



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

JOÃO VICTOR SOUZA OLIVEIRA

**ESTUDO DOS EFEITOS NEUROPROTETORES DO EXTRATO
HIDROALCOOLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA EM MODELOS DE
CONVULSÃO INDUZIDOS QUIMICAMENTE EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA

2020

JOÃO VICTOR SOUZA OLIVEIRA

ESTUDO DOS EFEITOS NEUROPROTETORES DO EXTRATO HIDROALCOOLICO DE
PRÓPOLIS VERMELHA EM MODELOS DE CONVULSÃO INDUZIDOS
QUIMICAMENTE EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestre em Farmacologia. Área de concentração: Neurofarmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles.

FORTALEZA

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)

- O47e Oliveira, João Victor Souza.
Estudo dos efeitos neuroprotetores do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha em modelos de convulsão induzidos quimicamente em camundongos / João Victor Souza Oliveira. – 2020.
95 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2020.
Orientação: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles .
1. Epilepsia . 2. Própolis vermelha brasileira . 3. Inflamação. I. Título.

CDD 615.1

JOÃO VICTOR SOUZA OLIVEIRA

ESTUDO DOS EFEITOS NEUROPROTETORES DO EXTRATO HIDROALCOOLICO DE
PRÓPOLIS VERMELHA EM MODELOS DE CONVULSÃO INDUZIDOS
QUIMICAMENTE EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito à obtenção do título de Mestrado em Farmacologia. Área de concentração: Neurofarmacologia.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Jamile Magalhães Ferreira
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

A Deus.

Aos meus pais, Regiane e Orlando.

AGRADECIMENTOS

Ao meu amado **Deus** por ter me cedido o dom da Vida. Obrigado meu Deus por acompanhar cada passo meu e por nunca me abandonar. Você me mostrou o amor mais genuíno, me deu forças e coragem para continuar sempre. Sem o senhor nada disso seria possível.

Aos meus pais, **Regiane** e **Orlando**, e meu irmão **Matheus** por serem a minha base e o meu motivo maior de amor. Vocês são o que eu tenho de mais precioso e importante na minha vida.

Ao meu amigo **Daniel Moreira** por ser não apenas o meu companheiro de pós-graduação, mas da vida. Obrigado por tantos momentos compartilhados e por todas as viagens realizadas juntos. Amo você.

Às amigas **Luciana de Vasconcelos**, **Daisy Lima** e **Larisse Marques** pela amizade construída e por todos os momentos divertidos e de aprendizado vividos juntos.

As minhas amigas do ensino médio **Juliana Maria** e **Paloma Ferreira** por todos os momentos compartilhados e pelo apoio de sempre. Amo vocês.

À amiga **Michele de Carvalho** por ser uma das melhores pessoas que eu conheço. Sou muito grato por ter conhecido alguém como você. Um agradecimento especial a você e a sua amizade que é tão importante para mim.

A minha querida Orientadora **Maria de França Fonteles** por ser um exemplo incrível de ser humana e profissional. Obrigado por todos os ensinamentos e pela amizade que foi estabelecida. Sou muito grato em fazer parte do seu grupo de Pesquisa. Agradeço a Deus por existir pessoas tão boas e com um coração tão grande como o seu no mundo. Um agradecimento especial a grande professora e pesquisadora que és.

Às professoras **Cléa Florenço** e **Jamile Magalhães** por terem aceitado fazer da minha banca de dissertação e ao professor **Said Gonçalves** por toda a ajuda na execução desse projeto.

A todos do Laboratório de Neurofarmacologia pela amizade e colaboração.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuem com meu crescimento e tornam a minha caminhada mais leve e feliz!

“Não importa o que aconteça, continue a nadar.” (Walters Graham; **Procurando Nemo**, 2003)

RESUMO

A epilepsia é um distúrbio neurológico que atinge aproximadamente 1% da população mundial e que pode levar a déficit cognitivo, disfunção neuronal, problemas comportamentais e sociais. Essa doença é capaz de gerar crises convulsivas recorrentes, onde atualmente 30 a 40% de todos os pacientes não respondem a nenhum tipo de terapia. Estudos prévios demonstram que a convulsão está relacionada positivamente com vias inflamatórias e pró-oxidantes, podendo ser tanto a causa como a consequência. A própolis vermelha proveniente de colmeias localizadas nos caules dos arbustos de manguezais situados no Nordeste do Brasil é rica em flavonoides com atividades anti-inflamatória e antioxidante comprovadas. Pesquisas anteriores comprovaram a atividade neuroprotetora do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha (EHPV). O objetivo deste trabalho foi estudar o potencial neuroprotetor e anticonvulsivante do EHPV em camundongos submetidos aos modelos de convulsão induzidos por pilocarpina (PILO) e pentilenotetrazol (PTZ). Camundongos Swiss machos (20-29g) foram pré-tratados com o EHPV (10 e 100 mg/kg, ip., n= 8) em tratamento com doses repetidas por 7 dias. Meia hora após a última dose de EHPV foram induzidas as convulsões nos animais através da administração de PILO 400 mg/kg, i.p. ou PTZ 85 mg/kg i.p. Na análise comportamental foram avaliados os parâmetros: latência de primeira convulsão, intervalo entre a primeira convulsão e a morte e latência de morte. Após os testes, as áreas cerebrais: córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foram dissecadas. Foram mensurados parâmetros de estresse oxidativo: malondialdeído, nitrito e glutathiona reduzida (GSH) e foi realizada a dosagem de IL-1 β . O projeto foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) protocolado sob o CEUA nº 1057050220. Os resultados demonstraram que o EHPV nas duas doses testadas, 10 e 100 mg/kg foi capaz de aumentar significativamente os parâmetros comportamentais: latência de primeira convulsão, intervalo entre a primeira convulsão e a morte e latência de morte nos animais submetidos aos dois modelos de convulsão (PTZ e PILO) avaliados nesse estudo. Além disso, o EHPV 10 e 100 mg/kg, reduziu significativamente a peroxidação lipídica e os níveis de nitrito, bem como foi capaz de aumentar de forma considerável os níveis de glutathiona reduzida nas três áreas cerebrais estudadas, nos animais submetidos aos modelos de convulsão induzidos por PTZ e PILO. Na avaliação da atividade anti-inflamatória, o EHPV diminuiu consideravelmente os níveis de IL-1 β no hipocampo dos animais que receberam injeções dos agentes indutores de convulsões, PTZ e PILO. Espera-se que esses dados ampliem as informações sobre o papel da inflamação e do estresse oxidativo nas crises convulsivas e sobre o papel anticonvulsivante e neuroprotetor do EHPV. Os resultados obtidos nesse estudo poderão abrir perspectivas para o desenvolvimento de abordagens farmacoterapêuticas novas e efetivas para a epilepsia e sobre possíveis mecanismos de ação do EHPV e de seus constituintes.

Palavras-chave: Epilepsia. Própolis vermelha Brasileira. Inflamação.

ABSTRACT

STUDY OF THE NEUROPROTECTIVE EFFECTS OF THE RED PROPOLIS HYDROALCOHOLIC EXTRACT ON CHEMICALLY INDUCED CONVULSION MODELS IN MICE

Epilepsy is a neurological disorder that affects approximately 1% of the world population and can lead to cognitive deficit, neuronal dysfunction, behavioral and social problems. This disease is capable of generating recurrent seizures, where currently 30 to 40% of all patients do not respond to any type of therapy. Previous studies have shown that the seizure is positively related to inflammatory and pro-oxidant pathways, which can be both the cause and the consequence. Red propolis from hives located on the stems of mangrove shrubs located in Northeastern Brazil is rich in flavonoids with proven anti-inflammatory and antioxidant activities. Previous research has proven the neuroprotective activity of the hydroalcoholic extract of red propolis (EHPV). The objective of this work was to study the neuroprotective and anticonvulsant potential of EHPV in mice submitted to the seizure models induced by pilocarpine (PILO) and pentylenetetrazole (PTZ). Male Swiss mice (20-29g) were pre-treated with EHPV (10 and 100 mg / kg, ip., N = 8) in repeated dose treatment for 7 days. Half an hour after the last dose of EHPV, seizures were induced in the animals by administering PILO 400 mg / kg, i.p. or PTZ 85 mg / kg i.p. In the behavioral analysis, the parameters were evaluated: first seizure latency, interval between the first seizure and death and death latency. After the tests, the brain areas: prefrontal cortex, hippocampus and striatum were dissected. Oxidative stress parameters were measured: malondialdehyde, nitrite and reduced glutathione (GSH) and IL-1 β was measured. The project was approved by the Animal Use Ethics Committee (CEUA) of the Federal University of Ceará (UFC) filed under CEUA n° 1057050220. The results showed that the EHPV in the two tested doses, 10 and 100 mg / kg was able to significantly increase behavioral parameters: first seizure latency, interval between first seizure and death and death latency in animals submitted to the two seizure models (PTZ and PILO) evaluated in this study. In addition, EHPV 10 and 100 mg / kg, significantly reduced lipid peroxidation and nitrite levels, as well as being able to considerably increase the levels of reduced glutathione in the three brain areas studied, in animals submitted to seizure models. induced by PTZ and PILO. In assessing anti-inflammatory activity, EHPV considerably decreased the levels of IL-1 β in the hippocampus of animals that received injections of seizure-inducing agents, PTZ and PILO. These data are expected to expand information on the role of inflammation and oxidative stress in seizures and on the anticonvulsant and neuroprotective role of EHPV. The results obtained in this study may open perspectives for the development of new and effective pharmacotherapeutic approaches for epilepsy and about possible mechanisms of action of EHPV and its constituents.

Keywords: Epilepsy. Brazilian red propolis. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Classificação dos Tipos de Crises da ILAE 2017: Esquema simplificado	18
Figura 2	– Classificação dos Tipos de Crises da ILAE 2017: Esquema expandido	18
Figura 3	– Estrutura do receptor GABA _A	21
Figura 4	– Síntese, liberação, degradação e recaptação da ACh na fenda sináptica	22
Figura 5	– Receptores colinérgicos muscarínicos	23
Figura 6	– Principais células e mediadores inflamatórios relacionados com o processo convulsivo	29
Figura 7	– Colmeia de abelhas em apiário na cidade de Marechal, Deodoro, Alagoas.....	34
Figura 8	– Estrutura química básica dos flavonoides e de algumas subclasses	35
Figura 9	– Estrutura química dos flavonoides isoliquiritigenina, vestitol e neovestitol	36
Figura 10	– Estrutura química do flavonoide formononetina	37
Figura 11	– Linha do tempo do protocolo experimental.....	44
Figura 12	– Modelo de convulsão induzido por PTZ	45
Figura 13	– Modelo de convulsão induzido por PILO	46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	– Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a latência de primeira convulsão induzida por PTZ (85mg/kg)	50
Gráfico 2	– Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a latência de morte induzida por PTZ (85 mg/kg)	51
Gráfico 3	– Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) no intervalo de tempo entre a primeira convulsão e a morte dos animais submetidos ao modelo de convulsão induzido por PTZ (85 mg/kg)	52
Gráfico 4	– Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a latência de primeira convulsão induzida por PILO (400 mg/kg)	53
Gráfico 5	– Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a latência de morte induzida por PILO (400 mg/kg)	54
Gráfico 6	– Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) no intervalo de tempo entre a primeira convulsão e a morte dos animais submetidos ao modelo de convulsão induzido por PILO (400 mg/kg)	55
Gráfico 7	– Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a dosagem de malondialdeído (MDA) no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado de animais submetidos ao modelo de convulsão induzido por PTZ	57
Gráfico 8	– Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a dosagem de nitrito/nitrato no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado de animais submetidos ao modelo de convulsão induzido por PTZ	59
Gráfico 9	– Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a dosagem de GSH no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado de animais submetidos ao modelo de convulsão induzido por PTZ	61
Gráfico 10	– Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a dosagem de MDA no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado de animais submetidos ao modelo de convulsão induzido pela pilocarpina	63
Gráfico 11	– Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a dosagem de nitrito/nitrato no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado de animais	

submetidos ao modelo de convulsão induzido pela pilocarpina	65
Gráfico 12 – Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a dosagem de GSH no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado de animais submetidos ao modelo de convulsão induzido pela pilocarpina	67
Gráfico 13 – Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a dosagem de IL-1 β no hipocampo de animais submetidos ao modelo de convulsão induzido por PTZ	68
Gráfico 14 – Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a dosagem de IL-1 β no hipocampo de animais submetidos ao modelo de convulsão induzido por PILO	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Drogas utilizadas no tratamento dos animais, preparo e via de administração	42
Tabela 2 – Descrição dos grupos experimentais.....	43
Tabela 3 – Parâmetros comportamentais observados nos animais que receberam PTZ..	46
Tabela 4 – Parâmetros comportamentais observados nos animais que receberam PILO	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
BDZ	Benzodiazepínicos
CE	Corpo Estriado
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CG	Cromatografia Gasosa
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CPF	Córtex Pré-Frontal
DFF	Departamento de Fisiologia e Farmacologia
EEG	Eletroencefalograma
EHPV	Extrato Hidroalcoólico de Própolis Vermelha
Enos	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EO	Estresse Oxidativo
EPM	Erro Padrão da Média
ESI-MS	Espectrometria de Massa com Ionização por Electrospray
FDA	Food and Drug Administration
FIRES	Síndrome de Epilepsia Relacionada à Infecção Febril
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
GAD	Glutamato Descarboxilase
GSH	Glutationa Reduzida
GSSG	Dissulfeto de Glutationa
HP	Hipocampo
INPI	Instituto Nacional de Propriedade Industrial

ILAE	Liga Internacional Contra Epilepsia
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-1R	Receptor de Interleucina-1 beta
Inos	Óxido Nítrico Sintase Induzida
i.p.	Intraperitoneal
JNM	Junção Neuromuscular
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDA	Malondialdeído
MEFS	microextração em Fase Sólida
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
Nnos	Óxido Nítrico Neural
PILO	Pilocarpina
PTZ	Pentilenotetrazol
PVB	Própolis Vermelha Brasileira
RCM	Receptores Colinérgicos Muscarínicos
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TNBS	Ácido Trinitrobenzeno Sulfônico
UFC	Universidade Federal do Ceará
v.o.	Via Oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Epilepsia e convulsão	17
1.2	Sistemas de neurotransmissão e o processo convulsivo	20
<i>1.2.1</i>	<i>Neurotransmissão GABAérgica</i>	20
<i>1.2.2</i>	<i>Neurotransmissão colinérgica</i>	22
1.3	Modelos experimentais de convulsão	24
1.4	Processo convulsivo e Estresse oxidativo	25
1.5	Processo convulsivo e Neuroinflamação	28
1.6	Produtos Naturais	31
1.7	Própolis	32
1.8	Própolis Vermelha Brasileira	33
<i>1.8.1</i>	<i>Composição Química</i>	34
<i>1.8.2</i>	<i>Propriedades biológicas e Farmacológicas</i>	36
<i>1.8.3</i>	<i>Perfil toxicológico</i>	38
2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	39
3	OBJETIVOS	41
4	METODOLOGIA	42
4.1	Animais	42
4.2	Drogas	42
4.3	Extrato Hidroalcólico de Própolis Vermelha	42
4.4	Protocolo experimental	43
4.5	Avaliação comportamental	45
<i>4.5.1</i>	<i>Modelo de convulsão induzido por PTZ</i>	45
<i>4.5.2</i>	<i>Modelo de convulsão induzido por PILO</i>	46
4.6	Avaliação Neuroquímica	47
<i>4.6.1</i>	<i>Dissecação da áreas cerebrais</i>	47
<i>4.6.2</i>	<i>Determinação dos parâmetros de estresse oxidativo</i>	47
<i>4.6.2.1</i>	<i>Determinação dos níveis de nitrito/nitrato</i>	47
<i>4.6.2.2</i>	<i>Determinação da peroxidação lipídica</i>	48
<i>4.6.2.3</i>	<i>Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)</i>	48
4.7	Avaliação da atividade anti-inflamatória do EHPV	48

4.7.1	<i>Determinação da concentração de IL-1β</i>	49
4.8	Princípios Éticos	49
4.9	Análise estatística	49
5	RESULTADOS	50
5.1	Avaliação comportamental	50
5.1.1	<i>Efeito da administração do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) sobre as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ)</i>	50
5.1.1.1	<i>Latência de primeira convulsão</i>	50
5.1.1.2	<i>Latência de morte</i>	51
5.1.1.3	<i>Intervalo de tempo entre a primeira convulsão e a morte</i>	51
5.1.2	<i>Efeito da administração do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) sobre as convulsões induzidas por pilocarpina (PILO)</i>	52
5.1.2.1	<i>Latência de primeira convulsão</i>	52
5.1.2.2	<i>Latência de morte</i>	53
5.1.2.3	<i>Intervalo de tempo entre a primeira convulsão e a morte</i>	54
5.2	Avaliação neuroquímica	56
5.2.1	<i>Efeito da administração do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) sobre os marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo e de defesa antioxidante no cérebro de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol (PTZ)</i>	56
5.2.1.1	<i>Grau de peroxidação lipídica no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado, por meio da dosagem de malondialdeído (MDA)</i>	56
5.2.1.2	<i>Níveis de nitrito/nitrato no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado</i>	58
5.2.1.3	<i>Níveis de glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado</i>	60
5.2.2	<i>Efeito da administração do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) sobre os marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo e de defesa antioxidante no cérebro de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzido por pilocarpina (PILO)</i>	62
5.2.2.1	<i>Grau de peroxidação lipídica no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado, por meio da dosagem de malondialdeído (MDA)</i>	62
5.2.2.2	<i>Níveis de nitrito/nitrato no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado</i>	64

5.2.2.3	<i>Níveis de glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado</i>	66
5.3	Avaliação da resposta anti-inflamatória	68
5.3.1	<i>Efeito da administração do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) na resposta inflamatória no hipocampo, por meio da dosagem de IL-1β em camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol (PTZ)</i>	68
5.3.2	<i>Efeito da administração do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) na resposta inflamatória no hipocampo, por meio da dosagem de IL-1β em camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzido por pilocarpina (PILO)</i>	69
6	DISCUSSÃO	70
7	CONCLUSÃO	77
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
	REFERÊNCIAS	79
	ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia e convulsão

A epilepsia é um distúrbio neurológico crônico com quadro clínico caracterizado por crises convulsivas recorrentes, principalmente imprevisíveis (FISHER *et al.*, 2017). Essa doença afeta aproximadamente 50 milhões de pessoas em todo o mundo (prevalência: 0,5%), representando um grande transtorno para os próprios pacientes, bem como para seus cuidadores e parentes (WILLEMS *et al.*, 2018; WILLEMS *et al.*, 2018a; VOS *et al.*, 2016; RIECHMANN *et al.*, 2015; RIECHMANN *et al.*, 2019).

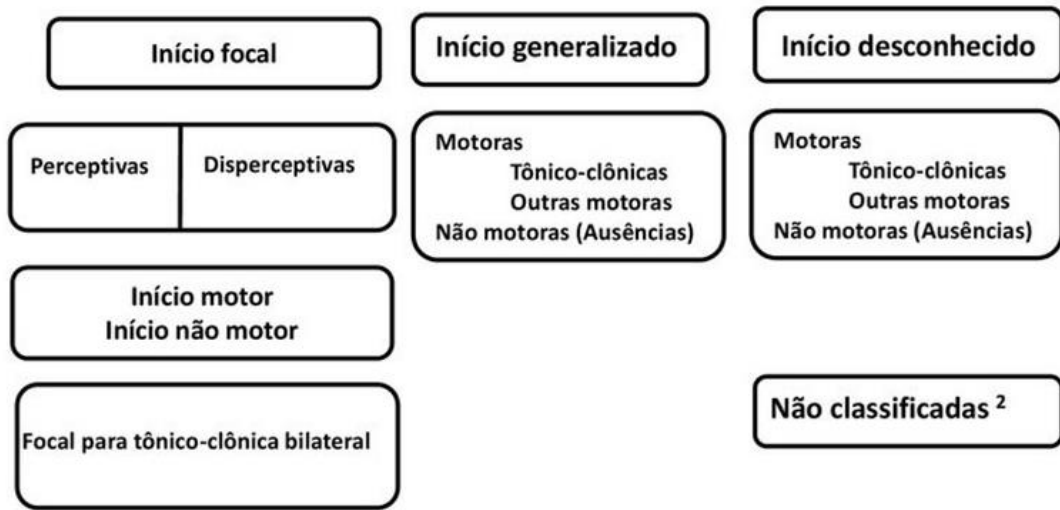
As crises convulsivas consistem em alterações paroxísticas anormais na atividade elétrica dos neurônios e estão, geralmente, relacionadas à um desequilíbrio nas redes cerebrais excitatórias e inibitórias (GOLDBERG *et al.*, 2013). As células da glia também desempenham um papel importante na geração de processos convulsivos, uma vez que elas são responsáveis por modular a função neural, restaurando a homeostase dos íons, bem como dos neurotransmissores glutamato e ácido gama-aminobutírico (GABA). (ROBEL *et al.*, 2015)

Muitas outras causas subjacentes à disfunção cerebral podem levar à ocorrência de convulsões e ao desenvolvimento de epilepsia, como malformações cerebrais, infecções do sistema nervoso central (SNC), trauma, acidente vascular cerebral e mutações genéticas. Entratanto, em muitos pacientes a causa da epilepsia ainda permanece não identificada. (SCHEFFER *et al.*, 2017)

As crises convulsivas podem ser classificadas de acordo a etiologia, a idade de início e a topografia cerebral em que ocorrem as descargas, baseando-se, por exemplo, nas manifestações clínicas e eletroencefálicas. Até recentemente, a classificação mais utilizada ainda era a de 1989 proposta pela Liga Internacional Contra Epilepsia (ILAE – International League Against Epilepsy) que divide as crises em parciais e generalizadas. As crises são consideradas parciais quando as descargas neuronais começam em regiões corticais localizadas, podendo generalizar-se, e são consideradas generalizadas quando iniciam em ambos os hemisférios cerebrais (COMISSION, 1989; GUILHOTO *et al.*, 2011).

Em 2017, a ILAE propôs uma classificação operacional (prática) revisada dos tipos de crises convulsivas representada em esquemas simplificado (figura 1) e expandido (Figura 2). O objetivo principal da nova classificação é reconhecer que alguns tipos de crises podem ter um início focal ou generalizado e, desta forma, permitir a classificação da crise quando o início dela não é observado (FISHER *et al.*, 2017).

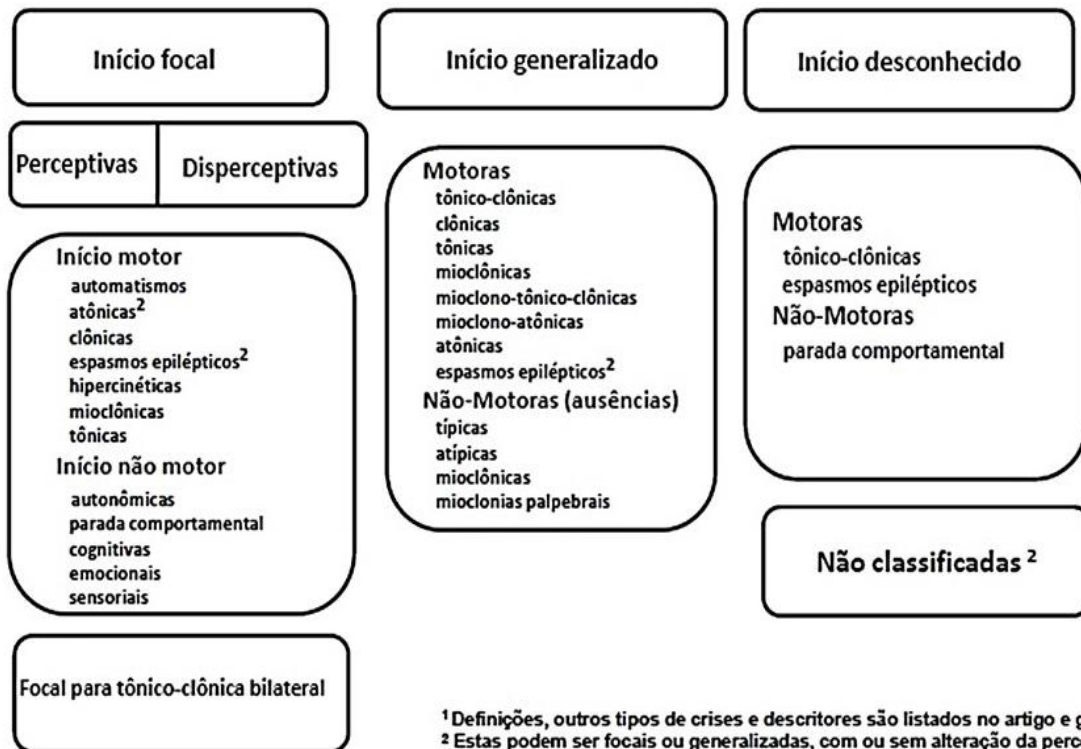
Figura 1 – Classificação dos Tipos de Crises da ILAE 2017: Esquema simplificado.



¹ Definições, outros tipos de crises e descritores estão listados no artigo e no glossário de termos
² Por informação inadequada ou impossibilidade de inserir nas outras categorias

Fonte: adaptado de Fisher *et al.*, (2017)

Figura 2 – Classificação dos Tipos de Crises da ILAE 2017: Esquema expandido.



¹ Definições, outros tipos de crises e descritores são listados no artigo e glossário de termos
² Estas podem ser focais ou generalizadas, com ou sem alteração da perceptividade
³ Por informação inadequada ou impossibilidade de inserir nas outras categorias

Fonte: adaptado de Fisher *et al.*, (2017).

A classificação de 2017 baseia-se na classificação de 1981 que foi estendida em 2010. Nessa nova classificação operacional ocorreram as seguintes alterações: (1) as crises “parciais” passaram a ser denominadas de crises focais; (2) o nível de consciência passou a ser utilizado como um classificador de convulsões focais; (3) alguns termos, como “parcial simples”, “parcial complexo” e “generalização secundária” foram eliminados; (4) novos tipos de crises focais incluem as subclassificações: automatismos, parada de comportamento, hipercinético, autonômico, cognitivo e emocional; (5) espasmos atônicos, clônicos, mioclônicos e convulsões tônicas podem ser de início focal ou generalizado; (6) convulsão tônico-clônica focal bilateral passou a substituir a convulsão generalizada secundária; (7) foram incluídos os novos tipos de crises generalizadas: ausência com mioclonia palpebral, ausência mioclônica, mioclônico-atônica, mioclônico-tônico-clônica; (8) as convulsões de início desconhecido podem apresentar características que podem ainda ser classificadas. Essa nova classificação não representa uma mudança fundamental, mas permite maior flexibilidade e transparência na caracterização dos tipos de crises (FISHER *et al.*, 2017).

A fisiopatologia da epilepsia tem sido amplamente investigada, resultando na identificação de diversas alterações moleculares e celulares que ocorrem no cérebro após lesões cerebrais agudas em modelos animais de convulsão e epilepsia (DEVINSKY *et al.*, 2018). Esses estudos pré-clínicos têm revelado alterações moleculares comuns na epilepsia desencadeada por causas diferentes, como acidente vascular cerebral, neurotrauma, convulsão febril e não-febril, dentre outros, que contribuem para o tratamento da epilepsia e, dessa forma, representam potenciais alvos para o desenvolvimento de novos medicamentos e para o redirecionamento de fármacos. (TERRONE *et al.*, 2020).

A incidência de epilepsia na população ocidental é de 1 caso para cada 2.000 pessoas ao ano. A incidência da doença é maior no primeiro ano de vida e aumenta novamente após os 60 anos de idade. A probabilidade de um indivíduo desenvolver epilepsia ao longo da vida é de cerca de 10 %, sendo que metade dos casos ocorrerá durante a infância ou adolescência (SILVA *et al.*, 2013).

Estima-se que em cerca de 30 a 40% dos pacientes diagnosticados com epilepsia no mundo, as convulsões não podem ser controladas adequadamente com medicamentos antiepiléticos, ou seja, esses indivíduos possuem epilepsia resistente à medicamentos. (JOBST *et al.*, 2015; ENGEL *et al.*, 2018).

Os modelos experimentais de convulsão realizados em ensaios pré-clínicos com ratos ou camundongos reproduzem alterações comportamentais e eletroencefalográficas que são semelhantes às que ocorrem na epilepsia em humanos. Esses modelos são utilizados com

a finalidade de estudar o envolvimento dos sistemas de neurotransmissores como moduladores da epileptogênese. Além disso, esses modelos experimentais permitem avaliar as alterações comportamentais, histopatológicas, e outros dados neuroquímicos relacionados ao processo convulsivo (CAVALHEIRO *et al.*, 1994, MARINHO *et al.*, 1997; MARINHO *et al.*, 1998).

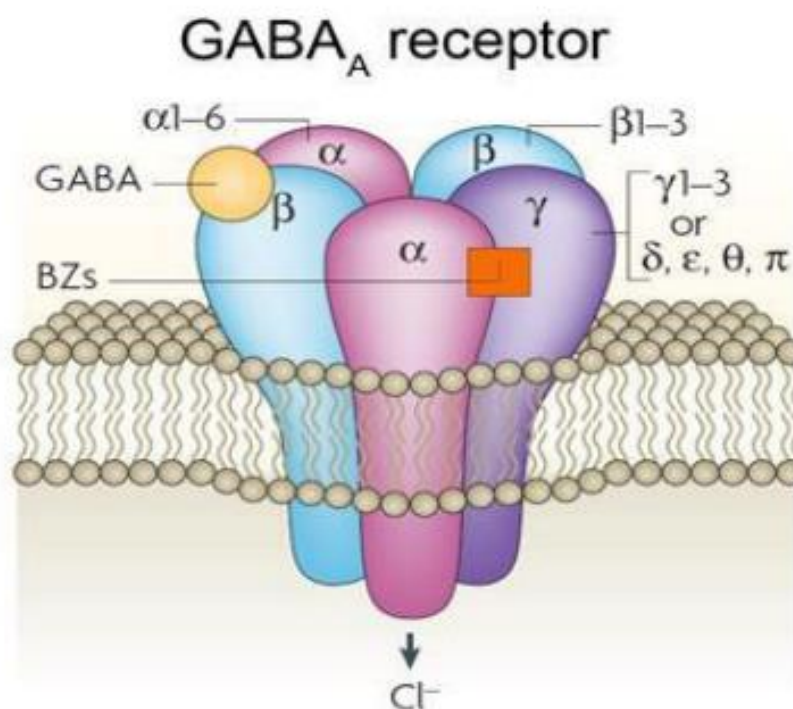
1.2 Sistemas de neurotransmissão e o processo convulsivo

1.2.1 Neurotransmissão GABAérgica

O ácido γ -aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central (encéfalo e medula espinhal) de vertebrados. É sintetizado a partir do aminoácido L-glutamato pela ação da enzima glutamato descarboxilase (GAD) que é encontrada apenas em neurônios que sintetizam este neurotransmissor no cérebro. O GABA, após ser sintetizado é armazenado dentro de vesículas e, quando liberado na fenda sináptica, ele se liga aos seus receptores causando hiperpolarização, devido ao influxo de Cl^- ou ao efluxo de K^+ nos neurônios pós-sinápticos (ROBERTS *et al.*, 1976). Esse neurotransmissor exerce um importante papel no sistema nervoso central, uma vez que atua na prevenção da excitação neuronal excessiva causada principalmente pelo glutamato (KANDEL *et al.*, 2014).

O neurotransmissor GABA atua em três tipos de receptores: GABA_A e GABA_C que são classificados como receptores ionotrópicos e GABA_B que é um receptor metabotrópico. (RUBINSON; LANG, 2009). Os receptores GABA_A e GABA_C são canais iônicos que permitem o influxo de Cl^- levando a um processo de hiperpolarização localizada na membrana neuronal, dificultando, dessa forma, a ocorrência do potencial de ação que é necessário para a liberação de diversos neurotransmissores. O receptor GABA_A possui uma estrutura pentamérica formada por cinco subunidades, sendo duas α , duas β e uma subunidade γ ou δ (Figura 3). Várias substâncias, agonistas ou antagonistas, se ligam em diferentes regiões deste receptor. Os receptores GABA_B agem por meio da ativação dos canais de K^+ , através de segundos mensageiros gerando uma hiperpolarização dos neurônios pós-sinápticos. Além disso, esses receptores, quando ativados, reduzem a condutância de Ca^{2+} (GOODMAN; GILMAN, 2012).

Figura 3 – Estrutura do receptor GABA_A .



Fonte: Jacob *et al.*, (2003).

Os receptores do tipo GABA_A possuem maior importância devido ao seu papel central na regulação da excitabilidade neuronal, através de seus efeitos inibitórios. Além disso, muitas drogas importantes, como os benzodiazepínicos (BDZ) apresentam diversos efeitos relacionados com as funções deste receptor, tais como a sedação, a hipnose, a redução da ansiedade e da agitação psicomotora, a redução do tônus muscular e da coordenação, efeitos anticonvulsivantes, além de causar amnésia anterógrada. Todos estes efeitos promovidos pelos fármacos benzodiazepínicos acontecem por conta da potencialização da resposta ao neurotransmissor GABA, uma vez que essa classe de fármacos é capaz de facilitar a abertura dos canais de cloreto ativados pelo GABA. Os BDZ se ligam especificamente em um sítio regulador do receptor GABA_A, que é diferente do sítio ligante do neurotransmissor GABA, e agem de modo alostérico aumentando a afinidade do GABA pelo receptor (BOWERY, 1993).

Os neurônios que contêm em suas vesículas o neurotransmissor GABA são considerados os principais neurônios com ação inibitória no cérebro e constituem a maior parte dos interneurônios que formam o hipocampo (FUKUDA *et al.*, 1997).

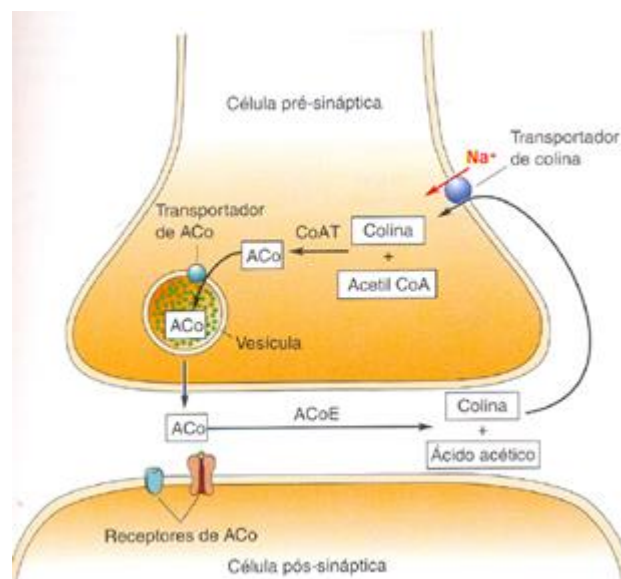
Vários estudos demonstram a participação do sistema GABAérgico na manutenção e/ou propagação da epilepsia em humanos, sendo a diminuição da inibição GABAérgica e o aumento da excitação glutamatérgica alguns dos principais mecanismos

envolvidos na geração de crises convulsivas. Quando a inibição ocasionada pela ação do GABA não é suficiente para controlar o aumento da excitação glutamatérgica, as descargas avançam e dão origem às crises epilépticas espontâneas e recorrentes (KANDEL *et al.*, 2014).

1.2.2 Neurotransmissão colinérgica

A acetilcolina (ACh), sintetizada a partir da acetil coenzima A e colina, é um neurotransmissor que atua em sinapses no sistema nervoso central (SNC), estando presente em neurônios do córtex pré-frontal que se projetam para regiões como neocórtex e hipocampo. Além disso, esse neurotransmissor exerce funções em sinapses no sistema nervoso periférico (SNP) e na junção neuromuscular (JNM). A ACh, seus receptores e as enzimas envolvidas na sua síntese e degradação (Figura 4) constituem o sistema de neurotransmissão colinérgica (RUBINSON; LANG, 2009; BRUNEAU, AKAABOUNE, 2006).

Figura 4 - Síntese, liberação, degradação e recaptção da ACh na fenda sináptica.



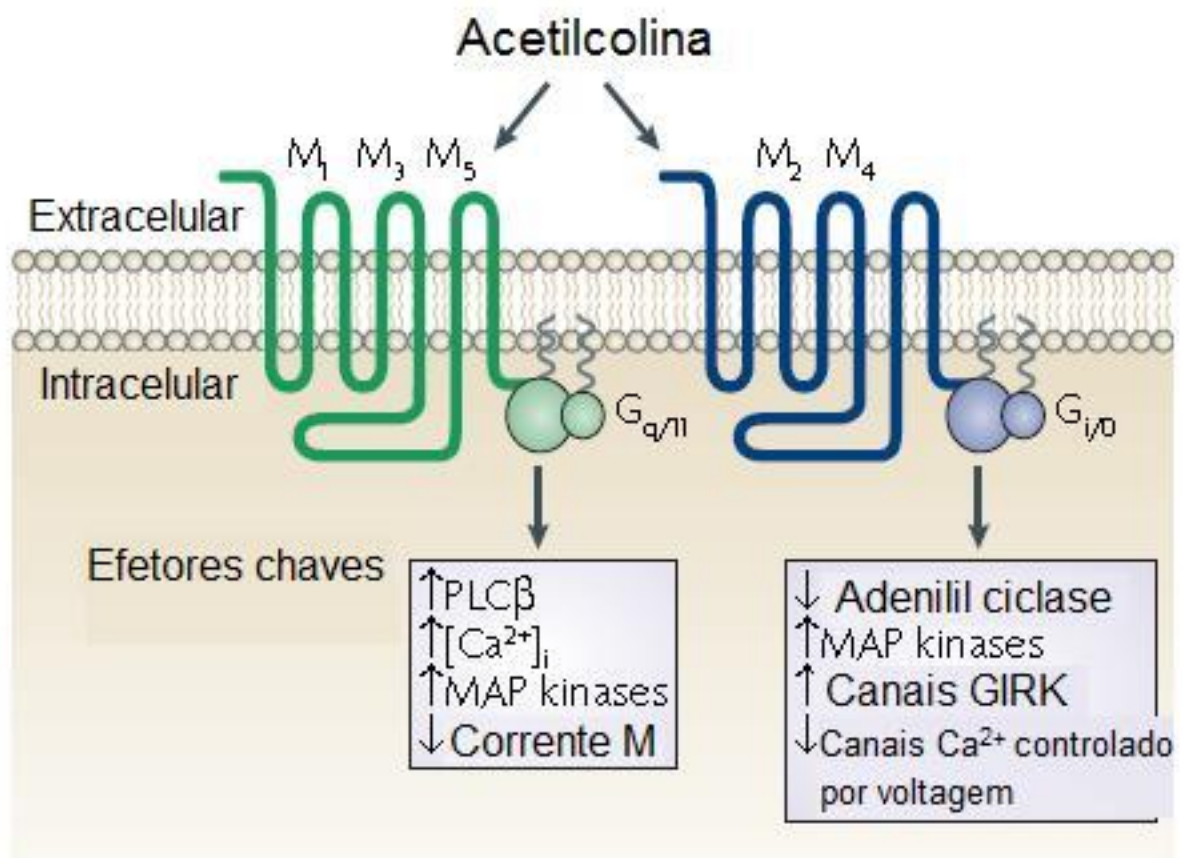
Fonte: Disponível em <http://fisiofisioex.blogspot.com/2013/04/neuromuscular.html>.

A ACh é considerada um importante neurotransmissor excitatório no cérebro (NATHANSON *et al.*, 1999; OLNEY *et al.*, 1983; OLNEY *et al.*, 1986). A estimulação do SNC provocada pela ACh acontece por meio da ativação dos receptores colinérgicos no cérebro, em que, praticamente 99% destes receptores são muscarínicos, e 1% são nicotínicos (PEPEU, 1983). Dessa forma, maior parte dos efeitos derivados da ativação colinérgica no

cérebro é devido à estimulação dos receptores colinérgicos muscarínicos (RCM).

Técnicas de clonagem gênica revelaram que existem cinco tipos de RCM, são eles: M1, M2, M3, M4, e M5 (BONNER *et al.*, 1987; LIAO *et al.*, 1989; NATHANSON *et al.*, 1999). Todos eles são receptores acoplados à proteína G (Figura 5), onde os receptores M1, M3, e M5 exercem seus efeitos por meio da via do fosfato de inositol, enquanto os receptores M2 e M4 atuam inibindo a adenilato ciclase e reduzindo, dessa forma, o AMPc intracelular (HULME *et al.*, 1990).

Figura 5 – Receptores colinérgicos muscarínicos.



Fonte: Wess *et al.*, (2007).

Alguns estudos demonstram que a ACh pode estar envolvida na fisiopatologia da epilepsia. Isso ocorre devido à excitação colinérgica muscarínica no cérebro, por conta do favorecimento do influxo de íons sódio e cálcio nos neurônios pela ação deste neurotransmissor, causando uma despolarização da membrana celular que é importante para a ocorrência da epileptogênese (BENARDO; PRINCE, 1982).

1.3 Modelos experimentais de convulsão

Os modelos experimentais de convulsão em animais conseguem reproduzir características da epilepsia humana. A maior parte do conhecimento sobre epilepsia e processo convulsivo adquirido por meio de estudos foi por conta da utilização de modelos animais. Dessa forma, esses modelos são considerados uma importante ferramenta de pesquisa (GRONE; BARABAN, 2015).

Os modelos pré-clínicos possibilitam a triagem de drogas antiepilépticas (WHITE, 1997), auxiliando, também, no conhecimento sobre os mecanismos que estão envolvidos na origem e na manutenção das crises convulsivas. De um modo geral, a escolha do modelo experimental e as drogas a serem estudadas são dois pontos importantes a serem considerados em estudos desta natureza (LIMA, 2011).

Nos modelos experimentais de convulsão, os animais mais utilizados são os murinos (camundongos e ratos), uma vez que apresentam várias vantagens que vão desde as anatômicas até as econômicas. O modelo pré-clínico de convulsão é considerado eficaz quando o padrão de atividade eletroencefalográfica (EEG) gerado no experimento apresenta semelhanças com o padrão observado na condição humana. Além disso, as alterações do comportamento animal geradas no modelo devem ser semelhantes às alterações comportamentais observadas no ser humano e devem responder aos medicamentos anticonvulsivantes com mecanismo de ação semelhante.

Existem diversos modelos pré-clínicos de indução de convulsão em animais que interferem em diversos sistemas de neurotransmissão que estão envolvidos na ocorrência do processo convulsivo, como o sistema colinérgico, o sistema gabaérgico, o sistema glutamatérgico, e o sistema glicinérgico (LIMA.,2011).

Um dos modelos experimentais de convulsão mais utilizados é o modelo induzido por pentilenotetrazol (PTZ). Este agente convulsivante é um antagonista competitivo dos receptores GABA_A e atua reduzindo a ação inibitória do GABA no sistema nervoso central (MACDONALD; BARKER, 1977; HUANG *et al.*, 2001). Além disso, já foi demonstrado que o PTZ também modula a via glutamatérgica, por meio da ativação de receptores NMDA que aumenta a excitotoxicidade neuronal contribuindo, desta forma, para a geração de crises convulsivas (LOSCHER *et al.*, 1991).

Injeções intraperitoneais de PTZ em animais induzem comportamentos estereotipados que começam com movimentos orofaciais e finalizam em convulsões clônicas. Este modelo foi desenvolvido há mais de 60 anos e é utilizado até os dias atuais para a

triagem de drogas anticonvulsivantes (SHORVON, 2009; LOSHER; SCHMIDT, 2011).

A pilocarpina (PILO) é um agonista colinérgico de receptores muscarínicos que é encontrada nas folhas do jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*), uma planta da flora brasileira que é conhecida por ser a única fonte comercial de extração deste alcalóide (ABREU *et al.*, 2007; GIL *et al.*, 2001).

O modelo experimental de convulsão induzido por PILO é caracterizado pela administração de altas doses desse alcaloide que pode induzir crises convulsivas ou status epiléptico completo em animais (CHO *et al.*, 2015). Estudos clássicos demonstram que a ativação exacerbada da transmissão colinérgica pela pilocarpina modula inicialmente a via glutamatérgica, ativando neurônios excitatórios e gerando o processo convulsivo (TURSKI *et al.*, 1989; CAVALHEIRO *et al.*, 1994).

O modelo agudo de convulsão induzido pela administração de pilocarpina (300 a 400 mg/kg) mimetiza em animais o comportamento convulsivo em humanos. Após a administração desse alcaloide ocorrem sinais e sintomas característicos, como tremores, automatismos faciais, irregularidades na coordenação muscular, alterações eletroencefalográficas e lesões graves em diversas áreas cerebrais, principalmente no hipocampo (TURSKI *et al.*, 1983; LEITE *et al.*, 1990; BELISSIMO *et al.*, 2001).

1.4 Processo convulsivo e Estresse Oxidativo

A hiperexcitabilidade neuronal e a lesão oxidativa produzida por uma produção excessiva de radicais livres podem desempenhar um papel importante na epilepsia, uma vez que o cérebro é particularmente suscetível ao estresse oxidativo, sendo o órgão mais aerobicamente ativo do corpo devido às suas altas demandas metabólicas (GERONZI *et al.*, 2018).

O cérebro humano consome 20% do orçamento total de oxigênio basal para apoiar a atividade neuronal intensiva de ATP. Entre os motivos que o cérebro é bastante suscetível ao estresse oxidativo estão os enriquecimentos lipídicos insaturados, presença de muitas mitocôndrias, cálcio, glutamato, defesa antioxidante modesta, metais de transição ativos redox e auto-oxidação de neurotransmissores (COBLEY *et al.*, 2018).

Sabe-se que alterações metabólicas, incluindo a produção de espécies reativas, resultam de convulsões prolongadas e também podem contribuir para o desenvolvimento da epilepsia (PEARSON-SMITH *et al.*, 2017). Acredita-se que a epilepsia esteja associada a excitotoxicidade do glutamato e disfunção mitocondrial. A excitotoxicidade do glutamato

contribui significativamente para a produção de espécies reativas de nitrogênio que causam estresse nitrosativo. Uma diminuição na síntese de adenosina trifosfato, que leva à formação de radicais livres, está associada à disfunção mitocondrial (VISHNOI *et al.*, 2016).

O glutamato excessivo nas sinapses ativa os receptores NMDA e AMPA correspondentes que facilitam o influxo excessivo de cálcio nas células neuronais. Isso leva à geração de estresse oxidativo que acarreta ainda a disfunção mitocondrial, peroxidação lipídica e oxidação de proteínas e DNA. Como consequência, a morte celular neuronal ocorre e, finalmente, as pessoas começam a enfrentar algumas sérias deficiências (KHATRI *et al.*, 2018).

O óxido nítrico (NO) é um importante contribuinte do estresse nitro-oxidativo que coexiste com neuroinflamação e epileptogênese (SHARMA *et al.*, 2017). Já foi demonstrado que a neuroinflamação constitui um mecanismo crucial na fisiopatologia do cérebro epilético (MERCADO-GÓMEZ *et al.*, 2018).

O NO demonstrou ser um mensageiro importante em muitos sistemas orgânicos em todo o corpo e, particularmente, no SNC. A óxido nítrico sintase (NOS) catalisa a produção de NO a partir de L-arginina, a concentração de NO é regulada pela atividade das isoformas NOS: formas neurais (nNOS) e endoteliais (eNOS) e indutíveis (iNOS) expressas constitutivamente (GADEK-MICHALSKA *et al.*, 2019). O óxido nítrico gerado pelo nNOS pode atuar como um neurotransmissor (GUIX *et al.*, 2005). O NOS indutível (iNOS), embora raramente presente nas células, é expresso em vários tipos de células, principalmente em micróglia e astrócitos nas proximidades de elementos sinápticos e pode liberar NO e afetar a transmissão sináptica (AMITAI *et al.*, 2010). Porém, quando produzido em excesso, o NO pode induzir danos oxidativos e nitrosativos e é neurotóxico (ZLATKOVIĆ *et al.*, 2013).

Esse comportamento do NO pode se tornar prejudicial quando reage com o ânion superóxido para formar peroxinitrito. Este composto pode se difundir facilmente através das membranas neuronais, danificando lipídios, proteínas e ácidos nucleicos. No caso das proteínas, o peroxinitrito reage principalmente com o anel fenólico das tirosinas, formando nitro-tirosinas que afeta as funções fisiológicas das proteínas. A nitrotirosinação de proteínas é um processo irreversível que também resulta no acúmulo de proteínas modificadas, contribuindo para o início e a progressão de processos neurodegenerativos (PICÓN-PAGÈS *et al.*, 2019).

O NO influencia de forma relevante o neurotransmissor excitatório glutamato, principalmente através dos receptores NMDA, e o neurotransmissor inibitório GABA, especialmente através dos receptores GABA A. Devido ao envolvimento do glutamato e do

GABA na homeostasia e funcionamento das células neuronais, essa interação sugere um papel do NO na regulação da excitabilidade neuronal e sua transição para os fenômenos de hiperexcitabilidade (FERRARO *et al.*, 2004).

Como exposto, o estresse nitrosativo/oxidativo possui variados alvos biológicos e os lipídios são uma das classes de biomoléculas mais envolvida nesse contexto. A oxidação lipídica dá origem a vários produtos secundários e o malondialdeído (MDA) é o principal e mais estudado produto da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados (RIO *et al.*, 2005). A peroxidação lipídica pode ser descrita geralmente como um processo pelo qual oxidantes, como radicais livres, atacam lipídios contendo ligações duplas carbono-carbono, especialmente ácidos graxos poliinsaturados (AYALA *et al.*, 2014).

O MDA é uma molécula altamente tóxica e deve ser considerado mais do que apenas um marcador de peroxidação lipídica. Sua interação com o DNA e proteínas tem sido frequentemente referida como potencialmente mutagênica e aterogênica (RIO *et al.*, 2005). Em condições tóxicas resultantes de taxas de peroxidação lipídica médias ou altas, a extensão do dano oxidativo sobrecarrega a capacidade de reparo e as células induzem a morte celular programada, levando a danos celulares e moleculares que podem facilitar o desenvolvimento de diversos estados patológicos, como a epilepsia (VOLINSKY *et al.*, 2013).

Entre os muitos aldeídos que podem ser formados como produtos secundários durante a peroxidação lipídica o MDA parece ser o produto mais mutagênico da peroxidação lipídica e tem sido amplamente utilizado por muitos anos como um biomarcador conveniente para a peroxidação lipídica dos ácidos graxos devido à sua reação fácil com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (AYALA *et al.*, 2014).

Por outro lado, existem moléculas importantes na defesa antioxidante das células, uma delas é a glutathiona (GSH), que é um antioxidante endógeno cujo seu desequilíbrio redox está bastante envolvido em distúrbios cerebrais, o déficit enzimático relacionado a GSH está envolvido na patologia do autismo, esquizofrenia, transtorno bipolar, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, epilepsia, entre outros (GU *et al.*, 2015).

A GSH é o antioxidante mais abundante nas células aeróbicas, presente nas concentrações micromolares (microM) nos fluidos corporais e nas concentrações milimolares (mM) nos tecidos, sendo muito relevante para proteger o cérebro do estresse oxidativo, atuando como eliminador de radicais livres e inibidor da peroxidação lipídica (OWEN *et al.*, 2010).

A diminuição de GSH pode levar a anormalidades no metabolismo da metilação e na função das mitocôndrias. Alguns estudos mostraram que um déficit de GSH ocorre antes

mesmo de anormalidades neuropatológicas nessas doenças (GU *et al.*, 2015). O equilíbrio redox da glutathiona mitocondrial tem importância central na resposta das mitocôndrias ao dano oxidativo e sinalização redox, onde a oxidação da glutathiona (GSH) em dissulfeto de glutathiona (GSSG) e, com isso, a alteração na proporção GSH / GSSG fazem com que os tióis proteicos alterem seu estado redox, permitindo que a função da proteína responda reversivelmente aos sinais redox e danos oxidativos (BEER *et al.*, 2004).

Em outras palavras, a proporção intracelular de GSH / GSSG geralmente é mantida alta através da redução de GSSG para GSH pela glutathiona redutase, permitindo que o GSH atue como antioxidante, porém, durante o estresse oxidativo há a oxidação de GSH em GSSG, onde os tióis de proteína respondem à diminuição da razão GSH / GSSG através da formação de dissulfetos mistos (JACOB *et al.*, 2003).

A disfunção mitocondrial está intimamente ligada ao estresse oxidativo e acredita-se que seja importante em lesões agudas e no desenvolvimento de epilepsia crônica adquirida (YUEN *et al.*, 2018). Dessa forma, aferir a concentração de GSH em modelos experimentais com drogas promissoras para tratamento de doenças do SNC, como na epilepsia, é uma excelente maneira de avaliar a eficácia terapêutica potencial na manutenção do potencial redox celular (OWEN *et al.*, 2010).

Por tudo que foi exposto, o estresse oxidativo pode ser considerado como um dos mecanismos possíveis na patogênese da epilepsia ou um dos mecanismos contribuintes, uma vez que, interrompendo gradualmente a homeostase intracelular, leva ao aumento da excitabilidade neuronal, da suscetibilidade a convulsões e à perda de células neuronais (YUEN *et al.*, 2018).

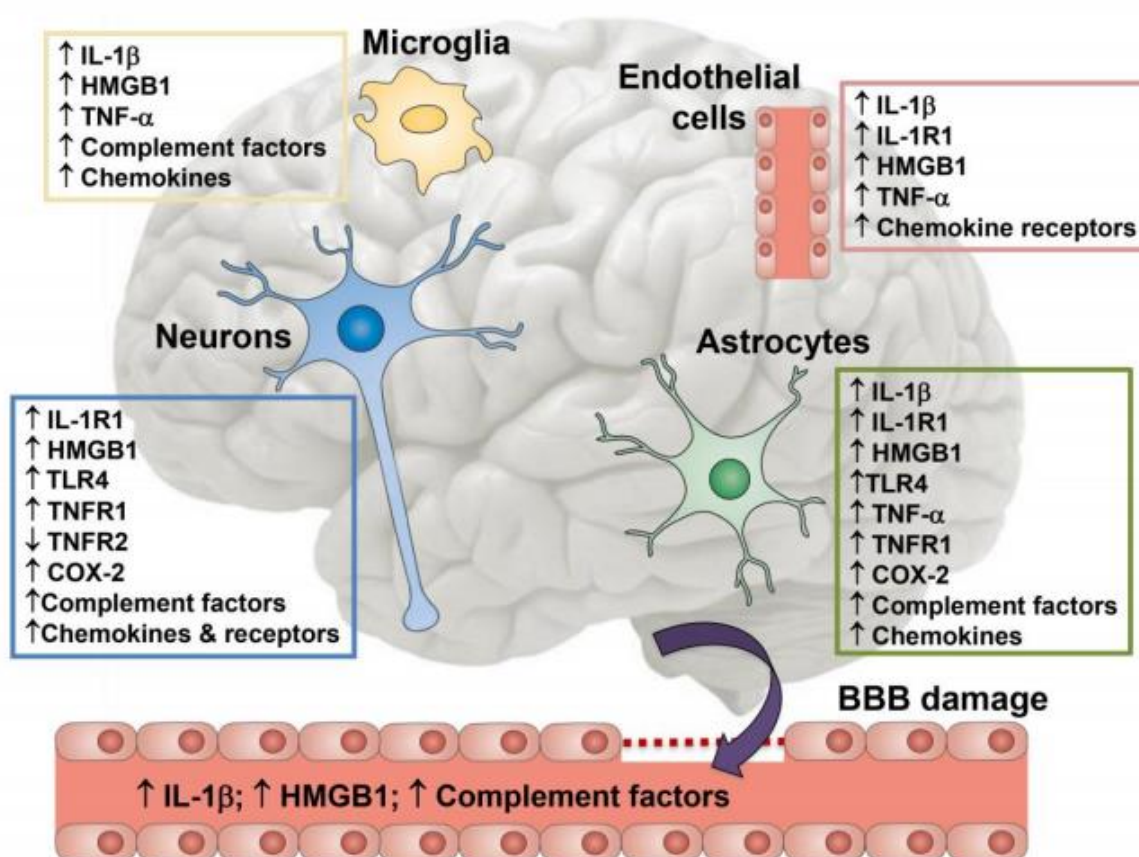
1.5 Processo convulsivo e Neuroinflamação

Nos últimos anos, diversas evidências vêm sugerindo que a neuroinflamação desempenha um papel vital na fisiopatologia da epilepsia. Nesse contexto, alguns estudos apontam que a neuroinflamação é uma característica patológica comum da epilepsia resistente à medicamentos, fornecendo, dessa forma, uma nova direção para o desenvolvimento de novos fármacos e o redirecionamento de fármacos para o tratamento da epilepsia. (VEZZANI; BALOSSO; RAVIZZA, 2019)

A neuroinflamação é normalmente considerada uma interação específica entre o sistema imunológico natural e o tecido cerebral prejudicado. A neuroinflamação é caracterizada pela liberação de moléculas pró-inflamatórias por células presentes no cérebro.

A liberação de fatores inflamatórios por essas células é regulada pela produção de moléculas neuroativas, como o óxido nítrico, prostaglandinas, neurotransmissores clássicos e neurotrofinas (VAN VLIET *et al.*, 2018). Esse processo ocorre de forma semelhante em modelos animais de convulsão e epilepsia induzidos por estimulação elétrica ou por fármacos quimoconvulsivantes que apresentam uma resposta neuroinflamatória em áreas cerebrais afetadas pela lesão primária, principalmente no hipocampo. Essa resposta de início rápido (em minutos) envolve a liberação de diversas moléculas inflamatórias, dentre elas, a IL-1 β , por células gliais ativadas, neurônios e componentes celulares da barreira hematoencefálica, como pericitos e células endoteliais (figura 6) (CHENG *et al.*, 2018; MARCHI; LERNER-NATOLI, 2012; GIANNONI *et al.*, 2018; VAN VLIET *et al.*, 2018; KLEMENT *et al.*, 2019).

Figura 6 – Principais células e mediadores inflamatórios relacionados com o processo convulsivo.



Fonte: Van Vliet *et al.*, (2018)

Os mecanismos pelos quais essas moléculas inflamatórias contribuem para o processo convulsivo como um todo estão relacionados com os efeitos diretos na função

neuronal ou os efeitos indiretos mediados por alterações da fisiologia das células endoteliais e gliais. Esses mecanismos representam vias não convencionais ativadas por mediadores inflamatórios no tecido doente que alteram a neurotransmissão e contribuem para o aumento da excitabilidade e para a neuropatologia (TERRONE *et al.*, 2020).

Dentre esses efeitos, a ativação exacerbada de células gliais (principalmente microglia e astrócitos) é considerada uma característica fundamental da neuroinflamação e foi um dos primeiros achados morfológicos bem descritos em pacientes com resistência aos medicamentos anticonvulsivantes e em modelos animais de convulsão e epilepsia (VAN VLIET *et al.*, 2018).

O aumento dos níveis de IL-1 está diretamente relacionado com a exacerbção de vários tipos de crises convulsivas, incluindo a Síndrome de Epilepsia Relacionada à Infecção Febril (FIRES). Uma das primeiras evidências demonstrando que a sinalização de receptores de IL-1 β (IL-1R) contribui para a geração e intensificação de convulsivas foi fornecida por estudos que mostraram que a injeção intra-hipocampal de IL-1 β aumentou de forma significativa a atividade convulsiva aguda em roedores que receberam injeções intracerebrais de agentes quimioconvulsivantes. (VEZZANI *et al.*, 2011)

Estudos realizados em animais demonstraram efeitos anticonvulsivantes e antiepileptogênicos promissores de drogas que interferem diretamente com a atividade da IL-1 β , como o anakinra que é um antagonista do receptor de IL-1R, ou o canaquinumabe, um anticorpo monoclonal que inativa a IL-1 β . (DILENA *et al.*, 2019; KENNEY-JUNG *et al.*, 2016). Paralelamente a isso, ensaios clínicos utilizando esses mesmos anticorpos monoclonais no tratamento de crianças diagnosticadas com FIRES, demonstraram que houve redução significativa das convulsões constantes nas fases aguda e crônica da doença, enquanto outras drogas anticonvulsivantes, dieta cetogênica ou corticosteroides foram ineficazes. Outro estudo demonstrou que o anakinra reduziu convulsões resistentes a medicamentos em adolescentes com epilepsia associada a uma etiologia inflamatória (DESENA; DO; SCHULERT, 2018; JYONOUCHI; GENG, 2016).

A neuroinflamação foi identificada também, antes mesmo do início das crises epiléticas, tanto no cérebro humano, (PRABOWO *et al.*, 2012; PAULETTI, *et al.*, 2017), como em modelos animais de convulsão. Além disso, a expressão de mediadores inflamatórios, como a IL-1 β e marcadores de estresse oxidativo, como a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) foram observados no hipocampo de pacientes que morreram de status epilético. Os padrões de expressão dessas moléculas, tanto nos neurônios, quanto nas células gliais foram semelhantes aos dos modelos de status epilepticus induzidos em roedores.

Essa evidência apoia o fato de que a neuroinflamação não é apenas uma consequência do processo convulsivo, mas está envolvida também na geração das convulsões (PAULETTI, *et al.*, 2017).

Além disso, a neuroinflamação está diretamente relacionada com a disfunção da barreira hematoencefálica (VEZZANI *et al.*, 2011a; FRIEDMAN; HEINEMANN, 2012). A infiltração de células imunes periféricas através dessa barreira já foi descrita no processo convulsivo. Os macrófagos provenientes da circulação sanguínea são mais comumente observados no cérebro durante o processo convulsivo (IYER *et al.*, 2010; CHOI; KOH, 2008; BAUER *et al.*, 2017; BIEN *et al.*, 2012). Somado a eles, os neutrófilos, monócitos ou linfócitos do sangue, que porventura venham a se infiltrar no espaço perivascular do cérebro podem contribuir para a resposta neuroinflamatória (BAUER *et al.*, 2017; VARVEL *et al.*, 2016).

Os monócitos que se infiltram no cérebro de camundongos após a indução de status epilepticus expressam níveis mais altos de IL-1 β do que nos camundongos do grupo controle, contribuindo, dessa forma, para a elevação do nível de citocinas pró-inflamatórias no tecido cerebral epileptogênico. Foi demonstrado que a prevenção do recrutamento de monócitos acelera a recuperação do peso dos animais e reduz a degradação da barreira hematoencefálica, atenuando os danos neuronais e aliviando, dessa maneira as consequências deletérias do status epilepticus (VARVEL *et al.*, 2016).

1.6 Produtos Naturais

Os produtos naturais vêm sendo utilizados pelo ser humano, como alternativa terapêutica, desde a idade antiga com a finalidade de aliviar e curar as doenças (LIU *et al.*, 2019). O Brasil é considerado o país líder em biodiversidade, apresentando mais de 20% das espécies do planeta, constituindo, dessa forma, uma reserva inigualável de matérias-primas com potencial aplicabilidade terapêutica nas mais diversas enfermidades (BRASIL *et al.*, 2016).

A descoberta de novos compostos bioativos agrega um valor claramente reconhecido aos produtos naturais, pois 28% dos novos fármacos aprovadas desde 1983 até 1994 pelo Food and Drug Administration (FDA) e entidades compatíveis em outros países, procedem integralmente de produtos naturais, 39% são de derivados de produtos naturais e 33% são substâncias de origem sintética (NEWMAN *et al.*, 2003).

A busca contínua por novos compostos anticonvulsivantes justifica-se pelo grande

número de pessoas com epilepsia refratária aos fármacos antiepilépticos disponíveis no mercado. Tendo em vista que os processos inflamatórios e oxidativos no sistema nervoso central vêm sendo associados às crises convulsivas resistentes a medicamentos, o uso de alternativas que tenham como finalidade reduzir esses processos deletérios se torna bastante promissor. Dentre os compostos que apresentam potenciais atividades anti-inflamatórias e antioxidantes estão os produtos naturais. Nesse contexto, entram os compostos ativos anti-inflamatórios e antioxidantes derivados de matérias primas naturais, como a própolis (JUIZ, 2010; JOBST *et al.*, 2015; ENGEL *et al.*, 2018).

1.7 Própolis

No Brasil já foram identificados 14 tipos de própolis que são classificados de acordo com suas composições e propriedades biológicas (TIVERON *et al.*, 2016). A própolis vermelha brasileira (PVB) foi o décimo terceiro tipo de própolis descoberto no Brasil e apresenta diversas propriedades farmacológicas importantes já estudadas (CABRAL, 2008).

Própolis é o termo utilizado para definir o subproduto de característica resinosa e balsâmica que é produzido pelas abelhas (*Apis mellifera*), por meio da mistura de secreções salivares com a resina de diversas partes de vegetais (TORETI *et al.*, 2013). A resina e os seus extratos são úteis para o tratamento de diversas enfermidades, devido às suas atividades antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica, citotóxica, antiulcerosa e cardioprotetoras (ABUBAKAR *et al.*, 2014; AHMED *et al.*, 2017; DANTAS SILVA *et al.*, 2017). O uso da própolis para o consumo humano é considerado seguro podendo ser utilizada para fins terapêuticos, cosméticos e alimentares (DALEPRANE; ABDALLA, 2013).

As abelhas utilizam a própolis para formar as paredes das colmeias com a finalidade de fortalecer a estrutura da colmeia e evitar que ela seja contaminada por microrganismos, como fungos e bactérias. Os tipos de própolis, além de apresentarem cores diferentes, possuem uma composição distinta (BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2014). Diversos motivos podem modificar a composição da própolis, dentre eles estão a origem geográfica, o tempo de coleta, a flora local, a espécie de abelha e os métodos de extração (SILVA *et al.*, 2019).

Nos diferentes tipos de própolis já foram identificados mais de 300 compostos diferentes. Dentre eles, ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos, aldeídos aromáticos, ácidos graxos, álcoois, esteroides, aminoácidos, açúcares, dentre outros. Os compostos fenólicos e os

flavonoides estão presentes em maior proporção na composição da maioria das classes de própolis quando comparados aos outros compostos citados. Dessa maneira, a própolis se configura com um potencial alvo para diversas áreas de pesquisa devido às suas importantes propriedades funcionais e atividades farmacológicas (VALENZUELA-BARRA *et al.*, 2015; XUE *et al.*, 2019).

O Brasil é o país do mundo que apresenta a maior representatividade no campo de pesquisa com produtos derivados de abelhas, incluindo a própolis (SENEL; DEMIR, 2018). A diferenciação dos tipos de própolis no Brasil tem influência direta da origem botânica.

O clima do Brasil possibilita que as abelhas produzam própolis durante o ano todo. Embora as variações do clima brasileiro influenciem nas concentrações dos constituintes da própolis, já foi observado que isso não afeta de forma significativa as propriedades biológicas e farmacológicas desses compostos (BUENO-SILVA *et al.*, 2017).

A própolis é considerada pela legislação brasileira um produto alimentício. A produção e comercialização da própolis é regida pela portaria N° 6, de 25 de julho de 1985 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e a segurança de sua utilização é comprovada pelo seu amplo uso popular tradicional (BRASIL, 1985).

O caráter organoléptico da própolis está diretamente relacionado às características de sua fração volátil. Esta por sua vez é definida pela região geográfica de origem e consiste em um dos principais critérios de qualidade da própolis. Dentre os tipos identificados, destaca-se a própolis vermelha brasileira.

1.8 Própolis Vermelha Brasileira

A própolis vermelha brasileira (PVB) é produzida pelas abelhas da espécie *Apis mellifera*, por meio da coleta de resina de partes da planta *Dalbergia ecastophyllum*. Essa resina é utilizada para fortificar a estrutura da colmeia e também é utilizada como defesa contra diversos agentes externos, como microrganismos e alguns insetos. A PVB possui uma constituição bastante heterogênea e complexa, sendo composta por mais de 180 substâncias identificadas. Dentre esses constituintes, podemos destacar os flavonoides, que são considerados compostos orgânicos tão importantes na constituição da própolis que passaram a ser usados como medida de qualidade de amostras (DE-MELO *et al.*, 2014).

A PVB tem origem específica na região de Marechal Deodoro no estado de Alagoas no Nordeste brasileiro (figura 7). Dessa forma, o Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) forneceu o título de Indicação Geográfica à região de Marechal Deodoro,

garantindo ao estado de Alagoas o certificado internacional de produtor exclusivo desse tipo de própolis no mundo, considerando essa região como o local onde se produz própolis vermelha com qualidade constante devido ao clima e às condições de sazonalidade da região (FREIRES; ALENCAR; ROSALEN, 2016; FRANCHIN *et al.*, 2016; SALATINO, 2018).

Figura 7 - Colmeia de abelhas em apiário na cidade de Marechal, Deodoro, Alagoas.



Fonte: Dausch (2007)

A PVB pertence ao 13º grupo de própolis no Brasil e nos últimos anos tem sido alvo de diversos estudos farmacológicos (SILVA *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2008; LIO *et al.*, 2010; PICCINELLI *et al.*, 2011; FRANCHI *et al.*, 2012). O grande potencial biológico e farmacológico da PVB vem atraindo o interesse de diversas indústrias farmacêuticas e cosméticas internacionais e isso tem gerado alta demanda de PVB por parte de nações como Japão, China, Rússia, França e Alemanha. A produção e a comercialização de PVB estão atualmente em expansão no mercado internacional, induzindo uma modernização cada vez maior de seus derivados e um progressivo interesse na produção e padronização de produtos à base de PVB (AZEVEDO *et al.*, 2018; DO NASCIMENTO *et al.*, 2016; SALATINO, 2018).

1.8.1 Composição Química

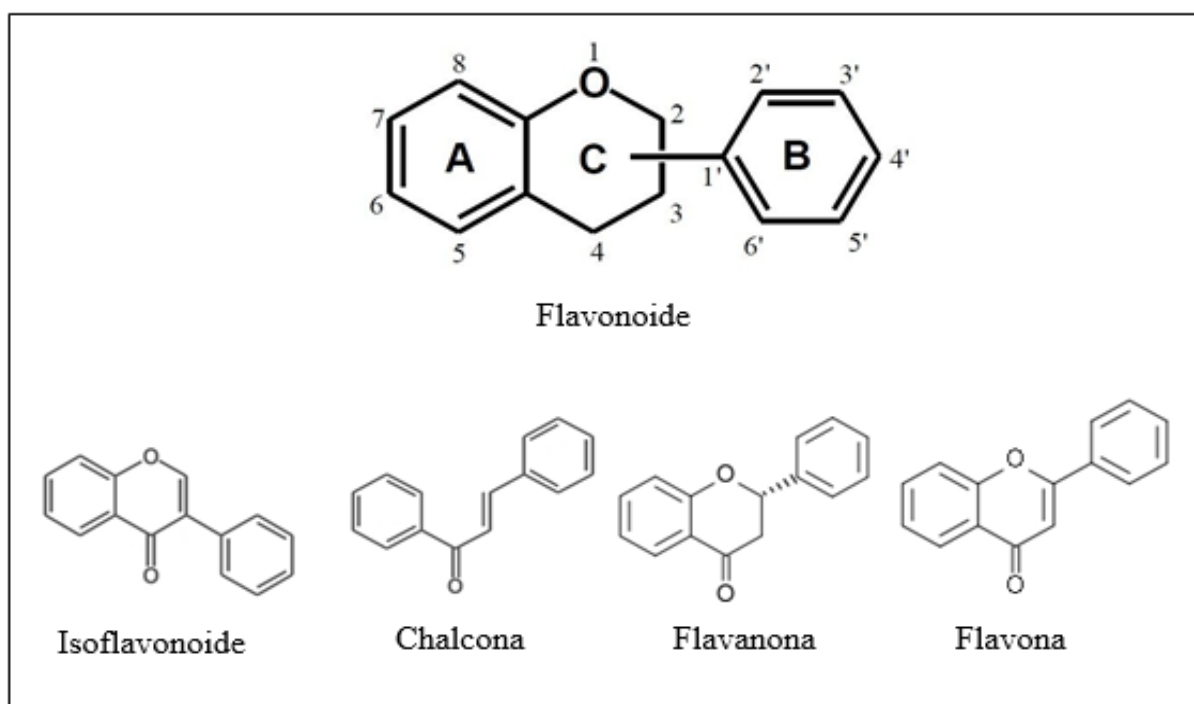
A composição química da PVB é heterogênea e complexa, bem como difere dos

demais tipos de própolis. Fazem parte da constituição da PVB, os isoflavonoides daidzeína, formononetina, biochanina A, medicarpina, vestitol e neovestitol; a chalcona isoliquiritigenina; a flavanona liquiritigenina; e o neoflavonoide dalbergina (ALENCAR *et al.*, 2007; DAUGSCH *et al.*, 2008; OLDONI *et al.*, 2011). Além disso, foram identificaram 34 constituintes voláteis na PVB, destacando-se o trans-anetol, o α -copaeno e o metil cis-iseugenol (NUNES *et al.*, 2009)

Os flavonoides são considerados as principais substâncias responsáveis pelos efeitos biológicos e farmacológicos da PVB, sendo atribuídas a eles, as propriedades anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antioxidante, dentre outras (BARBOSA *et al.*, 2009).

Os flavonoides possuem uma estrutura de hidrocarbonetos do tipo C₆-C₃-C₆, onde as duas unidades C₆ que constituem os anéis A e B apresentam natureza fenólica (Figura 8) (TSAO, 2010). Os flavonoides podem ser divididos em subgrupos classificados de acordo com o grau de oxidação do anel heterocíclico, como flavan-3-ol, flavona, flavonol, flavanona, antocianina, isoflavonas, chalcona, neoflavonol, dentre outros (SINGH *et al.*, 2008). De maneira geral, os compostos flavonoides apresentam-se, metoxilados, hidroxilados e/ou glicosilados, sendo a glicose ou a ramnose, o açúcar mais frequentemente ligado (SINGH *et al.*, 2008).

Figura 8 - Estrutura química básica dos flavonoides e de algumas subclasses.



Fonte: Tsao, (2010)

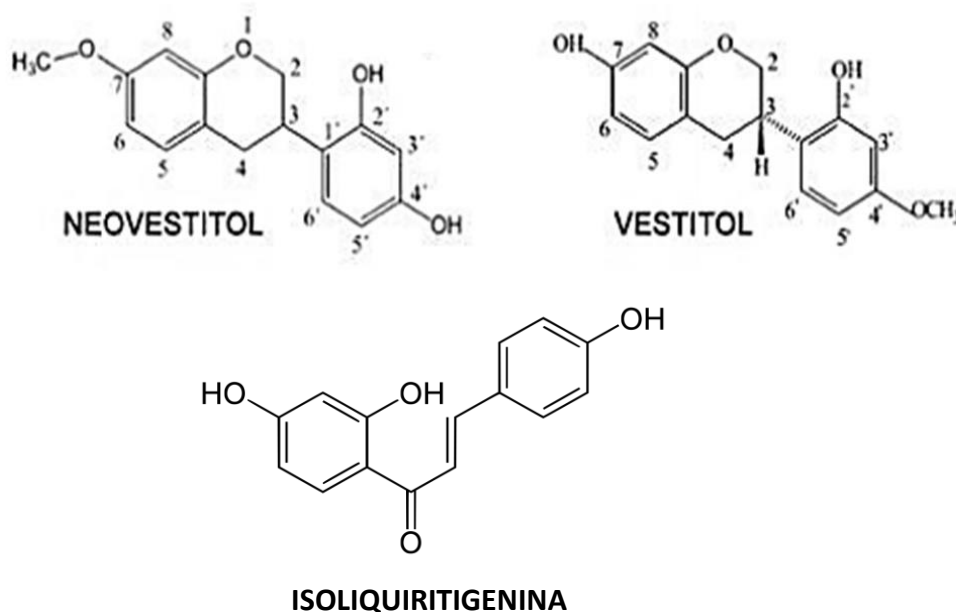
Para a identificação e caracterização dos diversos compostos químicos presentes na PVB podem ser empregados várias ferramentas. Dentre elas, a cromatografia gasosa (CG), a microextração em fase sólida (MEFS) e a espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI-MS) são considerados métodos confiáveis para a análise direta de extratos hidroalcoólicos de própolis (BANKOVA; POPOVA; TRUSHEVA, 2014; CHENG *et al.*, 2013).

1.8.2 Propriedades biológicas e farmacológicas

A PVB possui uma gama de benefícios à saúde humana e entre as propriedades biológicas e farmacológicas mais estudadas, estão a anti-inflamatória (BARRETO, 2008), a antiulcerativa (PINHEIRO, 2009), a antioxidante (CABRAL *et al.*, 2009; RIGHI *et al.*, 2011), a antibacteriana (CABRAL *et al.*, 2009; RIGHI *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2016), antifúngica (SIQUEIRA *et al.*, 2009), e a antitumoral (ALENCAR *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2008; PINHEIRO *et al.*; 2014).

Dentre os compostos flavonoides presentes na PVB, já foi demonstrado que a chalcona isoliquiritigenina e os isoflavonoides vestitol e neovestitol (figura 9) apresentam potentes atividades antioxidantes, além de possuírem boas propriedades antimicrobianas (OLDONI *et al.*, 2011).

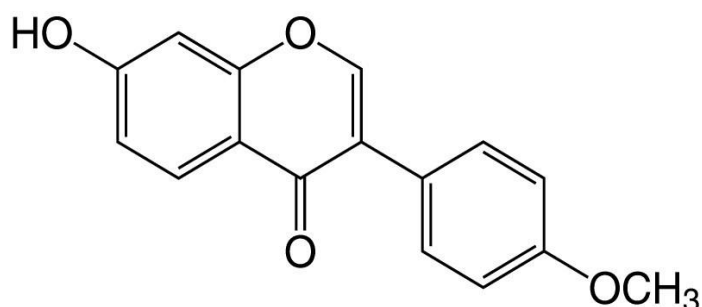
Figura 9 – Estrutura química dos flavonoides isoliquiritigenina, vestitol e neovestitol.



Fonte: Adaptado de Bueno-Silva *et al.*, (2013).

Em relação à atividade anti-inflamatória, um estudo mostrou o isoflavonoide formononetina (figura 10) apresenta atividade anti-inflamatória significativa (LIMA CAVENDISH *et al.*, 2015). Além disso, um estudo comparativo demonstrou que a PVB foi mais efetiva, quanto às propriedades anti-inflamatórias, quando comparada à própolis verde, em modelo de edema induzido por carragenina e edema de orelha induzido por óleo de cróton (ABREU, 2008).

Figura 10 – Estrutura química do flavonoide formononetina.



FORMONONETINA

Fonte: Disponível em: <https://www.anulab.com/product/1791447/formononetine>

Essas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias sugerem que a PVB pode representar uma importante estratégia de tratamento para diversas enfermidades que possuem a inflamação e o estresse oxidativo como contribuintes para suas bases fisiopatológicas, como o câncer e doenças do sistema nervoso (FROZZA *et al.*, 2013; RIGHI *et al.*, 2011).

No SNC, observou-se que após a hemisseção da medula espinhal em ratos, o tratamento com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) ocasionou um aumento no desempenho motor dos animais (KASAI *et al.*, 2011). Outro estudo demonstrou que o tratamento com EHPV acelerou a recuperação funcional e diminuiu a neuroinflamação e a perda de neurônios motores após lesão medular (DOS SANTOS, 2013) e lesão de nervo ciático (BARBOSA *et al.*, 2015) em murinos.

Além disso, compostos da PVB, como a formononetina, a daidzeína e a biochanina A apresentaram ações neuroprotetoras *in vivo* em modelo animal de isquemia e trauma cerebral (LIANG *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014; ARAS *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015), tendo como mecanismos subjacentes, a redução da resposta inflamatória

e a diminuição do estresse oxidativo.

1.8.3 Perfil toxicológico

O uso de produtos naturais pode levar a quadros de intoxicação devido a uma série de fatores, como as doses administradas, as características da substância e as características do indivíduo que os consome. Em estudo avaliando toxicidade aguda e subaguda do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) em murinos, não foram observados efeitos letais para a dose de 300mg/kg, mas foram observados sinais de toxicidade para essa dose. A maior parte dos sinais de toxicidade subaguda apareceram quando foram administradas doses acima de 200 mg/kg. (DA SILVA *et al.*, 2015). Dessa forma, a administração de EHPV nas doses de 10 mg/kg e 100 mg/kg em animais pode ser considerada segura.

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A neuroinflamação e o estresse oxidativo (EO) vêm sendo constantemente associados aos danos neuronais causados pela epilepsia e com a maior suscetibilidade ao desenvolvimento de convulsões. O processo inflamatório do SNC e o EO são fenômenos inter-relacionados que podem ser desencadeados por várias lesões provocadas por crises convulsivas em humanos e em modelos animais de convulsão e epilepsia e ambos são evidenciados em amostras cerebrais de pacientes com epilepsias resistentes à medicamentos com etiologia estrutural adquirida ou genética. (ARENA *et al.*, 2018; DEVINSKY *et al.*, 2018; GERONZI *et al.*, 2018; KLEIN *et al.*, 2018; PAULETTI *et al.*, 2019; VEZZANI *et al.*, 2019). No mundo, estima-se que cerca de 30 a 40% dos pacientes diagnosticados com epilepsia são resistentes à medicamentos, ou seja, nesses indivíduos, as convulsões não podem ser controladas adequadamente com medicamentos antiepiléticos. Logo, a busca por novas alternativas terapêuticas faz-se necessária (JOBST *et al.*, 2015; ENGEL *et al.*, 2018).

Dessa forma, tanto os mecanismos responsáveis pelos processos de neuroinflamação e EO, bem como os seus subprodutos tornam-se alvos farmacológicos importantes em diversas estratégias terapêuticas de relevância clínica para o tratamento da epilepsia, tais como o direcionamento de fármacos e o desenvolvimento de novos medicamentos. Além disso, a inflamação do SNC e o EO geram moléculas mensuráveis no sangue ou em exames de imagem, logo, esses marcadores podem ter um valor prognóstico e preditivo importantes (TERRONE *et al.*, 2020).

Nesse contexto, a utilização de fármacos ou substâncias com ações anti-inflamatórias e antioxidantes para o tratamento da epilepsia se mostra bastante promissora. Muitas substâncias de origem natural possuem compostos que apresentam elevado potencial antioxidante e anti-inflamatório, tornando-se, dessa forma, potenciais candidatas no combate às injúrias causadas pelos processos convulsivos. Além disso, os produtos naturais possuem bastante aceitação popular, o que gera boas perspectivas no mercado. (SOARES *et al.*, 2010)

Os produtos naturais vêm sendo utilizados pelo ser humano, como alternativa terapêutica, desde a idade antiga com a finalidade de aliviar e curar as doenças. (LIU *et al.*, 2019). O Brasil é considerado o país líder em biodiversidade, apresentando mais de 20% das espécies do planeta, constituindo, dessa forma, uma reserva inigualável de matérias-primas com potencial aplicabilidade terapêutica nas mais diversas enfermidades. (BRASIL *et al.*, 2016). Logo, a busca por ativos naturais com propriedades terapêuticas se mostra bastante

promissora quando o conhecimento popular das espécies é associado ao método científico e à realização de ensaios farmacológicos adequados. (SILVA *et al.*, 2019)

A própolis está entre os produtos naturais promissores, devido ao seu grande potencial biológico proporcionado pela diversidade de compostos que fazem parte de sua composição. Dentre os tipos de própolis, está a própolis vermelha brasileira (PVB) que é encontrada na região Marechal Deodoro em Alagoas e apresenta diversas propriedades terapêuticas já estudadas e descritas na literatura. (CABRAL *et al.*, 2008) A PVB foi o 13º tipo de própolis a ser identificado no país, sendo os flavonoides a espécie química majoritária na sua composição. A PVB vem atraindo o interesse da comunidade científica por conta dos seus potenciais efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e antimicrobianos já comprovados em diversas pesquisas. (DALEPRANE; ABDALLA, 2013; AZEVEDO *et al.*, 2018). Além disso, alguns estudos demonstraram efeitos neuroprotetores em ensaios pré-clínicos *in vivo* e *in vitro* de flavonoides que compõem a PVB. (SUM *et al.*, 2012; PLEMEL *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2012).

Tendo em vista que não há informações na literatura sobre os efeitos neuroprotetores da PVB na convulsão e na epilepsia, justifica-se o estudo da PVB em modelos pré-clínicos de convulsão. O uso de dois modelos experimentais de convulsão induzidos por fármacos que atuam por duas vias bioquímicas distintas aumenta a probabilidade de se determinar possíveis mecanismos de ação da PVB, podendo possibilitar, desta forma, uma terapia farmacológica mais direcionada.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar em camundongos machos adultos, os efeitos do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) nas alterações comportamentais, oxidativas e inflamatórias que ocorrem nas convulsões induzidas por pilocarpina (PILO) e pentilenotetrazol (PTZ).

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os efeitos do EHPV nos parâmetros comportamentais: latência de 1ª convulsão, intervalo de tempo entre a primeira convulsão e a morte e latência de morte de camundongos submetidos aos modelos de convulsão induzidos por PTZ e PILO;
- Verificar os efeitos do EHPV no grau de peroxidação lipídica no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado de camundongos submetidos aos modelos de convulsão induzidos por PTZ e PILO, por meio da dosagem de malondialdeído (MDA);
- Observar os efeitos do EHPV no estresse nitrosativo no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado de camundongos submetidos aos modelos de convulsão induzidos por PTZ e PILO, por meio da dosagem de nitrito/nitrato;
- Determinar os efeitos do EHPV no sistema de defesa endógena contra o estresse oxidativo e nitrosativo no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado de camundongos submetidos aos modelos de convulsão induzidos por PTZ e PILO por meio da dosagem da glutathiona reduzida (GSH);
- Definir os efeitos do EHPV na resposta inflamatória no hipocampo de camundongos submetidos aos modelos de convulsão induzidos por PTZ e PILO, através da dosagem da concentração de IL-1 β .

4 METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, pesando entre 22 e 26 g, provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos em condições padrão de acondicionamento, ou seja, 23-25 °C com ciclo claro/escuro de 12h e alimentados com ração e água *ad libitum*. Cada grupo permaneceu em caixas de propileno, contendo 8 animais por caixa.

4.2 Drogas

As drogas utilizadas no estudo e suas respectivas vias de administração e formas de preparo estão expressas na tabela 1.

Tabela 1 – Drogas utilizadas no tratamento dos animais, preparo e via de administração.

Droga	Preparo	Via de administração
Extrato hidroalcoólico de própolis vermelha	Dissolvido em tween 80 à 2% nas doses de 10 e 100 mg/kg	Via oral (v.o.)
Pentilenotetrazol (Sigma Chemical Co,USA)	Dissolvido em solução salina a 0.9% (85mg/kg)	via intraperitoneal (i.p.)
Pilocarpina (Sigma Chemical Co,USA)	Dissolvida em solução salina a 0.9% (400mg/kg)	via intraperitoneal (i.p.)

Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

4.3 Extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV)

Para o estudo em questão, foi adquirido o extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) a 10%, georreferenciado de Marechal Deodoro-AL, considerada região de indicação geográfica do extrato pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial. O EHPV foi obtido a partir da extração realizada com amostras de própolis vermelha (2g) e etanol a 70% (25 mL) à temperatura ambiente por 1 h em banho de ultrassom. Após a extração, a mistura

foi filtrada e o solvente foi evaporado.

O EHPV foi solubilizado em solução de tween 80 a 2% (BARBOSA *et al.*, 2015) e administrado via gavagem nos camundongos, nas doses de 10 mg/kg e 100 mg/kg. As doses foram escolhidas com base em estudos anteriores que demonstraram efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e neuroprotetores (BARBOSA *et al.*, 2015; BEZERRA *et al.*, 2017; CAVENDISH *et al.*, 2015).

4.4 Protocolo experimental

A divisão e descrição dos grupos experimentais utilizados no estudo estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Descrição dos grupos experimentais.

Grupo	Descrição
Veículo	Tratado com solução salina a 0,9% i.p. + tween 2% v.o.
PTZ85	Tratado com PTZ 85 mg/kg i.p. + solução de tween 2% v.o.
PILO400	Tratado com PILO 400 mg/kg i.p. + solução tween 2% v.o.
EHPV10 + PTZ85	Tratado com PTZ 85 mg/kg i.p. + EHPV 10 mg/kg v.o.
EHPV100 + PTZ85	Tratado com PTZ 85 mg/kg i.p. + EHPV 100 mg/kg v.o.
EHPV10 + PILO400	Tratado com PILO 400 mg/kg i.p. + EHPV 10 mg/kg v.o.
EHPV100 + PILO400	Tratado com PILO 400 mg/kg i.p. + EHPV 100 mg/kg v.o.

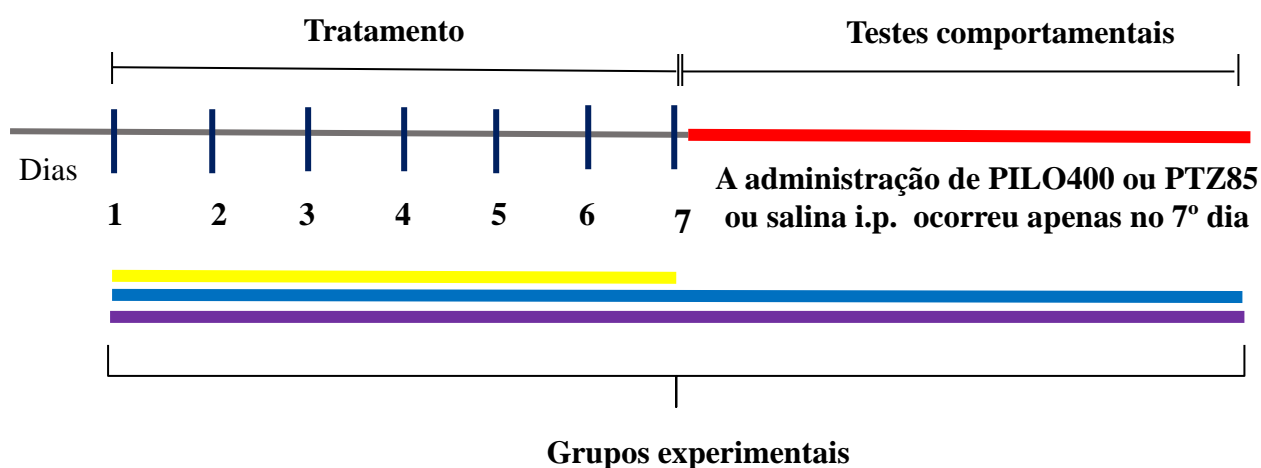
Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

O pré-tratamento oral (v.o.) realizado via gavagem com EHPV, nas doses de 10 mg/kg e 100 mg/kg ocorreu durante sete dias consecutivos e a indução das convulsões com PTZ e PILO via intraperitoneal (i.p.) aconteceu no sétimo dia, 30 e 60 minutos, respectivamente, após o tratamento com EHPV. Os parâmetros comportamentais: latência de convulsão, latência de morte e intervalo de tempo entre a 1ª convulsão e a morte foram avaliados por um período de 30 minutos, para os animais que receberam PTZ e de 60 minutos, para os animais que receberam PILO, após a administração desses agentes

convulsivantes. Todas as soluções preparadas foram administradas em volume de 0,1mL para cada 10 g de peso corporal. Os animais foram ambientados por um período de uma semana antes do início de todos os testes. O pré-tratamento de sete dias consecutivos com EHPV foi escolhido baseando-se em estudos anteriores que realizaram pré-tratamentos com doses repetidas (variando de 3 a 7 dias), para avaliar atividades neuroprotetoras e anticonvulsivantes ou pró-convulsivantes de algumas drogas em modelos experimentais de convulsão induzidos por PTZ e/ou PILO (CARVALHO *et al.*, 2019; CAVALCANTE, 2017; BEZERRA *et al.*, 2016).

Após isso, os animais dos grupos submetidos aos modelos de convulsão tiveram os cérebros removidos e as regiões cerebrais: córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e corpo estriado (CE) foram dissecadas. Além disso, os animais dos grupos que não receberam os agentes indutores de convulsão foram eutanasiados através de decapitação por guilhotina, seus cérebros foram removidos e lavados em solução salina gelada e as áreas HP, CE e CPF foram dissecadas. Todas as áreas cerebrais especificadas anteriormente, de todos os animais utilizados no experimento foram utilizadas para análise de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo e nitrosativo. A figura 11 mostra a linha do tempo do protocolo experimental.

Figura 11 - Linha do tempo do protocolo experimental



Legenda:

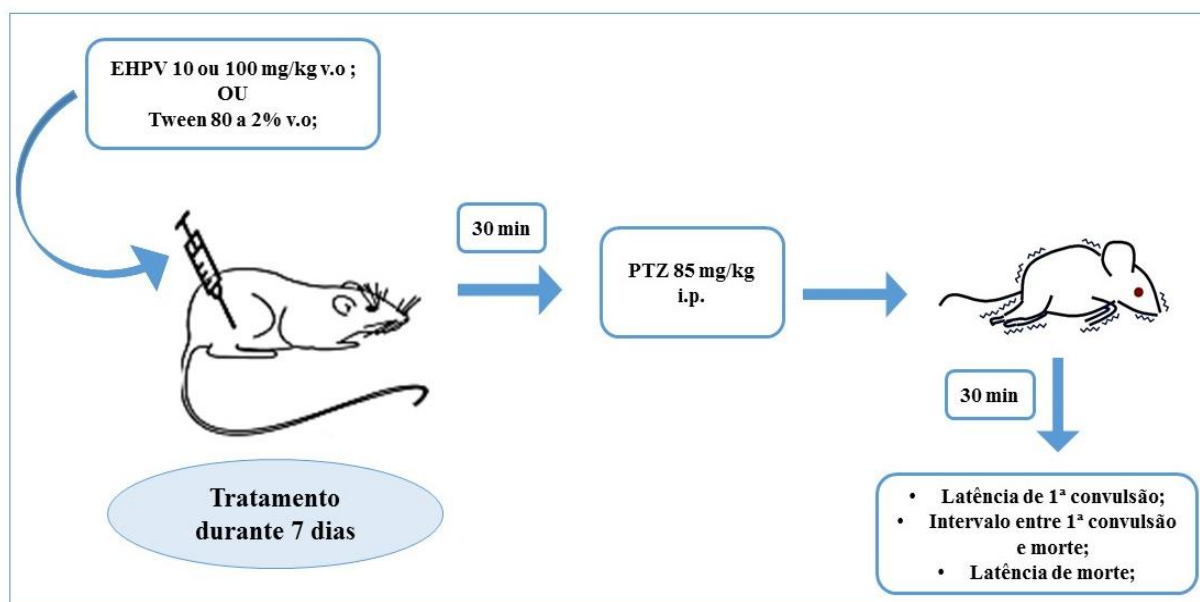
- Grupo veículo: tratado apenas com tween 80 2% v.o. e salina 0,9% i.p.
- Grupos PTZ85 ou PILO400: grupos tratados com tween 80 2% v.o. e PILO400 ou PTZ85 i.p.
- Grupos EHPV 10 ou 100 + PILO400 ou PTZ85: grupos tratados com EHPV 10 ou 100 mg/kg v.o. e PILO400 ou PTZ85 i.p.

4.5 Avaliação Comportamental

4.5.1 Modelo de convulsão induzido por Pentilenotetrazol (PTZ)

Os animais foram pré-tratados com EHPV (10 e 100mg/kg) ou tween 80 a 2% via gavagem, durante 7 dias consecutivos. No sétimo dia, 30 min após a administração de EHPV ou tween 80, os animais foram submetidos ao modelo de convulsão induzido por PTZ (Sigma Chemical Co, USA) que foi administrado via i.p. O PTZ foi dissolvido em solução salina na dose de 85mg/kg (Figura 12)

Figura 12 – Modelo de convulsão induzido por PTZ



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Os animais foram colocados caixas individuais, e observados por até 30 minutos. Os parâmetros avaliados (tabela 3) foram: tempo de latência para a primeira convulsão clônica, que é caracterizada por uma série de movimentos espasmódicos ou tônico-clônica caracterizada pelo aumento do tônus muscular seguido de movimentos espasmódicos, em segundos (RUBINSON; LANG, 2009), latência de morte em segundos (AGUIAR *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2012) e o intervalo de tempo, em segundos, entre a ocorrência da primeira convulsão e a morte (CRUZ, 2012).

Tabela 3 - Parâmetros comportamentais observados nos animais que receberam PTZ.

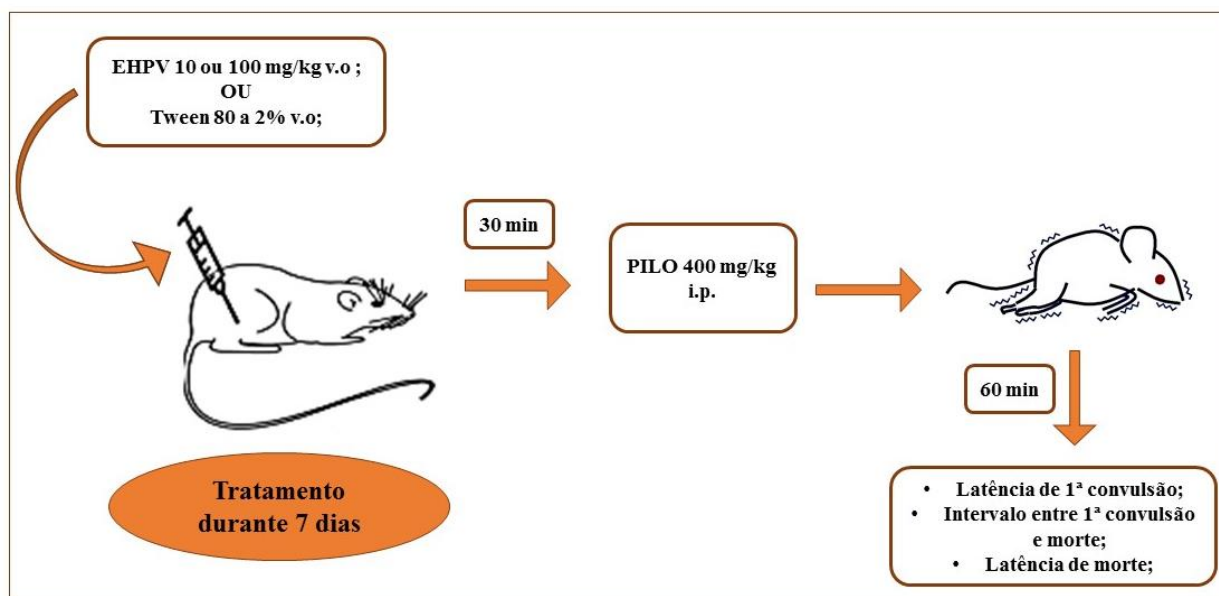
PARÂMETROS	CARACTERÍSTICAS
Latência de convulsão	Tempo, em segundos, para o aparecimento da primeira convulsão.
Intervalo convulsão-morte	Intervalo de tempo, em segundos, entre a primeira convulsão e a morte do animal.
Latência de morte	Tempo, em segundos, para a morte do animal.

Fonte: Adaptado de TURSKI *et al.*, 1983.

4.5.2 Modelo de convulsão induzido por Pilocarpina (PILO)

Os animais foram pré-tratados com EHPV (10 e 100mg/kg) ou tween 80 a 2% via gavagem, durante 7 dias consecutivos. No sétimo dia, 30 min após a administração de EHPV ou tween 80, os animais foram submetidos ao modelo de convulsão induzido por PILO (Sigma Chemical Co, USA) que foi administrado via i.p. A pilocarpina foi dissolvida em solução salina na dose de 400mg/kg. (Figura 14)

Figura 14 – Modelo de convulsão induzido por PILO.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2020).

Os animais foram colocados caixas individuais, e observados por até 60 minutos. Os parâmetros avaliados (tabela 4) foram: tempo de latência para a primeira convulsão clônica ou tônico-clônica, intervalo entre a ocorrência da primeira convulsão e a morte e a latência de morte. Todos os esses parâmetros foram avaliados em segundos (LIMA *et al.*,

2012; AGUIAR *et al.*, 2012).

Tabela 4 - Parâmetros comportamentais observados nos animais que receberam PILO.

PARÂMETROS	CARACTERÍSTICAS
Latência de convulsão	Tempo, em segundos, para o aparecimento da primeira convulsão.
Intervalo convulsão-morte	Intervalo de tempo, em segundos, entre a primeira convulsão e a morte do animal.
Latência de morte	Tempo, em segundos, para a morte do animal.

Fonte: Adaptado de TURSKI *et al.*, 1983.

4.6 Avaliação Neuroquímica

4.6.1 Dissecação das áreas cerebrais

Os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina e os cérebros dos mesmos foram retirados e colocados rapidamente sobre uma placa de Petri revestida com papel alumínio e refrigerada com bateria de gelo. As áreas: córtex pré-frontal, corpo estriado e hipocampo foram dissecadas e armazenadas em microtubos de centrifugação de plástico devidamente identificados, pesados e conservados a -80°C para uso posterior. Imediatamente antes das análises neuroquímicas, as áreas foram retiradas do freezer e após serem descongeladas foram utilizadas para o preparo dos homogenatos necessários para a realização dos testes.

4.6.2 Determinação de parâmetros de estresse oxidativo

4.6.2.1 Determinação dos níveis de nitrato/nitrito

Para avaliar os efeitos do tratamento com as drogas utilizadas nesse estudo na produção de óxido nítrico (NO), foram determinados os níveis de nitrito/nitrato nos homogenatos, pelo método de Green *et al.*, (1982). Para esse experimento 100 μL do Reagente de Griess (ácido fosfórico 5%, sulfonilamida 1% em ácido fosfórico 5%, NEED 0,1% e água destilada) foram adicionados a 100 μL do sobrenadante do homogenato e incubados a temperatura ambiente por 10 min.

A curva padrão foi elaborada com concentrações de NaNO_2 (variando de 0,75 a 100 mM) sob as mesmas condições. Os brancos foram preparados pela adição de 100 μL do Reagente de Griess a 100 μL do tampão usado para o homogenato (fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,4). A absorbância foi medida em leitor de microplacas em 540 nm, e o resultado expresso em μmol de nitrito/g de tecido.

4.6.2.2 Determinação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica nas áreas cerebrais foi avaliada por meio da quantificação dos níveis de malonildialdeído (MDA), conforme o método sugerido por Draper *et al.*, (1990).

Os homogenatos das áreas cerebrais foram preparados a 10% em tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,4 e 63 μL destes foram adicionados a 100 μL de ácido perclórico 35% em microtubos de centrifugação de plástico que foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C.

Em seguida, 150 μL do sobrenadante foram adicionados a 50 μL de ácido tiobarbitúrico 1,2%, que ficaram em banho-maria a 95°C por 30 minutos. Por fim, 150 μL da mistura foram adicionados aos poços da placa de ELISA e, posteriormente, foi feita a leitura a 535nm. Os resultados foram expressos em μg de MDA/g de tecido.

4.6.2.3 Determinação da concentração de glutathiona reduzida (GSH)

Para avaliar as defesas antioxidantes endógenas contra o estresse oxidativo foram determinados os níveis de glutathiona reduzida (GSH). O método é baseado na reação de reagente de Ellman (DTNB), com grupos tiol livres. Foram retirados 40 μL do homogenato e adicionados a 50 μL de água destilada e mais 10 μL de ácido tricloroacético (ATC) a 50%.

O material foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos à temperatura de 4° C. Em seguida foram recolhidos 60 μL do sobrenadante e adicionados à placa de ELISA (mantida resfriada durante todo o processo). Além disso, foram acrescentados Tris-HCl-EDTA 0,4M, pH 8,9 e DTNB 0,01M aos poços da placa de ELISA e, após 1 minuto de reação, a leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro a 412nm (SEDLAK; LINDSAY, 1968). A concentração de glutathiona reduzida foi expressa em μg de GSH/g de tecido, tendo por base uma curva padrão.

4.7 Avaliação da atividade anti-inflamatória do EHPV

4.7.1 Determinação da concentração de IL-1 β

Os hipocampos dissecados foram homogeneizadas em 8 volumes de tampão PBS com protease (EMD Biosciences®), fosfatase (Sigma®-Aldrich). Logo após, os homogenatos foram centrifugadas a 10000 rpm, por 5 min e, para a realização do teste foi utilizado o sobrenadante. A concentração de IL-1 β , em 50 μ L de amostra foi determinada pela técnica de ELISA (R&D® Systems, Minneapolis, MN, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante e expressa em pg/g de tecido.

4.8 Princípios Éticos

Os experimentos foram realizados somente após aprovação do projeto no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Ceará (UFC) protocolada sob o CEUA nº 1057050220 (Anexo A). A manipulação dos animais foi realizada de acordo com as diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e seguiram os princípios éticos aceitos pelo *National Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH et al., 2011). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento e reduzir o número de animais usados nos experimentos.

4.9 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism versão 6.0 para Windows (GraphPad Software®, San Diego Califórnia EUA). Inicialmente, os resultados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, para verificar a normalidade da amostra. Para os testes com mais de três grupos, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Tukey (*post hoc*) para resultados paramétricos. Em todas as análises estatísticas, os valores foram representados pela Média \pm Erro Padrão da Média (EPM) com valores significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

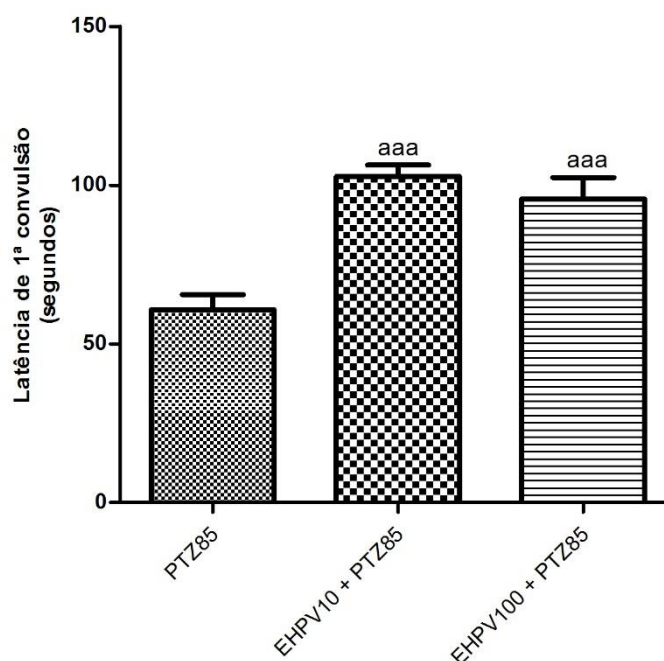
5.1 Avaliação comportamental

5.1.1 Efeito da administração do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) sobre as convulsões induzidas por pentilenotetrazol (PTZ)

5.1.1.1 Latência de primeira convulsão

Nos grupos pré-tratados com EHPV houve aumento significativo da latência de primeira convulsão nas duas doses testadas, 10 mg/kg e 100 mg/kg, quando comparadas ao grupo controle PTZ85 (EHPV10 + PTZ85: $102,8 \pm 3,604$, EHPV100 + PTZ85: $95,67 \pm 6,726$ vs PTZ85: $60,83 \pm 4,715$, $P < 0,001$). Os resultados estão representados no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a latência de primeira convulsão induzida por PTZ (85 mg/kg).

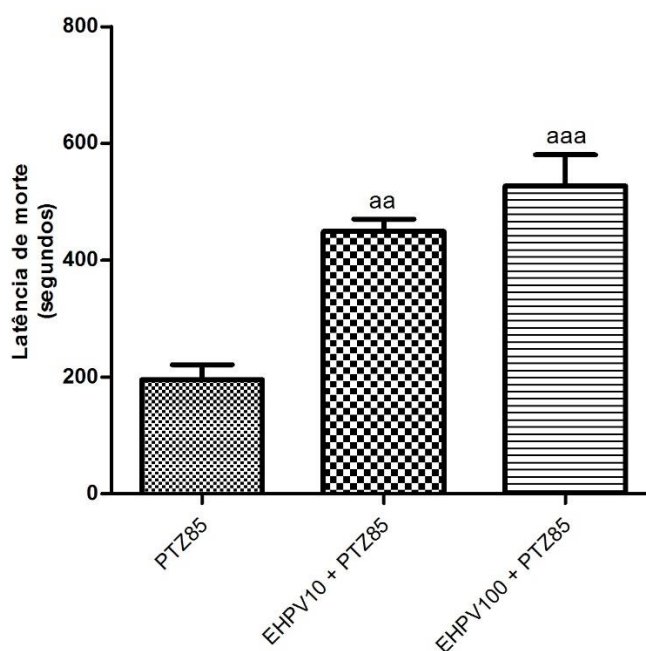


Os animais ($n=8$ animais/grupo) foram tratados durante 7 dias com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. No 7º dia do protocolo experimental, os animais foram submetidos ao modelo agudo de convulsão induzido por pentilenotetrazol, sendo avaliado o tempo para a ocorrência da 1ª convulsão. Os valores estão representados como média \pm EPM.; ^{aaa} $p < 0,001$ vs PTZ85. Teste ANOVA, seguido do Tukey como *post hoc*. Abreviações: PTZ85: Pentilenotetrazol 85 mg/kg; EHPV10: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 10 mg/kg; EHPV100: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 100 mg/kg.

5.1.1.2 Latência de morte

Na observação dos animais, verificou-se que houve aumento significativo na latência de morte dos animais pré-tratados com EHPV, tanto na dose de 10 mg/kg, quanto na dose de 100 mg/kg, quando comparados aos animais do grupo controle PTZ85 (EHPV10 + PTZ85: 449,5 ± 20,75 vs PTZ85: 195,3 ± 26,03, $P < 0,01$; EHPV100 + PTZ85: 527,3 ± 53,44 vs PTZ85: 195,3 ± 26,03, $P < 0,001$). Os resultados estão representados no Gráfico 2.

Gráfico 2 - Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a latência de morte induzida por PTZ (85 mg/kg).



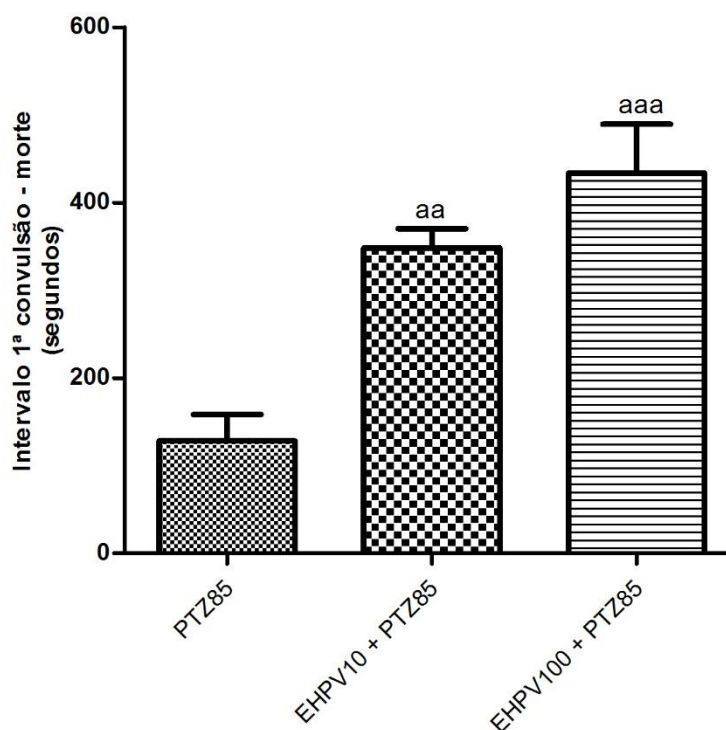
Os animais (n=8 animais/grupo) foram tratados durante 7 dias com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. No 7º dia do protocolo experimental, os animais foram submetidos ao modelo agudo de convulsão induzido por pentilenotetrazol, sendo avaliada a latência de morte. Os valores estão representados como média ± EPM.; ^{aa}p<0,01 vs PTZ85; ^{aaa}p<0,001 vs PTZ85. Teste ANOVA, seguido do Tukey como *post hoc*. Abreviações: PTZ85: Pentilenotetrazol 85 mg/kg; EHPV10: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 10 mg/kg; EHPV100: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 100 mg/kg.

5.1.1.3 Intervalo de tempo entre a primeira convulsão e a morte

Observou-se que houve aumento significativo no intervalo de tempo entre a primeira convulsão e a morte dos animais pré-tratados com EHPV, tanto na dose de 10 mg/kg,

quanto na dose de 100 mg/kg, quando comparados aos animais do grupo controle PTZ85 (EHPV10 + PTZ85: $348,3 \pm 22,13$ vs PTZ85: $128,2 \pm 30,01$, $P < 0,01$; EHPV100 + PTZ85: $433,9 \pm 55,45$ vs PTZ85: $128,2 \pm 30,01$, $P < 0,001$). Os resultados estão representados no Gráfico 3.

Gráfico 3 - Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) no intervalo de tempo entre a primeira convulsão e a morte dos animais submetidos ao modelo de convulsão induzido por PTZ (85 mg/kg).



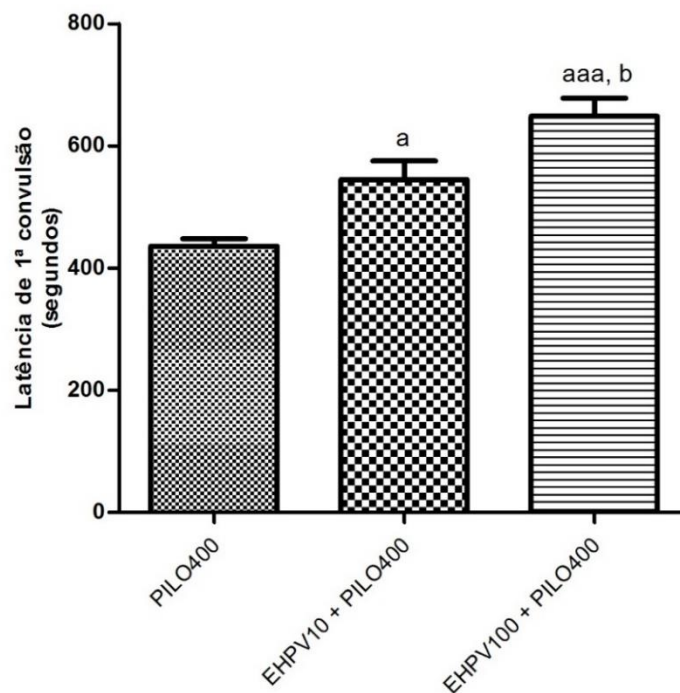
Os animais (n=8 animais/grupo) foram tratados durante 7 dias com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. No 7º dia do protocolo experimental, os animais foram submetidos ao modelo agudo de convulsão induzido por pentilenotetrazol, onde foi avaliado o intervalo de tempo entre a primeira convulsão e a morte. Os valores estão representados como média \pm EPM.; ^{aa}p<0,01 vs PTZ85; ^{aaa}p<0,001 vs PTZ85. Teste ANOVA, seguido do Tukey como *post hoc*. Abreviações: PTZ85: Pentilenotetrazol 85 mg/kg; EHPV10: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 10 mg/kg; EHPV100: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 100 mg/kg.

5.1.2 Efeito da administração do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) sobre as convulsões induzidas por pilocarpina (PILO)

5.1.2.1 Latência de primeira convulsão

Nos grupos pré-tratados com EHPV houve aumento significativo da latência de primeira convulsão nas duas doses testadas, 10 mg/kg e 100 mg/kg, quando comparadas ao grupo controle PILO400 (EHPV10 + PILO400: $544,7 \pm 30,41$ vs PILO400: $436,0 \pm 11,85$, $P < 0,05$; EHPV100 + PILO400: $648,5 \pm 29,62$ vs PILO400: $436,0 \pm 11,85$, $P < 0,001$). Além disso, observou-se que a dose de 100 mg/kg de EHPV foi significativamente superior à dose de 10 mg/kg (EHPV100 + PILO400: $648,5 \pm 29,62$ vs EHPV10 + PILO400: $544,7 \pm 30,41$, $P < 0,05$). Os resultados estão representados no Gráfico 4.

Gráfico 4 - Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a latência de primeira convulsão induzida por PILO (400 mg/kg).



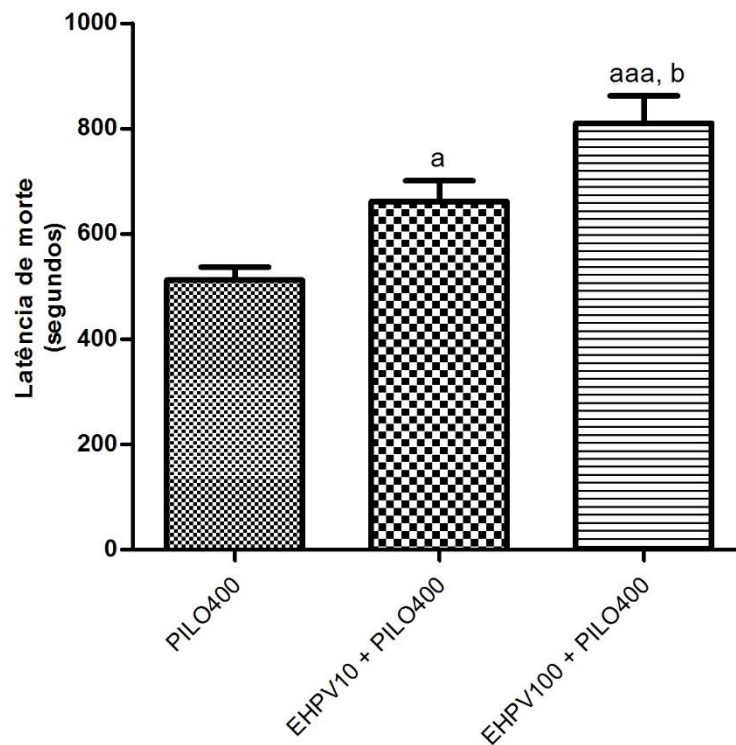
Os animais ($n=8$ animais/grupo) foram tratados durante 7 dias com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. No 7º dia do protocolo experimental, os animais foram submetidos ao modelo agudo de convulsão induzido por pilocarpina, sendo avaliado o tempo para a ocorrência da 1ª convulsão. Os valores estão representados como média \pm EPM.; ^a $p < 0,05$ vs PILO400; ^{aaa} $p < 0,001$ vs PILO400; ^b $p < 0,05$ vs EHPV10 + PILO400. Teste ANOVA, seguido do Tukey como *post hoc*. Abreviações: PILO400: Pilocarpina 400 mg/kg; EHPV10: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 10 mg/kg; EHPV100: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 100 mg/kg.

5.1.2.2 Latência de morte

Com os resultados obtidos, verificou-se que houve aumento significativo na latência de morte dos animais pré-tratados com EHPV, tanto na dose de 10 mg/kg, quanto na

dose de 100 mg/kg, quando comparados aos animais do grupo controle PILO400 (EHPV10 + PILO400: $661,4 \pm 39,68$ vs PILO400: $512,0 \pm 25,23$, $P < 0,05$; EHPV100 + PILO400: $810,3 \pm 52,44$ vs PILO400: $512,0 \pm 25,23$, $P < 0,001$). Além disso, observou-se que a dose de 100 mg/kg de EHPV foi significativamente superior à dose de 10 mg/kg (EHPV100 + PILO400: $810,3 \pm 52,44$ vs EHPV10 + PILO400: $661,4 \pm 39,68$, $P < 0,05$). Os resultados estão representados no Gráfico 5.

Gráfico 5 - Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a latência de morte induzida por PILO (400 mg/kg).



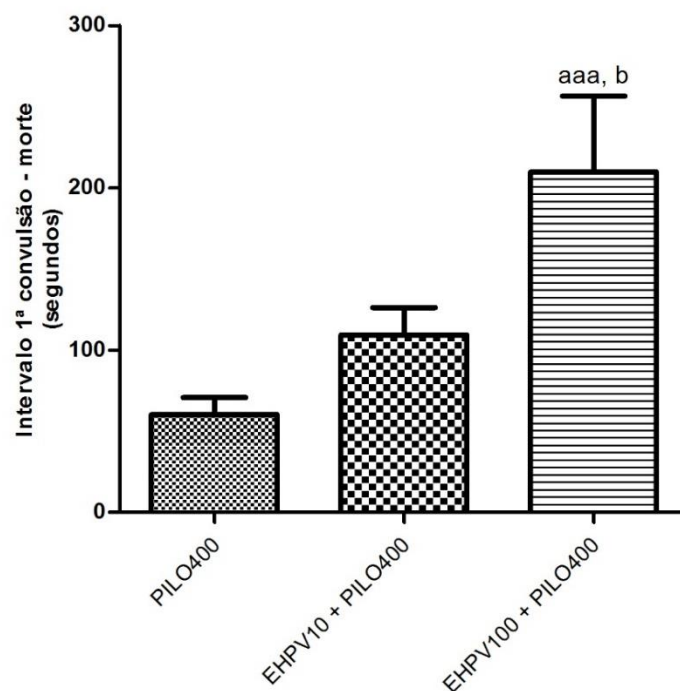
Os animais ($n=8$ animais/grupo) foram tratados durante 7 dias com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. No 7º dia do protocolo experimental, os animais foram submetidos ao modelo agudo de convulsão induzido por pilocarpina, sendo avaliada a latência de morte. Os valores estão representados como média \pm EPM.; ^a $p < 0,05$ vs PILO400; ^{aaa} $p < 0,001$ vs PILO400; ^b $p < 0,05$ vs EHPV10 + PILO400. Teste ANOVA, seguido do Tukey como *post hoc*. Abreviações: PILO400: Pilocarpina 400 mg/kg; EHPV10: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 10 mg/kg; EHPV100: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 100 mg/kg.

5.1.2.3 Intervalo de tempo entre a primeira convulsão e a morte

Observou-se que houve aumento significativo no intervalo de tempo entre a primeira convulsão e a morte dos animais pré-tratados com EHPV, apenas na dose de 100

mg/kg, quando comparado aos animais do grupo controle PILO400 (EHPV100 + PILO400: $209,8 \pm 46,85$ vs PILO400: $60,13 \pm 10,66$, $P < 0,001$). O grupo pré-tratado com EHPV 10 mg/kg não obteve diferença significativa quando comparado ao grupo controle PILO400 (EHPV10 + PILO400: $109,4 \pm 16,70$ vs PILO400: $60,13 \pm 10,66$, $P > 0,05$). Observou-se também que a dose de 100 mg/kg de EHPV foi significativamente superior à dose de 10 mg/kg (EHPV100 + PILO400: $209,8 \pm 46,85$ vs EHPV10 + PILO400: $109,4 \pm 16,70$, $P < 0,05$). Os resultados estão representados no Gráfico 6.

Gráfico 6 - Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) no intervalo de tempo entre a primeira convulsão e a morte dos animais submetidos ao modelo de convulsão induzido por PILO (400 mg/kg).



Os animais (n=8 animais/grupo) foram tratados durante 7 dias com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. No 7º dia do protocolo experimental, os animais foram submetidos ao modelo agudo de convulsão induzido por pilocarpina onde foi avaliado o intervalo de tempo entre a primeira convulsão e a morte. Os valores estão representados como média \pm EPM.; ^{aaa} $p < 0,001$ vs PILO400; ^b $p < 0,05$ vs EHPV10 + PILO400. Teste ANOVA, seguido do Tukey como *post hoc*. Abreviações: PILO400: Pilocarpina 400 mg/kg; EHPV10: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 10 mg/kg; EHPV100: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 100 mg/kg.

5.2 Avaliação neuroquímica

5.2.1 Efeito da administração do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) sobre os marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo e de defesa antioxidante no cérebro de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol (PTZ)

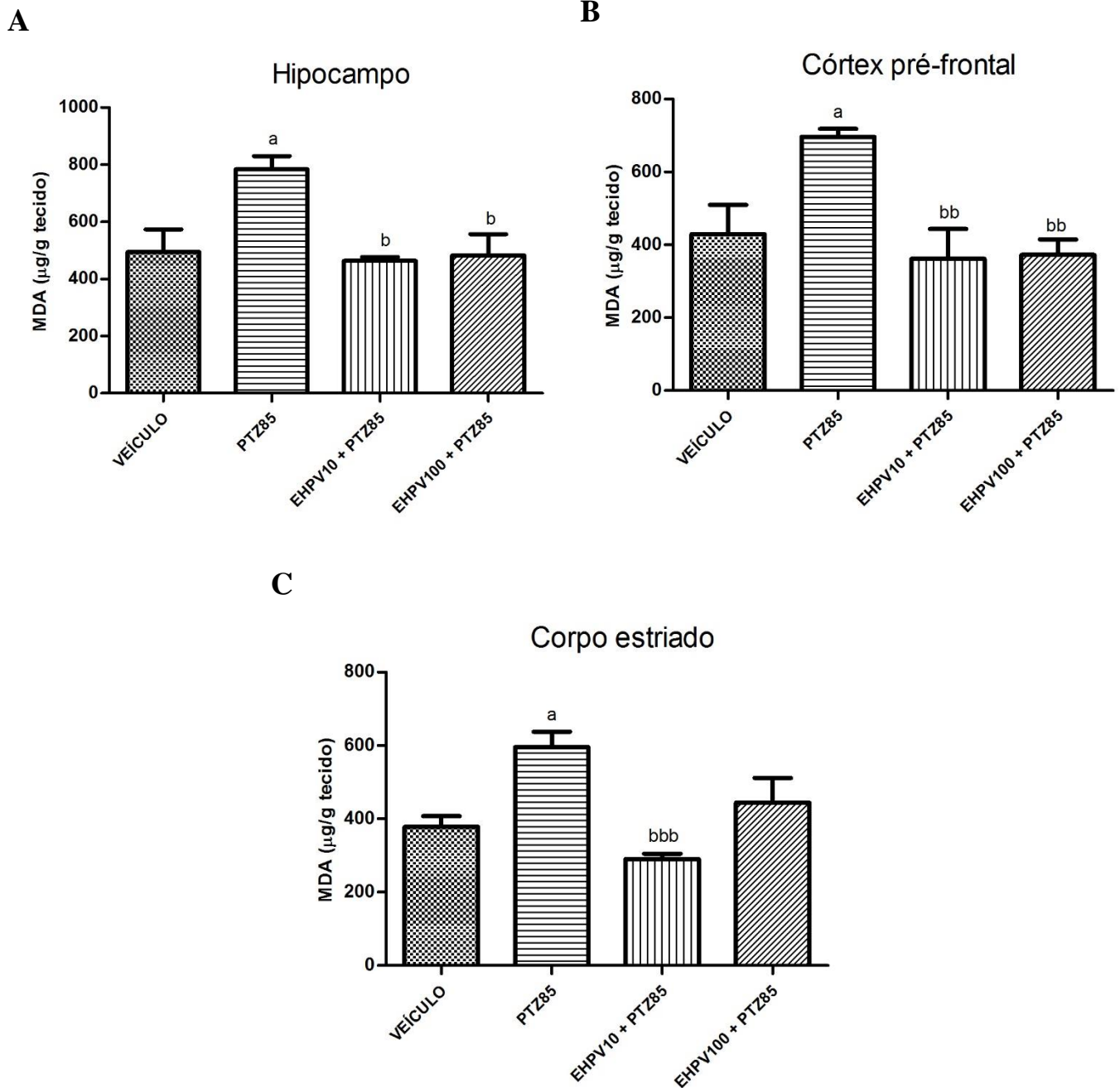
5.2.1.1 Grau de peroxidação lipídica no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado, por meio da dosagem de malondialdeído (MDA)

Na análise do hipocampo (Gráfico 7A), observou-se que no grupo controle PTZ85, o grau de peroxidação lipídica foi significativamente maior, uma vez que os níveis de MDA foram mais elevados, quando comparado ao grupo VEÍCULO. (PTZ85: $783,9 \pm 46,71$ vs VEÍCULO: $494,6 \pm 79,25$, $P < 0,05$). O pré-tratamento com EHPV foi capaz de diminuir de forma significativa os níveis de MDA nas duas doses testadas, 10 e 100 mg/kg, após a indução das convulsões pelo PTZ (EHPV10 + PTZ85: $463,4 \pm 14,06$ vs PTZ85: $783,9 \pm 46,71$; EHPV100 + PTZ85: $482,8 \pm 74,48$ vs PTZ85: $783,9 \pm 46,71$, $P < 0,05$).

No córtex pré-frontal, verificou-se que o grupo controle PTZ85 apresentou aumento significativo dos níveis de MDA, quando comparado ao grupo VEÍCULO, ou seja, no grupo PTZ85, os animais apresentaram maior grau de lipoperoxidação (PTZ85: $696,6 \pm 21,70$ vs VEÍCULO: $429,9 \pm 79,74$, $P < 0,05$). O pré-tratamento com EHPV nas duas doses testadas, 10 mg/kg e 100 mg/kg diminuiu significativamente os níveis de MDA, após as convulsões induzidas por PTZ (EHPV10 + PTZ85: $361,5 \pm 81,90$ vs PTZ85: $696,6 \pm 21,70$; EHPV100 + PTZ85: $372,2 \pm 42,96$ vs PTZ85: $696,6 \pm 21,70$, $P < 0,01$). Os resultados são expressos no Gráfico 7B.

Os níveis de malondialdeído (MDA) no corpo estriado dos animais do grupo controle PTZ85 tiveram aumento significativo, quando comparados aos animais do grupo VEÍCULO (PTZ85: $595,7 \pm 41,88$ vs VEÍCULO: $378,4 \pm 29,34$, $P < 0,05$). O pré-tratamento com EHPV10 foi capaz de diminuir de forma significativa as concentrações de MDA, após a indução de convulsões pelo PTZ (EHPV10 + PTZ85: $361,5 \pm 81,90$ vs PTZ85: $595,7 \pm 41,88$, $P < 0,001$). Por outro lado, o mesmo não foi observado com o grupo que foi pré-tratado com EHPV100, onde não houve diferença significativa nas concentrações de MDA quando se compara com o grupo controle PTZ85 (EHPV100 + PTZ85: $444,1 \pm 67,34$ vs PTZ85: $595,7 \pm 41,88$, $P > 0,05$). Os resultados estão expressos no Gráfico 7C.

Gráfico 7 - Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a dosagem de malondialdeído (MDA) no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado de animais submetidos ao modelo de convulsão induzido por PTZ.



Os animais (n=8 animais/grupo) foram tratados durante 7 dias com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. No 7º dia do protocolo experimental, os animais foram submetidos ao modelo agudo de convulsão induzido por pentilenotetrazol e as áreas cerebrais foram dissecadas para avaliar a dosagem de malondialdeído (MDA) no hipocampo (A), córtex pré-frontal (B) e corpo estriado (C). Os valores estão representados como média ± EPM. ^ap<0,05 vs VEÍCULO; ^bp<0,05; ^{bb}p<0,01; ^{bbb}p<0,001 vs PTZ85. Teste ANOVA, seguido do Tukey como *post hoc*. Abreviações: PTZ85: pentilenotetrazol 85 mg/kg; EHPV10: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 10 mg/kg; EHPV100: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 100 mg/kg.

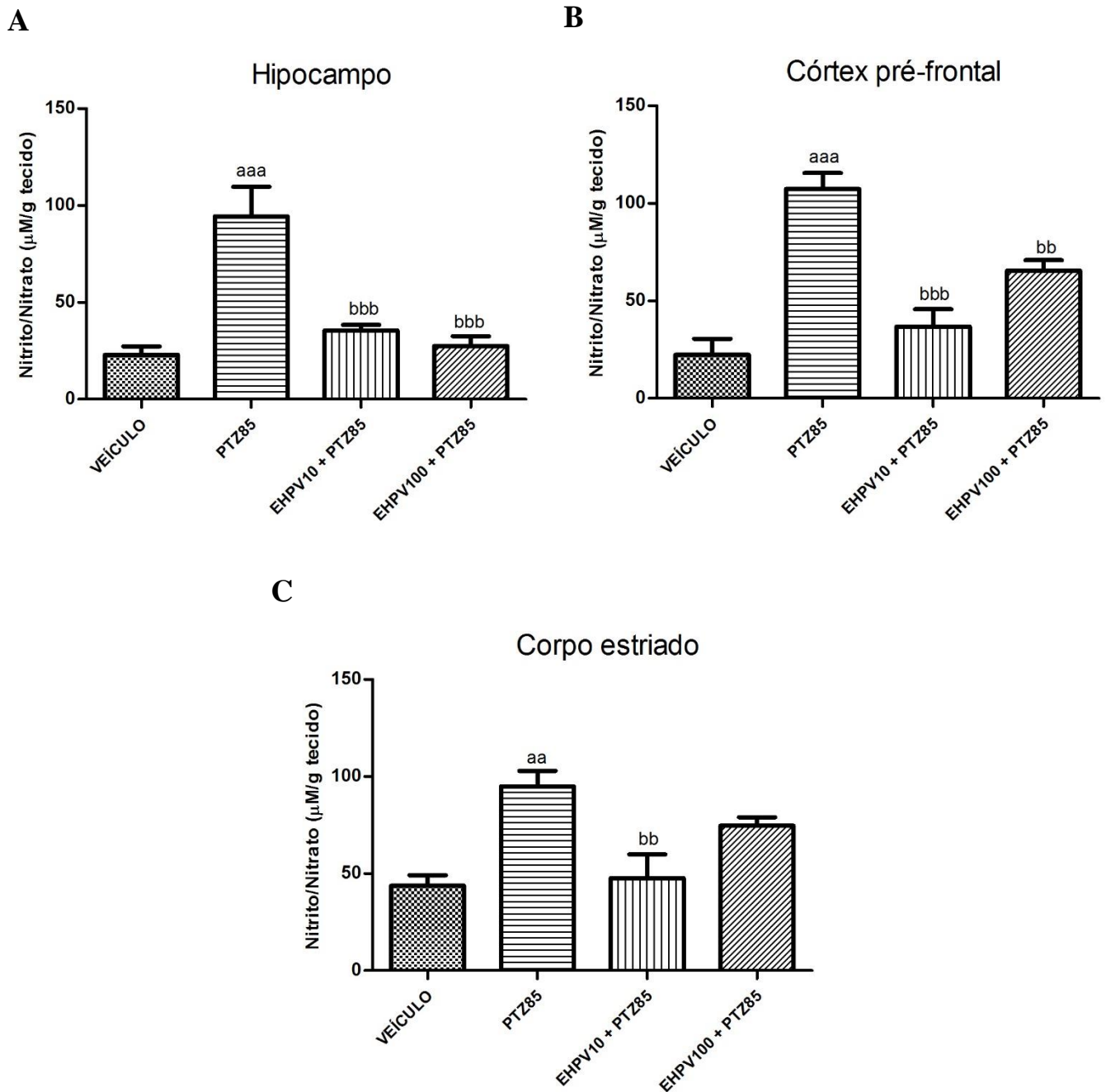
5.2.1.2 Níveis de nitrito/nitrato no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado

No hipocampo, verificou-se que no grupo controle PTZ85 os níveis de nitrito/nitrato foram significativamente maiores que no grupo VEÍCULO. (PTZ85: $94,38 \pm 15,25$ vs VEÍCULO: $23,00 \pm 4,313$, $P < 0,001$). O pré-tratamento com EHPV, tanto na dose de 10 mg/kg, quanto na dose de 100 mg/kg foi capaz de diminuir de forma significativa os níveis de nitrito/nitrato, após a indução das convulsões pelo PTZ (EHPV10 + PTZ85: $35,62 \pm 2,781$ vs PTZ85: $94,38 \pm 15,25$; EHPV100 + PTZ85: $27,54 \pm 4,987$ vs PTZ85: $94,38 \pm 15,25$, $P < 0,001$). Os resultados são expressos no Gráfico 8A.

Na análise do córtex pré-frontal, verificou-se que o grupo controle PTZ85 apresentou aumento significativo dos níveis de nitrito/nitrato, quando comparado ao grupo VEÍCULO (PTZ85: $107,3 \pm 8,209$ vs VEÍCULO: $22,32 \pm 8,283$, $P < 0,001$). O pré-tratamento com EHPV nas duas doses testadas, 10 mg/kg e 100 mg/kg diminuiu significativamente os níveis de nitrito/nitrato após as convulsões induzidas por PTZ (EHPV10 + PTZ85: $36,80 \pm 8,850$ vs PTZ85: $107,3 \pm 8,209$ $P < 0,001$; EHPV100 + PTZ85: $65,42 \pm 5,448$ vs PTZ85: $107,3 \pm 8,209$, $P < 0,01$). Os resultados são expressos no Gráfico 8B.

Os níveis de nitrito/nitrato no corpo estriado dos animais do grupo controle PTZ85 tiveram aumento significativo, quando comparados aos animais do grupo VEÍCULO (PTZ85: $94,95 \pm 7,970$ vs VEÍCULO: $43,64 \pm 5,611$. $P < 0,01$). O pré-tratamento com EHPV10 foi capaz de diminuir de forma significativa as concentrações de nitrito/nitrato após a indução de convulsões pelo PTZ (EHPV10 + PTZ85: $47,74 \pm 12,16$ vs PTZ85: $94,95 \pm 7,970$, $P < 0,01$). O mesmo não foi observado com o grupo pré-tratado com EHPV100, onde não houve diferença significativa nas concentrações de nitrito/nitrato quando se compara com o grupo controle PTZ85 (EHPV100 + PTZ85: $74,75 \pm 4,352$ vs PTZ85: $94,95 \pm 7,970$, $P > 0,05$). Os resultados estão expressos no Gráfico 8C.

Gráfico 8 - Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a dosagem de nitrito/nitrato no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado de animais submetidos ao modelo de convulsão induzido por PTZ.



Os animais ($n=8$ animais/grupo) foram tratados durante 7 dias com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. No 7º dia do protocolo experimental, os animais foram submetidos ao modelo agudo de convulsão induzido por pentilenotetrazol e as áreas cerebrais foram dissecadas para avaliar a dosagem de nitrito/nitrato no hipocampo (A), córtex pré-frontal (B) e corpo estriado (C). Os valores estão representados como média \pm EPM. ^{aa} $p<0,01$, ^{aaa} $p<0,001$ vs VEÍCULO; ^{bb} $p<0,01$; ^{bbb} $p<0,001$ vs PTZ85. Teste ANOVA, seguido do Tukey como *post hoc*. Abreviações: PTZ85: pentilenotetrazol 85 mg/kg; EHPV10: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 10 mg/kg; EHPV100: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 100 mg/kg.

5.2.1.3 Níveis de glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado

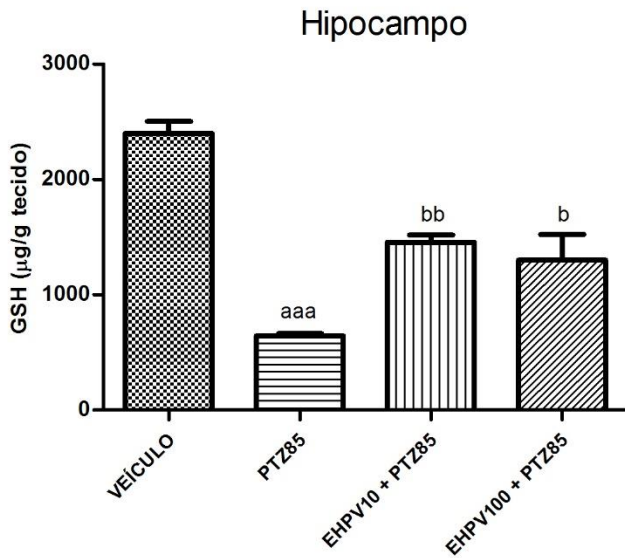
No hipocampo, verificou-se que as concentrações da enzima glutathiona reduzida reduziram significativamente nos animais do grupo controle PTZ85 quando comparados aos animais do grupo VEÍCULO. (PTZ85: $642,9 \pm 20,15$ vs VEÍCULO: $2398,0 \pm 105,9$, $P < 0,001$). O pré-tratamento com EHPV, tanto na dose de 10 mg/kg, quanto na dose de 100 mg/kg foi capaz de aumentar de forma significativa os níveis de GSH, após a indução das convulsões pelo PTZ (EHPV10 + PTZ85: $1457 \pm 62,40$ vs PTZ85: $642,9 \pm 20,15$ $P < 0,01$; EHPV100 + PTZ85: $1301 \pm 222,1$ vs PTZ85: $642,9 \pm 20,15$, $P < 0,05$). Os resultados são expressos no Gráfico 9A.

Na análise do córtex pré-frontal, verificou-se que o grupo controle PTZ85 apresentou redução significativa dos níveis de GSH, quando comparado ao grupo VEÍCULO (PTZ85: $639,2 \pm 66,30$ vs VEÍCULO: $2784,0 \pm 125,4$, $P < 0,001$). O pré-tratamento com EHPV nas duas doses testadas, 10 mg/kg e 100 mg/kg aumentou significativamente os níveis de glutathiona reduzida, após as convulsões induzidas por PTZ (EHPV10 + PTZ85: $1249,0 \pm 26,20$ vs PTZ85: $639,2 \pm 66,30$ $P < 0,001$; EHPV100 + PTZ85: $1015,0 \pm 41,80$ vs PTZ85: $639,2 \pm 66,30$, $P < 0,05$). Os resultados estão expressos no Gráfico 9B.

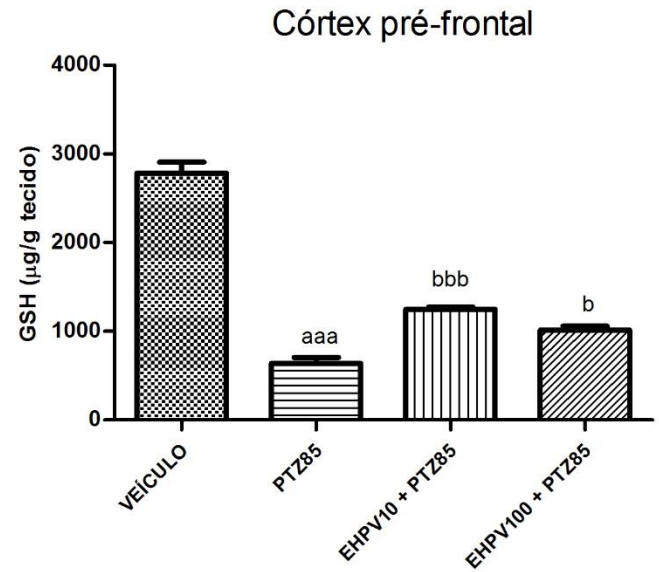
Os níveis de GSH no corpo estriado dos animais do grupo controle PTZ85 tiveram redução significativa, quando comparados aos animais do grupo VEÍCULO (PTZ85: $738,8 \pm 95,02$ vs VEÍCULO: $1749 \pm 25,77$. $P < 0,001$). O pré-tratamento com EHPV10 foi capaz de aumentar de forma significativa as concentrações de GSH, após a indução de convulsões pelo PTZ (EHPV10 + PTZ85: $1164,0 \pm 186,1$ vs PTZ85: $738,8 \pm 95,02$, $P < 0,05$). O mesmo não foi observado com o grupo pré-tratado com EHPV100, onde não houve diferença significativa nas concentrações de glutathiona reduzida quando se compara com o grupo controle PTZ85 (EHPV100 + PTZ85: $1019,0 \pm 29,29$ vs PTZ85: $738,8 \pm 95,02$, $P > 0,05$). Os resultados estão expressos no Gráfico 9C.

Gráfico 9 - Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a dosagem de GSH no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado de animais submetidos ao modelo de convulsão induzido por PTZ.

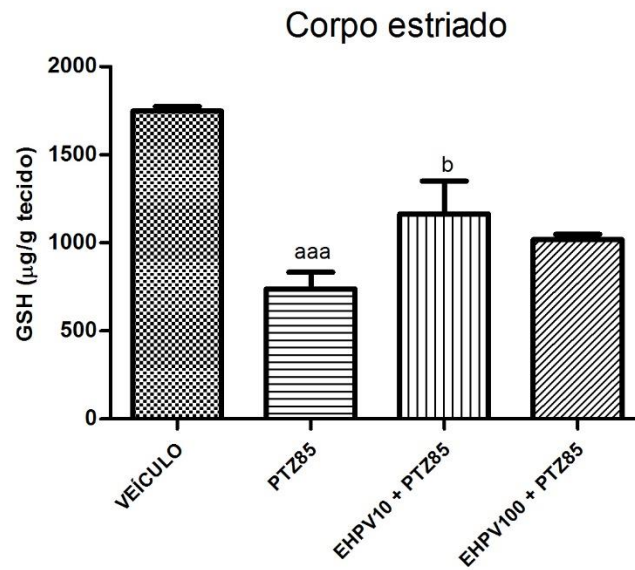
A



B



C



Os animais (n=8 animais/grupo) foram tratados durante 7 dias com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. No 7º dia do protocolo experimental, os animais foram submetidos ao modelo agudo de convulsão induzido por pentilenotetrazol e as áreas cerebrais foram dissecadas para avaliar a dosagem de glutatona reduzida (GSH) no hipocampo (A), córtex pré-frontal (B) e corpo estriado (C). Os valores estão representados como média \pm EPM. ^{aaa}p<0,001 vs VEÍCULO; ^bp<0,05; ^{bb}p<0,01; ^{bbb}p<0,001 vs PTZ85. Teste ANOVA, seguido do Tukey como *post hoc*. Abreviações: PTZ85: pentilenotetrazol 85 mg/kg; EHPV10: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 10 mg/kg; EHPV100: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 100 mg/kg.

5.2.2 Efeito da administração do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) sobre os marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo e de defesa antioxidante no cérebro de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzido por pilocarpina (PILO)

5.2.2.1 Grau de peroxidação lipídica no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado, por meio da dosagem de malondialdeído (MDA)

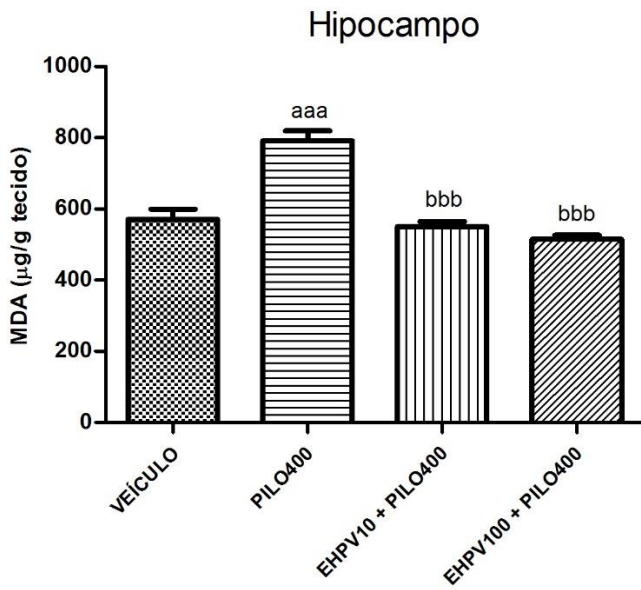
Na análise do hipocampo (Gráfico 10A), observou-se que o grupo controle PILO400 apresentou níveis de MDA significativamente mais elevados que o grupo VEÍCULO. (PILO400: $791,0 \pm 28,19$ vs VEÍCULO: $570,5 \pm 29,27$, $P < 0,001$). O pré-tratamento com EHPV foi capaz de diminuir de forma significativa os níveis de MDA nas duas doses testadas, 10 e 100 mg/kg, após a indução das convulsões pela pilocarpina (EHPV10 + PILO400: $550,4 \pm 13,92$ vs PILO400: $791,0 \pm 28,19$; EHPV100 + PILO400: $515,2 \pm 11,25$ vs PILO400: $791,0 \pm 28,19$, $P < 0,001$).

No córtex pré-frontal, verificou-se que o grupo controle PILO400 apresentou aumento significativo dos níveis de MDA, quando comparado ao grupo VEÍCULO, ou seja, no grupo PILO, os animais apresentaram maior grau de lipoperoxidação (PILO400: $658,1 \pm 24,72$ vs VEÍCULO: $429,9 \pm 79,74$, $P < 0,05$). O pré-tratamento com EHPV nas duas doses testadas, 10 mg/kg e 100 mg/kg diminuiu significativamente os níveis de MDA, após as convulsões induzidas pela pilocarpina (EHPV10 + PILO400: $394,0 \pm 48,24$ vs PILO400: $658,1 \pm 24,72$; EHPV100 + PILO400: $355,1 \pm 19,73$ vs PILO400: $658,1 \pm 24,72$, $P < 0,01$). Os resultados são expressos no Gráfico 10B.

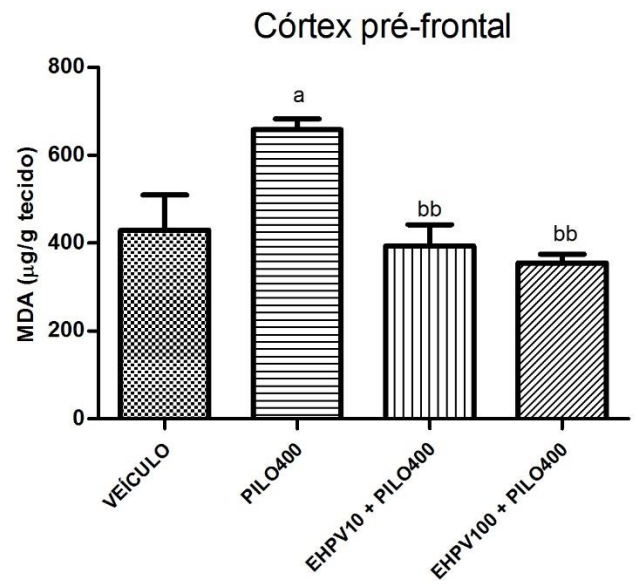
Os níveis de malondialdeído (MDA) no corpo estriado dos animais do grupo controle PILO400 tiveram aumento significativo, quando comparados aos animais do grupo VEÍCULO (PILO400: $814,6 \pm 166,4$ vs VEÍCULO: $466,8 \pm 59,02$, $P < 0,05$). O pré-tratamento com EHPV tanto na dose de 10 mg/kg, quanto na dose de 100 mg/kg foi capaz de diminuir de forma significativa as concentrações de MDA, após a indução de convulsões pela pilocarpina (EHPV10 + PILO400: $390,4 \pm 42,34$ vs PILO400: $814,6 \pm 166,4$; EHPV100 + PILO400: $373,0 \pm 42,34$ vs PILO400: $814,6 \pm 166,4$ $P < 0,01$). Os resultados estão expressos no Gráfico 10C.

Gráfico 10 - Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a dosagem de MDA no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado de animais submetidos ao modelo de convulsão induzido pela pilocarpina.

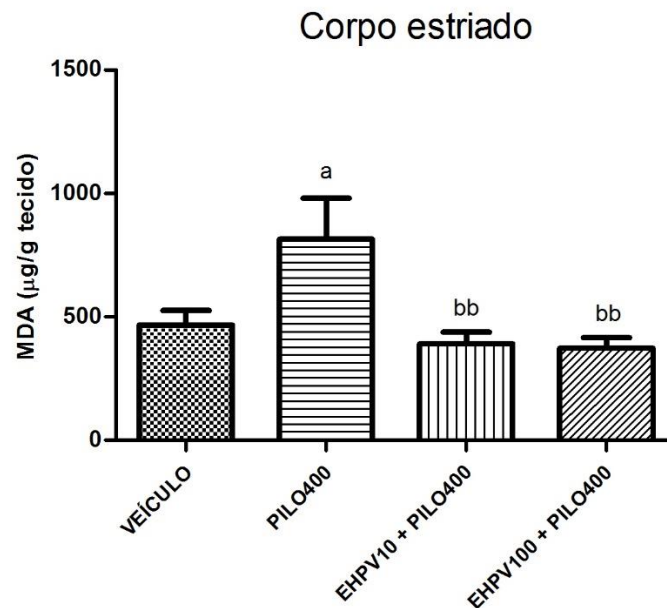
A



B



C



Os animais (n=8 animais/grupo) foram tratados durante 7 dias com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. No 7º dia do protocolo experimental, os animais foram submetidos ao modelo agudo de convulsão induzido pela pilocarpina e as áreas cerebrais foram dissecadas para avaliar a dosagem de malondialdeído (MDA) no hipocampo (A), córtex pré-frontal (B) e corpo estriado (C). Os valores estão representados como média \pm EPM. ^ap<0,05, ^{aaa}p<0,001 vs VEÍCULO; ^{bb}p<0,01; ^{bbb}p<0,001 vs PILO400. Teste ANOVA, seguido do Tukey como *post hoc*. Abreviações: PILO400: Pilocarpina 400 mg/kg; EHPV10: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 10 mg/kg; EHPV100: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 100 mg/kg.

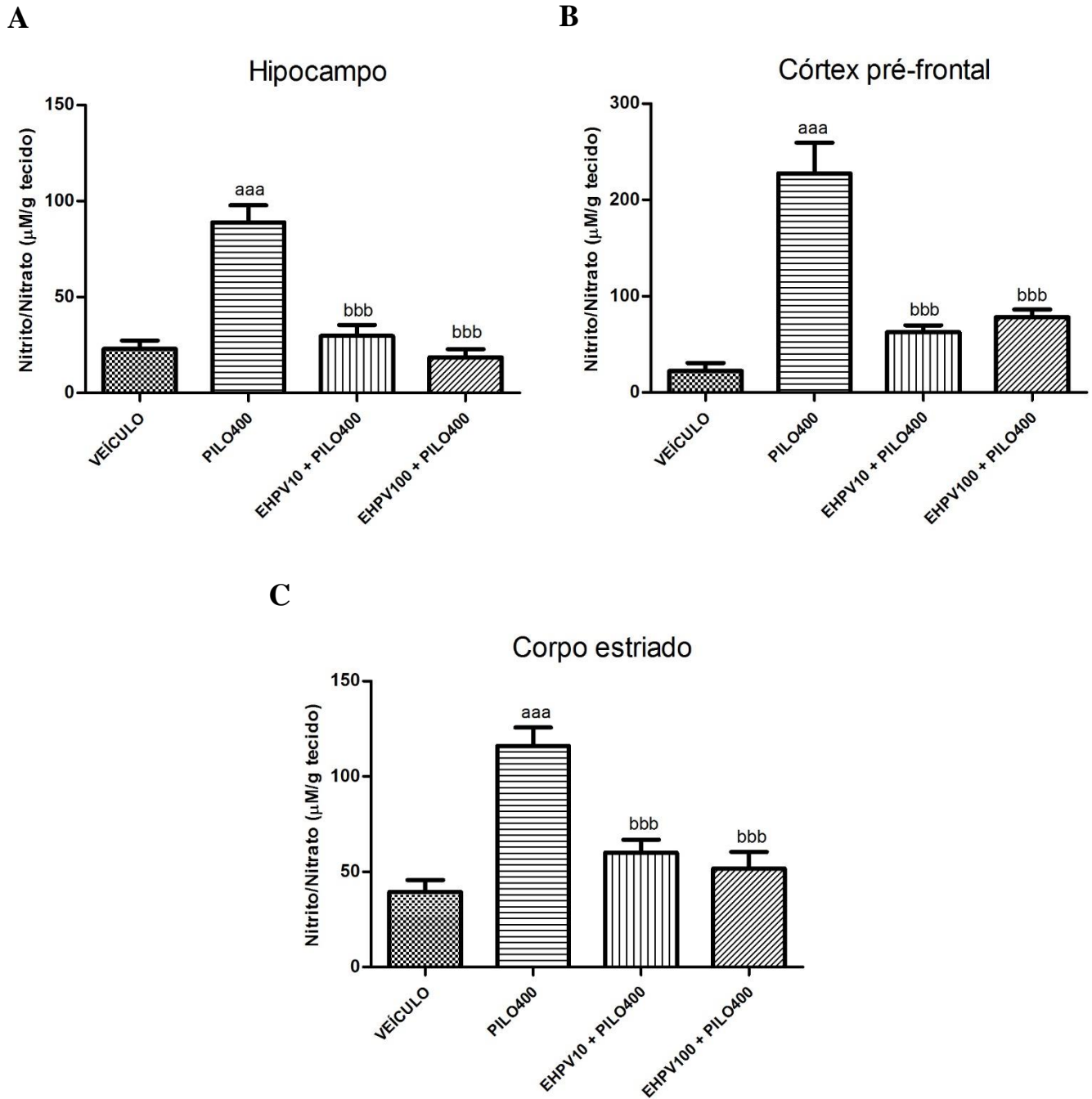
5.2.2.2 Níveis de nitrito/nitrato no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado

No hipocampo, verificou-se que no grupo controle PILO400 os níveis de nitrito/nitrato foram significativamente maiores que no grupo VEÍCULO. (PILO400: $88,89 \pm 8,879$ vs VEÍCULO: $23,00 \pm 4,313$, $P < 0,001$). O pré-tratamento com EHPV, tanto na dose de 10 mg/kg, quanto na dose de 100 mg/kg foi capaz de diminuir de forma significativa os níveis de nitrito/nitrato, após a indução das convulsões pela pilocarpina (EHPV10 + PILO: $29,73 \pm 5,651$ vs PILO400: $88,89 \pm 8,879$; EHPV100 + PILO400: $18,59 \pm 4,218$ vs PILO400: $88,89 \pm 8,879$, $P < 0,001$). Os resultados são expressos no Gráfico 11A.

Na análise do córtex pré-frontal, verificou-se que o grupo controle PILO400 apresentou aumento significativo dos níveis de nitrito/nitrato, quando comparado ao grupo VEÍCULO (PILO400: $227,5 \pm 32,14$ vs VEÍCULO: $22,32 \pm 8,283$, $P < 0,001$). O pré-tratamento com EHPV nas duas doses testadas, 10 mg/kg e 100 mg/kg diminuiu significativamente os níveis de nitrito/nitrato, após as convulsões induzidas pela pilocarpina (EHPV10 + PILO400: $62,73 \pm 7,227$ vs PILO400: $227,5 \pm 32,14$; EHPV100 + PTZ85: $78,38 \pm 7,706$ vs PILO400: $227,5 \pm 32,14$, $P < 0,001$). Os resultados são expressos no Gráfico 11B.

Os níveis de nitrito/nitrato no corpo estriado dos animais do grupo controle PILO400 tiveram aumento significativo, quando comparados aos animais do grupo VEÍCULO (PILO400: $116,0 \pm 9,639$ vs VEÍCULO: $39,49 \pm 6,176$. $P < 0,001$). O pré-tratamento com EHPV tanto na dose de 10 mg/kg, quanto na dose de 100 mg/kg foi capaz de diminuir de forma significativa as concentrações de nitrito/nitrato, após a indução de convulsões pela pilocarpina (EHPV10 + PILO400: $60,03 \pm 6,783$ vs PILO400: $116,0 \pm 9,639$; EHPV100 +PILO400: $51,72 \pm 8,669$ vs PILO400: $116,0 \pm 9,639$, $P < 0,001$). Os resultados estão expressos no Gráfico 11C.

Gráfico 11 - Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a dosagem de nitrito/nitrato no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado de animais submetidos ao modelo de convulsão induzido pela pilocarpina.



Os animais (n=8 animais/grupo) foram tratados durante 7 dias com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. No 7º dia do protocolo experimental, os animais foram submetidos ao modelo agudo de convulsão induzido pela pilocarpina e as áreas cerebrais foram dissecadas para avaliar a dosagem de nitrito/nitrato no hipocampo (A), córtex pré-frontal (B) e corpo estriado (C). Os valores estão representados como média \pm EPM. ^{aaa}p<0,001 vs VEÍCULO; ^{bbb}p<0,001 vs PILO400. Teste ANOVA, seguido do Tukey como *post hoc*. Abreviações: PILO400: pilocarpina 400 mg/kg; EHPV10: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 10 mg/kg; EHPV100: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 100 mg/kg.

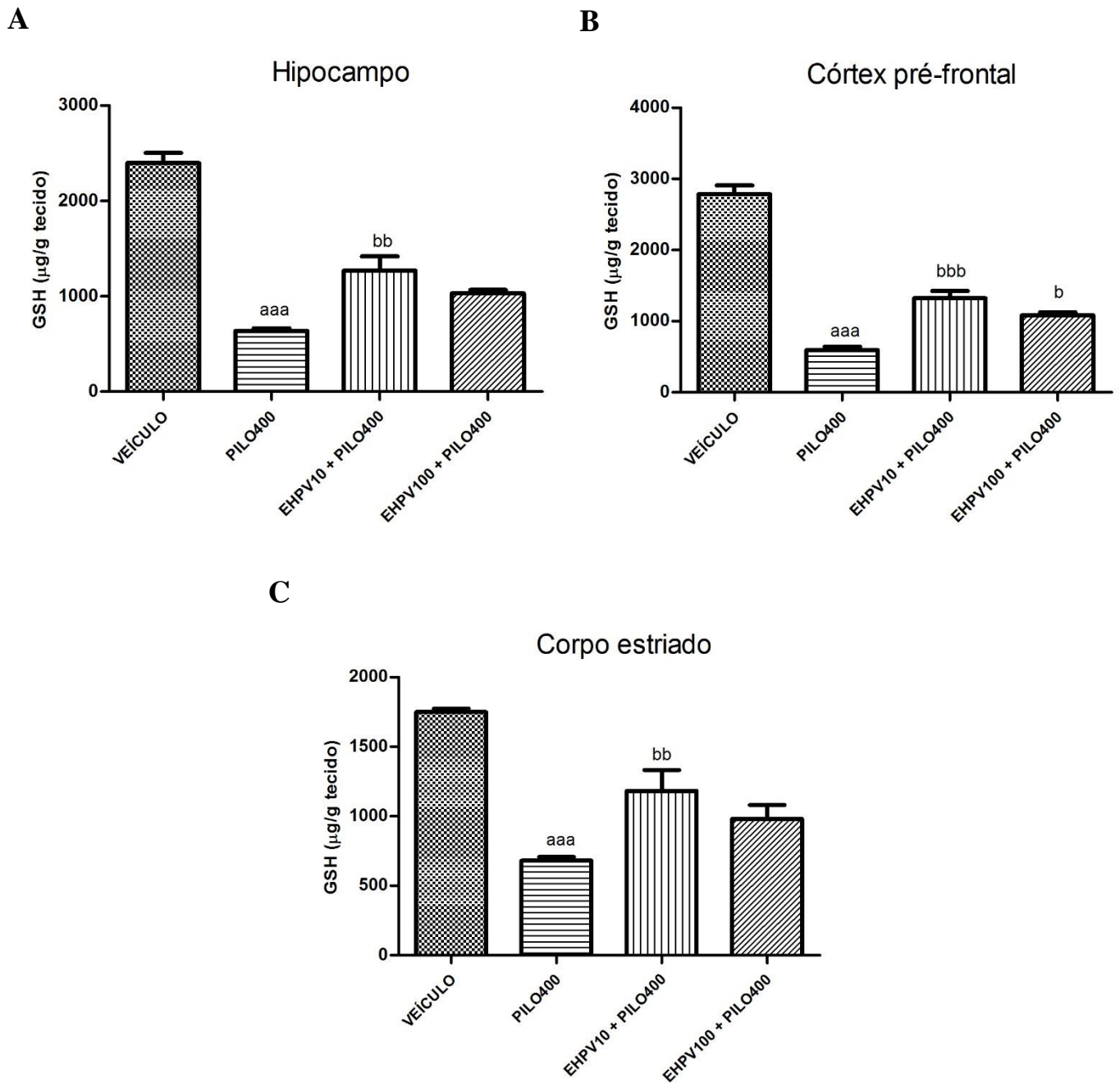
5.2.2.3 Níveis de glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado

No hipocampo, verificou-se que as concentrações da enzima glutathiona reduzida reduziram significativamente nos animais do grupo controle PILO400 quando comparados aos animais do grupo VEÍCULO. (PILO400: $635,4 \pm 28,75$ vs VEÍCULO: $2398,0 \pm 105,9$, $P < 0,001$). O pré-tratamento com EHPV10 foi capaz de aumentar de forma significativa as concentrações de GSH, após a indução de convulsões pela pilocarpina (EHPV10 + PILO400: $1270,0 \pm 148,0$ vs PILO400: $635,4 \pm 28,75$, $P < 0,01$). O mesmo não foi observado com o grupo pré-tratado com EHPV100, onde não houve diferença significativa nas concentrações de glutathiona reduzida quando se compara com o grupo controle PILO400 (EHPV100 + PILO400: $1030,0 \pm 35,29$ vs PILO400: $635,4 \pm 28,75$, $P > 0,05$). Os resultados estão expressos no Gráfico 12A.

Na análise do córtex pré-frontal, verificou-se que o grupo controle PILO400 apresentou redução significativa dos níveis de GSH, quando comparado ao grupo VEÍCULO (PILO400: $592,6 \pm 49,35$ vs VEÍCULO: $2784,0 \pm 125,4$, $P < 0,001$). O pré-tratamento com EHPV nas duas doses testadas, 10 mg/kg e 100 mg/kg aumentou significativamente os níveis de glutathiona reduzida, após as convulsões induzidas por PILO400 (EHPV10 + PILO400: $1321,0 \pm 104,8$ vs PILO400: $592,6 \pm 49,35$, $P < 0,001$; EHPV100 + PILO400: $1083,0 \pm 42,68$ vs PILO400: $592,6 \pm 49,35$, $P < 0,05$). Os resultados estão expressos no Gráfico 12B.

Os níveis de GSH no corpo estriado dos animais do grupo controle PILO400 tiveram redução significativa, quando comparados aos animais do grupo VEÍCULO (PILO400: $680,1 \pm 26,64$ vs VEÍCULO: $1749 \pm 25,77$. $P < 0,001$). O pré-tratamento com EHPV10 foi capaz de aumentar de forma significativa as concentrações de glutathiona reduzida, após a indução de convulsões pelo pilocarpina (EHPV10 + PILO400: $1183,0 \pm 149,8$ vs PILO400: $680,1 \pm 26,64$, $P < 0,01$). Entretanto, os animais do grupo pré-tratado com EHPV100, não apresentaram diferença significativa nas concentrações de glutathiona reduzida no corpo estriado quando comparados aos animais do grupo controle PILO400 (EHPV100 + PILO400: $980,5 \pm 99,47$ vs PILO400: $680,1 \pm 26,64$, $P > 0,05$). Os resultados estão expressos no Gráfico 12C.

Gráfico 12 - Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a dosagem de GSH no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado de animais submetidos ao modelo de convulsão induzido pela pilocarpina.



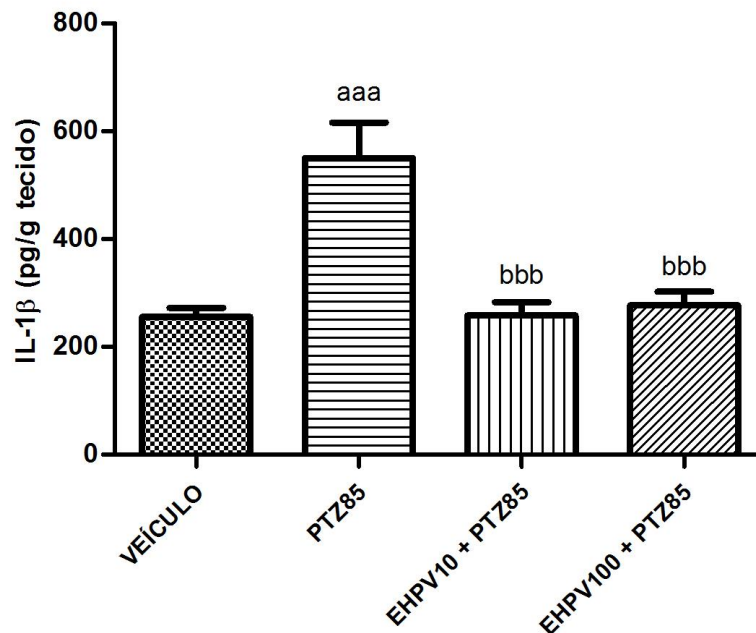
Os animais ($n=8$ animais/grupo) foram tratados durante 7 dias com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. No 7º dia do protocolo experimental, os animais foram submetidos ao modelo agudo de convulsão induzido pela pilocarpina e as áreas cerebrais foram dissecadas para avaliar a dosagem de glutatona reduzida (GSH) no hipocampo (A), córtex pré-frontal (B) e corpo estriado (C). Os valores estão representados como média \pm EPM. ^{aaa} $p < 0,001$ vs VEÍCULO; ^b $p < 0,05$; ^{bb} $p < 0,01$; ^{bbb} $p < 0,001$ vs PILO400. Teste ANOVA, seguido do Tukey como *post hoc*. Abreviações: PILO400: pilocarpina 400 mg/kg; EHPV10: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 10 mg/kg; EHPV100: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 100 mg/kg.

5.3 Avaliação da resposta anti-inflamatória

5.4.1 Efeito da administração do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) na resposta inflamatória no hipocampo, por meio da dosagem de IL-1 β em camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol (PTZ)

As concentrações de IL-1 β tiveram seus níveis aumentados de forma significativa no hipocampo dos animais do grupo controle PTZ85, quando comparados aos animais do grupo VEÍCULO (PTZ85: $550,4 \pm 66,12$ vs VEÍCULO: $255,4 \pm 17,07$, $P < 0,001$). O pré-tratamento com EHPV nas duas doses testadas, 10 mg/kg e 100 mg/kg foi capaz de reverter de forma significativa o aumento da citocina pró-inflamatória IL-1 β (EHPV10 + PTZ85: $258,3 \pm 24,67$ vs PTZ85: $550,4 \pm 66,12$; EHPV100 + PTZ85: $276,8 \pm 25,33$ vs PTZ85: $550,4 \pm 66,12$, $P < 0,001$). Os resultados estão expressos no Gráfico 13.

Gráfico 13 - Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a dosagem de IL-1 β no hipocampo de animais submetidos ao modelo de convulsão induzido por PTZ

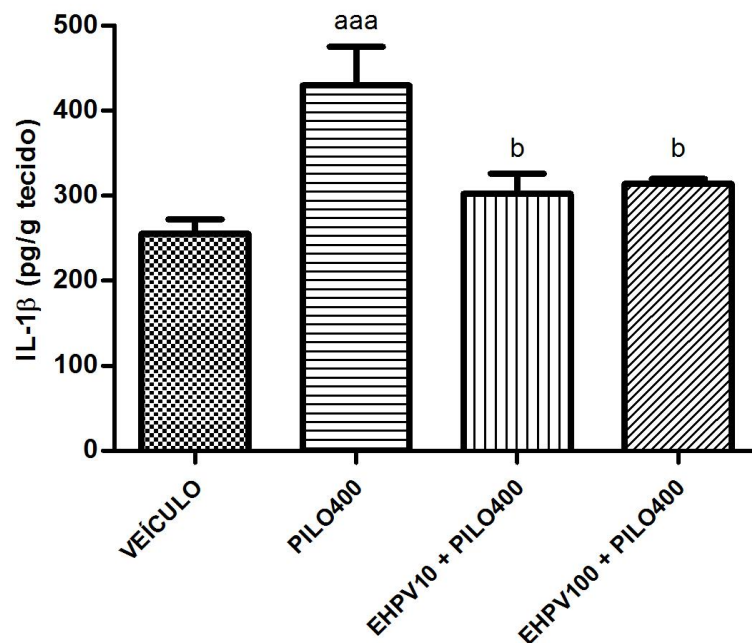


Os animais (n=8 animais/grupo) foram tratados durante 7 dias com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. No 7º dia do protocolo experimental, os animais foram submetidos ao modelo agudo de convulsão induzido por PTZ e as áreas cerebrais foram dissecadas para avaliar a dosagem de IL-1 β no hipocampo. Os valores estão representados como média \pm EPM. ^{aaa} $p < 0,001$ vs VEÍCULO; ^{bbb} $p < 0,001$ vs PTZ85. Teste ANOVA, seguido do Tukey como *post hoc*. Abreviações: PTZ85: pentilenotetrazol 85 mg/kg; EHPV10: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 10 mg/kg; EHPV100: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 100 mg/kg.

5.3.2 Efeito da administração do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha (EHPV) na resposta inflamatória no hipocampo, por meio da dosagem de IL-1 β em camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzido por pilocarpina (PILO)

As concentrações de IL-1 β aumentaram significativamente no hipocampo dos animais do grupo controle PILO400, quando comparados aos animais do grupo VEÍCULO (PILO400: $429,7 \pm 45,61$ vs VEÍCULO: $255,4 \pm 17,07$, $P < 0,001$). O pré-tratamento com EHPV tanto na dose de 10 mg/kg, quanto na dose de 100 mg/kg foi capaz de reverter de forma significativa o aumento de IL-1 β (EHPV10 + PILO400: $302,5 \pm 23,49$ vs PILO400: $429,7 \pm 45,61$; EHPV100 + PILO400: $313,8 \pm 5,962$ vs PILO400: $429,7 \pm 45,61$, $P < 0,05$). Os resultados estão expressos no Gráfico 14.

Gráfico 14 - Efeito da administração de EHPV (10 ou 100 mg/kg) sobre a dosagem de IL-1 β no hipocampo de animais submetidos ao modelo de convulsão induzido por pilocarpina



Os animais (n=8 animais/grupo) foram tratados durante 7 dias com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. No 7º dia do protocolo experimental, os animais foram submetidos ao modelo agudo de convulsão induzido por pilocarpina e as áreas cerebrais foram dissecadas para avaliar a dosagem de IL-1 β no hipocampo. Os valores estão representados como média \pm EPM. ^{aaa} $p < 0,001$ vs VEÍCULO; ^b $p < 0,05$ vs PILO400. Teste ANOVA, seguido do Tukey como *post hoc*. Abreviações: PILO400: pilocarpina 400 mg/kg; EHPV10: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 10 mg/kg; EHPV100: extrato hidroalcoólico de própolis vermelha 100 mg/kg.

6 DISCUSSÃO

Para investigar se possíveis efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios podem estar envolvidos nas ações neuroprotetoras do EHPV durante o processo convulsivo, foi realizado nesse trabalho um pré-tratamento com EHPV nas doses de 10 e 100 mg/kg, por via oral, durante sete dias consecutivos e, no sétimo dia, poucos minutos após a administração de EHPV, os animais receberam PTZ 85 mg/kg e PILO 400 mg/kg de forma aguda. As doses foram selecionadas com base em estudos anteriores que demonstraram efeitos anti-inflamatórios, antioxidantes e neuroprotetores (BARBOSA *et al.*, 2015; BEZERRA *et al.*, 2017; CAVENDISH *et al.*, 2015).

A administração de EHPV nas doses de 10 mg/kg e 100 mg/kg em roedores pode ser considerada segura, pois em um estudo que avaliou o perfil de toxicidade aguda e subaguda do EHPV em murinos, não foram observados efeitos letais para doses abaixo de 300 mg/kg, embora tenham sido observados alguns sinais de toxicidade para essa dose exata. Além disso, a maior parte dos sinais de toxicidade subaguda apareceram somente quando foram administradas doses acima de 200 mg/kg. (DA SILVA *et al.*, 2015).

O presente estudo demonstrou que a administração sistêmica dos agentes pentilenotetrazol 85 mg/kg e pilocarpina 400 mg/kg levaram à ocorrência de convulsões nos camundongos. Esses achados corroboram com a literatura, uma vez que já foi bem demonstrado que, em modelo animal, o PTZ na dose de 85 mg/kg mimetiza ausência generalizada e/ou crises mioclônicas em humanos (LÖSCHER, 1998), devido a inibição dos canais de Cl⁻ associados aos receptores GABA (LÖSCHER *et al.*, 1998) e pela estimulação e modificação da densidade e da sensibilidade de diferentes subtipos de receptores de glutamato (WHITE *et al.*, 2007). Além disso, já está descrito na literatura que a pilocarpina leva a ocorrência de epilepsia do lobo temporal (PINHEIRO, 2002), por exacerbação da atividade colinérgica, provavelmente por influência direta, aumentando a ação da ACh circulante, modificando o binding dos receptores muscarínicos (HRUSKA *et al.*, 1984) e diminuindo a atividade da enzima acetilcolinesterase (IMPERATO *et al.*, 1998).

Os resultados deste estudo mostram que as convulsões induzidas por pilocarpina, nos animais pré-tratados com EHPV por sete dias consecutivos, tanto na dose de 10 mg/kg quanto na dose de 100 mg/kg foram atenuadas, sendo observado, de forma significativa, o aumento do tempo para o início da primeira convulsão, o aumento do intervalo de tempo, em segundos, entre a ocorrência da primeira convulsão e a morte dos animais e o aumento da latência de morte, quando comparados aos animais tratados apenas com pilocarpina 400

mg/kg. O aumento desses três parâmetros indica que o EHPV nas duas doses testadas, apresenta ação neuroprotetora importante e, até mesmo, possíveis propriedades anticonvulsivantes.

A investigação do mecanismo anticonvulsivantes pela via colinérgica, foi realizada através do modelo da pilocarpina, um agonista muscarínico, que em doses elevadas induz alterações comportamentais, como convulsões e lesões cerebrais em ratos e camundongos devido a uma superestimulação cortical promovida por esse agente (FREITAS *et al.*, 2006). As análises comportamentais para a latência de convulsão e morte nos permitem sugerir que o EHPV pode possuir um provável mecanismo anticonvulsivante pela via colinérgica.

A ativação colinérgica se mostra essencial para o início do processo convulsivo em modelos de epilepsia do lobo temporal, uma vez que este processo convulsivo pode ser inibido pelo pré-tratamento com o antagonista muscarínico atropina (MARINHO *et al.*, 1998). O agonista muscarínico pilocarpina exacerba a atividade colinérgica, provavelmente por influência direta, aumentando a ação da ACh circulante, modificando o *binding* dos receptores muscarínicos (HRUSKA *et al.*, 1984) e diminuindo a atividade acetilcolinesterásica (IMPERATO *et al.*, 1998).

O pré-tratamento com EHPV nas duas doses testadas, 10 e 100 mg/kg em doses repetidas foi capaz de aumentar consideravelmente os parâmetros comportamentais: tempo para o início da primeira convulsão, intervalo de tempo, em segundos, entre a ocorrência da primeira convulsão e a morte dos animais e latência de morte, nos animais do grupo EHPV10 + PTZ85 e EHPV100 + PTZ85 quando comparados aos animais tratados apenas com pentilenotetrazol 85 mg/kg.

Sabendo que o sistema GABAérgico apresenta participação direta na manutenção e/ou propagação do processo convulsivo, uma vez que a diminuição da hiperpolarização promovida pelo GABA, e o consequente aumento da excitação glutamatérgica ainda são considerados uns dos principais mecanismos envolvidos na geração de crises convulsivas. (KANDEL *et al.*, 2014), podemos inferir que o aumento significativo desses três parâmetros comportamentais observados no modelo induzido por PTZ indica que o EHPV, nas duas doses testadas, apresenta ação neuroprotetora importante e, até mesmo, possíveis propriedades anticonvulsivantes pela via GABAérgica.

Além dos parâmetros comportamentais, latência de primeira convulsão e latência de morte, avaliar o intervalo de tempo entre o aparecimento da 1ª convulsão e a morte do animal, torna-se importante, uma vez que extrapolando esse modelo experimental de

convulsão para uma situação clínica hipotética, quanto mais tempo existir entre o da 1ª convulsão e a possibilidade óbito do paciente decorrente do processo convulsivo, maiores e melhores podem ser as intervenções que podem ser realizadas e o prognóstico do paciente. Neste contexto, pode-se dizer que a PVB possui um efeito neuroprotetor importante capaz de aumentar de forma significativa esse parâmetro (CRUZ, 2012)

A hiperexcitabilidade neuronal e a lesão oxidativa produzida por uma produção excessiva de radicais livres podem desempenhar um papel importante na epilepsia, uma vez que o cérebro é um órgão extremamente suscetível ao estresse oxidativo, sendo considerado o órgão mais aerobicamente ativo do corpo devido às suas altas demandas metabólicas (GERONZI *et al.*, 2018).

O cérebro do ser humano necessita consumir pelo menos 20% do oxigênio total basal para sustentar a atividade neuronal excessiva que é dependente de ATP. Entre os motivos que tornam o cérebro bastante suscetível ao estresse oxidativo está a alta concentração de ácidos graxos insaturados que contribuem com a formação exarcebada de radicais livres, que conseqüentemente leva ao aumento do processo de lipoperoxidação, tendo como um dos principais produtos de liberação da membrana celular lesada, o malondialdeído (MDA) (PALTA *et al.*, 2014; SIWEK *et al.*, 2013; COBLEY *et al.*, 2018).

Neste estudo, as concentrações de MDA no hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado foram significativamente maiores nos grupos que receberam apenas pentilenotetrazol ou pilocarpina quando comparados ao grupo VEÍCULO. Menon *et al.* (2012) investigou se o aumento dos níveis de estresse oxidativo em pacientes com epilepsia é resultado da própria doença ou está relacionado à ação dos agentes anticonvulsivantes. Os resultados demonstraram que houve um aumento significativo nos níveis de MDA em pacientes com epilepsia, em comparação com os grupos controles. Os achados do presente estudo corroboram com a literatura e mostram que a administração aguda de pentilenotetrazol ou de pilocarpina causa um aumento acentuado de MDA, sugerindo assim o aumento da liberação de metabólitos reativos de oxigênio e conseqüente ataque oxidativo em ácidos graxos poliinsaturados, que estão muito presentes no cérebro.

Além disso, estudos pré-clínicos realizados anteriormente demonstraram que a administração de pilocarpina 400 mg/kg e/ou pentilenotetrazol 85 mg/kg aumentou de forma significativa os níveis de MDA no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos submetidos à modelos agudos de convulsão induzidos por esses agentes convulsivantes, quando comparados aos animais dos grupos veículos CARVALHO *et al.*, 2019; CAVALCANTE, 2017).

No presente estudo, observou-se que o pré-tratamento com extrato hidroalcolico de própolis vermelha na dose de 10 mg/kg, em doses repetidas foi capaz de reduzir os níveis de MDA de forma significativa nas três áreas cerebrais, hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal, nos dois modelos de convulsão analisados. Entretanto, o pré-tratamento com EHPV 100 mg/kg por sete dias consecutivos foi capaz de atenuar de forma significativa, os níveis de MDA nas três áreas cerebrais avaliadas apenas no modelo de convulsão induzido pela pilocarpina. Nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol, o pré-tratamento com EHPV na dose de 100 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente os níveis de MDA no hipocampo e no córtex pré-frontal, não apresentando diferença significativa no corpo estriado.

Os achados do presente estudo corroboram com os resultados de um estudo conduzido por Teles *et al.*, (2015), que demonstrou uma redução significativa dos níveis de MDA na urina de animais submetidos a um modelo de ablação renal e pré-tratado com PVB na dose 150 mg/kg, em doses repetidas, quando comparados aos animais que não receberam PVB.

Por outro lado, um estudo conduzido por Bezerra *et al.*, (2016) avaliou os efeitos do EHPV, na dose 10 mg/kg, nos níveis de MDA em um modelo animal de colite ulcerativa induzido por ácido acético, não sendo observada diferença significativa entre os grupos tratados com EHPV e os não tratados. Entretanto o próprio estudo afirma que o tempo experimental de curto prazo de 24 h pode ter sido menor do que o tempo necessário para haver uma resposta antioxidante eficaz por parte do EHPV. Esse achado ratifica ainda mais a escolha, no presente estudo, de se realizar um pré-tratamento com EHPV em doses repetidas.

Em relação às dosagens de nitrito/nitrato, observou-se que os animais que foram submetidos aos modelos de convulsão induzidos por pentilenotetrazol 85 mg/kg e pilocarpina 400 mg/kg tiveram níveis consideravelmente elevados de nitrito/nitrato quando comparados ao grupo veículo. O pré-tratamento com extrato hidroalcolico de própolis vermelha na dose de 10 mg/kg, por sete dias consecutivos foi capaz de reduzir os níveis de nitrito e nitrato de forma significativa nas três áreas cerebrais estudadas: hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal, nos dois modelos de convulsão analisados. Já o pré-tratamento com EHPV 100 mg/kg em doses repetidas foi capaz de atenuar de forma significativa, os níveis de nitrito/nitrato nas três áreas cerebrais avaliadas apenas no modelo de convulsão induzido pela pilocarpina. Nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol, o pré-tratamento com EHPV na dose de 100 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente os níveis de espécies reativas de nitrogênio no hipocampo e no córtex pré-frontal. Não havendo diferença significativa no corpo estriado.

Bezerra *et al.*, (2016) conduziram um estudo no qual foram avaliados os efeitos

anti-inflamatórios e antioxidantes do pré-tratamento com EHPV, por via oral, durante 7 dias consecutivos, nas doses de 10 e 100 mg/kg em roedores submetidos a um modelo de colite ulcerativa induzido por ácido acético. Os resultados obtidos no estudo demonstraram que os animais tratados com EHPV, em ambas as doses testadas, apresentaram redução de danos causados pela ação das espécies reativas de nitrogênio (nitrito/nitrato), devido à diminuição significativa da expressão de iNOS nos animais pré-tratados com EHPV. Esses dados corroboram de forma importante com os nossos achados.

A Glutathione reduzida é uma das principais enzimas que fazem parte das defesas endógenas do corpo contra o estresse oxidativo (PALTA *et al.*, 2014; SIWEK *et al.*, 2013). Dessa forma, o aumento dos níveis de GSH está relacionado com a redução do desequilíbrio oxidativo em doenças neurodegenerativas (VASCONCELOS *et al.*, 2015; LIMA, 2016; SOUSA *et al.*, 2015).

A disfunção mitocondrial está intimamente ligada ao estresse oxidativo e acredita-se que seja importante em lesões agudas e no desenvolvimento de epilepsia crônica adquirida (YUEN *et al.*, 2018). Dessa forma, aferir a concentração de GSH em modelos experimentais com drogas promissoras para tratamento de doenças do SNC, como na epilepsia, é uma excelente maneira de avaliar a eficácia terapêutica potencial na manutenção do potencial redox celular (OWEN *et al.*, 2010).

No estudo em questão, as concentrações de GSH nas áreas cerebrais, hipocampo, córtex pré-frontal e corpo estriado foram significativamente menores nos animais dos grupos que receberam apenas os agentes quimioconvulsivantes, quando comparados aos animais do grupo veículo. Esses achados estão de acordo com os resultados da pesquisa conduzida por Carvalho *et al.*, (2019) que demonstrou que a administração aguda de pilocarpina 400 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente os níveis de glutathione reduzida no hipocampo e córtex pré-frontal de camundongos.

O pré-tratamento com extrato hidroalcolico de própolis vermelha na dose de 10 mg/kg por sete dias consecutivos foi capaz de aumentar de forma significativa, os níveis de glutathione reduzida nas três áreas cerebrais estudadas: hipocampo, corpo estriado e córtex pré-frontal nos dois modelos de convulsão analisados (pilocarpina e pentilenotetrazol). Já o pré-tratamento com EHPV 100 mg/kg em doses repetidas foi capaz de aumentar significativamente, os níveis de GSH, apenas no hipocampo e no córtex pré-frontal dos animais submetidos aos modelos de convulsão induzidos por PTZ e PILO. Não houve diferença significativa nos níveis de GSH corpo estriado em ambos os modelos de convulsão.

Tohamy *et al.*, (2013) utilizou um modelo animal de nefrotoxicidade induzido por cisplatina, sendo observado que os níveis de glutathiona reduzida no tecido renal foram significativamente diminuídos quando comparados aos animais que não receberam o agente antineoplásico. Esse estudo demonstrou que o tratamento com própolis na dose de 8,4 mg/kg foi capaz de restabelecer de forma significativa a produção dessas enzimas antioxidantes endógenas, corroborando de certa forma com os resultados do presente estudo.

A avaliação da resposta inflamatória, através da dosagem de citocinas revelou que as convulsões induzidas por pentilenotetrazol e pilocarpina aumentaram significativamente a concentração de uma importante citocina pró-inflamatória, a interleucina-1 β . Esses resultados corroboram com estudos anteriores que mostraram que animais submetidos a modelos de convulsão e epilepsia induzidos por drogas quimoconvulsivantes apresentaram uma resposta neuroinflamatória com elevação dos níveis de IL-1 β em áreas cerebrais afetadas pela lesão primária, principalmente no hipocampo. (CHENG *et al.*, 2018; MARCHI; LERNER-NATOLI, 2012; GIANNONI *et al.*, 2018; VAN VLIET *et al.*, 2018; KLEMENT *et al.*, 2019).

Já está descrito na literatura que a elevação dos níveis de IL-1 β no cérebro está diretamente relacionada com a ocorrência de vários tipos de crises convulsivas, incluindo a FİRES que ocorre com mais frequência em crianças e adolescentes. Uma das primeiras evidências demonstrando que a sinalização de receptores IL-1R contribui para a geração e intensificação de crises convulsivas foi fornecida por estudos que mostraram que a injeção intra-hipocampal de IL-1 β aumentou de forma significativa a atividade convulsiva aguda em roedores que receberam injeções intracerebrais de agentes quimioconvulsivantes. (VEZZANI *et al.*, 2011).

O pré-tratamento com extrato hidroalcolico de própolis vermelha nas duas doses testadas, 10 e 100 mg/kg foi capaz de reduzir de forma significativa a concentração de IL-1 β no hipocampo dos animais submetidos aos dois modelos de convulsão analisados nesse estudo. Os nossos resultados corroboram com estudos anteriores que demonstraram efeitos anti-inflamatórios importantes de alguns compostos da PVB. Min *et al.*, (2015) mostraram que a isoliquiritigenina, flavonoide encontrado na PVB foi capaz de reduzir de forma significativa os níveis de IL-1 β e de outros marcadores inflamatórios em modelo de colite induzida por ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS) em ratos. Outro estudo, conduzido por Wang *et al.* (2012) testou *in vitro* um tratamento com o flavonoide formononetina, encontrado em grandes concentrações na PVB, sobre células produtoras de insulina do pâncreas e avaliaram a produção de IL-1 β , e de outros marcadores inflamatórios. Os resultados mostraram que a formononetina foi capaz de inibir o fator de transcrição NF-K β , impedindo o

aumento dos níveis de IL-1 β .

Diversos estudos presentes na literatura sugerem que o EHPV apresenta potentes atividades anti-inflamatórias em diversos modelos experimentais, como cicatrização de queimaduras (DE ALMEIDA *et al.*, 2013), lesão de nervos periféricos (BARBOSA *et al.*, 2015), em ensaios de migração intraperitoneal de leucócitos e edema de pata (LIMA CAVENDISH *et al.*, 2015), em modelos de hemisseção da medula espinhal em ratos, (KASAI *et al.*, 2011), após lesão medular (DOS SANTOS, 2013) e lesão de nervo ciático (BARBOSA *et al.*, 2015) em animais.

Cavendish *et al.*, 2015 demonstram em um estudo, que o tratamento com EHPV na dose de 10 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente a inflamação induzida em modelo de edema de pata, além de apresentar, na mesma dose, importante atividade antinociceptiva em um modelo de dor induzido por glutamato. Uma vez que o glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório do SNC, pode-se inferir que a potente ação inibitória do EHPV sobre o glutamato pode repercutir também nos processos convulsivos ocasionados pela excitotoxicidade exacerbada promovida por esse neurotransmissor.

Além disso, compostos isolados da PVB demonstraram ações neuroprotetoras, *in vivo* em modelo animal de isquemia e trauma cerebral, por meio da redução da resposta inflamatória (LIANG *et al.*, 2014; ZHU *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2014; ARAS *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

Considerando tudo o que foi abordado sobre o papel da inflamação na fisiopatologia da epilepsia, especula-se que a administração oral de EHPV apresenta potencial capacidade de minimizar os danos teciduais provenientes do processo inflamatório observado nesses modelos experimentais de convulsão.

Diante do que foi exposto, a administração de EHPV demonstrou resultados promissores nos testes comportamentais, na avaliação do estresse oxidativo e nitrosativo e nas concentrações da citocina pró-inflamatória IL-1 β , sugerindo, assim, que o EHPV possui um perfil de neuroproteção importante. Dessa forma, pode-se sugerir que o uso da própolis vermelha brasileira poderia ser uma opção terapêutica no tratamento de distúrbios neurológicos com bases fisiopatológicas na inflamação e no estresse oxidativo.

7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados apresentados neste trabalho permitiu as seguintes conclusões:

- ✓ O extrato hidroalcolico de própolis vermelha, nas doses de 10 e 100 mg/kg foi capaz de reduzir consideravelmente a ocorrência de convulsões em animais pré-tratados por sete dias consecutivos e, logo após, submetidos a indução de convulsão por PTZ e PILO.
- ✓ O extrato hidroalcolico de própolis vermelha, nas doses de 10 e 100 mg/kg foi capaz de aumentar significativamente a latência de morte em animais pré-tratados por sete dias consecutivos e, logo após, submetidos a indução de convulsão por PTZ e PILO, demonstrando, dessa forma, possuir considerável ação anticonvulsivante.
- ✓ O extrato hidroalcolico de própolis vermelha, nas doses de 10 e 100 mg/kg reduziu significativamente a peroxidação lipídica nas áreas cerebrais estudadas em animais submetidos a modelos de convulsão por PTZ e PILO.
- ✓ O extrato hidroalcolico de própolis vermelha, nas doses de 10 e 100 mg/kg reduziu significativamente os níveis de nitrito nas áreas cerebrais estudadas em animais submetidos a modelos de convulsão por PTZ e PILO.
- ✓ O extrato hidroalcolico de própolis vermelha, nas doses de 10 e 100 mg/kg aumentou de forma significativa os níveis de glutathiona reduzida (GSH) nas áreas cerebrais estudadas em animais submetidos a modelos de convulsão por PTZ e PILO.
- ✓ O extrato hidroalcolico de própolis vermelha, nas doses de 10 e 100 mg/kg reduziu de forma significativa os níveis de IL-1 β nas áreas cerebrais estudadas em animais submetidos a modelos de convulsão por PTZ e PILO.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse trabalho demonstrou a ação neuroprotetora e anticonvulsivante do tratamento em doses repetidas com extrato hidroalcoólico de própolis vermelha, através dos modelos de convulsão induzidos por pentilenotetrazol e pilocarpina. Diante dos resultados, podee-se concluir que essas ações neuroprotetoras e anticonvulsivantes do EHPV, possivelmente estão relacionadas às suas potentes atividades anti-inflamatória e antioxidante, podendo sugerir o uso da própolis vermelha brasileira como possível agente adjuvante no tratamento da epilepsia refratária a medicamentos e de outras doenças neurológicas que possuem suas bases fisiopatológicas no processo inflamatório. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de existir possíveis mecanismos anticonvulsivantes relacionados às vias GABAérgica e colinérgica, uma vez que nos testes comportamentais o EHPV foi capaz de aumentar consideravelmente as latências de primeira convulsão e de morte nos animais submetidos aos dois modelos de convulsão avaliados nesse estudo. Para a determinação precisa de mecanismos específicos relacionados a essas vias de neurotransmissão serão necessários mais estudos.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. P. L. Estudo comparativo da atividade antiinflamatória e antifúngica de extratos de própolis vermelha e verde, Fortaleza – Brasil [Dissertação]. Fortaleza: Universidade federal do Ceará; 2008.
- ABREU, I.N.; MAZZAFERA,P.; EBERLIN, M.N.; ZULLO, M.A.; SAWAYA,C.H.F.Characterization of the variation in the imidazole alkaloid profile of *Pilocarpus microphyllus* in different seasons and parts of the plant by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting and identification of novel alkaloids by tandem mass spectrometry. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, v. 21, n. 7, p.1205-1213, 2007.
- ABUBAKAR, Murtala. B. et al. Polyphenols as Key Players for the Antileukaemic Effects of Propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–11, 2014.
- AGUIAR, Carlos Clayton Torres; ALMEIDA, Anália Barbosa; ARAËJO, Paulo Victor Pontes; VASCONCELOS, Germana Silva; CHAVES, Edna Maria Camelo; VALE, Otoni Cardoso do; MACÊDO, Danielle Silveira; SOUSA, Francisca Cléa Florenço de; VIANA, Glauce Socorro de Barros; VASCONCELOS, Silvânia Maria Mendes. Anticonvulsant effects of agomelatine in mice. **Epilepsy & Behavior**, [S.L.], v. 24, n. 3, p. 324-328, jul. 2012.
- AHMED, Romana et al. Antioxidant Properties and Cardioprotective Mechanism of Malaysian Propolis in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–11, 2017.
- ALENCAR, S.M., OLDONI, T.L., CASTRO, M.L., CABRAL, I.S., COSTA-NETO, C.M., CURY, J.A., ROSALEN, P.L., IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. **J. Ethnopharmacol.** 113, 278-283. 2007.
- AMITAI, Yael. Physiologic role for “inducible” nitric oxide synthase: a new form of astrocytic-neuronal interface. **Glia**, [S.L.], v. 58, n. 15, p. 1775-1781, 24 ago. 2010.
- ARAS, Adembozkurt; GUVEN, Mustafa; AKMAN, Tarık; OZKAN, Adile; SEN, Halilmurat; DUZ, Ugur; KALKAN, Yıldray; SILAN, Coskun; COSAR, Murat. Neuroprotective effects of daidzein on focal cerebral ischemia injury in rats. **Neural Regeneration Research**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 146, 2015.
- ARENA, Andrea; ZIMMER, Till S.; VAN SCHEPPINGEN, Jackelien; KOROTKOV, Anatoly; ANINK, Jasper J.; MÜHLEBNER, Angelika; JANSSEN, Floor E.; VAN HECKE, Wim; SPLIET, Wim G.; VAN RIJEN, Peter C.. Oxidative stress and inflammation in a spectrum of epileptogenic cortical malformations: molecular insights into their interdependence. **Brain Pathology**, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 351-365, maio 2019.
- AYALA, Antonio; MUÑOZ, Mario F.; ARGÜELLES, Sandro. Lipid Peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [S.L.], v. 2014, p. 1-31, 2014.
- AZEVEDO, Lais Farias; SILVA, Priscilla da Fonseca; BRANDÃO, Marianna Porfírio;

ROCHA, Louisianny Guerra da; ARAGÃO, Cícero Flávio Soares; SILVA, Sâmia Andréia Souza da; PORTO, Isabel Cristina Celerino Moraes; BASÍLIO-JÔNIO, Irinaldo Diniz; FONSECA, Eduardo Jorge da Silva; MOURA, Maria Aline Barros Fidelis de. Polymeric nanoparticle systems loaded with red propolis extract: a comparative study of the encapsulating systems, pcl-pluronic versus eudragit®e100-pluronic. **Journal Of Apicultural Research**, [S.L.], v. 57, n. 2, p. 255-270, 28 fev. 2018.

BANKOVA, Vassya; POPOVA, Milena; TRUSHEVA, Boryana. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 28, 2014.

BARBOSA, M.H.; ZUFFI, F.B.; MARUXO, H.B.; JORGE, L.L.R. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. **Acta Paul Enferm.** 22: 318-322. 2009.

BARBOSA, Roberta Almeida; NUNES, Tássia Luiza Gonçalves Magalhães; NUNES, Tâmara Luiza Gonçalves Magalhães; PAIXÃO, Ailma Oliveira da; BELO NETO, Reinaldo; MOURA, Sidnei; ALBUQUERQUE JUNIOR, Ricardo Luiz Cavalcanti; CÂNDIDO, Edna Aragão Farias; PADILHA, Francine Ferreira; QUINTANS-JÔNIO, Lucindo José. Hydroalcoholic extract of red propolis promotes functional recovery and axon repair after sciatic nerve injury in rats. **Pharmaceutical Biology**, [S.L.], v. 54, n. 6, p. 993-1004, 29 out. 2015.

BARRETO, A.L.S. **Estudo histomorfológico do efeito de membranas de colágeno contendo própolis vermelha sobre o processo de reparo cicatricial por segunda intenção em ratos.** Universidade Tiradentes, Aracaju, Brasil. 2008.

BAUER, Jan; BECKER, Albert J.; ELYAMAN, Wassim; PELTOLA, Jukka; RÜEGG, Stephan; TITULAER, Maarten J.; VARLEY, James A.; BEGHI, Ettore. Innate and adaptive immunity in human epilepsies. **Epilepsia**, [S.L.], v. 58, p. 57-68, jul. 2017.

BEER, Samantha M.; TAYLOR, Ellen R.; BROWN, Stephanie E.; DAHM, Christina C.; COSTA, Nikola J.; RUNSWICK, Michael J.; MURPHY, Michael P. Glutaredoxin 2 Catalyzes the Reversible Oxidation and Glutathionylation of Mitochondrial Membrane Thiol Proteins. **Journal Of Biological Chemistry**, [S.L.], v. 279, n. 46, p. 47939-47951, 30 ago. 2004.

BELISSIMO, M.I.; AMADO, D.; ABDALLA, D.S.; FERREIRA, E.C.; CAVALHEIRO, E. A.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Research**, v.46, n. 2, p.121-128, 2001.

BENARDO, Larry S.; PRINCE, David A.. Ionic mechanisms of cholinergic excitation in mammalian hippocampal pyramidal cells. **Brain Research**, [S.L.], v. 249, n. 2, p. 333-344, out. 1982.

BEZERRA, Gislaine Barbosa; SOUZA, Luana de Menezes de; SANTOS, Adailma Santana dos; ALMEIDA, Grace Kelly Melo de; SOUZA, Marília Trindade Santana; SANTOS, Sandra Lauton; CAMARGO, Enilton Aparecido; LIMA, Bruno dos Santos; ARAUJO, Adriano Antunes de Souza; CARDOSO, Juliana Cordeiro. Hydroalcoholic extract of Brazilian red propolis exerts protective effects on acetic acid-induced ulcerative colitis in a rodent

model. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 85, p. 687-696, jan. 2017.

BIEN, C. G.; VINCENT, A.; BARNETT, M. H.; BECKER, A. J.; BLUMCKE, I.; GRAUS, F.; JELLINGER, K. A.; REUSS, D. E.; RIBALTA, T.; SCHLEGEL, J.. Immunopathology of autoantibody-associated encephalitis: clues for pathogenesis. **Brain**, [S.L.], v. 135, n. 5, p. 1622-1638, 25 abr. 2012.

BONNER, T.; BUCKLEY, N.; YOUNG, A.; BRANN, M.. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. **Science**, [S.L.], v. 237, n. 4814, p. 527-532, 31 jul. 1987.

BOWERY, N G. GABAB Receptor Pharmacology. **Annual Review Of Pharmacology And Toxicology**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 109-147, abr. 1993.

BRASIL. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. **Portaria nº 6, de 25 de julho de 1985**. Normas Higiénico-Sanitárias e Tecnológicas para Mel, Cera de Abelhas e Derivados. Disponível em: . Acesso em 18/jul/2020.

BRASIL. Ministério do meio ambiente. **5º Relatório Nacional para a Convenção sobre Diversidade Biológica**. Brasília, DF, 2016. Disponível em<
<https://www.mma.gov.br/informma/item/10772-quinto-relat%C3%B3rio>>. Acesso em 12 jun 2020.

BRUNEAU, Emile G.; AKAABOUNE, Mohammed. Running to Stand Still: ionotropic receptor dynamics at central and peripheral synapses. **Molecular Neurobiology**, [S.L.], v. 34, n. 2, p. 137-152, 2006

BUENO-SILVA, Bruno et al. The effect of seasons on Brazilian red propolis and its botanical source: chemical composition and antibacterial activity. **Natural Product Research**, v. 31, n. 11, p. 1318–1324, 2017.

CABRAL, I.S.R., OLDONI, T.L.C., PRADO, A., BEZERRA, R.M.N., ALENCAR, S.M.D. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quim Nova** 32, 1523-1527. 2009.

CABRAL, Ingridy Simone Ribeiro. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antibacteriana da própolis vermelha brasileira**. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

CARVALHO, Michele Albuquerque Jales de; CHAVES-FILHO, Adriano; SOUZA, Alana Gomes de; LIMA, Camila Nayane de Carvalho; LIMA, Klistenes Alves de; VASCONCELOS, Emiliano Ricardo Rios; FEITOSA, Mariana Lima; OLIVEIRA, João Victor Souza; SOUZA, Denia Alves Albuquerque de; MACEDO, Danielle S.. Proconvulsant effects of sildenafil citrate on pilocarpine-induced seizures: involvement of cholinergic, nitrenergic and pro-oxidant mechanisms. **Brain Research Bulletin**, [S.L.], v. 149, p. 60-74, jul. 2019.

CAVALCANTE, Talita Matias Barbosa. **AÇÃO ANTICONVULSIVANTE E NEUROPROTETORA DA IVABRADINA EM CAMUNDONGOS**. 2017. 86 f. Tese

(Doutorado) - Curso de Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

CAVALHEIRO, E. A.; FERNANDES, M. J.; TURSKI, L.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G. Spontaneous Recurrent Seizures in Rats: Amino Acid and Monoamine Determination in the Hippocampus. **Epilepsia**, v. 35, n. 1, p.1-11, jan. 1994.

CAVENDISH, Rodrigo Lima; SANTOS, Jandson de Souza; BELO NETO, Reinaldo; PAIXÃO, Ailma Oliveira; OLIVEIRA, Juciele Valéria; ARAUJO, Edilson Divino de; SILVA, Andresa Aparecida Berretta e; THOMAZZI, Sara Maria; CARDOSO, Juliana Cordeiro; GOMES, Margarete Zanardo. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 173, p. 127-133, set. 2015.

CHENG, Huan et al. Geographical origin identification of propolis using GC–MS and electronic nose combined with principal component analysis. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 813–822, 2013.

CHENG, Jinping; KORTE, Nils; NORTLEY, Ross; SETHI, Huma; TANG, Yamei; ATTWELL, David. Targeting pericytes for therapeutic approaches to neurological disorders. **Acta Neuropathologica**, [S.L.], v. 136, n. 4, p. 507-523, 10 ago. 2018.

CHO, K.O.; et al. Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. **Nat Commun**. v.6, p.6606, 2015.

CHOI, Jieun; KOH, Sookyong. Role of Brain Inflammation in Epileptogenesis. **Yonsei Medical Journal**, [S.L.], v. 49, n. 1, p. 1, 2008.

COBLEY, James Nathan; FIORELLO, Maria Luisa; BAILEY, Damian Miles. 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. **Redox Biology**, [S.L.], v. 15, p. 490-503, maio 2018.

CRUZ, Giovany Michely Pinto da. **ESTUDO DOS MECANISMOS NEUROPROTETORES DA PIPERINA NAS CONVULSÕES INDUZIDAS PELA PILOCARPINA EM CAMUNDONGOS**. 2012. 201 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2012.

da SILVA, Cléber Ribeiro Álvares; CARDOSO, Ingrid Sheila Zavaleta Obregon, MACHADO, Natalie Rodrigues. Considerações sobre epilepsia. **Boletim Científico de Pediatria**, v. 2, n. 3, p. 71-76, dez. 2013.

DALEPRANE, Julio Beltrame; ABDALLA, Dulcinéia Saes. Emerging Roles of Propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2013, p. 1-8, 2013.

DANTAS SILVA, Rejane Pina et al. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. **Plos One**, v. 12, n. 3, p. e0172585, 2017.

DAUGSCH, A., MORAES, C.S., FORT, P., PARK, Y.K. Brazilian red propolis--chemical composition and botanical origin. **Evid Based Complement Alternat Med** 5, 435-441. 2008.

DAUGSCH, Andreas. **A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas**. 2007. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, São Paulo, 2007.

DAUGSCH, Andreas; MORAES, Cleber; FORT, Patrícia; PARK, Yong. Brazilian Red Propolis—Chemical Composition and Botanical Origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 4, p. 435-441, 2007.

DAVIES, John A.. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. **Seizure**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 267-271, dez. 1995.

DE ALMEIDA, E. B; CARDOSO, C.J; DE LIMA, A.K; DE OLIVEIRA, N.L; DE PONTESFILHO, N.T; LEAL SOUZA, I.C; ALBURQUE-JÚNIOR, R.L.C; 2013The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. **Journal of Ethnopharmacology** 2013; 147(2):419–425. 2013.

DE SENA, Allen D.; DO, Thuy; SCHULERT, Grant S.. Systemic autoinflammation with intractable epilepsy managed with interleukin-1 blockade. **Journal Of Neuroinflammation**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 327-345, 9 fev. 2018.

DE-MELO, Adriane Alexandre Machado et al. Capacidade antioxidante da própolis. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 44, n. 3, p. 341–348, 2014.

DEVINSKY, Orrin; VEZZANI, Annamaria; O'BRIEN, Terence J.; JETTE, Nathalie; SCHEFFER, Ingrid E.; CURTIS, Marco de; PERUCCA, Piero. Epilepsy. **Nature Reviews Disease Primers**, [S.L.], v. 4, n. 1, p. 1-24, 3 maio 2018.

DILENA, Robertino; MAURI, Eleonora; ARONICA, Eleonora; BERNASCONI, Pia; BANA, Cristina; CAPPELLETTI, Cristina; CARRABBA, Giorgio; FERRERO, Stefano; GIORDA, Roberto; GUEZ, Sophie. Therapeutic effect of Anakinra in the relapsing chronic phase of febrile infection–related epilepsy syndrome. **Epilepsia Open**, [S.L.], v. 4, n. 2, p. 344-350, 27 mar. 2019.

DO NASCIMENTO, Ticiano Gomes et al. Polymeric Nanoparticles of Brazilian Red Propolis Extract: Preparation, Characterization, Antioxidant and Leishmanicidal Activity. **Nanoscale Research Letters**, v. 11, n. 1, p. 301, 2016.

DOS SANTOS, FANILDES DA SILVA MORAES. Efeitos do tratamento oral com própolis vermelha e exercício de natação sobre a lesão medular em ratos. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Tiradentes, 2013.

DRAPER, H.H.; HADLEY, M.. [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. **Oxygen Radicals In Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants**, [S.L.], p. 421-431, 1990.

ENGEL, Jerome. The current place of epilepsy surgery. **Current Opinion In Neurology**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 192-197, abr. 2018.

ERAKOVIĆ, V.; ŠUPAN, G.; VARLJEN, J.; LAGINJA, J.; SIMONIĆ, A.. Lithium plus pilocarpine induced status epilepticus — biochemical changes. **Neuroscience Research**,

[S.L.], v. 36, n. 2, p. 157-166, fev. 2000.

FERRARO, Giuseppe. Nitric oxide and brain hyperexcitability. **In Vivo**, Palermo, Italy, v. 5, n. 18, p. 357-366, maio 2004.

FISHER, Robert S.; CROSS, J. Helen; FRENCH, Jacqueline A.; HIGURASHI, Norimichi; HIRSCH, Edouard; JANSEN, Floor E.; LAGAE, Lieven; MOSHÉ, Solomon L.; PELTOLA, Jukka; PEREZ, Eliane Roulet. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: position paper of the ilae commission for classification and terminology. **Epilepsia**, [S.L.], v. 58, n. 4, p. 522-530, 8 mar. 2017.

FRANCHI, Gilberto C.; MORAES, Cleber S.; TORETI, Viviane C.; DAUGSCH, Andreas; NOWILL, Alexandre E.; PARK, Yong K.. Comparison of Effects of the Ethanolic Extracts of Brazilian Propolis on Human Leukemic Cells As Assessed with the MTT Assay. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2012, p. 1-6, 2012.

FRANCHIN, Marcelo et al. Neovestitol, an isoflavonoid isolated from Brazilian red propolis, reduces acute and chronic inflammation: involvement of nitric oxide and IL6. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 36401, 2016.

FREIRES, Irlan Almeida; ALENCAR, Severino Matias; ROSALEN, Pedro Luiz. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 110, p. 267–279, 2016.

FREITAS, R. M. **Estudo Farmacológico e Neuroquímico da Fase Aguda do Processo Convulsivo Induzido Por Pilocarpina em Áreas Cerebrais de Ratos Adultos**. Tese. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará, 2006.

FRIEDMAN, A. & HEINEMANN, U. **Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies 4th edition** (ed. Noebels, J. L.) (US National Center for Biotechnology Information, 2012).

FROZZA, Caroline Olivieri da Silva; GARCIA, Charlene Silvestrin Celi; GAMBATO, Gabriela; SOUZA, Marcia Denize Oliveira de; SALVADOR, Mirian; MOURA, Sidnei; PADILHA, Francine Ferreira; SEIXAS, Fabiana Kömmling; COLLARES, Tiago; BORSUK, Sibebe. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. **Food And Chemical Toxicology**, [S.L.], v. 52, p. 137-142, fev. 2013.

FUKUDA, Takaichi; HEIZMANN, Claus W; KOSAKA, Toshio. Quantitative analysis of GAD65 and GAD67 immunoreactivities in somata of GABAergic neurons in the mouse hippocampus proper (CA1 and CA3 regions), with special reference to parvalbumin-containing neurons. **Brain Research**, [S.L.], v. 764, n. 1-2, p. 237-243, ago. 1997.

GADEK-MICHALSKA, Anna; TADEUSZ, Joanna; BUGAJSKI, Andrzej; BUGAJSKI, Jan. Chronic Isolation Stress Affects Subsequent Crowding Stress-Induced Brain Nitric Oxide Synthase (NOS) Isoforms and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis Responses. **Neurotoxicity Research**, [S.L.], v. 36, n. 3, p. 523-539, 18 jun. 2019.

GERONZI, Ursula; LOTTI, Federica; GROSSO, Salvatore. Oxidative stress in

epilepsy. **Expert Review Of Neurotherapeutics**, [S.L.], v. 18, n. 5, p. 427-434, 19 abr. 2018.

GIANNONI, Patrizia; BADAUT, Jerome; DARGAZANLI, Cyril; MAUDAVE, Alexis Fayd'Herbe de; KLEMENT, Wendy; COSTALAT, Vincent; MARCHI, Nicola. The pericyte–glia interface at the blood–brain barrier. **Clinical Science**, [S.L.], v. 132, n. 3, p. 361-374, 8 fev. 2018.

GIL, D.; SPALDING, T.; KHARLAMB, A.; SKJAERBAEK, N.; UL DAM, A.; TROTTER, C.; BRANN, M. Exploring the potential for subtype-selective muscarinic agonists in glaucoma. **Life Sciences**, v. 68, n. 22-23, p.2601-2604, 2001.

GOLDBERG, Ethan M.; COULTER, Douglas A.. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 14, n. 5, p. 337-349, 18 abr. 2013.

GOODMAN & GILMAN, J.Farmacologia que agem no Sistema Nervoso Central. In: **As Bases Farmacológicas Da Terapêutica**. HARDMAN, J.G; LIMBIRD, L.E; GILMAN, A.G (editors)10. ed.Rio de Janeiro: McGraw Hill,2012.

GREEN, Laura C.; WAGNER, David A.; GLOGOWSKI, Joseph; SKIPPER, Paul L.; WISHNOK, John S.; TANNENBAUM, Steven R.. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 126, n. 1, p. 131-138, out. 1982.

GRONE, Brian P; BARABAN, Scott C. Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. **Nature Neuroscience**, [S.L.], v. 18, n. 3, p. 339-343, 24 fev. 2015.

GU, Feng; CHAUHAN, Ved; CHAUHAN, Abha. Glutathione redox imbalance in brain disorders. **Current Opinion In Clinical Nutrition And Metabolic Care**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 89-95, jan. 2015.

GUILHOTO, Laura M.F.F.; LODDENKEMPER, Tobias; GOOTY, Vasu D.; ROTENBERG, Alexander; TAKEOKA, Masanori; DUFFY, Frank H.; COULTER, David; URION, David; BOURGEOIS, Blaise F.; KOTHARE, Sanjeev V.. Experience With Lacosamide in a Series of Children With Drug-Resistant Focal Epilepsy. **Pediatric Neurology**, [S.L.], v. 44, n. 6, p. 414-419, jun. 2011.

GUIX, F.X.; URIBESALGO, I.; COMA, M.; MUÑOZ, F.J.. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Progress In Neurobiology**, [S.L.], v. 76, n. 2, p. 126-152, jun. 2005.

HRUSKA, R. E.; LUDMER, L. M.; PERT, A.; BUNNEY, W. E.. Effects of lithium on [3H](-)quinuclidinyl benzilate ([3H](-)QNB) binding to rat brain muscarinic cholinergic receptors. **Journal Of Neuroscience Research**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 171-177, 1984.

HUANG, R. Q.; BELL-HORNER, C. L.; DIBAS, M. I.; COVEY, D. F.; DREWE, J. A.; DILLON, G. H. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant γ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptors: mechanism and site of action. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 298, n. 3, p. 986-995, 2001.

HULME, E. C. Muscarinic acetylcholine receptors: typical G-coupled receptors. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 44, p. 39-54, 1990.

IIO, Akio; OHGUCHI, Kenji; INOUE, Hiroyasu; MARUYAMA, Hiroe; ARAKI, Yoko; NOZAWA, Yoshinori; ITO, Masafumi. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis promote adipocyte differentiation through PPAR γ activation. **Phytomedicine**, [S.L.], v. 17, n. 12, p. 974-979, out. 2010.

IMPERATO, Assunta; DAZZI, Laura; CARTA, Giovanna; COLOMBO, Giancarlo; BIGGIO, Giovanni. Rapid increase in basal acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats induced by withdrawal from long-term ethanol intoxication. **Brain Research**, [S.L.], v. 784, n. 1-2, p. 347-350, fev. 1998.

IYER, Anand; ZUROLO, Emanuele; SPLIET, Wim G.M.; VAN RIJEN, Peter C.; BAAYEN, Johannes C.; GORTER, Jan A.; ARONICA, Eleonora. Evaluation of the innate and adaptive immunity in type I and type II focal cortical dysplasias. **Epilepsia**, [S.L.], v. 51, n. 9, p. 1763-1773, 23 mar. 2010.

JACOB, Claus; GILES, Gregory I.; GILES, Niroshini M.; SIES, Helmut. Sulfur and Selenium: the role of oxidation state in protein structure and function. **Angewandte Chemie International Edition**, [S.L.], v. 42, n. 39, p. 4742-4758, 13 out. 2003.

JOBST, Barbara C.; CASCINO, Gregory D.. Resective Epilepsy Surgery for Drug-Resistant Focal Epilepsy. **Jama**, [S.L.], v. 313, n. 3, p. 285, 20 jan. 2015.

JUIZ, Paulo J. L.; ALVES, Reinaldo J. C.; BARROS, Tânia F. Uso de produtos naturais como coadjuvante no tratamento da doença periodontal. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 1, p. 134-139, 2010.

JYONOUCHI, Harumi; GENG, Lee. Intractable Epilepsy (IE) and Responses to Anakinra, a Human Recombinant IL-1 Receptor Agonist (IL-1ra): case reports. **Journal Of Clinical & Cellular Immunology**, [S.L.], v. 7, n. 5, p. 327-345, 11 fev. 2016.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M.; SIEGELBAUM, S.A.; HUDSPETH. Crises epilépticas e epilepsia. IN:Princípios de Neurociências. KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M.; SIEGELBAUM, S.A.; HUDSPETH editores. 5ªed. Editora Artmed, Porto Alegre-RS. p.970-990, 2014.

KASAI, Masaki; FUKUMITSU, Hidefumi; SOUMIYA, Hitomi; FURUKAWA, Shoei. Ethanol Extract of Chinese Propolis Facilitates Functional Recovery of Locomotor Activity after Spinal Cord Injury. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 2011, p. 1-9, 2011.

KENNEY-JUNG, Daniel L.; VEZZANI, Annamaria; KAHOUD, Robert J.; LAFRANCE-COREY, Reghann G.; HO, Mai-Lan; MUSKARDIN, Theresa Wampler; WIRRELL, Elaine C.; HOWE, Charles L.; PAYNE, Eric T.. Febrile infection-related epilepsy syndrome treated with anakinra. **Annals Of Neurology**, [S.L.], v. 80, n. 6, p. 939-945, 14 nov. 2016.

KHATRI, Nidhi; THAKUR, Manisha; PAREEK, Vikas; KUMAR, Sandeep; SHARMA, Sunil; DATUSALIA, Ashok Kumar. Oxidative Stress: major threat in traumatic brain injury.

Cns & Neurological Disorders - Drug Targets, [S.L.], v. 17, n. 9, p. 689-695, 2 nov. 2018.

KLEIN, Pavel; DINGLELINE, Raymond; ARONICA, Eleonora; BERNARD, Christophe; BLÜMCKE, Ingmar; BOISON, Detlev; BRODIE, Martin J.; BROOKS-KAYAL, Amy R.; ENGEL, Jerome; FORCELLI, Patrick A.. Commonalities in epileptogenic processes from different acute brain insults: do they translate?. **Epilepsia**, [S.L.], v. 59, n. 1, p. 37-66, 15 dez. 2017.

KLEMENT, Wendy; BLAQUIERE, Marine; ZUB, Emma; DEBOCK, Frederic; BOUX, Fabien; BARBIER, Emmanuel; AUDINAT, Etienne; LERNER-NATOLI, Mireille; MARCHI, Nicola. A pericyte-glia scarring develops at the leaky capillaries in the hippocampus during seizure activity. **Epilepsia**, [S.L.], v. 60, n. 7, p. 1399-1411, 28 maio 2019.

LEITE, J.P.; BORTOLOTTI, Z.A.; CAVALHEIRO, E.a.. Spontaneous recurrent seizures in rats: An experimental model of partial epilepsy. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 14, n. 4, p.511-517,1990.

LI, F.; AWALE, S.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Cytotoxic constituents from Brazilian red propolis and their structure-activity relationship. **Bioorg. Med. Chem.** 16: 5434- 5440. 2008.

LI, Zhengzhao; DONG, Xianhong; ZHANG, Jianfeng; ZENG, Guang; ZHAO, Huimin; LIU, Yun; QIU, Rubiao; MO, Linjian; YE, Yu. Formononetin protects TBI rats against neurological lesions and the underlying mechanism. **Journal Of The Neurological Sciences**, [S.L.], v. 338, n. 1-2, p. 112-117, mar. 2014.

LIANG, Kun; YE, Yu; WANG, Yong; ZHANG, Jianfeng; LI, Chaoqian. Formononetin mediates neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion in rats via downregulation of the Bax/Bcl-2 ratio and upregulation PI3K/Akt signaling pathway. **Journal Of The Neurological Sciences**, [S.L.], v. 344, n. 1-2, p. 100-104, set. 2014.

LIAO, Ching-Fong; THEMME, A. P. N.; JOHO, Rolf; BARBERIS, Claude; BIRNBAUMER, Marie; BIRNBAUMER, Lutz. Molecular cloning and expression of a fifth muscarinic acetylcholine receptor. **J. Biol. Chem.** v. 264, p. 7328-7337, 1989.

LIMA CAVENDISH R, DE SOUZA SANTOS J, BELO NETO R, OLIVEIRA PAIXÃO A, VALÉRIA OLIVEIRA J, DIVINO DE ARAUJO E, et al.. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Brazilian red propolis extract and formononetin in rodents. **J Ethnopharmacol** 2015; 15(33):173:177. 2015.

LIMA, Raquel Cristina de Sousa; SILVA, Márcia Calheiros Chaves; AGUIAR, Carlos Clayton Torres; CHAVES, Edna Maria Camelo; DIAS, Kátia Cilene Ferreira; MACÊDO, Danielle Silveira; SOUSA, Francisca Cléa Florenço de; CARVALHO, Krishnamurti de Moraes; RAMOS, Márcio Viana; VASCONCELOS, Silvânia Maria Mendes. Anticonvulsant action of Calotropis procera latex proteins. **Epilepsy & Behavior**, [S.L.], v. 23, n. 2, p. 123-126, fev. 2012.

LIMA, C.N.C. **Potencial convulsivante de carbapenêmico em diferentes modelos experimentais de convulsão: avaliação comparativa, comportamental e neuroquímica.** 2011. 182 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Fortaleza, 2011.

LIU, Jie; MAO, Jun J.; WANG, Xin Shelley; LIN, Hongsheng. Evaluation of Traditional Chinese Medicine Herbs in Oncology Clinical Trials. **The Cancer Journal**, [S.L.], v. 25, n. 5, p. 367-371, 2019.

LIU, Rui.; WU, Cai-xia; ZHOU, Dan; YANG, Fan.; TIAN, Shuo; ZHANG, Li; ZHANG, Tian-tai; DU, Guan-hua. Pinocembrin protects against β -amyloid-induced toxicity in neurons through inhibiting receptor for advanced glycation end products (RAGE)-independent signaling pathways and regulating mitochondrion-mediated apoptosis. **BMC Med**, v. 10, n. 105, p. 1- 21, set. 2012.

LOSCHER, W.; HONACK, D.; FASSBENDER, C.P.; NOLTING, B. The role of the clinical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III.Pentylenetetrazole seizure models. **Epilepsy Res.** v.8, p. 171-189, 1991.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. Modern antiepileptic drug development has failed to 72 deliver: Ways out of the current dilemma. **Epilepsia**, v. 52, n. 4, p. 657–678, 2011.

LÖSCHER, Wolfgang. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 342, n. 1, p. 1-13, jan. 1998.

LÖSCHER, Wolfgang; SCHMIDT, Dieter. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Research**, [S.L.], v. 2, n. 3, p. 145-181, maio 1988.

MACDONALD, R.L.; BARKER, J.L. Pentylenetetrazol and penicillin are selective antagonists of GABA-mediated post-synaptic inhibition in cultured mammalian neurones. **Nature**, v. 267, n. 5613, p.720-721,1977.

MACHADO, Bruna Aparecida Souza; SILVA, Rejane Pina Dantas; BARRETO, Gabriele de Abreu; COSTA, Samantha Serra; SILVA, Danielle Figuerêdo da; BRANDÃO, Hugo Neves; ROCHA, José Luiz Carneiro da; DELLAGOSTIN, Odir Antônio; HENRIQUES, João Antônio Pegas; UMSZA-GUEZ, Marcelo Andres. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. **Plos One**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. e0145954, 8 jan. 2016.

MARCHI, Nicola; LERNER-NATOLI, Mireille. Cerebrovascular Remodeling and Epilepsy. **The Neuroscientist**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 304-312, 16 out. 2012.

MARINHO, M.M.F.; SOUSA, F.C.F. de; BRUIN, V.M.s. de; VALE, M.R.; VIANA, G.s.B.. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. **Neurochemistry International**, [S.L.], v. 33, n. 4, p. 299-306, out. 1998.

MARINHO, M.M.F; BRUIN, V.M.S de; SOUSA, F.C.F de; AGUIAR, L.M.V; PINHO, R.s.N de; VIANA, G.s.B. Inhibitory action of a calcium channel blocker (nimodipine) on seizures and brain damage induced by pilocarpine and lithium-pilocarpine in rats. **Neuroscience Letters**, [S.L.], v. 235, n. 1-2, p. 13-16, out. 1997.

MENON, Bindu; RAMALINGAM, Krishnan; KUMAR, Rajendiran Vinoth. Oxidative stress

in patients with epilepsy is independent of antiepileptic drugs. **Seizure**, [S.L.], v. 21, n. 10, p. 780-784, dez. 2012.

MERCADO-GÓMEZ, Octavio Fabián; CÓRDOVA-DÁVALOS, Laura; GARCÍA-BETANZO, Delfina; ROCHA, Luisa; ALONSO-VANEGAS, Mario Arturo; CIENFUEGOS, Jesús; GUEVARA-GUZMÁN, Rosalinda. Overexpression of inflammatory-related and nitric oxide synthase genes in olfactory bulbs from frontal lobe epilepsy patients. **Epilepsy Research**, [S.L.], v. 148, p. 37-43, dez. 2018.

MIN, J. K. Amelioration of trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in mice by liquiritigenin. **Journal of Gastroenterology and Hepatology** 2015, v. 30, n. 5, p. 858–865. 2015.

NADLER, Laurie S.; ROSOFF, Marc L.; HAMILTON, Susan E.; KALAYDJIAN, Amanda E.; MCKINNON, Lise A.; NATHANSON, Neil M.. Molecular analysis of the regulation of muscarinic receptor expression and function. **Life Sciences**, [S.L.], v. 64, n. 6-7, p. 375-379, jan. 1999.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J. Nat. Prod.**, 66: 1022-1037, 2003.

NUNES, L.C.C.; GALINDO, A.B.; DE DEUS, A.S.O.; RUFINO, D.A.; RANDAU, K.P.; XAVIER, H.S.; CITO, A.M.G.L.; NETO, P.J.R. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Rev. Bras. Farmacogn.** 19: 524-529. 2009.

OLDONI, Tatiane Luiza C.; CABRAL, Ingridy S.R.; D'ARCE, Marisa A.B. Regitano; ROSALEN, Pedro L.; IKEGAKI, Masaharu; NASCIMENTO, Andrea M.; ALENCAR, Severino M.. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation And Purification Technology**, [S.L.], v. 77, n. 2, p. 208-213, fev. 2011.

OLNEY, J. W.; COLLINS, R. C.; SLOVITER, R. S. Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. **Adv. Neurol.** v. 44, p. 857-877, 1986.

OLNEY, John W.; GUBAREFF, Taisija de; LABRUYERE, Joann. Seizure-related brain damage induced by cholinergic agents. **Nature**, [S.L.], v. 301, n. 5900, p. 520-522, fev. 1983.

PAULETTI, Alberto. Retracted: targeting oxidative stress improves disease outcomes in a rat model of acquired epilepsy. **Brain**, [S.L.], v. 140, n. 7, p. 1885-1899, 30 maio 2017.

PAULETTI, Alberto; TERRONE, Gaetano; SHEKH-AHMAD, Tawfeeq; SALAMONE, Alessia, RAVIZZA, Teresa; RIZZI, Massimo; PASTORE, Anna; PASCENTE, Rosaria; LIANG, Li-Ping; VILLA, Bianca R; BALOSSO, Silvia; ABRAMOV, Andrey Y; VLIET, Erwin A van; GIUDICE, Ennio Del; ARONICA, Eleonora; ANTOINE, Daniel J; PATEL, Manisha; WALKER, Matthew; VEZZANI, Annamaria. Targeting oxidative stress improves disease outcomes in a rat model of acquired epilepsy. **Brain**, v. 149, n.7, p. 1885-1899. 2019.

PEARSON-SMITH, Jennifer; PATEL, Manisha. Metabolic Dysfunction and Oxidative Stress in Epilepsy. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 18, n. 11, p. 2365, 8

nov. 2017.

PEPEU, Giancarlo. Brain acetylcholine: an inventory of our knowledge on the 50th anniversary of its discovery. **Trends In Pharmacological Sciences**, [S.L.], v. 4, p. 416-418, jan. 1983.

PICCINELLI, Anna Lisa; LOTTI, Cinzia; CAMPONE, Luca; CUESTA-RUBIO, Osmany; FERNANDEZ, Mercedes Campo; RASTRELLI, Luca. Cuban and Brazilian Red Propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography: photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S.L.], v. 59, n. 12, p. 6484-6491, 22 jun. 2011.

PICÓN-PAGÈS, Pol; GARCIA-BUENDIA, Joan; MUÑOZ, Francisco J.. Functions and dysfunctions of nitric oxide in brain. **Biochimica Et Biophysica Acta (Bba) - Molecular Basis Of Disease**, [S.L.], v. 1865, n. 8, p. 1949-1967, ago. 2019.

PINHEIRO, Claudio Urbano B.. Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.; Rutaceae) no Maranhão, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 141-150, abr. 2002.

PINHEIRO, Kariny Souza; RIBEIRO, Danielle Rodrigues; ALVES, Angela Valéria Farias; PEREIRA-FILHO, Rose Nely; OLIVEIRA, Clauberto Rodrigues de; LIMA, Sônia Oliveira; REIS, Francisco Prado; CARDOSO, Juliana Cordeiro; ALBUQUERQUE-JÔNIO, Ricardo Luiz Cavalcanti de. Modulatory activity of brazilian red propolis on chemically induced dermal carcinogenesis. **Acta Cirurgica Brasileira**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 111-117, fev. 2014.

PINHEIRO, M.S. **Avaliação da atividade antimicrobiana e citoprotetora gástrica dos extratos de mangaba, caju e própolis vermelha**. Universidade Tiradentes, Aracaju. 2009.

PLEMEL, Jason R.; DUNCAN, Greg; CHEN, Kai-Wei K.; SHANNON, Casey; PARK, Sophia; SPARLING, Joseph S.; TETZLAFF, Wolfram. A Graded Forceps Crush Spinal Cord Injury Model in Mice. **Journal Of Neurotrauma**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 350-370, abr. 2008.

PRABOWO, Avanita S.; ANINK, Jasper J.; LAMMENS, Martin; NELLIST, Mark; OUWELAND, Ans M. W. van Den; ADLE-BIASSETTE, Homa; SARNAT, Harvey B.; FLORES-SARNAT, Laura; CRINO, Peter B.; ARONICA, Eleonora. Fetal Brain Lesions in Tuberous Sclerosis Complex: *torc1* activation and inflammation. **Brain Pathology**, [S.L.], v. 23, n. 1, p. 45-59, 30 ago. 2012.

Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy. **Epilepsia**, v. 30, n. 4, p. 389-399, jul.1989.

RIECHMANN, Janna; STRZELCZYK, Adam; REESE, Jens P.; BOOR, Rainer; STEPHANI, Ulrich; LANGNER, Cornelia; NEUBAUER, Bernd A.; OBERMAN, Bettina; PHILIPPI, Heike; ROCHEL, Michael. Costs of epilepsy and cost-driving factors in children, adolescents, and their caregivers in Germany. **Epilepsia**, [S.L.], v. 56, n. 9, p. 1388-1397, 3 ago. 2015.

RIECHMANN, Janna; WILLEMS, Laurent M.; BOOR, Rainer; KIESLICH, Matthias;

KNAKE, Susanne; LANGNER, Cornelia; NEUBAUER, Bernd A.; OBERMAN, Bettina; PHILIPPI, Heike; REESE, Jens P. Quality of life and correlating factors in children, adolescents with epilepsy, and their caregivers: a cross-sectional multicenter study from germany. **Seizure**, [S.L.], v. 69, p. 92-98, jul. 2019.

RIGHI, Adne; ALVES, Thiago R; NEGRI, Giuseppina; MARQUES, Lucas M; BREYER, Henrique; SALATINO, Antonio. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, [S.L.], v. 91, n. 13, p. 2363-2370, 17 maio 2011.

RIO, Daniele del; STEWART, Amanda J.; PELLEGRINI, Nicoletta. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism And Cardiovascular Diseases**, [S.L.], v. 15, n. 4, p. 316-328, ago. 2005.

ROBEL, Stefanie; SONTHEIMER, Harald. Glia as drivers of abnormal neuronal activity. **Nature Neuroscience**, [S.L.], v. 19, n. 1, p. 28-33, 29 dez. 2015.

ROBERTS, E. Roberts E, Chase T.N. and Tower D.B., Introduction. In *GABA in Nervous System Function*. raven Press, New York, p. 1-6, 1976.

RUBINSON, K.; LANG, E. Transmissão Sináptica. In: Berne & Levy: Fisiologia. Ed. Bruce M.Koeppen, Bruce A.Stanton. 6ª ed.Elsevier,RJ, p.94, 2009.

SALATINO, Antonio. Brazilian Red Propolis: Legitimate Name of the Plant Resin Source. **MOJ Food Processing & Technology**, v. 6, n. 1, 2018.

SCHEFFER, Ingrid E.; BERKOVIC, Samuel; CAPOVILLA, Giuseppe; CONNOLLY, Mary B.; FRENCH, Jacqueline; GUILHOTO, Laura; HIRSCH, Edouard; JAIN, Satish; MATHERN, Gary W.; MOSHÉ, Solomon L.. ILAE classification of the epilepsies: position paper of the ilae commission for classification and terminology. **Epilepsia**, [S.L.], v. 58, n. 4, p. 512-521, 8 mar. 2017.

SCHWARTZ, J.H.;JESSEL, T.M.;SIEGELBAUM, S.A.;HUDSPETH editores. 5ªed. Editora Artmed,Porto Alegre-RS. p.970-990, 2014.

SEDLAK, Jozef; LINDSAY, Raymond H.. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, [S.L.], v. 25, p. 192-205, 1968.

SENEL, Engin; DEMIR, Emre. Bibliometric analysis of apitherapy in complementary medicine literature between 1980 and 2016. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 31, p. 47–52, 2018.

SHARMA, Shaunik; PUTTACHARY, Sreekanth; THIPPESWAMY, Thimmasettappa. Glial source of nitric oxide in epileptogenesis: a target for disease modification in epilepsy. **Journal Of Neuroscience Research**, [S.L.], v. 97, n. 11, p. 1363-1377, 12 dez. 2017.

SHORVON, S.D. Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: The second 50 **Epilepsia**, v. 50, p.93-130,2009.

SILVA, Bruno B.; ROSALEN, Pedro L.; CURY, Jaime A.; IKEGAKI, Masaharu; SOUZA, Vinícius C.; ESTEVES, Alessandro; ALENCAR, Severino M.. Chemical Composition and Botanical Origin of Red Propolis, a New Type of Brazilian Propolis. **Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine**, [S.L.], v. 5, n. 3, p. 313-316, 2008.

SILVA, F. R. G.; MATIAS, T. M. S.; SOUZA, L. I. O.; MATOS-ROCHA, T. J.; FONSECA, S. A.; MOUSINHO, K. C.; SANTOS, A. F. Phytochemical screening and in vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and antitumor activities of the red propolis Alagoas. **Brazilian Journal Of Biology**, [S.L.], v. 79, n. 3, p. 452-459, set. 2019.

SILVA, Rafaela Oliveira da; ANDRADE, Valléria Matos; RÊGO, Ester Seixas Bullé; DÓRIA, Grace Anne Azevedo; LIMA, Bruno dos Santos; SILVA, Francilene Amaral da; ARAËJO, Adriano Antunes de Souza; ALBUQUERQUE JÚNIOR, Ricardo Luiz Cavalcanti de; CARDOSO, Juliana Cordeiro; GOMES, Margarete Zanardo. Acute and sub-acute oral toxicity of Brazilian red propolis in rats. **Journal Of Ethnopharmacology**, [S.L.], v. 170, p. 66-71, jul. 2015.

SINGH, M.; ARSENEAULT, M.; SANDERSON, T.; MURTHY, V.; RAMASSAMY, C. Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms. **J Agric Food Chem**. 56: 4855-4873. 2008.

SIQUEIRA, A.B.s.; GOMES, B.s.; CAMBUIM, I.; MAIA, R.; ABREU, S.; SOUZA-MOTTA, C.M.; QUEIROZ, L.A. de; PORTO, A.L.F.. Trichophytonspecies susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Letters In Applied Microbiology**, [S.L.], v. 48, n. 1, p. 90-96, jan. 2009.

SOARES, Francisco Kleryson. Fitoterapia: uma opção para o tratamento odontológico. **Revista Saúde**, v. 4, n. 1, p. 18-24, 2010.

TELES, Flávio; SILVA, Tarcilo Machado da; CRUZ JÚNIOR, Francisco Pessoa da; HONORATO, Vitor Hugo; COSTA, Henrique de Oliveira; BARBOSA, Ana Paula Fernandes; OLIVEIRA, Sabrina Gomes de; PORFÍRIO, Zenaldo; LIBÓRIO, Alexandre Braga; BORGES, Raquel Lerner. Brazilian Red Propolis Attenuates Hypertension and Renal Damage in 5/6 Renal Ablation Model. **Plos One**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 0116535-0116551, 21 jan. 2015.

TERRONE, Gaetano; BALOSSO, Silvia; PAULETTI, Alberto; RAVIZZA, Teresa; VEZZANI, Annamaria. Inflammation and reactive oxygen species as disease modifiers in epilepsy. **Neuropharmacology**, [S.L.], v. 167, p. 107742, maio 2020.

TIVERON, Ana Paula et al. Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of South Brazilian organic propolis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1-18, 2016.

TOHAMY, Amany A.; ABDELLA, Ehab M.; AHMED, Rasha R.; AHMED, Yara K.. Assessment of anti-mutagenic, anti-histopathologic and antioxidant capacities of Egyptian bee pollen and propolis extracts. **Cytotechnology**, [S.L.], v. 66, n. 2, p. 283-297, 16 maio 2013.

TORETI, Viviane Cristina et al. Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative**

Medicine, v. 2013, p. 1–13, 2013.

TSAO, R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. **Nutrients**. 2: 1231- 1246. 2010.

TURSKI, L.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, W.; BORTOLOTTI, Z.; CAVALHEIRO, E.A. Review: Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine. **Synapse**, v. 3, n. 2, p.154-171, 1989.

TURSKI, Waldemar A.; CAVALHEIRO, Esper A.; SCHWARZ, Michael; CZUCZWAR, Stanisław J.; KLEINROK, Zdzisław; TURSKI, Lechosław. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, [S.L.], v. 9, n. 3, p. 315-335, set. 1983.

VALENZUELA-BARRA, Gabriela et al. Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p. 37–44, 2015.

VAN VLIET, E. A.; ARONICA, E.; VEZZANI, A.; RAVIZZA, T.. Review: neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarker candidates in epilepsy. **Neuropathology And Applied Neurobiology**, [S.L.], v. 44, n. 1, p. 91-111, fev. 2018.

VARVEL, Nicholas H.; NEHER, Jonas J.; BOSCH, Andrea; WANG, Wenyi; RANSOHOFF, Richard M.; MILLER, Richard J.; DINGLEDINE, Raymond. Infiltrating monocytes promote brain inflammation and exacerbate neuronal damage after status epilepticus. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 113, n. 38, p. 5665-5674, 6 set. 2016.

VEZZANI, Annamaria; BALOSSO, Silvia; RAVIZZA, Teresa. Neuroinflammatory pathways as treatment targets and biomarkers in epilepsy. **Nature Reviews Neurology**, [S.L.], v. 15, n. 8, p. 459-472, 1 jul. 2019.

VEZZANI, Annamaria; FRIEDMAN, Alon. Brain inflammation as a biomarker in epilepsy. **Biomarkers In Medicine**, [S.L.], v. 5, n. 5, p. 607-614, out. 2011a.

VEZZANI, Annamaria; GRANATA, Tiziana. Brain Inflammation in Epilepsy: experimental and clinical evidence. **Epilepsia**, [S.L.], v. 46, n. 11, p. 1724-1743, nov. 2005.

VEZZANI, Annamaria; MAROSO, Mattia; BALOSSO, Silvia; SANCHEZ, Manuel-Alavez; BARTFAI, Tamas. IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures. **Brain, Behavior, And Immunity**, [S.L.], v. 25, n. 7, p. 1281-1289, out. 2011.

VISHNOI, Shruti; RAISUDDIN, Sheikh; PARVEZ, Suhel. Glutamate Excitotoxicity and Oxidative Stress in Epilepsy: modulatory role of melatonin. **Journal Of Environmental Pathology, Toxicology And Oncology**, [S.L.], v. 35, n. 4, p. 365-374, 2016.

VOLINSKY, Roman; KINNUNEN, Paavo K. J.. Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: from biophysics to physiology and molecular pathology. **Febs Journal**, [S.L.], v. 280, n. 12, p. 2806-2816, 17 abr. 2013.

VOS, Theo; ALLEN, Christine; ARORA, Megha; BARBER, Ryan M; A BHUTTA, Zulfiqar; BROWN, Alexandria; CARTER, Austin; CASEY, Daniel C; CHARLSON, Fiona J; CHEN, Alan Z. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990–2015: a systematic analysis for the global burden of disease study 2015. **The Lancet**, [S.L.], v. 388, n. 10053, p. 1545-1602, out. 2016.

WANG, Y; ZHAO, L; HAN, T; CHEN, S; W.J. Formononetin attenuates IL-1b-induced apoptosis and NF-kB activation in INS-1 cells. **Molecules** 2012;17 (9): 10052–10064. 2012.

WANG, Wenbo; TANG, Lejian; LI, Yong; WANG, Yong. Biochanin A protects against focal cerebral ischemia/reperfusion in rats via inhibition of p38-mediated inflammatory responses. **Journal Of The Neurological Sciences**, [S.L.], v. 348, n. 1-2, p. 121-125, jan. 2015.

WESS, J.; EGLIN, R. M.; GAUTAM, D. Muscarinic acetylcholine receptors: mutant mice provide new insights for drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 721-733, 2007.

WILLEMS, Laurent M.; RICHTER, Saskia; WATERMANN, Nina; BAUER, Sebastian; KLEIN, Karl Martin; REESE, Jens-Peter; SCHÖFFSKI, Oliver; HAMER, Hajo M.; KNAKE, Susanne; ROSENOW, Felix. Trends in resource utilization and prescription of anticonvulsants for patients with active epilepsy in Germany from 2003 to 2013 — A ten-year overview. **Epilepsy & Behavior**, [S.L.], v. 83, p. 28-35, jun. 2018.

WILLEMS, Laurent M.; WATERMANN, Nina; RICHTER, Saskia; KAY, Lara; HERMSEN, Anke M.; KNAKE, Susanne; ROSENOW, Felix; STRZELCZYK, Adam. Incidence, Risk Factors and Consequences of Epilepsy-Related Injuries and Accidents: a retrospective, single center study. **Frontiers In Neurology**, [S.L.], v. 9, n. 9, p. 414-414, 15 jun. 2018a.

XUE, Meilan et al. Propolis modulates the gut microbiota and improves the intestinal mucosal barrier function in diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 118, p. 109393, 2019.

YUEN, Alan W.C.; KEEZER, Mark R.; SANDER, Josemir W.. Epilepsy is a neurological and a systemic disorder. **Epilepsy & Behavior**, [S.L.], v. 78, p. 57-61, jan. 2018.

ZHU, Haibo; ZOU, Libo; TIAN, Jingwei; LIN, Fei; HE, Jie; HOU, Jian. Protective Effects of Sulphonated Formononetin in a Rat Model of Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury. **Planta Medica**, [S.L.], v. 80, n. 04, p. 262-268, 18 fev. 2014.

ZLATKOVIĆ, Jelena; FILIPOVIĆ, Dragana. Chronic social isolation induces NF-κB activation and upregulation of iNOS protein expression in rat prefrontal cortex. **Neurochemistry International**, [S.L.], v. 63, n. 3, p. 172-179, set. 2013.

ANEXO A



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "ESTUDO DO EFEITO NEUROPROTETOR DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA EM MODELOS DE CONVULSÃO INDUZIDOS POR Pilocarpina e Pentilenotetrazol em Camundongos", protocolada sob o CEUA nº 1057050220 *in vivo*, sob a responsabilidade de **Marta Maria de França Fonteles** e equipe; Joao Victor Souza Oliveira - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 28/04/2020.

We certify that the proposal "Study of the neuroprotective effect of the red propolis hydroalcoholic extract on pilocarpine and pentylentetrazole convulsion models in mice ", utilizing 144 Heterogenic mice (144 males), protocol number CEUA 1057050220 *in vivo*, under the responsibility of **Marta Maria de França Fonteles** and team; Joao Victor Souza Oliveira - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 04/28/2020.

Finalidade da Proposta: *Pesquisa (Acadêmica)*

Vigência da Proposta: de 03/2020 a 07/2020

Área: Departamento de Fisiologia E Farmacologia

Origem: Biotério Central da UFC

Espécie: Camundongos heterogênicos

sexo: Machos

idade: 42 a 48 dias

N: 144

Linhagem: Swiss

Peso: 22 a 29 g

Local do experimento: A manutenção e alojamento dos animais serão realizadas no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF) localizado na Rua Coronel Nunes de Melo, 1127 - Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE. O protocolo experimental será realizado em salas de experimentação adequadas para o manuseio de animais, sem ruídos e devidamente higienizadas, mantendo as condições de temperatura e ciclo claro/escuro anteriormente descritos. Os testes comportamentais serão executados em sala também apropriada (com as mesmas condições) e aparatos de acrílico para execução dos testes. Os aparatos serão limpos depois de cada animal. A eutanásia será executada em sala separada, isolada do ambiente de alojamento dos animais, impedindo a passagem de ruídos e odores provenientes da referida sala.

Fortaleza, 31 de julho de 2020

Prof. Dr. Alexandre Havt Binda
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Camilla Ferreira Roncari
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará