm em leitor de microplacas (MOLECULAR DEVICES –Spectra Max Paradigm Multi-Mode). A concentração de nitrito (μ M) foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO₂ e os resultados foram expressos em μ M de nitrito-nitrato por grama de tecido.

3.7.3 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH).

A atividade antioxidante foi determinada pela concentração de GSH, que se baseia na reação do reagente de Ellman (5,5'-ditiobis-ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. Inicialmente foi preparado o homogenato a 10% em EDTA 0,02M das áreas cerebrais em estudo, em seguida foi retirado 40 μ L desse homogenato e adicionado 50 μ L de água destilada e 10 μ L de ácido tricloracético a 50%. O material foi agitado e centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Posteriormente, foi recolhido 60 μ L do sobrenadante e acrescido 102 μ L de tampão Tris-HCL 0,4 M, pH 8,9 + DTNB 0,01M e distribuídos na placa de poliestireno de 96 poços, após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração em 412 nm em leitor de microplacas (MOLECULAR DEVICES –Spectra Max Paradigm Multi-Mode). A concentração de glutathiona reduzida foi expressa em nanogramas de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva padrão. A curva padrão foi construída a partir da solução padrão de GSH (1mg/mL), a qual foi preparada em triplicata de soluções a 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 μ g/mL. O branco foi feito com água destilada (4 mL) e a cada tubo das soluções de GSH foi acrescentado de 4 mL de tampão Tris HCl 0,4M (pH 8,9). Para a determinação da equação da curva padrão de GSH, foi adicionado ainda a cada tubo 0,1 mL de DTNB (SELDLAK; LINDSAY, 1988).

3.8 Análise estatística

Os dados paramétricos foram calculados através do programa estatístico GraphPadPrism[®] versão 8.0 para Windows (GraphPad Software, Inc., EUA). Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguido por teste de comparações múltiplas de Tukey com nível de significância de 95% ($p < 0,05$) foi aplicado para todos os testes estatísticos.

4 . RESULTADOS

4.1 Avaliação comportamental

4.1.1 Teste do Campo Aberto

A Atividade Locomotora Espontânea (nº cruzamentos), Autolimpeza (*grooming*), Atividade Exploratória Vertical (*Rearing*) e o Tempo Parado foram os parâmetros analisados neste teste.

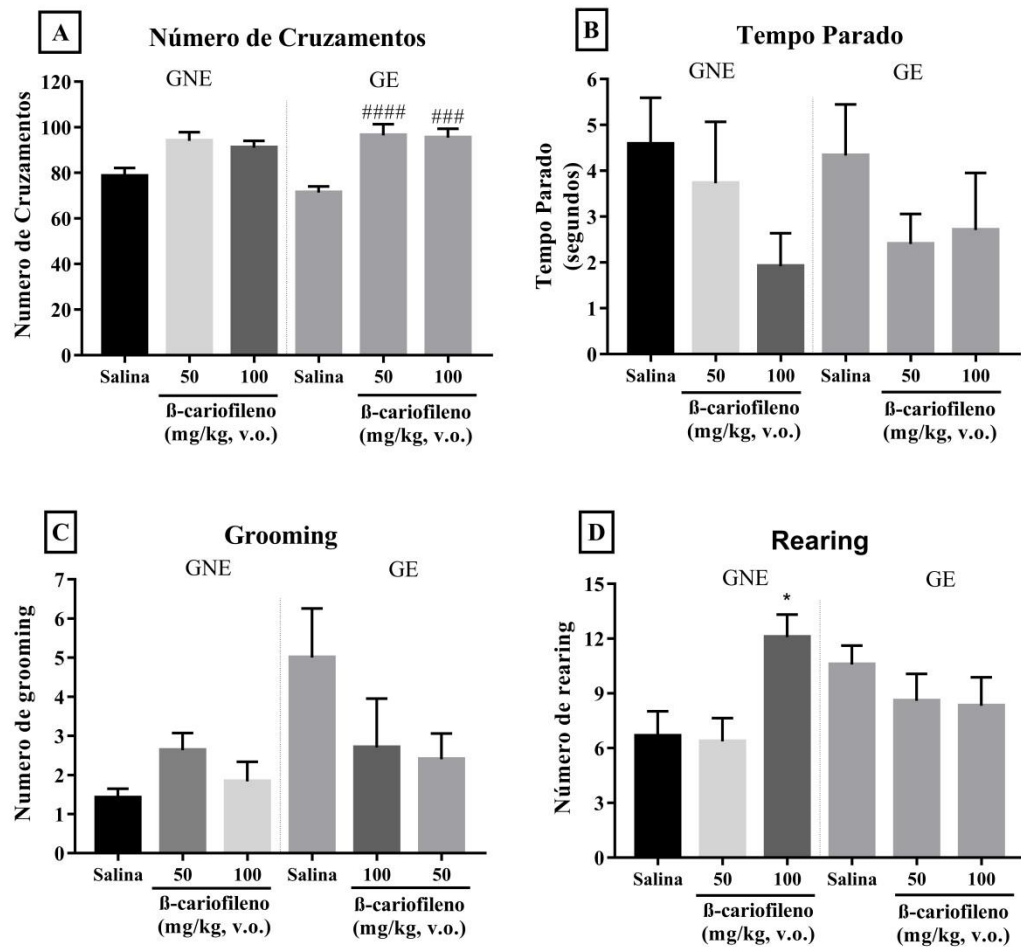
Quanto a variável número de cruzamentos, os animais epiléticos tratados com β -Cariofileno em ambas as doses, β -Cariofileno 50 mg/kg ($96,47 \pm 21,19$; $p < 0,0001$) e β -Cariofileno 100 ($95,43 \pm 14,76$; $p < 0,0001$) aumentaram significativamente em relação ao grupo salina. Quanto ao grupo não epilético, não foi demonstrado nenhuma diferença estatística, conforme o gráfico 1 A.

Ao analisar os dados de Tempo parado, comparando os animais tratados com o grupo salina, foi observado que em nenhuma dose testada de β -Cariofileno dentro dos dois grupos analisados mostraram diferença significativa.

Quando analisados os valores de autolimpeza (*grooming*), não houveram diferenças significativas nos tratamentos com β -Cariofileno em nenhuma dose testada, tanto no grupo epilético quanto no grupo não epilético.

O último parâmetro analisado foi a atividade exploratória vertical (*rearing*), o único tratamento que se mostrou diferente significativamente do grupo salina foi o β -Cariofileno 100 mg/kg ($12,08 \pm 4,27$; $p < 0,05$) no grupo não epilético, aumentando a sua atividade. Quanto ao grupo epilético, não houve alterações estatisticamente significantes.

Gráfico 01 – Análise da atividade motora no Teste do Campo Aberto em camundongos não epiléticos (GNE) e epiléticos (GE) tratados por 14 dias com β -cariofileno e salina.



Fonte: Autor. **Legenda:** A: Número de cruzamentos; B: Tempo parado; C: Grooming; D: Rearing. Os valores representam a média \pm SEM. Para análises estatísticas foram utilizados o teste One-way ANOVA seguido por Tukey. * mostra diferença significativa em relação ao grupo Salina GNE. # mostra diferença significativa em relação ao grupo Salina GE. Valores significativos: * $p < 0,05$, ### $p < 0,005$; #### $p < 0,0001$.

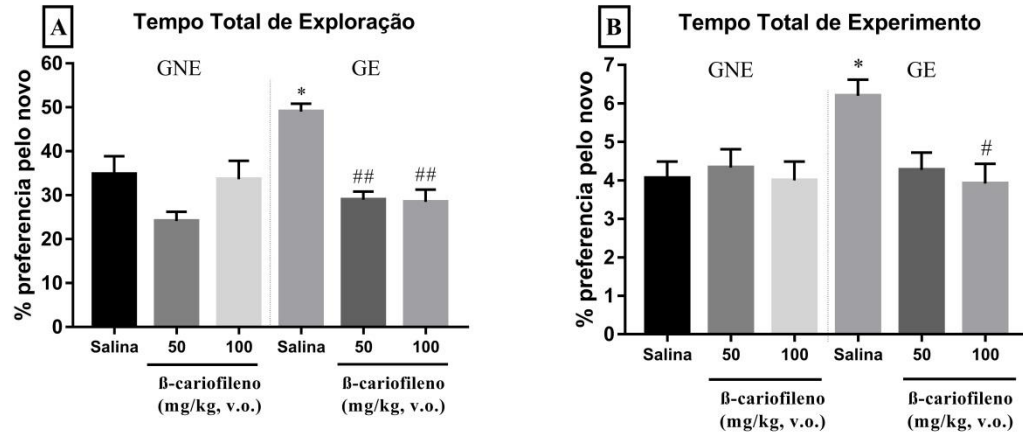
4.1.2. Teste de Reconhecimento de Objeto

O teste de reconhecimento de objetos (TRO) é utilizado para avaliar memória de curto prazo em roedores. Os parâmetros utilizados neste teste foram a Porcentagem de preferência pelo objeto novo em relação ao tempo total de exploração e a Porcentagem de preferência pelo objeto novo em relação ao tempo total do experimento.

Quanto a variável de Preferência pelo objeto novo em relação ao tempo total de exploração, os animais epiléticos tratados com β -Cariofileno apresentaram diferença significativa tanto na dose de 50 mg/kg ($28,99 \pm 6,05$; $p < 0,01$) quanto na dose de β -Cariofileno 100 mg/kg ($24,47 \pm 9,78$; $p < 0,01$). Nesta mesma variável, quando analisado o grupo não epilético, não foi constatado nenhuma diferença significativa quando comparado ao grupo salina. Os grupos Salina GE e Salina GNE apresentaram diferença significativa entre eles com $p < 0,05$.

No teste que se trata da Preferência por explorar o objeto novo utilizando o tempo total do experimento, observou-se que somente os animais tratados com β -Cariofileno na dose de 100 mg/kg dentro do grupo dos epiléticos apresentou redução significativa ($3,91 \pm 1,782$; $p < 0,05$). Os grupos Salina GE e Salina GNE apresentaram diferença significativa entre eles com $p < 0,05$.

Gráfico 02 – Análise do Teste de Reconhecimento de Objeto em camundongos não epiléticos (GNE) e epiléticos (GE) tratados por 14 dias com β -cariofileno e salina



Fonte: Autor. **Legenda:** A: Tempo total de exploração; B: tempo total de Experimento. Os valores representam a média \pm SEM. Para análises estatísticas foram utilizados o teste One-way ANOVA seguido por Tukey. * mostra diferença significativa em relação ao grupo salina GNE. # mostra diferença significativa em relação ao grupo Salina GE. Valores significativos: * $p < 0,05$, # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$.

4.1.3 Teste de Rota-rod

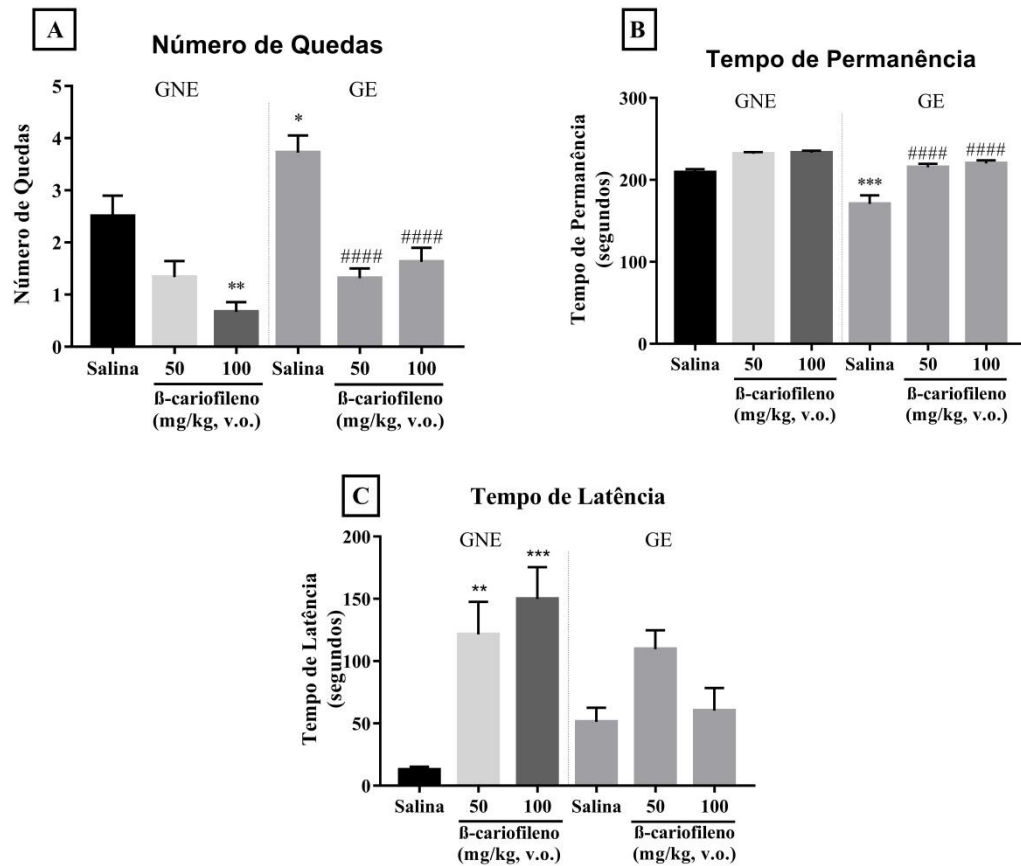
Para o teste de Rota-rod, foram avaliadas três variáveis relacionadas a atividade motora do animal, a saber: Tempo de latência, Tempo de permanência e o Número de quedas total.

Quando avaliado o número de quedas. O β -cariofileno foi capaz de diminuir significativamente o número de quedas, tanto no grupo epilético quanto no grupo não epilético. [Grupo epilético: β -cariofileno 100 mg/kg ($1,44 \pm 1,14$; $p < 0,01$). Grupo não epilético: β -cariofileno 50 mg/kg ($1,33 \pm 1,07$; $p < 0,0001$); β -cariofileno 100 mg/kg ($0,66 \pm 0,65$; $p < 0,0001$). Também houve diferença significativa quando comparado os grupos salinas GE e GNE ($3,72 \pm 1,4$; $p < 0,005$)

Em relação a variável tempo de permanência, somente foi constatado diferença significativa dentro do grupo dos animais epiléticos, onde em ambas as doses testadas de β -cariofileno houveram aumento significativo em relação ao grupo salina [β -cariofileno 50 mg/kg; ($215,5 \pm 18,96$; $p < 0,0001$); β -cariofileno 100 mg/kg ($220,2,6 \pm 16,09$; $p < 0,0001$)]. Quando comparado os grupos salina GNE e GE, houve diferença significativa, onde GE reduziu em relação ao GNE ($170,68 \pm 44,98$; $p < 0,005$);

O último parâmetro avaliado foi quanto ao Tempo de latência, o grupo Epilético apresentou aumento significativo em relação ao grupo salina nas doses de 50 mg/kg de β -cariofileno ($109,6 \pm 69,41$; $p < 0,01$) e também de 100 mg/kg de β -cariofileno ($60,16 \pm 60,37$; $p < 0,01$). Já quando analisado animais não epiléticos, não foi possível constatar nenhuma diferença estatística. Foi possível constatar a diferença significativa entre os grupos salina, onde o salina GE aumentou em relação ao salina GNE significativamente ($51,2,6 \pm 36,131$; $p < 0,005$).

Gráfico 03 – Análise da locomoção através do teste de RotaRod em camundongos não epiléticos (GNE) e epiléticos (GE) tratados por 14 dias com β -cariofileno e salina



Fonte: Autor. **Legenda:** A: Número de quedas; B: Tempo de permanência; C: Tempo de Latência. Os valores representam a média \pm SEM. Para análises estatísticas foram utilizados o teste One-way ANOVA seguido por Tukey. * mostra diferença significativa em relação ao grupo controle. Valores significativos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$ e #### $p < 0,0001$.

4.2 Testes Neurobioquímicos

4.2.1 Determinação dos Níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS)

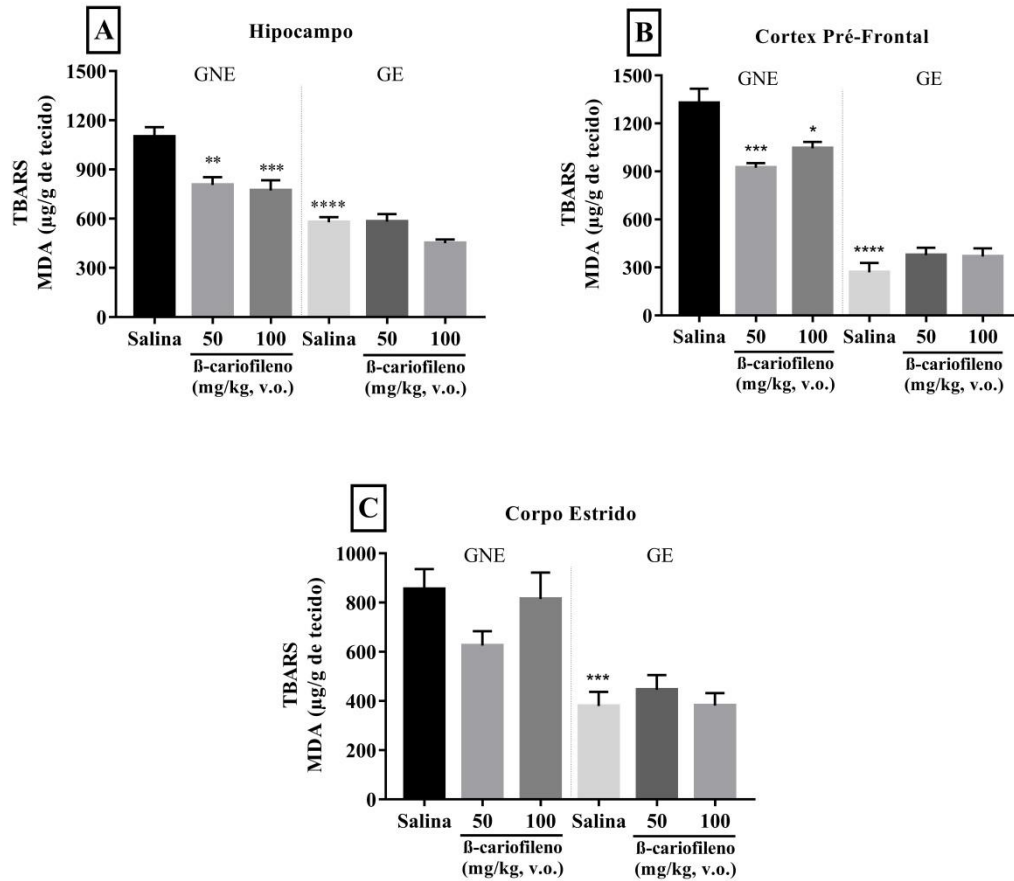
De acordo com os resultados obtidos (GRÁFICO 4), quando analisados os níveis de Peroxidação Lipídicas no Hipocampo dos animais não epiléptico, o β -cariofileno conseguiu reduzir os níveis de MDA tanto na dose de β -cariofileno 50 mg/kg ($1806,2 \pm 116,2$; $p < 0,01$), quanto na dose de β -cariofileno 100 mg/kg ($772,2 \pm 151,8$; $p < 0,01$) quando comparado ao grupo salina.

No Córtex Pré-Frontal, somente em animais não epilépticos apresentaram alterações significativas quando comparado ao grupo salina, onde diminuíram os níveis de malondialdeído nas doses de β -cariofileno 50 mg/kg ($923 \pm 64,14$; $p < 0,005$) e β -cariofileno 100 mg/kg ($1045 \pm 96,45$; $p < 0,05$).

No corpo estriado, nenhuma dose testada de β -cariofileno foi diferente significativamente do grupo salina ao analisar os níveis de malondialdeído nos tecidos cerebrais dos animais epilépticos ou não epilépticos.

Em todas as variáveis analisadas, os grupos Salina GNE e GE foram significativamente diferente, onde em hipocampo houve redução ($577,7 \pm 31,44$; $p < 0,0001$), em córtex pré-frontal reduziu ($269 \pm 157,5$; $p < 0,0001$) e em corpo estriado também reduziu ($379,7 \pm 141,3$; $p < 0,005$) quando comparado o grupo salina GE em relação a salina GNE.

Gráfico 04 – Níveis de Peroxidação Lipídica nas áreas cerebrais de camundongos tratados por 14 dias com com β -cariofileno e salina.

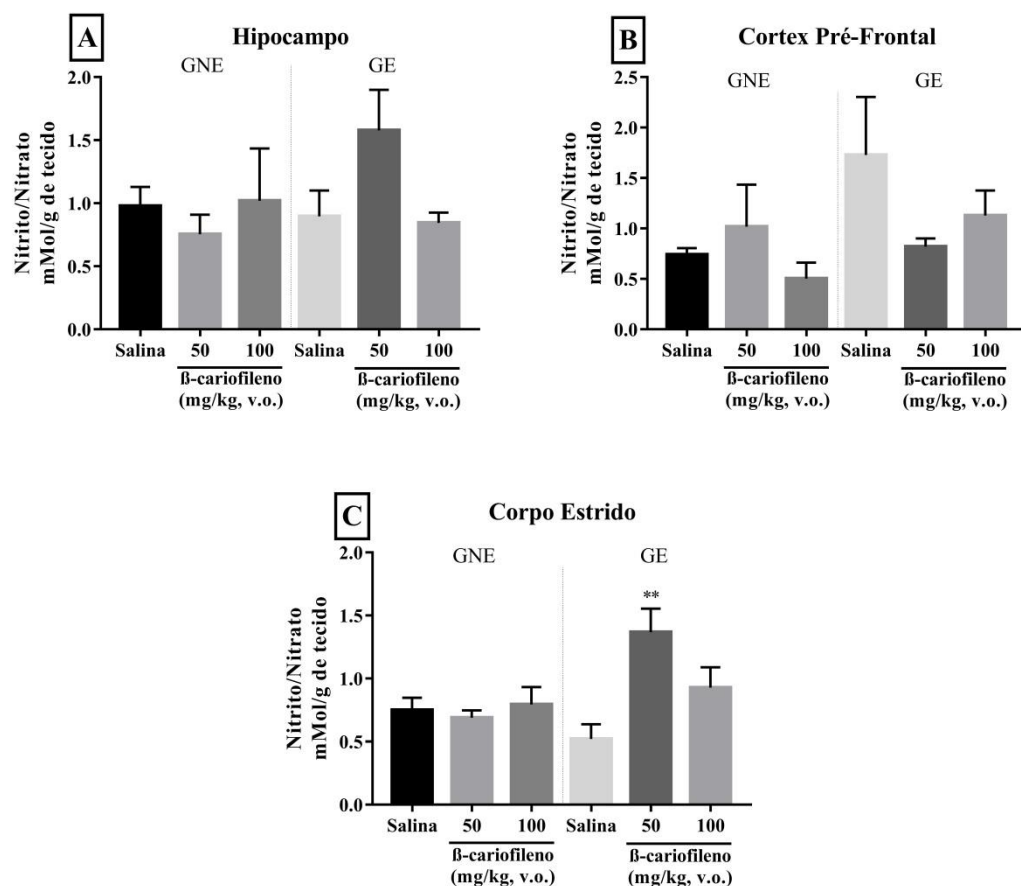


Fonte: Autor. **Legenda:** A:Hipocampo; B: Córtex pré-frontal; C: Corpo estriado. Os valores representam a média \pm SEM dos níveis de MDA medidos em $\mu\text{g/g}$ de tecido. Para análises estatísticas foram utilizados o teste One-way ANOVA seguido por Tukey. * mostra diferença significativa em relação ao grupo salina GNE. # mostra diferença significativa em relação ao grupo salina GE Valores significativos: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. *** $p < 0,005$, **** $p < 0,0001$ e # $p < 0,05$.

4.2.2 Determinação da Concentração de Nitrito (NO_2) / Nitrato (NO_3)

Neste teste, somente o corpo estriado de animais epiléticos na dose de β -cariofileno 50 mg/kg ($923 \pm 64,14$; $p < 0,01$) mostraram diferença significativa em relação ao grupo salina. Todas as demais doses de β -cariofileno de ambos os grupos experimentais estudados não apresentaram diferença estatística, conforme gráfico 5 (Veículo – DMSO3%). Quando comparado os grupos salina GNE e GE também não houve nenhuma diferença significativa entre eles.

Gráfico 5 – Níveis de Nitrito (NO_2) / Nitrato (NO_3) nas áreas cerebrais de camundongos tratados por 14 dias com β -cariofileno e salina.



Fonte: Autor. **Legenda:** A: Hipocampo; B: Córtex pré-frontal; C: Corpo estriado Os valores representam a média \pm SEM dos níveis de Nitrito/Nitrato medidos em mMol/g de tecido. Para análises estatísticas foram utilizados o teste One-way ANOVA seguido por Tukey. * representa diferença significativa em relação ao grupo veículo. ** $p < 0,01$

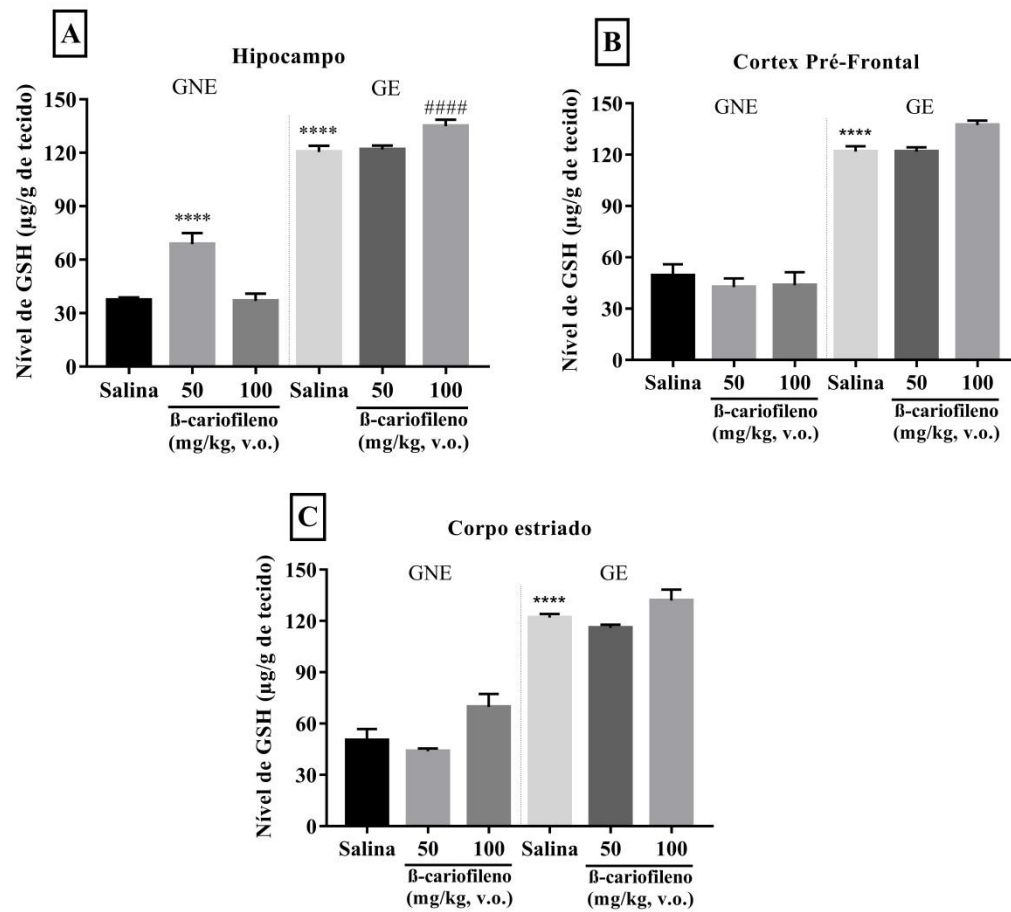
4.2.3 Determinação dos Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH)

De acordo com os resultados obtidos (GRÁFICO 6), quando analisado os níveis de GSH dos grupos não epiléticos, somente houve diferença estatística no hipocampo dos animais não epiléticos tratados com β -cariofileno na dose de 50 mg/kg, onde mostrou diferença significativa ($68,65 \pm 14,15$; $p < 0,0001$), aumentando os níveis de GSH no tecido neural quando comparado com o grupo salina GNE. Quando feito as análises estatísticas do grupo epilético, somente o β -cariofileno na dose de 100 mg/kg mostrou diferença significativa tanto em hipocampo ($134,9 \pm 9,01$; $p < 0,0001$).

Tanto em Córtex pré-frontal quanto em Corpo estriado, não houveram diferença significativa quando comparado os animais tratados com β -cariofileno em nenhuma das doses testadas.

Em consideração a comparação estatística entre os grupos salina GNE e Salina GE, em todas as áreas cerebrais estudadas apresentaram diferença significativa, onde em hipocampo ($120,45 \pm 9,07$; $p < 0,0001$), Córtex pré-frontal ($121,81 \pm 8,86$; $p < 0,0001$) e Corpo estriado ($121,89 \pm 5,72$; $p < 0,0001$) houve aumento de salina GE em relação ao grupo salina GNE

Gráfico 6 – Níveis de Glutathiona Reduzida (GSH) nas áreas cerebrais de camundongos tratados por 14 dias com β -cariofileno e salina..



Fonte: Autor. **Legenda:** Os valores representam a média \pm SEM dos níveis de GSH medidos em $\mu\text{g/g}$ de tecido. Para análises estatísticas foram utilizados o teste One-way ANOVA seguido por Tukey. * mostra diferença significativa em relação ao grupo controle. Valores significativos: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,005$.

5. DISCUSSÃO

Os óleos essenciais (OE) ou seus constituintes químicos isolados vêm ganhando grande espaço na comunidade científica por trazer um amplo potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos no tratamento de diversas desordens neurológicas, incluindo a epilepsia (ALMEIDA, et al., 2011).

No teste do campo aberto, popular por ser um dos testes laboratoriais mais utilizados para medir comportamentos relacionados à ansiedade, foi observado um aumento significativo no número de cruzamentos, ou seja, da atividade locomotora dos grupos BCF50 e BCF100 tanto do GE quanto do GNE em relação aos seus respectivos grupos Salina. O parâmetro “número de cruzamentos” é considerado uma medida simultânea de comportamento ansioso e de atividade locomotora. Um alto valor deste parâmetro sugere exploração e locomoção aumentadas e, conseqüentemente, menor nível de ansiedade (ZIMCIKOVA et al, 2017). Há pouca disponibilidade na literatura de estudos que avaliem a atividade do BCF em modelos de epilepsia, porém há evidência de que o BCF reduz o comportamento relacionado à ansiedade no teste de campo aberto (BAHI et al, 2014), o que condiz com tais achados do presente estudo.

Quanto à análise dos *rearings*, o grupo BCF100 dentre os animais do GNE apresentou uma quantidade significativamente maior deste comportamento em relação ao grupo Salina do GNE. O *rearing* é interpretado tanto como um índice de medição de comportamento exploratório como de comportamento ansiolítico, apesar de haver controvérsias na literatura acerca do tema (SEIBENHENER et al, 2015). O resultado obtido no presente estudo foi um aumento significativo na quantidade de *rearings* no grupo BCF 100 do GNE em relação ao grupo Salina do GNE, sem diferenças significantes quanto aos demais grupos, o que pode ser interpretado como um aumento da atividade exploratória que se deve ao BCF, relacionando-se negativamente com estados ansiosos e de medo (SESTAKOVAL et al, 2013). Entretanto, o *rearing* é um comportamento de caráter essencialmente multifatorial, possuindo assim baixa objetividade em sua interpretação quantitativa e grande variabilidade dentre diferentes estudos, possivelmente devido a diferenças entre ambientes laboratoriais, protocolos metodológicos e outros fatores diversos, visto que até mesmo pistas olfatórias ou auditivas distantes podem influenciar de forma expressiva neste comportamento (LEVER et al, 2006).

O teste de reconhecimento de objetos é um dos testes comportamentais mais usados atualmente para avaliar de maneira simples o desempenho do animal no domínio cognitivo da

memória em camundongos (LEGER, 2013). Nos resultados do presente estudo, o aumento significativo da porcentagem de preferência pelo objeto novo tanto no tempo total de exploração quanto no do tempo total de experimento do grupo Salina do GE em relação ao grupo Salina do GNE é um achado que contradiz os achados da maioria dos estudos da literatura, que normalmente demonstram uma redução significativa da exploração do objeto novo pelos animais epiléticos em relação aos animais saudáveis (GRIGOLETTO et al, 2016). Ademais, a redução significativa destes parâmetros nos grupos BCF50 e BCF100 em relação ao grupo Salina do GE também se mostra contrastante em relação aos estudos de Oliveira et al. 2016, que demonstrou melhora no desempenho no índice de reconhecimento de ratos epiléticos induzidos à doença por pentilenotetrazol após a administração de BCF a 100mg/kg (OLIVEIRA et al, 2016). Tal conflito pode ocorrer principalmente devido ao número insuficiente de animais usado no presente estudo, considerando que a quantidade adequada sugerida por LUEPTOW et al é de 15 a 20 animais por grupo para que se alcance um poder estatístico satisfatório. Outros fatores que podem justificar a falta de significância nos resultados são a variedade de níveis de ansiedade dentre os grupos, preferências ou aversões particulares aos objetos usados e sutis diferenças ambientais que fogem ao controle dos pesquisadores. Por esses motivos, é sugerido que, para a realização adequada deste teste, sejam aplicados múltiplos testes pilotos para melhor avaliação destes fatores (LUEPTOW et al, 2017) .

Além do teste de reconhecimento de objetos, outros testes são empregados e podem ser mais eficazes para avaliar a memória e cognição dos animais, o teste de labirinto em Y ou Y-maze por exemplo, observa a alternância espontânea, uma medida de memória espacial, e pode ser avaliada permitindo que os camundongos explorem os três braços do labirinto e é motivada por uma curiosidade inata dos roedores em explorar áreas anteriormente não visitadas (KRAEUTER; GUEST; SARNYAIS, 2019).

O teste de rotarod é uma ferramenta prática para avaliar o desempenho motor genérico do animal, visto que avalia simultaneamente diversos parâmetros motores, como coordenação motora, força de preensão das patas e resistência física. Um maior número de quedas, menor tempo de latência até a primeira queda ou menor tempo de permanência no aparato estão relacionados à neurotoxicidade causada pelo agente lesante específico de cada modelo animal (DUNHAM, MIYA, 1957). Neste estudo, podemos observar que o grupo Salina do GE teve seu número de quedas aumentado e seu tempo de permanência reduzido de forma significativa. Tal resultado sugere uma piora do desempenho motor no GE, o que condiz com a

hipótese de que a neurotoxicidade induzida pela pilocarpina, na qual diminui o desempenho motor do animal, visto que, em estudos prévios de modelos de epilepsia, foi reportado que as camadas corticais superficiais do cérebro do rato são particularmente afetadas, apresentando pronunciada atrofia e brotamento dendrítico, o que sugere lesão, neuroplasticidade e reorganização patológica de redes corticais motoras. Ademais, é também reportado importante grau de gliose reativa no terço superficial do córtex motor de ratos epiléticos (SANABRIA et al., 2002).

Quanto aos grupos tratados com BCF50 e BCF100, o GE demonstrou uma melhora significativa em todos os parâmetros avaliados no teste, em ambas as doses. Na literatura são poucos os estudos que avaliam o efeito do BCF em modelos de epilepsia em relação ao desempenho motor, especificamente no teste rotarod (FONSÊCA et al, 2019). Em estudo recente de OLIVEIRA et al. 2015, onde é avaliada a propriedade anticonvulsivante e neuroprotetora do BCF em modelo de epilepsia induzido por pentilenetetrazol, não foi encontrada diferença significativa entre os grupos no teste rotarod (OLIVEIRA et al, 2015), o que diverge do resultado encontrados do presente estudo. Quanto à análise intergrupo entre os grupos BCF50 e BCF 100, não houve diferença significativa nos parâmetros avaliados. É possível inferir com isto que ambas as doses proporcionaram efeitos positivos similares no aspecto motor dos animais. Estudos similares encontraram efeitos neuroprotetores com o uso de até 200mg/kg de BCF (CALLEJA, 2013) em modelos animais de diversos processos patológicos, o que nos permite deduzir que a faixa terapêutica do BCF no modelo estudado provavelmente seja similar aos encontrados por Calleja (2013), considerando que não foram relatados efeitos tóxicos com doses até 2000mg/kg (OLIVEIRA, 2018). Um ponto importante a ser ressaltado é que um efeito colateral comum e limitante dos fármacos antiepiléticos é o déficit motor observado em variados testes, inclusive no rotarod, onde tal efeito esteve ausente no tratamento com BCF nas doses estudadas (FORCELLI et al, 2012).

Além de parâmetros comportamentais, as alterações neurobioquímicas estão intimamente ligadas à fisiopatologia da epilepsia, sendo desta forma imprescindível a avaliação desses biomarcadores nesse estudo. O estresse oxidativo pode ser caracterizado por um desequilíbrio metabólico entre espécies pró-oxidantes e antioxidantes. Os agentes pró-oxidantes podem ser representados por espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), já os antioxidantes são sistemas de defesa constituídos por enzimas como, por exemplo: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona peroxidase (GSH) (PISOCHI, 2015).

O cérebro é um órgão particularmente sensível ao estresse oxidativo devido a algumas de suas características, como alto nível de oxigênio, baixa capacidade de reparo, grande número de mitocôndrias e alto teor de ácidos graxos poli-insaturados. Além disso, o cérebro mantém baixos níveis de antioxidantes, principalmente o hipocampo. Este fato aumenta a predisposição ao estresse oxidativo. (BELLISSIMO; et. al., 2001).

O beta-cariofileno tem sido estudado nesta seara, na qual a substância tem demonstrado, majoritariamente, atividade neuroprotetora. Em estudo recente, a administração de beta-cariofileno na dose de 50 mg/kg por via intraperitoneal durante quatro semanas em ratos no modelo de doença de parkinson induzido por rotenona revelou atividade neuroprotetora, sendo capaz de inibir a peroxidação lipídica, a depleção da glutatona e promover um aumento nos níveis das enzimas antioxidantes (SOD e CAT) no cérebro, bem como reduzir ativação de astrócitos e células microgliais atenuando a neuroinflamação e a produção de EROs em o sistema nervoso central (OJHA; et al., 2016). Ademais, o pré-tratamento com beta-cariofileno nas concentrações de 30 e 60 mg/ kg via i.p. de forma aguda durante dois dias em camundongos foi capaz de reduzir a atividade convulsiva induzida pelo modelo de cainato (LIU; et al., 2015). Ao analisar marcadores bioquímicos no mesmo estudo, foi possível observar que o beta-cariofileno foi capaz de aumentar a atividade de enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase (LIU; et al., 2015).

Estudos apontam que os casos de convulsão induzem a produção de ERO e ERN (GLUCK; et al., 2000; CHUANG, 2010), e que portadores de epilepsia apresentam níveis séricos elevados de malondialdeído (MDA) na maioria dos casos devido ao aumento da peroxidação lipídica da membrana (MARTINC; GRABNAR; VOVK, 2014). Tais achados corroboram com os resultados obtidos nesse estudo, uma vez que os animais tratados com salina apresentaram maiores níveis de malondialdeído, sendo que a concentração de 100 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente os níveis de MDA no hipocampo de animais submetidos ao *status epilepticus*. Segundo estudo de Calleja et al. (2013), o beta-cariofileno na concentração de 200 mg/kg administrado por via oral apresentou atividade neuroprotetora, sendo capaz de reduzir a peroxidação lipídica induzida pelo tetracloreto de carbono em ratos. Como observado no presente estudo, a dose de apenas 100 mg/kg foi capaz de reduzir os níveis de MDA no hipocampo de camundongos epiléticos induzidos por pilocarpina, sendo tal redução também obtida em doses de 200 mg/kg em diferentes estudos (CALLEJA et al, 2013). Apesar da escassez de estudos acerca da atividade neuroprotetora do BCF em modelos animais de epilepsia, considerando a ausência de uma redução significativa no grupo

BCF50 (50mg/kg), é possível inferir que possivelmente uma dose igual ou superior a 100 mg/kg seria a dose adequada para que seja atingida a redução dos níveis de MDA no hipocampo dos ratos do modelo animal estudado. Além disso, quanto às repercussões comportamentais da redução dos níveis de MDA no hipocampo, é possível relacionar o aumento significativo de *rearings* no grupo BCF100 do GNE em relação ao grupo Salina do GNE às alterações bioquímicas relacionadas à redução do estresse oxidativo no hipocampo dos camundongos do grupo BCF100 do GNE, visto que a medição de TBARS e MDA no hipocampo dos ratos do GNE Salina foi significativamente menor do que os dos ratos do grupo BCF100 do GNE. Há sólidas evidências de que a estrutura cerebral mais relacionada a tal comportamento é a formação hipocampal, sendo esta área cerebral o componente central do sistema controlador do comportamento de *rearing* em ambientes novos, significando uma medida etológica da função de aprendizagem, navegação espacial e posterior consolidação de memórias pelo hipocampo (LEVER et al, 2006).

Quanto aos níveis de nitrito e nitrato, não foram encontradas relações significativas entre os grupos, com exceção de um aumento nos níveis do grupo BCF50 do GE em relação ao grupo Salina do GNE, o que, isoladamente, é um resultado do qual não é possível depreender conclusões acertadas. Dentre os estudos que avaliaram a atividade de outras substâncias quanto aos níveis de nitrito e nitrato em modelo animal de epilepsia, há estudos que encontraram uma redução destes níveis nos grupos tratados, como no caso da *Trichosanthes tricuspidata* (SMILIN et al, 2013), o que, até onde se tem conhecimento, não foi encontrado com o uso de BCF em modelos animais de epilepsia. O estudo de CARDOSO et al encontrou redução significativa dos níveis de nitrito e nitrato no córtex pré-frontal e no corpo estriado, mas não no hipocampo, com o uso de BCF nas doses de 75 e 150 mg/kg em um modelo animal de depressão e ansiedade (CARDOSO et al, 2018). Há estudos que sugerem que o BCF atua na supregulação do fator relacionado ao fator nuclear eritóide 2 (Nrf2), promovendo transcrição gênica que estimula enzimas que reduzem o estresse oxidativo por múltiplas vias, além de outros efeitos benéficos relacionados à fisiopatologia da epilepsia, como redução da neuroinflamação, melhora do acoplamento neurovascular e do retorno ao estado de repouso neuronal (MACHADO et al, 2018). Logo, é provável que o BCF atue reduzindo o estresse oxidativo cerebral por meio da redução dos níveis de nitrito e nitrato em modelos animais, mas tal efeito não se comprovou no modelo animal de epilepsia induzida por pilocarpina. Tal modelo comprovadamente causa modificações estruturais patológicas severas a nível histológico no cérebro do animal, especialmente nas áreas CA1,

CA3 e no giro denteado, como perda neuronal intensa e presença aumentada de neurônios granulares patológicos, o que pode ser um dano que supera a capacidade neuroprotetora do BCF a curto prazo em tal modelo (CAVALHEIRO et al, 1996).

O aumento significativo nos níveis de glutathiona nos grupos tratados com 100 mg/kg no hipocampo e no córtex pré-frontal no GE é um resultado expressivo, tendo em vista que estudos anteriores que analisaram a ação do beta-cariofileno em modelo animal de epilepsia, como o estudo de Oliveira et al., 2016, não demonstraram um aumento nos níveis de GSH após o tratamento com beta-cariofileno (OLIVEIRA, 2016). Esta elevação nos níveis de GSH no grupo tratado também foi encontrada em estudos de modelos de epilepsia nos quais foram testadas outras substâncias que agem nos receptores CB2 assim como o beta-cariofileno, como a curcumina (SAUDI, 2013). O aumento de GSH em modelo de epilepsia é um resultado positivo para a possível utilização do beta-cariofileno no tratamento da doença, visto que os níveis de GSH possuem uma relação inversamente proporcional aos escores de gravidade da doença em modelo animal (SHIN et al, 2008). Quanto à dose de 50 mg/kg, ela não foi capaz de elevar os níveis de glutathiona no GE, o que advoga a favor da possibilidade de que o beta-cariofileno de fato possua uma ação neuroprotetora com ação significativa apenas a partir de 100mg/kg, como discutido anteriormente.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho apontam que o beta-cariofileno melhora a atividade motora dos animais submetidos ao teste de rotarod, uma vez que nas concentrações testadas aumentou o tempo de permanência, reduziu o número de quedas e aumentou a latência para primeira queda no grupo epilético. Além disso, o BCF apresentou uma atividade neuroprotetora, observada com a diminuição dos níveis de peroxidação lipídica no hipocampo e aumento dos níveis de glutathiona no cortex pré-frontal e hipocampo dos animais submetidos ao modelo de epileptogênese, reduzindo o estresse oxidativo cerebral e se mostrando importante na modulação de parâmetros neuroquímicos envolvidos na gênese na epilepsia. Assim, o beta cariofileno apresenta-se como uma molécula promissora para futuros estudos pré-clínicos, entretanto são necessários ensaios moleculares que venham a corroborar com os resultados encontrados neste estudo na perspectiva de elucidar uma possível via de sinalização celular ao qual essa molécula atua.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, R.N. et al. Essential oils and their constituents: Anticonvulsant activity. **Molecules**, v. 16, n. 3, p. 2726–2742, 2011.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 213, n. 3, p. 403-410, 1990.
- APP/PS1 Mice through CB2 receptor activation and the PPAR γ pathway. **Pharmacology**, v. 94, n. 1, p. 1-12, 2014.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v. 21, p. 205-235, 1973.
- ARMENTA, M. M. et al. Oxidative Stress Associated with Neuronal Apoptosis in Experimental Models of Epilepsy. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2014, p. 01-12, 2014.
- BAHI, A. et al. β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology & Behavior**, v. 135, p. 119-124, 2014.
- BEGHI, E. The epidemiology of epilepsy. **Neuro-epidemiology**, v. 1, n. 1, p. 1-7, 2019.
- BELLISSIMO, M.I. et al. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Res.** v. 46, n. 2, p.121–128, 2001.
- BEN-ARI, Y. et al. The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. **The Neuroscientist**, v. 18, n. 5, p. 467–486, 2012.
- BRASIL. Ministério da Ciência e Tecnologia. **Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008.** Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 2008.
- BRIAN, P. G.; BARABAN, S. C. Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. **Nature neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 339-343, 2015.

CALLEJA, M. A. *et al.* The antioxidant effect of β -caryophyllene protects rat liver from carbon tetrachloride-induced fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. **British Journal of Nutrition**, v. 109, n. 3, p. 394-401, 2013.

CARVALHO, C.R, *et al.* The cannabinoid CB2 receptor-specific agonist AM1241 increases pentylenetetrazole-induced seizure severity in Wistar rats. **Epilepsy Research**, v. 127, p. 160-167, 2016.

CHEN, Z. *et al.* Treatment outcomes in patients with newly diagnosed epilepsy treated with established and new antiepileptic drugs. A 30-year longitudinal cohort study. **Jama Neurology**, v. 75, n. 3, p. 279-286, 2018.

CHENG Y, DONG Z, LIU S. Beta-caryophyllene ameliorates the alzheimer-like phenotype in app/ps1 mice through cb2 receptor activation and the ppargamma pathway. **Pharmacology**, v. 94:1-12, 2014.

CHOI, I. Y. *et al.* Activation of cannabinoid CB2 receptor-mediated AMPK/CREB pathway reduces cerebral ischemic injury. **American Journal of Pathology**, v. 182, n. 3, p. 928-939, 2013.

CHUANG, Y. C. *et al.* Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in seizure-induced neuronal cell death. **Acta Neurol. Taiwanica**, v. 19, n. 1, p. 3-15, 2010.

COSTA, J.C., OLIVEIRA, M. L. K., PANTA, R. M. G. Epilepsia na infância. **Acta médica atm**, v. 142, p. 142-179, 1982.

DAHAM, S. S. *et al.* The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11808-11829, 2015.

DEVINSKY, O. *et al.* Epilepsy. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 4, p. 1-24, 2018.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as an index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.186, p. 421-431, 1990.

DUKINC, V.; BEZIC, N.; VUKO, E. Antiphytoviral activity of essential oil from endemic species *Teucrium arduini*. **Natural Products Communications**, v. 6, n. 9, p. 1385-1388, 2011.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc.**, v. 46, n. 3, p. 208-209, 1957.

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

FIDYT, K. *et al.* β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide — natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Medicine**, v. 5, n. 10, p. 3007-3017, 2016.

FIEST, K.M. et al. Prevalence and incidence of epilepsy: A systematic review and meta-analysis of international studies. **Neurology**, n. 88, v. 3, p. 296–303, 2017.

FISHER, R. S. et al. Classificação da ILAE das epilepsias: artigo da posição da Comissão de Classificação de Terminologia International League against Epilepsy. **International League Against Epilepsy (ILAE)**, v. 1, n. 1, p. 1-25, 2017.

FONSECA, D. V. et al. Anticonvulsant Essential Oils and Their Relationship with Oxidative Stress in Epilepsy. **Biomolecules**, v. 9, n. 12, p. 835, 2019.

FORCELLI, P. A. et al. Effects of neonatal antiepileptic drug exposure on cognitive, emotional, and motor function in adult rats. **J. Pharmacol Exp. Ther.**, v. 340, n. 3, p. 558–566, 2012.

FREITAS, R.M. Sistemas de Neurotransmissão Envolvidos no Modelo de Epilepsia: Uma revisão de Literatura. **Rev Neurocienc.**, v. 19, p.128-38, 2011.

GAO, B. et al. Sinomenine exerts anticonvulsant profile and neuroprotective activity in pentylenetetrazole kindled rats: involvement of inhibition of NLRP1 inflammasome. **Journal neuroinflammation**, v. 15, n. 1, p. 152, 2018.

GARCÍA-GUTIÉRREZ, M. S. et al. Chronic blockade of cannabinoid CB2 receptors induces anxiolytic-like actions associated with alterations in GABAA receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 165, n. 4, p. 951-964, 2012.

GARCIA-GUTIERREZ, M. S. *et al.* Depression-resistant endophenotype in mice overexpressing cannabinoid CB2 receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 160, n. 7, p. 1773-1784, 2010.

- GERTSCH, J. et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the national academy of sciences of the united states of America**, v. 105, n. 26, p. 9099-9104, 2008.
- GHELARDINI, C. *et al.* Local anaesthetic activity of the essential oil of *Lavandula angustifolia*. **Planta Medica**, v. 65, n. 8, p. 700-703, 1999.
- GLUCK, M. R. et al. CNS oxidative stress associated with the kainic acid rodent model of experimental epilepsy. **Epilepsy Res.**, v. 39, n. 1, p. 63–71, 2000.
- GOODMAN, L; GILMAN, A. **Manual de farmacologia e terapêutica**. 2^a Ed. Porto Alegre: AMGH editora ltda; 2015.
- GREEN, L. C. et al. Nitrate synthesis in the gerbil and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-58, 1981.
- GUARNIERE, L. O. **Estudo farmacológico, fisiológico e comportamental de ratos tratados com dose subconvulsivante de pilocarpina**. 2013. 101f. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós- Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- GUO, K. *et al.* Trans-caryophyllene suppresses hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF-κB activation in microglia. **The Journal of Molecular Neuroscience**, v. 54, n. 1, p. 41-48, 2014.
- HO, C. L. *et al.* Composition and antifungal activities of the leaf essential oil of *Neolitsea parviflora* from Taiwan. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 9, p. 1357-1360, 2011.
- HUIZENGA, M.N, et al. Anticonvulsant effect of cannabinoid receptor agonists in models of seizures in developing rats. CB1 receptor agonists as novel antiepileptic drugs targeting epilepsy. **Epilepsia**, v. 58, 1593-1602, 2017.
- JAN, L.Y.; JAN, Y.N. Voltage-gated potassium channels and the diversity of electrical signalling. **J. Physiol.**, v. 590, n. 11, p. 2591–2599, 2012.
- KATSUYAMA, S. et al. Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in β -caryophyllene-induced antinociception. **European Journal of Pain**, v. 17, n. 5, p. 664–675, 2013.

KLINK, R.; ALONSO, A. Ionic mechanisms of muscarinic depolarization in entorhinal cortex layer II neurons. **J. Neurophysiology**, v. 77, p.1829-1843, 1997.

KOBAYASHI, C. *et al.* Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 49, n. 3, p. 306-313, 2011.

KOHLING, R.; WOLFART, J. Potassium Channels in Epilepsy. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, v. 6, n. 5, p. 1-25, 2016.

KOLE, M.H.; STUART, G.J. Signal processing in the axon initial segment. **Neuron.**, n. 73, v. 2, p. 235–247, 2012.

KRAUTER, A. K.; GUEST, P. C.; SARNYAIS, Z. The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. **Methods mol boil**, v. 1916, n. 1, p. 105-111, 2019.

LACZKOWSKI, K. Z. *et al.* Synthesis and anticonvulsant activities of novel 2 (cyclopentylmethylene)hydrazinyl-1,3-thiazoles in mouse models of seizures. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 31, n. 6, p. 1576-1582, 2016.

LEE, S. K. Old versus New: Why do we need new antiepileptic drugs? **Joenal of epilepsy research**, p. 39-44, v. 4, 2014.

LEITE, J.P. *et al.* Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 14, p. 511-517, 1990.

LEVER, C.; BURTON, S.; O'KEEFE, J. Rearing on hind legs, environmental novelty, and the hippocampal formation. **Rev. Neurosci**, v. 17, n. 1, p. 111–133, 2006.

LIU, H. *et al.* Neuroprotective effects of trans-caryophyllene against kainic acid induced seizure activity and oxidative stress in mice. **Neurochem. Res.**, v. 40, n. 1, p. 118–123, 2015.

LIU, H. *et al.* Neuroprotective effects of trans-caryophyllene against kainic acid induced seizure activity and oxidative stress in mice. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 1, p. 118-123, 2015.

LIU, J. *et al.* Oxidative stress mediates hippocampal neuron death in rats after lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. **Seizure**, v. 19, n. 3, p. 165-172, 2010.

- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(Delta Delta C (T) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.
- LOIZZO, M. R. *et al.* Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. **Cell Proliferation**, v. 41, n. 6, p. 1002-1012, 2008.
- 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.
- MARES, P., KUBOVÁ, H. What is the role of neurotransmitter systems in cortical seizures? **Physiol Res.**, v.57, p. 111-120, 2008.
- MARINO JR, R. CUKIERT, A. PINHO, E. Aspectos epidemiológicos da epilepsia em São Paulo. Um estudo da prevalência. **Arq Neuropsiquiatria**, v. 44, n. 3, p. 243-254, 1986.
- MARTINC, B.; GRABNAR, I.; VOVK, T. Antioxidants as a preventive treatment for epileptic process: A review of the current status. **Curr. Neuropharmacol.**, v. 12, n. 6, p. 527–550, 2014
- MCCNAMARA, J. O. Cellular and molecular basis of epilepsy. **Neuroscience**, v. 14, n. 6, p. 3413-3425, 1994.
- MEGIDDO, I. *et al.* Health and economic benefits of public financing of epilepsy treatment in India: An agent-based simulation model epilepsy. **Full-Length Original Research**, v. 57, n.3, p. 464-474, 2016.
- MOCKUTE, D.; BERNOTIENE, G.; JUDZENTIENE, A. The essential oil of *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* growing wild in Vilnius district (Lithuania). **Phytochemistry**, v. 57, n. 1, p. 65-69, 2001.
- NELIGAN, A.; SHORVON, S. D. Frequency and prognosis of convulsive status epilepticus of different causes: a systematic review. **Arch Neurol.**, v. 67, n. 8, p. 931–940, 2010.
- NORONHA, A. L. *et al.* Prevalence and pattern of epilepsy treatment in different socioeconomic classes in Brazil. **Epilepsia**, v. 48, n. 5, p. 880-885, 2008.

OJHA, S. et al. β -Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. **Mol. Cell. Biochem**, v. 418, n. 1, p. 59–70, 2016.

OLIVEIRA, C. C. et al. Anticonvulsant activity of β -caryophyllene against pentylentetrazol-induced seizures. **Epilepsy & Behavior**, v. 56, n. 1, p. 26-31, 2016.

OLIVEIRA, C. V. et al. Effect of atorvastatin on behavioral alterations and neuroinflammation during epileptogenesis. **Epilepsy & behavior**, v. 78, n. 1, p. 109-117, 2018.

OLIVEIRA, C.C, et al. Anticonvulsant activity of b-caryophyllene against pentylentetrazol-induceds eizures. **Epilepsy e Behavior**, v. 127, n. 56, p. 26-31, 2016.

OLIVEIRA, D. R. et al. Monoamine Involvement in the Antidepressant-Like Effect of β -Caryophyllene. **CNS Neurol. Disord. Drug Targets**, v. 17, n. 4, p. 309–320, 2018.

OLIVEIRA, G. L. D. S. et al. Non-clinical toxicity of β -caryophyllene, a dietary cannabinoid: Absence of adverse effects in female Swiss mice. **Regul. Toxicol. Pharmacol**, v. 92, n. 1, p. 338–346, 2018.

OLIVEIRA, G. L. D. S. et al. Non-clinical toxicity of β -caryophyllene, a dietary cannabinoid: Absence of adverse effects in female Swiss mice. **Regul. Toxicol. Pharmacol**, v. 92, n. 1, p. 338–346, 2018.

PAHUJA. M. et al. Effect of Anacyclus pyrethrum on pentylentetrazole-induced kindling, spatial memory, oxidative stress and rho-kinase II expression in mice. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 3, p. 547-556, 2013.

PAREDES, G. Recent Advances in the Neurochemistry of Epilepsy. **Epilepsy**, p. 96-98, 2008.
PARENT, J.M. et al. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. **Journal Neuroscience**. v.17, n. 10, p. 3727–3738, 1997.

PAULETTI, A. et al. Targeting oxidative stress improves disease outcomes in a rat model of acquired epilepsy. **Brain**, v. 142, n. 7, p. 1-15, 2019.

PEARSON-SMITH, J; PATEL, M. Metabolic dysfunction and oxidative stress in epilepsy. **Int. J. Mol. Sci**, v. 18, n. 11, p. 2365-2394, 2017.

PISOCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 97, n. 01, p. 55–74, 2015.

PITANEN, A.; SCHWARTZKROIN, P. A.; MOSHE, S. L. Models of seizures and epilepsy. **Elsevier**, 2005.

PORSOLT, R. D. et al. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, p. 730-732, 1977.

SANABRIA, E. R. G. et al. Damage, reorganization, and abnormal neocortical hyperexcitability in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 43, n. 5, p. 96-106, 2002.

SANABRIA, E. R. G.; CAVALHEIRO, E. A. Epileptogênese: Contribuição dos modelos experimentais. In **Epilepsia**. GM.M. Guerreiro C A M, Cendes F, Lopes-Cendes. São Paulo, Lemos editorial & Gráficos Ltda, p.29-57,2000.

SANKARANI, R; LACHHWANI, D. Antiepileptic drugs - a review. **Pediatric annals**, v. 44, n. 2, p. 36-42, 2015.

SAUDI, M. A. Protective effects of curcumin against lithium–pilocarpine induced status epilepticus, cognitive dysfunction and oxidative stress in young rats. **J Biol Sci**, v. 20, n. 2, p. 155–162, 2013.

SCHMITT, D.; LEVY, R.; CARROLL, B. Toxicological Evaluation of β -Caryophyllene Oil. **International Journal of Toxicology**, v. 35, n. 6, 2016.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the open field maze to measure locomotor and Anxiety-like behavior in mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 96, n. 1, p. 524-534, 2015.

SELDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Anal. Biochem**, v. 25, p. 192-205, 1988.
SENDROWSKI, K; SOBANIEC, W. Hippocampus, hippocampal sclerosis and epilepsy. **Pharmacological Reports**, v. 65, p. 555-565, 2013.

SHAFAGHAT, A. Antibacterial activity and GC/MS analysis of the essential oils from flower, leaf and stem of *Origanum vulgare* ssp. *viride* growing wild in north-west Iran. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 9, p. 1351-1352, 2011.

SHAN, J.; CHEN, L.; LU, K. Protective effects of trans-caryophyllene on maintaining osteoblast function. **Iubmb Life**, v. 69, n. 1, p. 22-29, 2017.

SHIN, E. J. et al. Role of glutathione peroxidase in the ontogeny of hippocampal oxidative stress and kainate seizure sensitivity in the genetically epilepsy-prone rats. **Neurochem Int**, v. 52, n. 6, p. 1134-1147, 2008.

SILVA, A. V; CABRAL, F. R. Ictogênese, epileptogênese e mecanismo de ação das drogas na drofilaxia e tratamento da epilepsia. **Journal epilepsy clinical neurophysiol**, v. 14, n. 2, p. 39-45, 2008.

SMILIN, B. A. G. et al. *Trichosanthes tricuspidata* modulates oxidative toxicity in brain hippocampus against pilocarpine induced status epilepticus in mice. **Neurochem Res.**, v. 38, n. 8, p. 1715-1725, 2013.

SNYDER, J.S. et al. Adult-born hippocampal neurons are more numerous, faster maturing, and more involved in behavior in rats than in mice. **Journal Neuroscience**, v. 29, n. 46, p. 14484–14495, 2009.

THOMAS, R.H; BERKOVIC, S. F. The hidden genetics of epilepsy—a clinically important new paradigm. **Nature Review Neurology**, v.10, n. 5, p. 283-292, 2014.

TRINKA, E. et al. A definition and classification of status epilepticus report of the ILAE task force on classification of status epilepticus. **Epilepsia**, v. 56, n. 10, p. 1515–1523, 2015.

TURSKI, W. A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, v. 9, p.315-35, 1983.

WAHAB, A. Difficulties in treatment and management of epilepsy and Challenges in new drug development. **Pharmaceutical**, v. 3, n. 1, p. 2090-2110, 2010.

ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, v. 18, n. 5, p. 821-829, 2008.

ANEXO 01- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM USO DE ANIMAIS – CEUA



Universidade Federal do Ceará – *Campus Sobral*
 Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Rua: Av. Comte. Maurício Rocha Pontes, 100, Derby
 CEP: 62.042-280 Sobral-CE
 Fone/Fax: (88) 3611.8000

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada: **Investigação do efeito antiepilético do β -cariofileno no modelo de epileptogênese induzida por pilorcapina em camundongos**, registrada com o nº 08/18, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Carla Thiciane Vasconcelos de Melo** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) *Campus Sobral*, em reunião de 06/09/2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	06/09/2018 até 01/03/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongos heterogênico Swiss
Nº de animais	186
Peso/Idade	25-30 g / 2-3 meses
Sexo	♂
Origem	Biotério Central de Fortaleza

Sobral, 13 de setembro de 2018.

Prof. Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA