

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
NEUROCIÊNCIAS

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTICONVULSIVANTE E NEUROPROTETOR DO
ÁCIDO ROSMARÍNICO E DO ÁCIDO CAFÉICO EM CAMUNDONGOS

Vanessa Rodrigues Coelho

Porto Alegre

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
NEUROCIÊNCIAS

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTICONVULSIVANTE E NEUROPROTETOR DO
ÁCIDO ROSMARÍNICO E DO ÁCIDO CAFÉICO EM CAMUNDONGOS

Vanessa Rodrigues Coelho

Orientadora

Prof(a). Dra. Patrícia Pereira

Tese apresentada ao curso de Pós-
Graduação em Ciências Biológicas:
Neurociências da UFRGS como
requisito parcial para a obtenção do
grau de doutor em neurociências.

Porto Alegre, Julho de 2016

“...mas toda verdade sem amor é como luz estéril e fria.
Não bastará conhecer e interpretar, é indispensável sublimar e servir.”

Francisco Cândido Xavier

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me proporcionar mais esta oportunidade de aprendizado e me iluminar sempre.

Ao meu pai (*in memoriam*) e à minha mãe que sempre me incentivaram em tudo na vida e me ensinaram a viver dentro de valores como o amor e a gratidão.

Às minhas irmãs, cunhados e sobrinhos que estão sempre torcendo por mim.

Ao meu marido, Adriano, pelo amor, compreensão e apoio. Pelo seu incentivo, bom humor e por estar ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu filho, José Adriano, por me mostrar a cada sorriso que a vida é muito linda!

À minha mestra durante todos esses anos, professora Dra. Patrícia Pereira, o meu sincero agradecimento pela orientação, dedicação e incentivo. Muito obrigada acima de tudo por sua amizade e sua confiança.

Aos colegas de laboratório Caroline, Luana, Lucas, Pricila, Gabriele, Alex, Alan e Karina pela amizade, carinho e pelo precioso auxílio nas atividades experimentais.

À professora Dra. Jaqueline Picada e seu grupo de pesquisa pela colaboração nos ensaios de genotoxicidade realizados neste doutorado.

À professora Dra. Ionara Siqueira e seus alunos pela colaboração nos ensaios de estresse oxidativo.

À professora Jenifer Saffi, seus alunos e à pós-doutoranda Cassiana Viau pela colaboração nos testes em células N9.

Aos professores do PPG Neurociências pelos conhecimentos transmitidos e aos funcionários pela dedicação.

Ao departamento de farmacologia/ICBS por disponibilizar a infraestrutura e a seus funcionários, em especial à Ieda, pelo profissionalismo, sempre auxiliando com toda boa vontade em nossas atividades.

À CAPES pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
LISTA DE TABELAS E FIGURAS.....	2
RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
LISTA DE ABREVIATURAS	5
1. INTRODUÇÃO.....	7
1. 1 Epilepsia	8
1.1.1 Generalidades	8
1.1.2 Fisiopatologia	11
1.1.2.1 Estresse Oxidativo	17
1.1.2.2 Neuroinflamação	21
1.1.2.3 Dano ao DNA	24
1.1.3 Modelos Animais	26
1.1.4 Tratamento	27
1.2 Ácido Rosmarínio e Ácido Caféico.....	29
2. OBJETIVOS.....	34
2.1 Objetivos gerais.....	35
2.2 Objetivos específicos	35
3. COLETÂNEA DE ARTIGOS.....	37
3.1 Capítulo 1: Antiepileptogenic, antioxidant and genotoxic evaluation of rosmarinic acid and its metabolite caffeic acid in mice	38
3.2 Capítulo 2: Behavioral and genotoxic evaluation of rosmarinic and caffeic acid in acute seizure models induced by pentylentetrazole and pilocarpine in mice.....	46
3.3 Capítulo 3: Activation of murine microglial n9 cells is attenuated by rosmarinic acid through down regulation of inflammatory cytokines and cleaved caspase-3.....	56

4. DISCUSSÃO.....	90
5. CONCLUSÕES	103
6. PERSPECTIVAS.....	106
7. REFERÊNCIAS	108
8. ANEXOS.....	125
ANEXO I Carta de aprovação do Comitê de Ética UFRGS.....	126
ANEXO II Autorização para uso de figura.....	127

APRESENTAÇÃO

Esta tese é constituída por:

I. Introdução, com o embasamento teórico necessário para compreensão da proposta de trabalho e objetivos.

II. Objetivos, contendo todas as metas a serem desenvolvidas ao longo dos capítulos.

III. Coleânea de artigos, constituída pelos capítulos 1, 2 e 3:

Capítulo 1: artigo publicado no periódico *Life Sciences*;

Capítulo 2: artigo publicado no periódico *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*;

Capítulo 3: artigo submetido ao periódico *Glia*.

IV. Discussão, contendo uma interpretação dos resultados obtidos relativos aos três capítulos acima, englobando-os em um contexto geral.

V. Conclusões.

VI. Perspectivas.

VII. Referências.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Classificação das crises epiléticas (adaptado de Berg *et al.*, 2010).

Figura 1 . Receptores Glutamatérgicos (Carobrez, 2003; com autorização).

Figura 2. Figura representativa do receptor GABAA (adaptado de Meyer e Quenzer, 2013, com base em Huang *et al.*, 2001).

Figura 3. Modelo esquemático da sinapse GABAérgica (adaptado de Owens e Kriegstein, 2002; Pinard *et al.*, 2010).

Figura 4. Mecanismos oxidativos envolvidos na epilepsia (adaptado de Méndez-Armenta *et al.*, 2014)

Figura 5. Representação dos sítios de anticonvulsivantes (adaptado de Bieger *et al.*, 2005; baseado em Taylor *et al.*, 1998).

Figura 6. Estrutura química do ácido rosmarínico e ácido caféico

RESUMO

Compostos antioxidantes e anti-inflamatórios vêm sendo apontados como uma alternativa para auxiliar no tratamento da epilepsia. Ácido rosmarínico (AR) e seu metabolito ácido caféico (AC) têm ação antioxidante e anti-inflamatória relatada em vários estudos. Além disso, AR tem ação inibitória sobre GABA transaminase (GABA-T), enzima que metaboliza um dos principais neurotransmissores envolvidos na epilepsia: o GABA. Nesta tese, investigamos o efeito do AR e AC em modelos de convulsão e sua ação neuroprotetora sobre o estresse oxidativo, neuroinflamação e genotoxicidade relacionados à epilepsia. Para isso, utilizou-se primeiramente o modelo de *kindling* induzido por pentilenotetrazol (PTZ) para avaliar o efeito dos compostos na epileptogênese. Os compostos não produziram efeito antiepileptogênico *in vivo* neste modelo, no entanto, algumas doses de AR e AC mostraram um efeito neuroprotetor contra o estresse oxidativo e contra o dano ao DNA induzidos pelo *kindling* no córtex dos camundongos, demonstrando um efeito benéfico contra alterações fisiológicas associadas à epileptogênese. Baseados no fato do AR ser um inibidor da GABA-T, avaliamos o efeito dos compostos na potencialização da ação do agonista GABAérgico diazepam (DZP) sobre as convulsões agudas induzidas por PTZ e pilocarpina (PIL) e no teste do sono induzido por DZP. O efeito de AR e AC na prevenção do dano genotóxico produzido pelos modelos também foi investigado. AR e AC mostraram potencializar a ativação GABAérgica, o que foi evidenciado pelo aumento da latência para a convulsão aguda induzida por PTZ, promovido por AR (4 mg/kg), e pela redução para o início do sono induzido por DZP, promovido por AR (4 mg/kg) e AC (8 mg/kg). Além disso, AR e AC (4 mg/kg) reduziram o dano genotóxico causado por PIL. Complementarmente, verificamos (*in vitro*) que o pré-tratamento com AR foi capaz modular a ativação microglial, produzindo um padrão de ativação anti-inflamatório, reduzindo a formação de espécies reativas e a expressão de citocinas pró-inflamatórias, e o dano genotóxico induzido pela inflamação. Estas respostas foram relacionadas à possível inibição da via apoptótica por AR. Em suma, os trabalhos aqui apresentados evidenciaram um efeito neuroprotetor de AR e AC por reduzir o estresse oxidativo, a ativação de vias inflamatórias e o dano genotóxico, envolvidos na progressão do processo epiléptico.

ABSTRACT

Antioxidants and anti-inflammatory compounds have been identified as an alternative to improve the treatment of epilepsy. The rosmarinic acid (RA) and its metabolite caffeic acid (CA) have their antioxidant and anti-inflammatory effects reported in several studies. Moreover, RA has inhibitory action on GABA transaminase (GABA-T), the enzyme that metabolizes an important neurotransmitter involved in epilepsy: GABA. In this thesis, we investigated the effect of RA and CA in seizure models and its neuroprotective action on oxidative stress, neuroinflammation and genotoxicity related to epilepsy. For this, first we used the *kindling* model induced by pentylenetetrazole (PTZ-induced *kindling*) for evaluating the effect of compounds on epileptogenesis. The compounds had no effect antiepileptogenic *in vivo* in this model, however, some doses of RA and CA showed a neuroprotective effect against oxidative stress and DNA damage induced by *kindling* in the cortex of the mice, demonstrating a beneficial effect against physiological changes related to epileptogenesis. Based on the fact of RA being an inhibitor of GABA-T, we evaluated the effect of compounds over potentiation of action of GABAergic agonist diazepam (DZP) on acute seizures induced by PTZ and pilocarpine (PIL) and in DZP-induced sleep test. The preventive effect of genotoxic damage induced by acute seizure models also was investigated. RA and CA showed potentiate GABAergic activation, which was evidenced by increase in latency to acute seizures PTZ-induced promoted by RA (4 mg/kg), and the reduction in latency to sleep in DZP-induced sleep test promoted by RA (4 mg/kg) and CA (8 mg/kg). In addition, RA and CA (4 mg/kg) reduced the genotoxic damage caused by PIL. Moreover, we found (*in vitro*) that the pre-treatment with RA was able to modulate microglial activation, producing a pattern of anti-inflammatory activation, reducing the formation of reactive species and the expression of proinflammatory cytokines, consequently reducing genotoxic damage induced by inflammation. These responses were related to the possible inhibition of apoptotic pathway by RA. In short, the works presented here showed a neuroprotective effect of RA and CA because of reduction of oxidative stress, inflammatory pathways and genotoxic damage, involved in the progression of the epileptic process.

LISTA DE ABREVIATURAS

AC - ácido caféico

AIF - fator indutor de apoptose

AMPA – ácido alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

AR - ácido rosmarínico

Arg-1 - arginase-1

BHE - barreira hemato-encefálica

Ca²⁺ – cálcio

CAD - DNase ativada por caspase

CAT - catalase

Cl⁻ - cloreto

COX - ciclo-oxigenase

DCFH-DA - 2,7 dicloro-fluoresceína diacetato

DNA - ácido desoxirribonucleico

DZP - diazepam

ERNs - espécies reativas de nitrogênio

EROs - espécies reativas de oxigênio

FD - frequência de dano

GABA - ácido gama-aminobutírico

GABA-T - GABA-transaminase

GAD - descarboxilase do ácido glutâmico

GLU - glutamato

GPx - glutathiona-peroxidase

GR - glutathiona redutase

GSH - glutathiona reduzida

H₂O₂ - peróxido de hidrogênio

ID - índice de dano

IGF-1 - fator de crescimento relacionado à insulina

IL-1 β - interleucina 1 β

IL-6 - interleucina 6

ILAE - Liga Internacional contra a Epilepsia

iNOS - óxido nítrico sintase induzível

K⁺ – potássio

LPS – lipopolissacarídeo

mGLURs - receptores metabotrópicos de glutamato

Na⁺ - sódio

NMDA- N-metil-D-aspartato

NO[•] - óxido nítrico

NO₂ - dióxido de nitrogênio

NOS - óxido nítrico sintase

NOX - NADPH oxidases

O₂^{•-} - radical superóxido

OH[•] - radical hidroxila

ON[•] - nitrosila

ONOO[•] - peroxinitrito

PIL - pilocarpina

PTZ - pentilenotetrazol

RNA – ácido ribonucléico

SE - *status epilepticus*

SNC – sistema nervoso central

SOD - superóxido dismutase

TGF- β - fator de transformação do crescimento beta

TNF- α – fator de necrose tomoral α

VGAT - transportador vesicular de GABA

VGB - vigabatrina

1. Introdução

1.1 *Epilepsia*

1.1.1 – Generalidades

A epilepsia, conceitualmente, é o termo utilizado para denominar um distúrbio neurológico caracterizado por uma predisposição persistente do encéfalo em gerar crises convulsivas espontâneas e recorrentes, e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais desta condição. A crise convulsiva, por sua vez, é a ocorrência transitória de sinais ou sintomas decorrentes da atividade neuronal anormal, excessiva ou sincrônica, no encéfalo (Fisher *et al.*, 2005). A ocorrência de uma crise convulsiva não significa que o indivíduo tenha epilepsia (até 10% da população em geral pode apresentar uma convulsão durante a vida) (OMS, 2016). Uma crise convulsiva após uma concussão, ou decorrente de uma febre alta, ou pelo uso ou abstinência de drogas, são exemplos de convulsões provocadas, que não levam a um diagnóstico de epilepsia (Fisher *et al.*, 2014).

Segundo a Liga Internacional contra a Epilepsia (ILAE), uma das condições abaixo deve ser atendida para a definição prática da doença: 1) a ocorrência de *pelo menos duas convulsões não provocadas* (ou reflexas) em um intervalo maior que 24 horas; 2) uma crise não provocada (ou reflexa) e uma probabilidade de futuras convulsões semelhante ao risco geral de recorrência (pelo menos 60%), após duas crises não provocadas, ocorrendo ao longo dos próximos 10 anos; (3) diagnóstico de uma síndrome epiléptica (Fisher *et al.*, 2014).

Uma situação convulsiva específica é o chamado *status epilepticus* (SE). Esta condição constitui-se da ocorrência de uma crise convulsiva prolongada (5 minutos ou mais de atividade convulsiva clínica ou eletroencefalográfica), ou da repetida atividade convulsiva sem recuperação entre as crises (não retornando à linha de base).

O SE é considerado uma emergência médica e está associado com uma alta morbidade, mortalidade e risco significativo de déficit cognitivo (Brophy *et al.*, 2012).

Já o conceito de epileptogênese diz respeito ao desenvolvimento do estado de epilepsia. Refere-se a uma sequência de eventos que converte um cérebro normal em um cérebro propenso a desenvolver convulsões. Supõe-se que grupos de neurônios se tornam-se hiperexcitáveis, ficando mais suscetíveis a dispararem potenciais de ação (Scharfman, 2007).

As crises convulsivas são o resultado de descargas elétricas excessivas e sincrônicas em um grupo de neurônios que podem estar localizados em diferentes partes do encéfalo. As manifestações comportamentais decorrentes das crises são determinadas de acordo com a área cerebral em que ocorrem os disparos neuronais anormais. Por exemplo, a hiperexcitabilidade em certas regiões do córtex visual podem causar alucinações visuais nos pacientes (Mcnamara, 1999). Iniciando-se de forma súbita, a manifestação da crise pode variar desde anormalidades sensitivas e motoras à alterações autonômicas e do estado de consciência (Fisher *et al.*, 2005). Os ataques também podem variar quanto à frequência. Pode ocorrer uma média de menos de uma crise ao ano, como podem ocorrer várias crises ao dia (OMS, 2016).

Deste modo, a epilepsia não é uma condição única, compreende uma família diversa de desordens, incluindo mais de 15 tipos diferentes de crises epiléticas e mais de 30 síndromes epiléticas (Fisher *et al.*, 2014; Löscher *et al.*, 2013). A epilepsia, ou as epilepsias, como preferem alguns autores, podem ser classificadas conforme o tipo de crise apresentada pelo paciente. Primeiramente, a classificação das crises epiléticas se baseia na sua descrição clínica e nos achados eletroencefalográficos, sendo assim

divididas em *crises focais (ou parciais)* e *crises generalizadas*. As *crises focais* são definidas como crises convulsivas que se originam em redes neurais limitadas a um único hemisfério cerebral, podendo atingir tanto uma região discretamente localizada, com uma região mais amplamente distribuída. As *crises generalizadas* são originadas em algum ponto do encéfalo e rapidamente ativam redes neuronais bilateralmente (nos 2 hemisférios), mas não necessariamente todo o córtex cerebral (Berg *et al.*, 2010). A tabela 1 apresenta a classificação das crises epiléticas reconhecidas pela ILAE (Berg *et al.*, 2010).

Tabela 1 – Classificação das crises epiléticas (adaptado de Berg *et al.*, 2010, baseado em Yacubian 2002).

CLASSIFICAÇÃO DAS CRISES EPILÉPTICAS ^a
<p><i>Crises Generalizadas</i></p> <p>Tônico-clônicas (contração tônica simétrica e bilateral seguida de contração clônica)</p> <p>Ausência (breves episódios de comprometimento de consciência)</p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Típica</i></p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Atípica</i></p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Ausência com características especiais</i></p> <p>Mioclônica (contrações musculares muito breves, semelhantes a choques)</p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Mioclônica atônica</i></p> <p style="padding-left: 20px;"><i>Mioclônica tônica</i></p> <p>Clônica (contração muscular seguida de relaxamento, originando abalos musculares sucessivos)</p> <p>Tônica (contração muscular mantida com duração de poucos segundos a minutos)</p> <p>Atônica (perda ou diminuição do tônus muscular)</p>
<p><i>Crises focais ou parciais</i></p> <p>Parciais simples (preservação da consciência)</p> <p>Parciais complexas (comprometimento da consciência)</p>
<p><i>Desconhecida</i>^b</p> <p>Espasmos epiléticos (contração tônica rápida da musculatura do pescoço, tronco e membros podendo assumir caráter em flexão ou em extensão)</p>
<p>^a Crise que não pode ser claramente diagnosticada dentro de uma dessas categorias deve ser considerada “não classificada”, até que maiores informações permitam seu diagnóstico. Entretanto, isso não é uma categoria de classificação.</p> <p>^b Ainda não há um consenso sobre a natureza generalizada ou focal dos espasmos epiléticos.</p>

De acordo com a origem, a epilepsia também pode ser classificada como genética, estrutural/metabólica ou idiopática. Diz-se que a epilepsia é genética quando é causada por mutações em canais iônicos (deleções e duplicações em genes que codificam canais iônicos) ou outros tipos de mutações, como na codificação de genes que expressão proteínas transportadoras de neurotransmissores importantes na epilepsia (por exemplo o GABA) (Myers e Mefford, 2015) . É chamada estrutural ou metabólica quando há outra doença pré-existente ou distúrbio associado ao risco de desenvolvimento de epilepsia. E por fim, a epilepsia idiopática é de origem indefinida por não apresentar nenhuma anormalidade conhecida na estrutura ou função cerebral (Berg e Scheffer, 2011; Mcnamara,1999).

Aproximadamente 50 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de algum tipo de epilepsia, sendo esta uma das doenças neurológicas crônicas mais frequentes na população em geral. Cerca de 80% dos indivíduos acometidos encontram-se nos países em desenvolvimento (OMS, 2016). A epilepsia afeta pessoas de todas as idades, raças, sexos e condições sócio-econômicas. O paciente epiléptico pode apresentar consequências profundas, incluindo morte súbita, ferimentos, problemas psicológicos e transtornos mentais associados (como depressão e ansiedade). Também se associam à epilepsia problemas sociais e econômicos diretos e indiretos, como gastos relacionados à internação hospitalar, medicamentos, além da redução na capacidade de trabalho, o que faz desta patologia um problema de saúde pública (Neto e Marchetti, 2005).

1.1.2 – Fisiopatologia

Os mecanismos que desencadeiam as crises epilépticas são complexos e diversos. No entanto, um princípio comum amplamente discutido é que as crises

epilépticas são oriundas de uma ruptura nos mecanismos responsáveis pelo equilíbrio entre a excitação e a inibição neuronal. Nas crises, há um aumento exacerbado da excitabilidade neuronal. Normalmente, existem controles que inibem uma descarga excessiva de potenciais de ação e existem mecanismos que facilitam o disparo neuronal para que o sistema nervoso funcione de forma adequada. O prejuízo nestes mecanismos de controle (favorecendo um aumento da excitabilidade de forma anormal) pode levar às convulsões (Briggs e Galanopoulou, 2011; Scharfman, 2007).

Nesse contexto, as principais hipóteses propostas para explicar os mecanismos fisiopatológicos da epilepsia incluem alterações na permeabilidade de canais iônicos, a diminuição da neurotransmissão GABAérgica e o aumento da neurotransmissão glutamatérgica (Löscher *et al.*, 2013).

A base iônica do potencial de ação é um aspecto fundamental da neurobiologia envolvida no desencadeamento de convulsões. O disparo adequado das descargas de potenciais de ação para manutenção da homeostasia depende dos gradientes químicos e iônicos através da membrana da célula, e para isso é necessário que haja, entre outros fatores, o normal funcionamento de canais iônicos, por exemplo, canais de sódio (Na^+), potássio (K^+) e cálcio (Ca^{2+}). Anormalidades na condutância destes canais podem ocasionar um aumento da excitabilidade neuronal, despolarizando mais facilmente o neurônio (gerando potenciais de ação) ou ainda aumentando a despolarização nos terminais (facilitando a liberação de neurotransmissores) (Scharfman, 2007).

Em relação aos sistemas de neurotransmissão, postula-se que ocorre principalmente um desequilíbrio entre a atividade de neurotransmissores excitatórios como o glutamato (GLU), ou da inibição da atividade de neurotransmissores

inibitórios como o ácido gama-aminobutírico (GABA), no sentido de aumentar a excitabilidade, o que estaria implicado no desencadeamento das crises (Bagdy *et al*, 2007; Yin *et al.*, 2013).

O GLU é o neurotransmissor excitatório predominante no encéfalo de mamíferos adultos e é fundamental para a execução normal dos numerosos processos no sistema nervoso central (SNC). O GLU desencadeia sua função excitatória através da ativação de seus receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e cainato) e metabotrópicos (mGLURs) (Fig. 1).

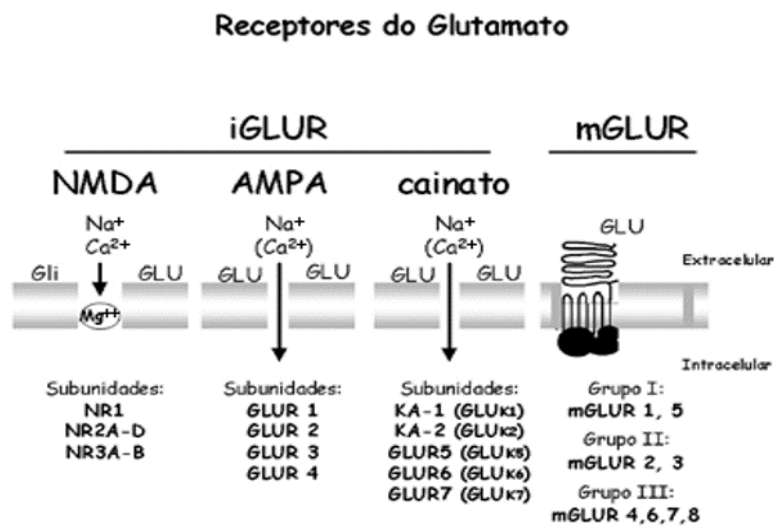


Fig. 1. Receptores Glutamatérgicos (Carobrez, 2003; com autorização).

Na sinapse glutamatérgica, a liberação de GLU das vesículas do terminal pré-sináptico ocorre na dependência de Ca^{2+} e é acionada em resposta à despolarização neuronal. O GLU liberado ativa inicialmente os receptores AMPA e cainato, promovendo rápida despolarização da célula através do influxo de íons Na^+ e Ca^{2+} . Esta despolarização ativa os receptores NMDA permitindo assim maior influxo de Ca^{2+} e Na^+ ao citoplasma através deste receptor, originando potenciais excitatórios pós-sinápticos e consequentemente gerando potenciais de ação (Carobrez, 2003).

A ativação dos mGLURs pelo GLU se dá em uma velocidade muito mais lenta, através da ação de proteínas G. Os mGLURs atuam na regulação da excitabilidade, modulando a função e a expressão dos receptores ionotrópicos de GLU. Há vários subtipos de mGLURs já identificados, podendo ocorrer tanto pré como pós-sinapticamente e ainda nos astrócitos (Barker-Haliski e White, 2015; Carobrez, 2003).

Por outro lado, o GABA (ácido gama-aminobutírico) é conhecido como o mais importante e mais abundante neurotransmissor inibitório no encéfalo dos mamíferos. Estima-se que o GABA está presente em 20-50% de todas as sinapses do SNC. Este neurotransmissor é sintetizado nos terminais axonais a partir do glutamato através de uma reação catalizada pela descarboxilase do ácido glutâmico (GAD). É armazenado em vesículas por um transportador vesicular (VGAT) e é liberado na fenda sináptica por exocitose dependente de Ca^{2+} (Kowalczyk e Kulig, 2014). Promove sua ação a partir de seus receptores específicos que podem ser do tipo GABA_A ou GABA_B. Alguns autores consideram a existência de mais um tipo de receptor denominado GABA_C (Johnston, 2013); no entanto a *International Union of Pharmacology* (IUPHAR) recomenda que esta denominação seja evitada por considerar os receptores GABA_C como subtipos de receptores GABA_A (Olsen e Sieghart, 2009).

Os receptores GABA_A e GABA_C são canais iônicos de cloreto (Cl⁻) operados por ligante. A ligação do GABA a estes receptores promove hiperpolarização no neurônio pós-sináptico (devido à entrada de Cl⁻) inibindo assim a geração de potenciais de ação (Kowalczyk e Kulig, 2014). Os receptores GABA_A (Fig. 2) são os mais estudados e constituem o alvo farmacológico mais explorado relacionado à

neurotransmissão GABAérgica. É constituído de 5 subunidades que unidas formam um poro central (canal de Cl⁻). Apresentam um sítio de ligação para o GABA e vários sítios acessórios aos quais se ligam moléculas capazes de modular a abertura do canal e a afinidade de ligação ao GABA em seu sítio específico. Benzodiazepínicos, barbitúricos, neuroesteroides, anestésicos gerais, picrotoxina, pentilenotetrazol, bicuculina são exemplos de ligantes dos receptores GABA_A (Greenfield , 2013). Os receptores GABA_C são altamente expressos na retina e em áreas anatômicas distintas no SNC. Alguns agonistas GABA_A parecem atuar também em GABA_C, no entanto alguns ligantes de GABA_A como a bicuculina, por exemplo, não são capazes de se ligar à GABA_C (Kowalczyk e Kulig, 2014; Owens e Kriegstein, 2002).

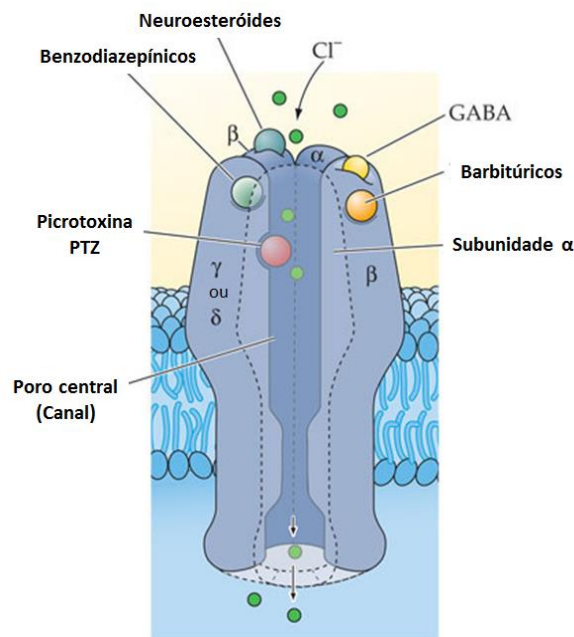


Fig. 2. Figura representativa do receptor GABA_A (adaptado de Meyer e Quenzer, 2013; com base em Huang *et al.*, 2001).

Os receptores GABA_B são receptores metabotrópicos (acoplados a proteínas G) e exercem uma ação mais lenta e modulatória (podendo aumentar ou reduzir a excitabilidade neuronal). Estão localizados na pré-sinapse como autoreceptores

(inibindo a liberação de GABA) ou heteroreceptores (inibindo a liberação de GLU, dopamina, adrenalina ou serotonina) e também no neurônio pós-sináptico. Suas ações estão relacionadas à abertura de canais de K^+ , aumentando o efluxo deste íon e à inibição e *downregulation* de canais de Ca^{2+} (Pinard *et al.*, 2010; Kowalczyk e Kulig, 2014).

Após ativar os receptores, o GABA extracelular é removido, por seus transportadores específicos (GATs), aos astrócitos e ao terminal pré-sináptico; onde então é metabolizado pela enzima GABA-transaminase em semialdeído succínico (Kowalczyk e Kulig, 2014).

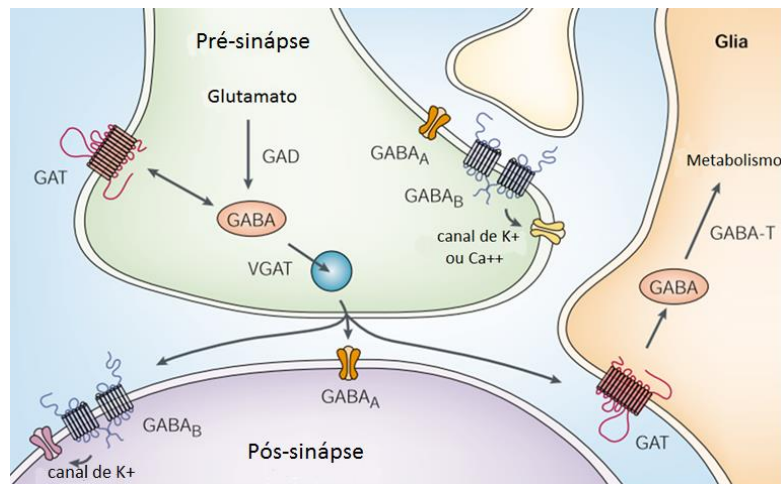


Fig. 3. Modelo esquemático da sinapse GABAérgica (adaptado de Owens e Kriegstein, 2002; com base em Pinard *et al.*, 2010).

Mecanismos moleculares glutamatérgicos e GABAérgicos estão envolvidos na iniciação e na progressão da epilepsia de forma a contribuir para hiperexcitabilidade (Barker-Haliski e White, 2015; Scharfman, 2007). Em relação à neurotransmissão glutamatérgica estes mecanismos incluem, a *upregulation* e a alteração funcional dos receptores, a elevação da concentração extracelular de GLU e alterações conformacionais e na expressão de transportadores glutamatérgicos. O

sistema GABAérgico tem um papel importante por contra-balancear a excitabilidade anormal, suprimindo as descargas epileptiformes. Os mecanismos GABAérgicos que têm sido propostos na fisiopatologia da epilepsia incluem o comprometimento da liberação pré-sináptica de GABA, alterações nos receptores, deficiência na síntese de GABA e perda neuronal (Barker-Haliski e White, 2015; Hui Yin *et al.*, 2013).

O modelo da excitação/inibição tem uma grande utilidade na compreensão geral e abrangente do que ocorre na epilepsia, no entanto este modelo é de certo modo simplista. É necessário considerar que tanto há mecanismos adjacentes ao aumento descontrolado da excitabilidade neuronal, como há consequências que irão criar uma condição propícia ao desenvolvimento de futuras crises. Já está estabelecido, por exemplo, que o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a ativação de processos inflamatórios podem contribuir tanto para o desencadeamento das crises epiléticas como podem ocorrer em consequência das mesmas (Kaneko *et al.*, 2002; Shin *et al.*, 2004). Do mesmo modo, crescentes evidências sugerem que a morte neuronal também pode ser apresentada tanto como consequência da crise epilética quanto como causa (Martinc *et al.*, 2012).

1.1.2.1 – Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e a defesa antioxidante do organismo. As espécies reativas incluem os radicais livres (moléculas que contêm um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos) e espécies reativas não radicalares (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2013b). Entre as espécies reativas mais importantes destacam-se as EROs e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) (Ilhan *et al.*, 2005). As principais EROs são o radical

superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\bullet); e as principais ERNs são o óxido nítrico (NO^\bullet), o peroxinitrito ($ONOO^-$), o radical nitrosila (ON^\bullet) e o dióxido de nitrogênio (NO_2) (Aprioku, 2013; Méndez-Armenta *et al.*, 2014).

EROs são geradas durante o metabolismo celular normal, e são produzidas principalmente pela mitocôndria, pelo sistema de citocromos P450, pelos peroxissomos e através da ativação de processos inflamatórios (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2013b). Em níveis fisiológicos são detoxificados pelas defesas antioxidantes enzimáticas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona-peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR) e não enzimáticas como a vitamina A, vitamina C, vitamina E, β -caroteno e glutathiona reduzida (GSH). No entanto, quando em excesso, as EROs geram estresse oxidativo. A elevada produção de radicais livres ou a diminuição das defesas antioxidantes ou ambos os processos simultaneamente podem levar ao estresse oxidativo causando danos celulares. Além disso, o excesso de EROs reage com o óxido nítrico gerando ERNs (Martinc *et al.*, 2014; Shin *et al.*, 2011).

O tecido encefálico é altamente suscetível aos danos causados por radicais livres devido ao alto metabolismo oxidativo, ao elevado conteúdo de ácidos graxos facilmente oxidáveis e aos baixos níveis de enzimas detoxificadoras de radicais livres e moléculas antioxidantes (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2013b; Zhen *et al.*, 2014).

O estresse oxidativo está fortemente relacionado à epilepsia por vários motivos (Fig. 4). A modificação dos gradientes iônicos (facilitando a despolarização) que ocorre no cérebro de um paciente epiléptico causa uma hiperativação dos receptores glutamatérgicos NMDA, promovendo um aumento do influxo de Ca^{2+} na célula. Alterações na função de canais de Ca^{2+} também contribuem para o aumento do conteúdo deste íon no meio intracelular.

Uma disfunção no metabolismo mitocondrial também parece estar relacionada às crises epiléticas (Shin *et al.*, 2011). A disfunção mitocondrial é outro ponto que promove o aumento do conteúdo de Ca^{2+} intracelular, uma vez que a mitocôndria atua como sequestradora de íons Ca^{2+} a fim de manter a homeostasia. O elevação excessiva do conteúdo de Ca^{2+} intracelular contribui para o aumento exacerbado da excitabilidade neuronal (excitotoxicidade) e para o estresse oxidativo, uma vez que o Ca^{2+} pode ativar uma série de enzimas (incluindo proteína cinase C, proteases, fosfatases, fosfolipases e xantina oxidase) produzindo EROs e ERNs. Além disso, o Ca^{2+} pode ativar a óxido nítrico sintase (NOS) e gerar óxido nítrico e peroxinitrito, aumentando a produção de EROs e ERNs (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2013a; Martinc *et al.*, 2014; Méndez-Armenta *et al.*, 2014; Shin *et al.*, 2011). As membranas biológicas, constituídas de fosfolípídeos e lipoproteínas, também são alvos especificamente vulneráveis à ação das EROS e ERNs, sofrendo peroxidação lipídica (ou lipoperoxidação), a qual é particularmente destrutiva para a estrutura e função das membranas biológicas (Martinc *et al.*, 2014).

As EROs e o aumento de Ca^{2+} podem também ocasionar a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, o que acarreta uma perda do potencial de membrana da mitocôndria, resultando em morte celular por necrose devido à depleção de ATP ou morte por apoptose. O aumento de Ca^{2+} e da permeabilidade de membrana mitocondrial pode causar extravasamento de citocromo C da mitocôndria para o citoplasma, ativando a via das caspases (incluindo caspase 3). Ocorre a ativação de CAD (DNase ativada por caspase) que promove fragmentação do ácido desoxirribonucléico (DNA) e morte celular (Méndez-Armenta *et al.*, 2014). Na epilepsia ocorre um importante dano neuronal em diversas áreas encefálicas. A ativação

do processo apoptótico através da via das caspases parece fazer parte deste processo (Chuang *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2011).

Desse modo, o aumento exacerbado de radicais livres, somado à diminuição na atividade de enzimas antioxidantes que ocorre durante os processos convulsivos têm sido implicado ao processo de epileptogênese (aumentando as chances de ocorrência de novos ataques epilépticos) (Bellissimo *et al.*, 2001; Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2013a; Martinc *et al.*, 2014). Estudos em modelos experimentais e em humanos também sugerem a participação do estresse oxidativo na refratariedade ao tratamento farmacológico da epilepsia. No entanto, os mecanismos correlacionando o estresse oxidativo à resistência farmacológica carecem de uma investigação mais aprofundada (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2013b).

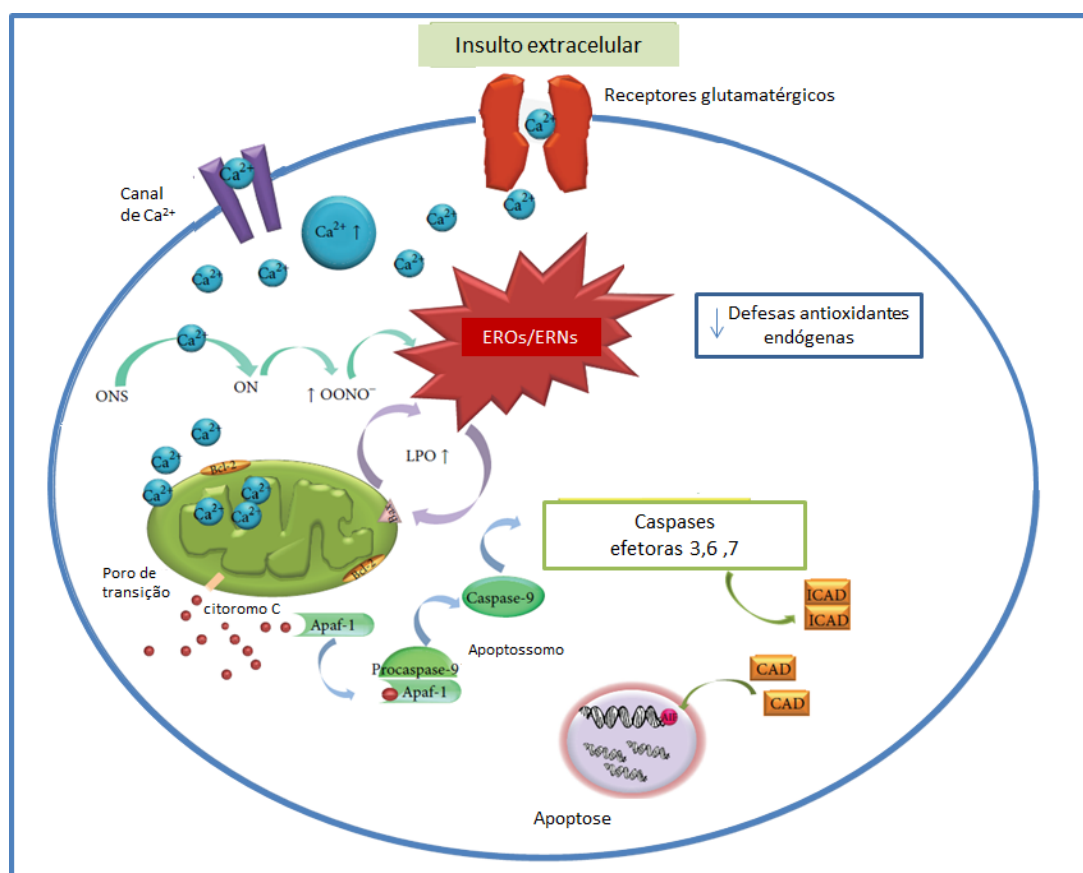


Fig. 4. Mecanismos oxidativos envolvidos na epilepsia (adaptado de Méndez-Armenta *et al.*, 2014)

Além do envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia da epilepsia, o processo inflamatório no SNC também tem sido associado tanto à gênese quanto à perpetuação das crises convulsivas (Vezzani *et al.*, 2011). Estudos demonstram que a ativação de mediadores inflamatórios ocorre tanto nas crises agudas como na epileptogênese (Fabene *et al.*, 2010; Kleen e Holmes, 2008; Vezzani *et al.*, 2011).

1.1.2.2 – Neuroinflamação

A inflamação é uma resposta imunológica ao dano celular induzido por estímulo nocivo (agentes químicos, físicos ou biológicos). É um processo adaptativo importante para o reparo e manutenção tecidual (Lugrin *et al.*, 2014). Durante a fase aguda da inflamação proteínas do plasma e leucócitos extravasam rapidamente dos vasos sanguíneos para os sítios de lesão iniciando uma série de eventos bioquímicos e celulares, que envolve o sistema imunológico, sistema vascular e células locais (Dey *et al.*, 2016). Como um componente-chave da imunidade inata, inflamação aguda representa uma tentativa de atenuar os estímulos nocivos e iniciar o processo de cicatrização. No entanto, este processo pode persistir e se tornar crônico. A ativação de modo exacerbado ou inapropriado do processo inflamatório pode promover alterações significativas nas funções dos tecidos, prejudicando gravemente a homeostasia (Lugrin *et al.*, 2014; Mcmorrow e Murphy, 2011).

A neuroinflamação é caracterizada pela ativação da micróglia, dos astrócitos e das células endoteliais da barreira hemato-encefálica (BHE), pela infiltração de proteínas do plasma e células do sistema imunológico (granulócitos, monócitos e linfócitos) e pelo aumento da expressão de uma variedade de mediadores pró e anti-

inflamatórios. Dentre as moléculas inflamatórias mais conhecidas estão as enzimas pró-inflamatórias, incluindo ciclo-oxigenases (COX), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e NADPH oxidases (NOX) e citocinas (como a IL-1 β , IL-6, TNF- α) (Dey *et al.*, 2016). Estudos clínicos e experimentais indicam que citocinas e moléculas relacionadas estão aumentadas no tecido encefálico após a epileptogênese ou durante as convulsões (De Vries *et al.*, 2016; Wilcox e Vezzani, 2014).

As células microgliais fazem parte da primeira linha de defesa imunológica no SNC (Eggen *et al.*, 2013; Gertig e Hanisch, 2014). Elas atuam no reconhecimento e proteção ao dano e na manutenção/restauração da homeostase do sistema nervoso (Kettenmann *et al.*, 2011; Kettenmann *et al.*, 2013). Em condições que representem risco à sobrevivência neuronal, as células microgliais são ativadas por citocinas produzidas por células efetoras imunitárias. Isso ocorre, por exemplo, após uma lesão no SNC ou pela indução por lipopolissacarídeo (LPS) produzido durante uma infecção bacteriana (Bosch e Kielian, 2015; Stoll e Jander, 1999).

No entanto, a ação da micróglia tem sido implicada em uma série de doenças neurodegenerativas e na epilepsia. Estudos propõem um papel da micróglia no desenvolvimento de crises epiléticas agudas, na neurodegeneração e na neurogênese aberrante (Eyo *et al.*, 2016; Ojo *et al.*, 2014; Pedata *et al.*, 2015). Sabe-se que a microglia poder ser ativada em dois estados distintos: um estado clássico ativado (M1), o qual produz eventos citotóxicos e um estado alternativo (M2), neurotrófico e relacionado à neuroproteção. Estudos têm evidenciado que no estado M1 há uma maior expressão de iNOS e em contrapartida no estado M2 há uma menor expressão da enzima arginase-1 (Arg-1) no SNC. Assim, a medida destas enzimas tem sido útil como marcadores do estado de ativação microglial (Tang e Le, 2016).

A ativação da micróglia está associada com aumento da fagocitose e da liberação de ERNs e EROs, óxido nítrico, proteases e citocinas pró-inflamatórias (Vezzani e Viviani, 2015). Citocinas inflamatórias clássicas, tais como IL-1 β , TNF- α e IL-6, através da ativação dos seus receptores cognatos em células alvo, induzem vias intracelulares que diferem dependendo do tipo de célula, e muitas vezes resultam em resultados fisiopatológicos divergentes. No sistema nervoso, as citocinas têm funções fisiológicas que incluem neurogênese, a sobrevivência neuronal e plasticidade sináptica (Marin e Kipnis, 2013). Porém, o excesso de produção e liberação exagerada de citocinas, ou sua presença prolongada no tecido, estão associados a distúrbios neurológicos como a epilepsia (Devinsky *et al*, 2013; Najjar *et al*, 2007; Najjar *et al*, 2011).

Entre os papéis que as citocinas podem desempenhar na fisiopatologia das convulsões e da epilepsia, pode-se citar, por exemplo, a modulação da atividade neuronal pela liberação de moléculas neuroativas provenientes da glia ou do endotélio, como óxido nítrico e glutamato (Allan e Rothwell, 2001; Montgomery e Bowers, 2012). Também já foi elucidado que a IL-1 β pode ativar receptores nas células neuronais. Em conjunto com outras citocinas como TNF- α , IL-6 e algumas prostaglandinas, IL-1 β é capaz de promover alterações no tráfego de receptores glutamatérgicos e GABAérgicos e na função de canais iônicos voltagem-dependente, alterando a excitabilidade neuronal (Vezzani *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2000). Experimentalmente, citocinas pró-inflamatórias, mostraram contribuir para a diminuição do limiar de convulsão, facilitando a ocorrência de crise convulsiva (Wilcox e Vezzani, 2014).

1.1.2.3 Dano ao DNA

Está bem estabelecido que o estresse oxidativo está associado ao dano e morte neuronal, sendo considerado como um possível mecanismo envolvido na epileptogênese (Martinc *et al.*, 2014). Sob condições de produção excessiva ou depleção das defesas do organismo, EROs e ERNs reagem com proteínas, ácidos graxos e DNA, causando dano a esses substratos (Aguiar *et al.*, 2012).

As espécies reativas podem desencadear danos genotóxicos como a quebra das fitas de DNA ou modificar diretamente as bases nucleicas, o que leva a deleções e outras mutações. Estas modificações podem resultar em expressão gênica aberrante ou morte celular (Martinc *et al.*, 2014). Espécies reativas são capazes de promover alterações epigenéticas, como por exemplo, a sobreativação da enzima e reparo DNA poli-ADPribose 1-polimerase (PARP-1) e mudanças na acetilação de histonas, o que conseqüentemente pode levar à prejuízo funcional e também à morte celular (Martinc *et al.*, 2012).

No contexto da excitotoxicidade presente na epilepsia, o dano genotóxico pode ser desencadeado pelo aumento excessivo do Ca^{2+} intracelular (por ativação dos receptores ou por liberação aumentada dos estoques intracelulares), que irá ativar várias vias gerando, por exemplo, um aumento na produção de óxido nítrico. Este, por sua vez, é capaz de gerar o radical livre peroxinitrito, o qual é potencialmente danoso ao DNA (Fugikawa, 2005). O peroxinitrito pode sofrer reações secundárias formando agentes que podem reagir com aminoácidos aromáticos como a tirosina gerando nitrotirosina e com bases de DNA, especialmente a guanina (Aguiar *et al.*, 2012).

Além do peroxinitrito, o radical livre hidroxila também causa intensivo dano ao DNA, RNA, proteínas, lipídeos e membranas celulares nucleares e da mitocôndria. Estudos demonstram um aumento do radical hidroxila após as convulsões (Rauca *et al.*, 1999). Já o peróxido de hidrogênio, embora não seja um radical livre, é extremamente nocivo por ser um intermediário na produção de radical hidroxila. O peróxido de hidrogênio tem uma meia-vida longa e é capaz de atravessar várias camadas lipídicas e reagir com metais de transição e hemoproteínas. Ele também pode induzir alterações cromossômicas, quebra nas fitas de DNA e, na ausência de catalisadores, oxidar compostos sulfidríla (-SH) (Aguiar *et al.*, 2012; Tang *et al.*, 2012). A redução das defesas antioxidantes endógenas e a anormal ativação de vias inflamatórias, que têm sido relacionadas à epilepsia (Martinc *et al.*, 2014; Vezzani *et al.*, 2008), contribuem para o aumento excessivo de espécie reativas.

Estudos experimentais demonstram que as crises convulsivas causam dano ao DNA (Abdel-Wahab *et al.*, 2015; Bengzon *et al.*, 1997; Cantafora *et al.*, 2014; Crowe *et al.* 2011; Engel e Henshall 2009; Matos *et al.* 2012; De Oliveira *et al.*, 2008; Shinoda *et al.*, 2003). Foi observado que uma única convulsão é capaz de causar morte neuronal e fragmentação do DNA, sendo que mais estímulos levam proporcionalmente mais células à morte (Henshall e Meldrum, 2012).

O ensaio cometa tem se mostrado um teste útil para investigar os efeitos genotóxicos e anti-genotóxicos de compostos sobre o SNC (Picada *et al.*, 2003). Ele pode ser aplicado a qualquer tecido num dado modelo *in vivo*, aonde a obtenção de uma amostra de células/núcleos (na forma de suspensão) seja possível de ser obtida. É um teste sensível e quantitativo para detectar a genotoxicidade molecular (Cantafora *et al.*, 2014). A versão alcalina de ensaio cometa detecta dano total ao DNA, isto é,

tanto simples como dupla quebra da fita de DNA e sítios álcali-lábeis (Tice *et al.*, 2000). Assim, este teste constitui uma ferramenta interessante para medida de dano ao DNA ocasionado por convulsões em modelos experimentais.

A descoberta de um novo fármaco é um processo longo constituído de várias etapas incluindo a pesquisa pré-clínica e clínica (Rang *et al.*, 2012). Os modelos comportamentais em animais constituem uma ferramenta importante utilizada na pesquisa pré-clínica de fármacos, como os anticonvulsivantes.

1.1.3 Modelos animais

Modelos experimentais de epilepsia *in vivo* são amplamente utilizados para testar a eficácia de novos compostos com potencial antiepiléptico, além de permitir a elucidação de mecanismos de ação de fármacos. São úteis para esclarecer questões que são difíceis de ser respondidas por meio de estudos *in vitro* e clínicos, como as consequências fisiopatológicas da progressão da doença, mecanismos celulares de resistência à farmacoterapia e mesmo a introdução de novos fármacos. Os estudos experimentais *in vivo* baseiam-se na hipótese de que há uma relação entre o modelo experimental e as condições fisiopatológicas de iniciação e propagação da crise convulsiva que ocorre em humanos (Kupferberg, 2001).

Uma variedade de modelos animais de convulsão tem sido desenvolvida, como os modelos genéticos (como o desenvolvimento de animais nocaute), elétricos (como o abrasamento ou *kindling elétrico*) e químicos (os quais empregam compostos convulsivantes como ácido caínico, 4-aminopiridina, bicuculina, picrotoxina, pentilenotetrazol e pilocarpina) (Cremer *et al.*, 2009; Loscher, 2002).

O modelo de convulsão induzida por pentilenotetrazol (PTZ) é especialmente sensível à ação de fármacos GABA_Amiméticos, uma vez que este composto é um inibidor não competitivo dos receptores GABA_A (Asadi-Shekaari *et al.*, 2014; Sucker e Carles, 2015). Doses convulsivantes de PTZ permitem estudar o efeito de compostos em convulsões agudas em roedores. No modelo de abrasamento ou *kindling* induzido por PTZ, repetidas aplicações de uma dose subconvulsivante de PTZ são realizadas a fim de reduzir progressivamente o limiar de convulsão levando os animais a convulsões generalizadas. (Da Silva *et al.*, 1998). Este modelo tem o intuito de mimetizar, mais precisamente, o processo de epileptogênese.

A pilocarpina (PIL) é um agonista dos receptores muscarínicos (Villalpando-Vargas e Medina-Ceja, 2015). Uma dose aguda deste convulsivante induz alterações que levam progressivamente ao SE e produz um modelo altamente relacionado à epilepsia do lobo temporal (TLE) (Curia *et al.*, 2008; Kupferberg, 2001; Villalpando-Vargas e Medina-Ceja, 2015).

Ambos os modelos são amplamente utilizados na investigação do efeito anticonvulsivante de compostos com possível ação benéfica no tratamento da epilepsia.

1.1.4 Tratamento farmacológico

O tratamento convencional da epilepsia é realizado, principalmente, pelo uso de fármacos anticonvulsivantes. A história moderna do tratamento farmacológico da epilepsia começa com a descoberta do fenobarbital, no início do século 20, o qual juntamente com a fenitoína, a seus derivados (por exemplo, primidona) foram os anticonvulsivantes mais empregados na primeira metade do século passado. Nos anos

cinquenta, etossuximida, foi introduzida demonstrando seu efeito em crises de ausência. Na década de sessenta, novos anticonvulsivantes classificados como de segunda geração foram descobertos, especialmente a carbamazepina, o valproato e os benzodiazepínicos, comprovando-se a alta efetividade do diazepam contra o SE (Santulli *et al.*, 2016).

Posteriormente surgiram os anticonvulsivantes de terceira geração, incluindo fármacos como vigabatrina, lamotrigina, oxcarbazepina, gabapentina, tiagabina, topiramato, entre outros (Löscher *et al.*, 2013).

Atualmente, diversos anticonvulsivantes estão disponíveis para uso na clínica médica e a escolha do melhor tratamento farmacológico baseia-se no diagnóstico clínico, uma vez que determinados fármacos mostram-se mais efetivos em alguns tipos de crise do que em outras (Glauser *et al.*, 2006).

Embora os mecanismos de ação dos fármacos antiepilépticos comercializados atualmente ainda não sejam completamente elucidados, de modo geral, eles atuam na modulação do desbalanço entre excitação e inibição neuronal. Em nível celular, são conhecidos três mecanismos básicos: modulação de canais iônicos dependentes de voltagem (Na^+ , Ca^{2+} , K^+); aumento da neurotransmissão inibitória mediada pelo GABA; e atenuação da neurotransmissão excitatória, particularmente a mediada pelo glutamato (Löscher *et al.*, 2013). Alvos importantes para a intervenção farmacológica incluem enzimas, proteínas transportadoras, receptores, canais iônicos voltagem dependente, entre outros (Fig. 5).

Apesar do grande número de fármacos anticonvulsivantes, cerca de 30% dos pacientes são refratários à terapia farmacológica ou apresentam efeitos colaterais preocupantes (Dua *et al.*, 2006; Löscher *et al.*, 2013; OMS, 2016). Além disso, grande

parte dos fármacos atualmente disponíveis não trata o processo subjacente à doença. Desse modo, a pesquisa contemporânea tem voltado sua atenção também para a busca de novos fármacos que sejam capazes de interferir no estabelecimento da epilepsia (epileptogênese) e prevenir a recorrência das convulsões (Kaminski *et al.*, 2014; Rowles e Olsen, 2012).

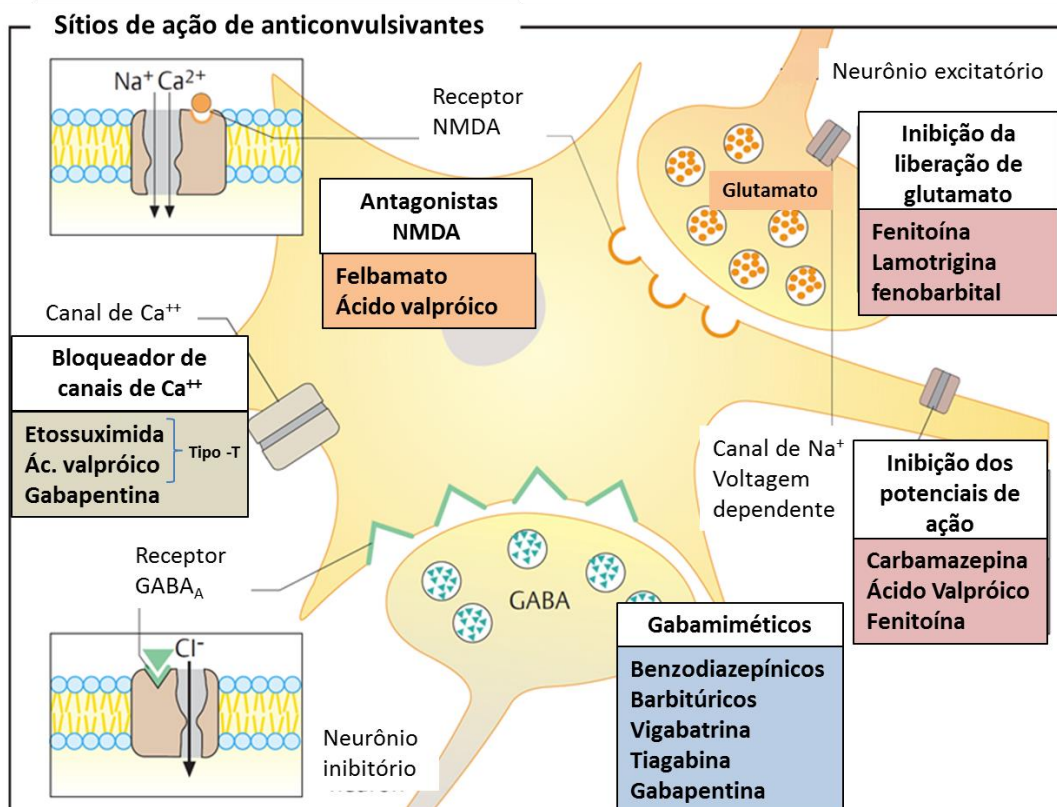


Fig. 5. Representação dos sítios de anticonvulsivantes (adaptado de Bieger *et al.*, 2005; com base em Taylor *et al.*, 1998).

1.2 Ácido Rosmarínico e Ácido Caféico

Ácido rosmarínico (AR, ácido *O*-cafeoil-3,4-diidroxifenil láctico) é um composto hidroxilado de origem natural. É um éster do ácido caféico (AC) e do ácido 3,4-diidroxifenilático isolado primeiramente da espécie *Rosmarinus officinalis*, mas também

presente em uma variedade de outras espécies como, *Artemisia capillaris*, *Calendula officinalis* L., *Melissa officinalis*, *Salvia officinalis* entre outras (Fazel Nabavi *et al.*, 2015; Pereira *et al.*, 2005). Estudos farmacocinéticos mostraram que AR é metabolizado em AC *in vivo*, caracterizando este último como seu principal metabólito (Takeda *et al.*, 2002a). Esta correlação metabólica sinaliza a importância de se investigar em paralelo a atividade de ambos os compostos.

O AC é um dos mais abundantes ácidos hidroxicinâmicos presentes nas frutas, particularmente nas *berries*. Outras fontes dietéticas incluem alguns vegetais (como batata, cenoura e alcachofra) e café (Silva *et al.*, 2014).

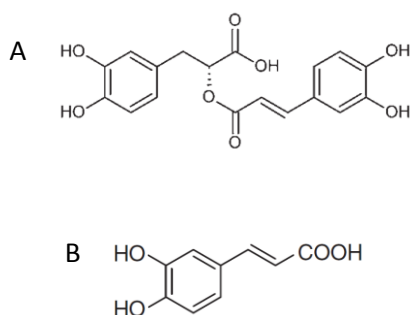


Fig. 6. Estrutura química do ácido rosmarínico (A) e ácido caféico (B)

Tanto AR como AC possuem propriedades biológicas importantes inclusive no SNC. Propriedades como antimicrobiana (Sova, 2012; Swarup *et al.*, 2007), antimutagênica (Sevgi *et al.*, 2015), anticancerígena (Bouzaiene *et al.*, 2015; Karthikkumar *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014), cardioprotetora (Chlopčíková *et al.*, 2004), antinociceptiva (Gamaro *et al.*, 2011; Guginski *et al.*, 2009; Hasanein e Mohammad Zaheri, 2014;), antidepressiva (Jin *et al.* 2013; Takeda *et al.*, 2002a), ansiolítica (Nie *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2006; Takeda *et al.*, 2002b), contra o dano isquêmico (Fallarini *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2015) e na

melhora cognitiva em modelos de memória e Alzheimer (Alkam *et al.*, 2007; Hasanein *et al.*, 2016; Deshmukh *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2016; Ono *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2015; Shan *et al.*, 2015) exemplificam ações que já foram descritas para ambos os compostos.

Grande parte das atividades biológicas apresentadas pelo AR e AC estão relacionadas às suas características antioxidante e anti-inflamatória, as quais são amplamente descritas na literatura (Amoah *et al.*, 2016; Hasanein *et al.*, 2016; Kelsey *et al.*, 2010; Luan *et al.*, 2013; Fazel Nabavi *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2014; Touaibia *et al.*, 2011). Estas ações estão associadas aos seus efeitos protetores em diversos tecidos (Chlopcíková *et al.*, 2004; Chu *et al.*, 2012; Prasad *et al.*, 2009).

No SNC, alguns efeitos protetores do AR incluem sua ação contra morte e dano induzidos por peróxido de hidrogênio em células dopaminérgicas, astrócitos e linhagem celular de neuroblastomas (Gao *et al.*, 2005; Ghaffari *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2008); dano neuronal em modelo *in vitro* de estresse oxidativo, excitotoxicidade e isquemia/reperfusão (Fallarini *et al.*, 2009); dano genotóxico causado por etanol no sangue periférico e em tecido encefálico de camundongos (De Oliveira *et al.*, 2012) e neurotoxicidade induzida por proteína beta amilóide em camundongos (Alkam *et al.*, 2007). Exemplos de neuroproteção promovida por AC incluem a proteção contra dano genotóxico induzido por peróxido de hidrogênio em tecido cerebral de ratos (Pereira *et al.*, 2006); atenuação da perda neuronal, do estresse oxidativo e de marcadores inflamatórios no hipocampo após dano isquêmico em ratos (Liang *et al.*, 2015); diminuição do dano neuronal induzido por alumínio no tecido encefálico de camundongos (Yang *et al.*, 2008), entre outros.

Os mecanismos pelos quais o AR e o AC provem suas atividades biológicas e farmacológicas ainda não foram totalmente elucidados. Além dos mecanismos envolvendo a redução do estresse oxidativo e ação em vias inflamatórias, estudos

apontam o envolvimento de alguns sistemas de neurotransmissão em determinados efeitos farmacológicos apresentados por estes compostos fenólicos.

Na investigação do mecanismo da ação antidepressiva do AR e AC observou-se que nenhum destes compostos foi capaz de inibir significativamente as monoamino oxidases ou atuar na receptação das monoaminas (noradrenalina, dopamina e serotonina) (Takeda *et al.*, 2002a). Em outro estudo, Tsuji e colaboradores (2008) relatam que AC atua de modo indireto nos receptores α -1A adrenérgicos, uma vez que o antagonista α -1A adrenérgico bloqueou o efeito antidepressivo e ansiolítico do AC sem haver ligação direta a estes receptores no ensaio de *binding*.

Em modelo de nocicepção o AR reduziu significativamente a dor induzida por glutamato em camundongos, parecendo inibir, de algum modo, a ação deste neurotransmissor no que diz respeito à dor (Guginski *et al.*, 2009). Em outro estudo, foi evidenciado que AR foi capaz de inibir *in vitro* a GABA-transaminase (GABA-T) (Awad *et al.*, 2009), enzima que promove o metabolismo do neurotransmissor GABA.

Já está bem estabelecido que a neurotransmissão GABAérgica desempenha um papel de grande relevância no controle da excitabilidade neuronal exacerbada que ocorre na epilepsia (Kowalczyk e Kullig 2014). Assim, a inibição do metabolismo do GABA constitui um ponto de modulação importante, permitindo uma maior disponibilidade de GABA para ativar seus receptores específicos. Desse modo, a GABA-T é um alvo útil para intervenção farmacológica. Vigabatrina, por exemplo, é um anticonvulsivante utilizado com sucesso na clínica médica para o controle de alguns tipos de epilepsia e tem como mecanismo de ação a inibição da GABA-T (Coelho *et al.*, 2015).

Além disso, tem sido crescente o interesse em pesquisar o efeito de compostos com potencial antioxidante no tratamento da epilepsia (Martinc *et al.*, 2014). O

estresse oxidativo tem sido implicados na gênese e progressão da doença e compostos antioxidantes vêm apresentando resultados interessantes em modelos experimentais de convulsão (Kim e Oh, 2012; Martinc *et al.*, 2014; Saha e Chakrabarti, 2014; Woodbury *et al.*, 2013). Assim, o AR e AC, devido suas ações antioxidante e anti-inflamatória, somado à capacidade do AR em inibir a enzima GABA-T, podem representar uma importante alternativa farmacológica para o tratamento da epilepsia.

Considerando a importância da constante pesquisa por novos fármacos anticonvulsivantes e o promissor potencial terapêutico de moléculas antioxidantes, como AR e AC, em patologias que afetam o normal funcionamento do SNC, como a epilepsia, este trabalho objetivou avaliar o efeito destes compostos em modelos animais de convulsão e parâmetros relacionados à neuroproteção promovida por estes compostos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Investigar o efeito do AR e AC em modelos animais de convulsão e sua ação neuroprotetora sobre o estresse oxidativo, neuroinflamação e genotoxicidade relacionados à epilepsia.

2.2 Objetivos específicos

I. Avaliar o efeito do AR e do AC na epileptogênese utilizando o modelo de *kindling* induzido por PTZ em camundongos;

II. Avaliar o potencial neuroprotetor do AR e do AC contra o dano gerado pelo modelo de *kindling* induzido por PTZ sobre parâmetros de estresse oxidativo (medida de radicais livres e atividade da enzima superóxido dismutase) e genotóxico (utilizando o ensaio cometa alcalino) no córtex total de camundongos;

III. Avaliar o efeito anticonvulsivante do AR e do AC em modelos de convulsão aguda induzida por PTZ e por PIL em camundongos, bem como sua possível ação sinérgica a uma dose subefetiva do agonista GABAérgico diazepam (DZP) nestes modelos;

IV. Avaliar o efeito do AR e do AC na potencialização do sono induzido por DZP em camundongos;

V. Avaliar o potencial neuroprotetor do AR e do AC contra o dano genotóxico gerado pelos modelos de convulsão aguda induzida por PTZ e PIL no córtex total e no hipocampo de camundongos (utilizando o ensaio cometa alcalino);

VI. Avaliar a capacidade do AR em modular a ativação microglial (*in vitro*) induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e verificar o efeito destes compostos fenólicos sobre parâmetros inflamatórios, oxidativos, genotóxicos e apoptóticos induzidos pelo modelo de LPS.

3. Coletânea de Artigos

3.1 Capítulo 1

ANTIEPILEPTOGENIC, ANTIOXIDANT AND GENOTOXIC EVALUATION
OF ROSMARINIC ACID AND ITS METABOLITE CAFFEIC ACID IN MICE

Artigo publicado no periódico Life Science, 122: 65–71, 2015.

Doi: 10.1016/j.lfs.2014.11.009

3.2 Capítulo 2

BEHAVIORAL AND GENOTOXIC EVALUATION OF ROSMARINIC AND
CAFFEIC ACID IN ACUTE SEIZURE MODELS INDUCED BY
PENTYLENETETRAZOLE AND PILOCARPINE IN MICE

Artigo publicado em 30.07.2016 no periódico Naunyn-Schmiedeberg's Archives of
Pharmacology. DOI 10.1007/s00210-016-1281-z

3.3 Capítulo 3

ACTIVATION OF MURINE MICROGLIAL N9 CELLS IS ATTENUATED BY
ROSMARINIC ACID THROUGH DOWN REGULATION OF INFLAMMATORY
CYTOKINES AND CLEAVED CASPASE-3

4. Discussão

Já é bem estabelecido que um importante dano neuronal ocorre em pacientes epiléticos e que o estresse oxidativo e a ativação de vias inflamatória contribuem para o aumento do dano. Neste contexto, compostos antioxidantes e com propriedades anti-inflamatória têm sido sugeridos como uma interessante alternativa para atuarem como coadjuvantes no tratamento farmacológico da epilepsia, agindo como neuroprotetores, reduzindo a epileptogênese e o dano metabólico/estrutural no tecido encefálico (Martinc *et al.*, 2014). O AR e o AC foram eleitos como os compostos-alvo deste presente estudo por possuírem tais propriedades, podendo desta forma desempenhar algum papel benéfico na proteção aos danos neuronais relacionados à doença.

No primeiro artigo desta tese apresentamos a interferência do tratamento com os compostos antioxidantes AR e AC no *kindling* induzido por PTZ, um modelo relacionado mais especificamente ao processo de epileptogênese (Da Silva *et al.*, 1998). Os resultados mostraram que AR e AC não foram capazes de prevenir a epileptogênese ou melhorar significativamente os parâmetros avaliados ao final do protocolo. O efeito do AR na epileptogênese foi observado somente no 4º dia do protocolo de *kindling*, quando AR (2 mg/kg) aumentou a latência e reduziu a porcentagem de convulsões.

Neste experimento a vigabatrina (VGB 600 mg/kg) foi usada como um controle positivo com intuito de compararmos sua ação com a dos compostos teste, uma vez que VGB é um inibidor da enzima GABA-T, o mesmo mecanismo já descrito para AR em estudo anterior (Awad *et al.*, 2009). Os animais tratados com VGB também não mostraram significante redução dos parâmetros convulsivos no último dia de observação, apesar de ter minimizado significativamente as convulsões no 1º, 3º, 4º e 5º dias de exposição ao PTZ. Interessantemente, os resultados apresentados pelo tratamento com AR (1 e 2 mg/kg) e AC (4 e 8 mg/kg) não foram estatisticamente diferentes aos da VGB em nenhum dia de observação. Isso nos fez pensar na hipótese

de uma inibição menos potente da GABA-T em relação à VGB, uma vez que já foi demonstrado (*in vitro*) que a VGB apresenta maior capacidade inibitória da GABA-T do que a inibição promovida pelo AR (Awad *et al.*, 2009; Larsson *et al.*, 1986).

Vigabatrina é um anticonvulsivante efetivo e bem tolerado, utilizado amplamente na clínica médica (Pellock, 2011). No entanto, estudos evidenciaram que este fármaco apresenta efeito apenas parcial em convulsões induzidas por PTZ (Sayin *et al.*, 1995). Diferentemente, o DZP, agonista GABA_A, promove uma total inibição destas convulsões, conforme demonstrado por nós neste trabalho e por outros pesquisadores (Sayyah *et al.*, 2005; Brum e Elisabetsky, 2000). Sayin e colaboradores (1995) relataram que o aumento do conteúdo de GABA extracelular promovido por VGB parece causar pouca interferência no efeito convulsivante produzido por PTZ. O que sugere que outros modelos experimentais possam ser mais sensíveis para avaliar o potencial anticonvulsivante de compostos inibidores da GABA-T. De acordo com esta possibilidade, posteriormente à publicação do primeiro artigo desta tese, Khamse e colaboradores (2015) evidenciaram que o pré-tratamento com AR (10 mg/kg/dia) durante 1 semana reduziu as convulsões induzidas por injeção intra-hipocampal de cainato, um antagonista NMDA.

No entanto, nosso estudo foi o primeiro a investigar o efeito de AR em um modelo comportamental voltado à epilepsia, sendo que poucos estudos haviam avaliado o efeito do AC em convulsões até então (Dos Santos Sales *et al.*, 2011; Nugroho *et al.*, 2012).

Ainda, neste trabalho, evidenciamos que o modelo de *kindling* induzido por PTZ provocou aumento nos níveis de radicais livres no córtex dos camundongos e que AR (1 mg/kg) e AC (4 e 8 mg/kg) foram capazes de minimizar esse aumento. Estas respostas podem ser relacionadas à estrutura química destes compostos. O AR e AC são ácidos

fenólicos. Muitos compostos fenólicos possuem ação antioxidante por atuarem como sequestradores de radicais livres, agindo tanto na etapa de iniciação como na de propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela ação destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas moléculas (Soares, 2002). Os hidrogênios fenólicos presentes nas estruturas químicas do AR e AC lhes confere a habilidade de neutralizar radicais livres. Além disso, a porção catecol das estruturas influencia positivamente na penetração das bicamadas lipídicas, para que então os compostos exerçam seu efeito antioxidante (Amoah *et al.*, 2016). Outro composto fenólico, a curcumina, também demonstrou minimizar o aumento de EROs gerado pelo modelo de *kindling* induzido por PTZ, corroborando com nossos resultados (Kaur *et al.*, 2014).

Visto que uma redução na atividade das defesas enzimáticas endógenas como SOD, GSH e CAT também ocorre após o modelo de *kindling* induzido por PTZ (Saha e Chakrabarti, 2014; Rauca *et al.*, 2004), neste primeiro artigo, também foi avaliado o efeito de AR e AC na modulação da atividade da enzima SOD, que faz parte da primeira linha de defesa enzimática ao estresse oxidativo (Cárdenas-Rodríguez *et al.*, 2013b).

Ácido rosmarínico e AC não foram capazes de reverter a diminuição da atividade de SOD induzida pelo modelo utilizado, sugerindo que a redução de radicais livres deve estar relacionada a outro mecanismo antioxidante. Os resultados observados no ensaio da 2,7 dicloro-fluoresceína diacetato (DCFH-DA) podem ter origem tanto na ação antioxidante intrínseca das moléculas de AR e AC (Muñoz-Muñoz *et al.*, 2013) como em uma possível modulação da atividade de outras defesas antioxidantes que não foram investigadas neste estudo. Estudos demonstraram que AR aumentou a atividade de CAT no hipocampo após convulsão induzida por cainato (Khamse *et al.*, 2015) e AC

aumentou a atividade de SOD e CAT no hipocampo de ratos após modelo de convulsão aguda induzida por pilocarpina (PIL) (Dos Santos Sales *et al.*, 2011). No entanto AR e AC não aumentaram a atividade da SOD reduzida pelo *kindling* por PTZ.

Finalmente, avaliamos a possível ação protetora do AR e AC contra o dano genotóxico. O processo de *kindling* induzido por PTZ causa dano ao DNA conforme evidenciado neste trabalho e em outros estudos (Abdel-Wahab *et al.*, 2015; Saha e Chakrabarti, 2014). AR (4 mg/kg) e AC (4 mg/kg) diminuíram o dano genotóxico no córtex cerebral dos camundongos, evidenciado pela redução do índice de dano (ID) no ensaio cometa alcalino.

Outros estudos, *in vitro* e *ex vivo*, já haviam demonstrado a capacidade do AR e AC de reduzir danos ao DNA provocados por H₂O₂ (Ghaffari *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Sevgi *et al.*, 2015), etanol (De Oliveira *et al.*, 2012); radiação (Fernando *et al.*, 2016; Sevgi *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2016; Prasad *et al.*, 2009), entre outros. Em nosso estudo esta ação protetora foi observada em relação ao dano causado pelo estabelecimento do processo convulsivo. Nós relacionamos a ação protetora do AR e AC contra o dano genotóxico à propriedade detoxificante de radicais livres promovida por estes compostos. Em concordância, outros compostos fenólicos antioxidantes, como o resveratrol, também apresentam um efeito protetor contra o dano ao DNA (Saha e Shakrabarti, 2014).

A excitotoxicidade presente na epilepsia aumenta a produção de radicais livres gerando estresse oxidativo e este, por sua vez, está implicado em uma série de reações que podem agredir as membranas biológicas, sobretudo a integridade do material genético (Aguiar *et al.*, 2012; Fugikawa, 2005; Martinc *et al.*, 2014).

Neste artigo, mostramos que AR e AC foram capazes de reduzir a formação de radicais livres e o dano genotóxico desenvolvido no modelo de *kindling* induzido por

PTZ. Ácido rosmarínico mostrou uma leve interferência no estabelecimento do processo epiléptico, ao atenuar as convulsões em apenas um dos dias do protocolo aplicado. Sendo assim, nos questionamos a respeito da capacidade dos compostos em potencializar o efeito de um fármaco GABA-mimético (uma vez que AR é um inibidor da GABA-T) e que efeito esses compostos teriam sobre convulsões induzidas por outro convulsivante além do PTZ.

Então, o segundo artigo desta tese apresenta a avaliação de um possível efeito sinérgico do AR e AC à baixas doses (não efetivas) do agonista GABAérgico DZP em convulsões agudas induzidas por PTZ e PIL. A ação dos compostos teste em potencializar o sono induzido por DZP e o efeito protetor dos mesmos contra o dano genotóxico induzido por PTZ e PIL também foram avaliados.

Neste estudo, o pré-tratamento com AR e AC não melhorou os parâmetros relacionados às convulsões agudas provocadas por doses convulsivantes de PTZ ou PIL quando administrados sozinhos. No entanto, AR (4 mg/kg) mostrou potencializar o efeito da baixa dose de DZP em relação à latência para convulsão no modelo induzido por PTZ. Nenhuma dose testada do AC foi capaz de potencializar o efeito de DZP nas convulsões induzidas por PIL em nenhum dos parâmetros observados.

O sinergismo de AR à baixa dose de DZP no modelo de convulsão aguda induzida por PTZ está em concordância com os resultados apresentados no primeiro artigo, onde AR apresentou um pequeno efeito no desenvolvimento do *kindling* induzido por PTZ. A literatura relata que a inibição da GABA-T promove um aumento de GABA extracelular (Ben-Manachem *et al.*, 2011). Nós acreditamos que, mesmo que AR tenha uma fraca capacidade de inibir a GABA-T, isto pode resultar em aumento no conteúdo de GABA extracelular. Este aumento de GABA somado à fraca ativação dos

receptores GABA_A promovida pelo DZP em baixa dose pode ter resultado na redução da latência observada.

Este efeito do AR em potencializar a ação de DZP no modelo de convulsão aguda induzida por PTZ foi confirmada pela redução na latência para o sono induzido por DZP no experimento seguinte deste trabalho. Neste experimento não só a dose mais alta do AR (4 mg/kg), como a dose mais alta do AC (8 mg/kg) mostraram redução do tempo de latência, indicando que AC também atua por algum mecanismo que aumenta a ativação GABAérgica.

As diferentes respostas em convulsões induzidas por PTZ e PIL se devem a seus diferentes mecanismos de ação. PTZ é um antagonista dos receptores GABA_A, inibindo a ação de GABA no seu receptor. PIL é um agonista dos receptores muscarínicos de acetilcolina (principalmente M1). Esta ativação causa uma redução inicial no GABA extracelular, com um subsequente aumento de GLU o qual é mantido pela ativação dos receptores NMDA gerando SE (Curia *et al.*, 2008; Smolders *et al.*, 1997). O pré-tratamento com fármacos que aumentam a neurotransmissão GABAérgica (como VGB ou fenobarbital) ou que diminuem a neurotransmissão glutamatérgica (por exemplo a ketamina) reduz convulsões induzidas por PIL (Pereira *et al.*, 2007). Vigabatrina e DZP minimizaram as convulsões induzidas por PIL, porém o pré-tratamento com AR e AC sozinhos ou associados à baixa dose de DZP não melhoraram os parâmetros convulsivos. Acreditamos que, pelo fato de VGB causar uma inibição irreversível da GABA-T ela demonstre efeitos satisfatórios neste modelo, atuando na fase inicial do processo induzido por PIL e que fraca inibição da GABA-T pelo AR não seja capaz de minimizar o efeito de PIL e impedir a elevada excitabilidade glutamatérgica subsequente.

Também analisamos o efeito dos compostos contra o dano genotóxico induzido por ambos os convulsivantes. Ácido rosmarínico e AC não protegeram contra o dano genotóxico no córtex e no hipocampo dos camundongos causado por PTZ. No entanto o pré-tratamento com AR (4m/kg) reduziu o índice e a frequência de dano (ID e FD) no córtex e AC (4 mg/kg) reduziu o ID no hipocampo causado por PIL.

Os resultados encontrados neste trabalho em relação ao dano genotóxico causado por PTZ divergem dos resultados encontrados no primeiro artigo. Esta diferença é justificável, uma vez que no modelo anterior as doses do AR e AC foram administradas repetidas vezes (1 vez a cada 3 dias durante 16 dias) sempre precedendo a aplicação de uma dose subconvulsivante de PTZ (50 mg/kg) com o objetivo de avaliar a interferência na epileptogênese. Neste segundo trabalho, os animais foram tratados uma única vez com os compostos e posteriormente receberam uma dose convulsivante de PTZ (88 mg/kg), constituindo um modelo de convulsão aguda. Desse modo, demonstramos que AR e AC são capazes de reduzir o dano ao DNA que ocorre durante a epileptogênese, mas que uma única administração destes compostos não é capaz de reduzir um estímulo convulsivante agudo induzido por PTZ.

O dano genotóxico promovido por PTZ pode ser relacionado à inibição da neurotransmissão GABAérgica promovida por ele (Asadi-Shekaari *et al.*, 2014). Já o mecanismo pelo qual a PIL gera danos ao DNA provavelmente é decorrente do seu mecanismo convulsivante (ativação muscarínica primária, seguida de redução de GABA e posterior aumento expressivo de glutamato) (Curia *et al.*, 2008; Smolders *et al.*, 1997). Sendo assim, mesmo que AR e AC não tenham mostrado uma melhora significativa nos parâmetros comportamentais observados na convulsão induzida por PIL, os resultados obtidos demonstram que em nível molecular houve uma interferência positiva destes compostos, uma vez que foram capazes de reduzir o dano genotóxico.

Levando em consideração os dados obtidos, é possível que AR e AC interfiram em algum ponto do mecanismo de ação de PIL, porém estes não foram efetivos o suficiente para mostrar este efeito no fenótipo comportamental. Em um estudo em ratos, AC (4 mg/kg) mostrou aumentar a latência e reduzir a porcentagem de convulsões induzidas por PIL, diferentemente do encontrado por nós (Dos Santos Sales *et al.*, 2011). Outros estudos mostraram que AR (1 e 3 mg/kg) foi capaz de reduzir a dor induzida por GLU (Guginski *et al.*, 2009) e que o tratamento com AR (10 mg/kg) durante uma semana reduziu a porcentagem de convulsões induzidas pelo agonista glutamatérgico cainato (Khamse *et al.*, 2015). Portanto, mais estudos são necessários para uma melhor elucidação dos mecanismos e dos efeitos de um tratamento mais prolongado com estes compostos.

Um grande número de trabalhos evidenciam uma relação entre estresse oxidativo e a ativação de vias neuroinflamatórias ao processo de epileptogênese (Aguiar *et al.*, 2012; Martinc *et al.*, 2014; Vezzani *et al.*, 2011; Vezzani e Viviani, 2015). Dentro deste contexto, estudos relatam a ocorrência da ativação da micróglia na epilepsia. Estes estudos indicam um direcionamento desta ativação para um fenótipo microglial relacionado à neurodegeneração (denominado M1) e a liberação de vários fatores pró-inflamatórios após as convulsões (Benson *et al.*, 2015; Choi e Koh, 2008; Okuneva *et al.*, 2015), o que pode constituir um fator importante na progressão da doença. A ativação clássica da micróglia (ao estado M1), é relacionada ao aumento da expressão de iNOS, enquanto um estado de ativação alternativo (M2), é correlacionado com o aumento de Arg-1 e com a ativação de mecanismos anti-inflamatórios e neuroprotetores (Okuneva *et al.*, 2015; Tang e Le, 2016).

Na primeira parte desta tese, voltada à avaliação da ação do AR e AC na epileptogênese, AR mostrou um resultado mais significativo em relação ao AC na

redução dos parâmetros comportamentais de convulsão. Por este motivo, escolhemos investigar o efeito do pré-tratamento com este composto sobre a ativação microglial e sobre parâmetros envolvidos na neuroinflamação e dano neuronal. Para isso, no terceiro estudo desta tese (capítulo 3), utilizamos um modelo de ativação do processo inflamatório *in vitro* induzido por lipopolissacarídeo (LPS) em células microgлияis murinas (N9).

Já é bem estabelecido que LPS induz a ativação microglial do tipo M1, caracterizada pelo aumento de iNOS e redução de Arg-1, sendo empregado com um modelo *in vitro* válido para o estudo de processos relacionados à neuroinflamação (Ma *et al.*, 2015). Nós verificamos que o pré-tratamento com AR reduziu a expressão de iNOS e aumentou a expressão de Arg-1, sugerindo uma polarização da ativação microglial para o estado M2. Estes resultados corroboram com os apresentados por Qiao e colaboradores (2009), onde AR inibiu a produção de NO e a expressão de iNOS induzida por LPS em macrófagos RAW264.7.

Arginase-1 e iNOS são enzimas que competem pelo mesmo substrato: L-arginina. Arginase-1 converte L-arginina em L-ornitina, em uma reação essencial no ciclo da uréia (Asano *et al.*, 2016). Por sua vez, iNOS converte L-arginase em NO, que , em conjunto com EROs e citocinas pró-inflamatórias, induz neurotoxicidade (Tang e Le, 2016). O aumento de Arg-1 e a redução de iNOS causadas pelo AR é um indicativo de que AR direciona a ativação da micróglia à favor do estado M2. A literatura cita que esta ativação alternativa suprime a produção de citocinas pró-inflamatórias e de NO, ativa a angiogênese e a recuperação da matriz extracelular (por meio de citocinas anti-inflamatórias IL- 4, IL-13, IL-10 e TGF- β), além de aumentar a expressão de fatores neurotróficos como o IGF-1 (fator de crescimento relacionado à insulina), implicado na sobrevivência neuronal (Tang e Le, 2016).

Chu e colegas (2012) mostraram que AR foi capaz de diminuir a produção de TNF- α , IL-6 e IL-1 β em um modelo de lesão pulmonar aguda induzida por LPS em camundongos. Nós mostramos que, além de reduzir iNOS e aumentar Arg-1, AR reduziu a formação de radicais livres e a expressão das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α em N9; o que também contribui para polarização da ativação ao estado M2 e evidencia um efeito antioxidante e anti-inflamatório de AR *in vitro*. Além disso, já foi evidenciado um envolvimento de moléculas inflamatórias como IL-1 β e HMGB1 na facilitação da geração de convulsões focais, o que foi observado após a aplicação em um modelo de epilepsia do lobo temporal (Chiavegato *et al.*, 2014) e que tais citocinas parecem estimular os receptores NMDA (Viviani *et al.*, 2003; Yu *et al.*, 1997). Como citado anteriormente, nós demonstramos que o pré-tratamento com AR reduziu o dano genotóxico gerado por PIL *in vivo*. Assim, a redução da expressão de IL-1 β promovida pelo pré-tratamento com AR em células N9 pode constituir um dos mecanismos pelos quais AR atenuou o dano genotóxico induzido pelas convulsões provocadas por PIL.

Sabe-se que estímulos nocivos (como lesão, trauma, infecção) ativam a micróglia no estado clássico M1 e que esta ativação produz um aumento de radicais livres, citocinas pró-inflamatórias e iNOS. Além disso, estes fatores atuam retroalimentando a ativação da micróglia M1 (Tang e Le, 2016). O estresse oxidativo também pode causar dano da membrana mitocondrial, aumentando sua permeabilidade (o que pode ser mensurado experimentalmente pela redução do potencial de membrana mitocondrial - $\Delta\Psi_m$). Conseqüentemente, pode haver o extravasamento de citocromo C da mitocôndria e a ativação do fator indutor de apoptose (AIF) e da via das caspases (incluindo a caspase 3). A ativação desses fatores promove fragmentação do DNA e a morte celular por apoptose (Gogvadze *et al.* 2015; Mendez-Armenta *et al.*, 2014; Otera e Mihara, 2013; Perez-Pinzon *et al.*, 2012).

Ácido rosmarínico foi capaz de diminuir a perda de permeabilidade da membrana mitocondrial, a ativação de caspase 3 e o dano ao DNA em células N9 (evidenciado no ensaio cometa). Gao e colaboradores (2005) evidenciaram que AR foi capaz de reduzir a perda da viabilidade celular e a apoptose induzida por H₂O₂ em astrócitos. O efeito anti-apoptótico, naquele estudo, foi confirmado pelo aumento do potencial de membrana mitocondrial e redução da ativação da caspase-3; e os efeitos observados foram justificados pela ação antioxidante do AR também mostrada por eles. Acreditamos, de acordo com nossos resultados, que a proteção contra apoptose e o dano genotóxico promovidos por AR em células N9 ocorreram em consequência não só do efeito antioxidante, mas também devido ao efeito anti-inflamatório deste composto.

Já foi evidenciado que crises convulsivas podem causar dano ao DNA (Abdel-Wahab *et al.*, 2015; Cantafora *et al.*, 2014; Henshall e Meldrum, 2012). Radicais livres e mediadores pró-inflamatórios que estão implicados nos mecanismos moleculares da epilepsia parecem participar deste processo (Aguiar *et al.*, 2012; Martinc *et al.*, 2014; Rauca *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2012; Vezzani *et al.*, 2008).

A neuroinflamação vem sendo implicada tanto na causa como por consequência da epilepsia (Dey *et al.*, 2013). Estudos relatam um aumento na expressão de IL-1 β , TNF- α e IL-6 em diversas áreas encefálicas após aplicação de modelos experimentais de convulsão tanto na geração como na propagação das crises convulsivas (Vezzani *et al.*, 2008). Citocinas sintetizadas na micróglia e nos astrócitos têm sido relacionadas à disfunção astrocitária, ao dano à BHE, à modulação do funcionamento de receptores e canais iônicos, à liberação de neurotransmissores e à hiperexcitabilidade neuronal. Todos esses processos favorecem a geração de convulsões, neurodegeneração e disfunções neurológicas (Vezzani e Viviani, 2015). Por sua vez, a excitotoxicidade gerada pelas convulsões produz radicais livres que, associados às baixas defesas

antioxidantes endógenas, podem ativar o processo inflamatório caracterizando um processo cíclico (Aguiar *et al.*, 2012; Dey *et al.*, 2013; Martinc *et al.*, 2014).

Sendo assim, compostos capazes de reduzir o estresse oxidativo e a neuroinflamação podem auxiliar no tratamento da epilepsia a fim de minimizar a progressão do processo epileptogênico. Os resultados deste terceiro estudo corroboram com os da primeira parte desta tese, no qual o pré-tratamento com AR reduziu o dano ao DNA e diminuiu a formação de radicais livres no córtex de camundongos submetidos ao *kindling* induzido por PTZ e com o segundo artigo onde AR reduziu o dano ao DNA induzido por PIL. Além disso, estes achados sugerem que a ação neuroprotetora do AR *in vivo* e *in vitro* contra o dano genotóxico pode estar relacionada não só ao potencial antioxidante deste composto como também com a capacidade de modular a ativação de vias inflamatórias relacionadas ao dano neuronal.

5. Conclusões

Os resultados apresentados nesta tese nos permitem concluir que:

- Algumas doses de AR e AC testadas reduziram o dano oxidativo e o dano ao DNA no córtex cerebral produzidos pelo *kindling* induzido por PTZ, evidenciando uma ação neuroprotetora;

- Ácido rosmarínico e AC não apresentaram efeito antiepileptogênico *in vivo* nas doses testadas;

- Ácido rosmarínico (4 mg/kg) potencializou o efeito do DZP ao aumentar a latência para convulsões induzidas por PTZ e ambos os compostos (nas doses mais altas) reduziram a latência para o sono induzido por DZP, mostrando que AR e AC potencializam a ativação GABAérgica;

- O pré-tratamento com AR e AC reduziu o dano genotóxico gerado pela convulsão aguda induzida por PIL no córtex e no hipocampo, respectivamente; evidenciando um efeito neuroprotetor contra o dano induzido por este convulsivante;

- Ácido rosmarínico mostrou ser capaz de desviar a ativação microglial (*in vitro*) de um estado pró-inflamatório para o estado anti-inflamatório relacionado à neuroproteção;

- O pré-tratamento com AR reduziu os níveis de radicais livres e mediadores pró-inflamatórios mostrando um efeito antioxidante e anti-inflamatório deste composto em células N9;

- O dano genotóxico induzido pela ativação da inflamação em células N9 foi reduzido pelo pré-tratamento com AR, o qual parece promover este efeito através inibição da apoptose.

Tomados em conjunto, os resultados apresentados nesta tese predizem um efeito neuroprotetor do AR e AC por reduzir o estresse oxidativo, a ativação de vias inflamatórias e o dano genotóxico relacionados às crises convulsivas. No entanto, mais estudos a fim de avaliar os mecanismos e o efeito destes compostos em outros modelos se fazem necessários.

6. Perspectivas

Como perspectivas, consideramos pertinente avaliar o perfil farmacológico e neuroprotetor do AR e do AC em outros modelos de convulsão (como os modelos químicos de 4-aminopiridina, isoniazida e aminofilina). Tais modelos promovem a resposta convulsiva por mecanismos diferentes aos promovidos por PTZ ou PIL, podendo, portanto evidenciar respostas diferentes às encontradas nos trabalhos apresentados nesta tese.

A avaliação de determinados parâmetros bioquímicos após as convulsões, como peroxidação lipídica, nível de nitrito e nitrato, superóxido dismutase, avaliação catalase, glutathione peroxidase e avaliação da função mitocondrial, podem ser relevantes a fim de complementar as informações a respeito do o perfil antioxidante de AR e AC.

Considerando-se que AR e AC diminuam o dano genotóxico induzido por PIL, a qual interfere indiretamente no sistema glutamatérgico, uma investigação mais direcionada a esse sistema de neurotransmissão talvez seja interessante, dependendo do resultado que os novos experimentos em outros modelos convulsivos possam mostrar.

A investigação dos efeitos farmacológicos após um tratamento crônico com estes compostos é outro ponto a ser considerado, pois é possível que AR e AC apresentem efeito anticonvulsivante apenas após um tratamento mais prolongado, mesmo que alterações bioquímicas já sejam possíveis de serem evidenciadas após um tratamento agudo.

E, finalmente, a observação de alterações astrocíticas e neuronais poderão ser avaliadas (através da medida de GFAP e NeuN), uma vez que grande parte das citocinas liberadas no processo inflamatório são provenientes dos astrócitos e que a neurogênese constitui um importante processo para recuperação das função cerebral.

7. Referências

- Aguiar, C. C. T., Almeida, A. B., Araújo, P. V. P., Abreu, R. N. D. C. D., Chaves, E. M. C., Vale, O. C. D., Macêdo, D.S., Woods, D.J., Fonteles, M.M.F., Vasconcelos, S. M. M. (2012). Oxidative stress and epilepsy: literature review. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1-12.
- Alkam, T., Nitta, A., Mizoguchi, H., Itoh, A., Nabeshima, T. (2007). A natural scavenger of peroxynitrites, rosmarinic acid, protects against impairment of memory induced by A β 25–35. *Behav. Brain Res*, 180, 139–145.
- Allan, S. M., Rothwell, N. J. (2001). Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, 2 (10), 734-744.
- Amoah, S. K., Sandjo, L. P., Kratz, J. M., Biavatti, M. W. (2016). Rosmarinic Acid–Pharmaceutical and Clinical Aspects. *Planta medica*, 82(05), 388-406.
- Aprioku, J. S. (2013). Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *Journal of reproduction & infertility*, 14, 158-172.
- Asadi-Shekaari, M., Eslami, A., Kalantaripour, T., Joukar, S. (2014). Potential Mechanisms Involved in the Anticonvulsant Effect of Walnut Extract on Pentylentetrazole-Induced Seizure. *Med Princ Pract*, 23, 538– 542.
- Awad, R., Muhammad, A., Durst, T., Trudeau, V. L., Arnason, J. T. (2009). Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. *Phytotherapy Research*, 23(8), 1075-1081.
- Bagdy, G., Kecskemeti, V., Riba, P., Jakus, R. (2007). Serotonin and epilepsy. *J Neurochem*, 100, 857-873.
- Barker-Haliski, M., White, H. S. (2015). Glutamatergic mechanisms associated with seizures and epilepsy. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(8), a022863.
- Bellissimo, M.I., Amado, D., Abdalla D.S.P., Ferreira E.C., Cavalheiro, E.A., Naffah-Mazzacoratti, M.G. (2001). Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. *Epilepsy Research*, 46, 121-128.
- Bengzon, J., Kokaia, Z., Elmer, E., Nanobashvili, A., Kokaia, M., Lindvall, O. (1997). Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(19), 10432–7.

- Ben-Menachem, E. (2011). Mechanism of action of vigabatrin: correcting misperceptions. *Acta Neurol Scand*, 192, 5–15.
- Benson, M.J, Manzanero, S., Borges, K. (2015). Complex alterations in microglial M1/M2 markers during the development of epilepsy in two mouse models. *Epilepsia*, 56, 895-905.
- Berg, A.T., Berkovic, S.F., Brodie, M.J., Buchhalter, J., Cross, J.H., van Emde Boas, W., Engel, J., French, J., Glauser, T.A., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Nordli, D., Plouin, P., Scheffer, I.E. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia*, 51(4), 676-85.
- Berg, A.T., Scheffer, Y. E. (2011). New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century. *Epilepsia*, 52 (6), 1058-1062.
- Bieger, D., Hein, L., Lüllmann, H., Mohr, K. (2005). *Color atlas of pharmacology*. Thieme.
- Bosch, M.E., Kielian, T. (2015). Neuroinflammatory paradigms in lysosomal storage diseases. *Front Neurosci*, 9, 417.
- Bouzaiene, N. N., Jaziri, S. K., Kovacic, H., Chekir-Ghedira, L., Ghedira, K., Luis, J. (2015). The effects of caffeic, coumaric and ferulic acids on proliferation, superoxide production, adhesion and migration of human tumor cells in vitro. *European journal of pharmacology*, 766, 99-105.
- Briggs, S.W., Galanopoulou, A.S. (2011). Altered GABA signaling in early life epilepsies. *Neural Plasticity*, 2011, 1-16.
- Brophy, G.M., Bell, R., Claassen, J., Alldredge, B., Bleck, T.P., Glauser, T., Laroche, S.M., Riviello Jr, J.J., Shutter, L., Sperling, M.R., Treiman, D.M., Vespa, P.M. (2012). Neurocritical Care Society Status Epilepticus Guideline Writing Committee. Guidelines for the evaluation and management of status epilepticus. *Neurocrit Care*, 17(1), 3-23.
- Brum, L. S., Elisabetsky, E. (2000). Antiepileptogenic properties of phenobarbital: behavior and neurochemical analysis. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 67(3), 411-416.

- Cantafora, E., Giorgi, F. S., Frenzilli, G., Scarcelli, V., Busceti, C. L., Nigro, M., Bernardeschi, M., Fornai, F. (2014). Region-specific DNA alterations in focally induced seizures. *Journal of Neural Transmission*, 121(11), 1399-1403.
- Cárdenas-Rodríguez, N., Coballase-Urrutia, E., Rivera-Espinosa, L., Romero-Toledo, A., Sampieri III, A., Ortega-Cuellar, D., Montesinos-Correa, H., Floriano-Sánchez, E., Carmona-Aparicio, L. (2013a). Modulation of antioxidant enzymatic activities by certain antiepileptic drugs (valproic acid, oxcarbazepine, and topiramate): evidence in humans and experimental models. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013, 1-8.
- Cárdenas-Rodríguez, N., Huerta-Gertrudis, B., Rivera-Espinosa, L., Montesinos-Correa, H., Bandala, C., Carmona-Aparicio, L., Coballase-Urrutia, E. (2013b). Role of Oxidative Stress in Refractory Epilepsy: Evidence in Patients and Experimental Models *Int. J. Mol. Sci.*, 14, 1455-1476.
- Carobrez, A.P. (2003). Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade Glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety. *Rev Bras Psiquiatr*, 25, 52-8.
- Chiavegato, A., Zurolo, E., Losi, G., Aronica, E., Carmignoto, G. (2014). The inflammatory molecules IL-1 β and HMGB1 can rapidly enhance focal seizure generation in a brain slice model of temporal lobe epilepsy. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8, 155.
- Chlopčíková, Š., Psoťova, J., Míketova, P., Soušek, J., Lichnovský, V., Šimánek, V. (2004). Chemoprotective effect of plant phenolics against anthracycline-induced toxicity on rat cardiomyocytes Part II. caffeic, chlorogenic and rosmarinic acids. *Phytotherapy Research*, 18(5), 408-413.
- Choi, J., Koh, S. (2008). Role of brain inflammation in epileptogenesis. *Yonsei medical journal*, 49(1), 1-18.
- Chu, X., Ci, X., He, J., Jiang, L., Wei, M., Cao, Q., Guan, M., Xie, X., Deng, X., He, J. (2012). Effects of a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, rosmarinic acid, on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Molecules*, 17(3), 3586-3598.
- Chuang, Y.C., Chen, S.D., Liou, C.W., Lin, T.K., Chang, W.N., Chan, S.H., Changm A.Y. (2009). Contribution of nitric oxide, superoxide anion, and peroxynitrite to

- activation of mitochondrial apoptotic signaling in hippocampal CA3 subfield following experimental temporal lobe status epilepticus. *Epilepsia*, 50(4), 731-46.
- Coelho, V. R., Sousa, K., Pires, T. R., Papke, D. K. M., Vieira, C. G., de Souza, L. P., Leal, M.B., Schunck, R.V.A., Picada, J.N., Pereira, P. (2015). Genotoxic and mutagenic effects of vigabatrin, a γ -aminobutyric acid transaminase inhibitor, in Wistar rats submitted to rotarod task. *Human & experimental toxicology*, 0960327115611970.
- Cremer, C. M., Palomero-Gallagher, N., Bidmon, H. J., Schleicher, A., Speckmann, E. J., Zilles, K. (2009). Pentylentetrazole-induced seizures affect binding site densities for GABA, glutamate and adenosine receptors in the rat brain. *Neuroscience*, 163(1), 490-499.
- Crowe, S. L., Tsukerman, S., Gale, K., Jorgensen, T. J., Kondratyev, A. D. (2011). Phosphorylation of histone H2A. X as an early marker of neuronal endangerment following seizures in the adult rat brain. *The Journal of Neuroscience*, 31(21), 7648-7656.
- Curia, G., Longo, D., Biagini, G., Jones, R. S., Avoli, M. (2008). The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Journal of neuroscience methods*, 172(2), 143-157.
- Da Silva, L. F., Pereira, P., Elisabetsky, E. (1998). A neuropharmacological analysis of PTZ-induced kindling in mice. *General Pharmacology: The Vascular System*, 31(1), 47-50.
- De Oliveira, N. C., Sarmiento, M. S., Nunes, E. A., Porto, C. M., Rosa, D. P., Bona, S. R., Rodrigues, G., Marroni, N.P., Pereira, P., Jaqueline, N.P., Ferraz, A. B., Thiesen F.V., Da Silva, J. (2012). Rosmarinic acid as a protective agent against genotoxicity of ethanol in mice. *Food and chemical toxicology*, 50(5), 1208-1214.
- De Oliveira, P. A., Lino, F. L., Cappelari, S. E., da Silva Brum, L. F., Picada, J. N., Pereira, P. (2008). Effects of gamma-decanolactone on seizures induced by PTZ-kindling in mice. *Experimental brain research*, 187(1), 161-166.
- De Vries, E. E., van den Munckhof, B., Braun, K. P., van Royen-Kerkhof, A., de Jager, W., Jansen, F. E. (2016). Inflammatory mediators in human epilepsy: a

- systematic review and meta-analysis. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 63, 177-190.
- Deshmukh, R., Kaundal, M., Bansal, V. (2016). Caffeic acid attenuates oxidative stress, learning and memory deficit in intra-cerebroventricular streptozotocin induced experimental dementia in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 81, 56-62.
- Devinsky, O., Vezzani, A., Najjar, S., De Lanerolle, N. C., Rogawski, M. A. (2013). Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends in neurosciences*, 36(3), 174-184.
- Dey, A., Kang, X., Qiu, J., Du, Y., Jiang, J. (2016). Anti-Inflammatory Small Molecules To Treat Seizures and Epilepsy: From Bench to Bedside. *Trends in pharmacological sciences*, 37(6), 463-484.
- Dos Santos Sales, Í. M., Do Nascimento, K. G., Feitosa, C. M., Saldanha, G. B., Feng, D., de Freitas, R. M. (2011). Caffeic acid effects on oxidative stress in rat hippocampus after pilocarpine-induced seizures. *Neurological Sciences*, 32(3), 375-380.
- Dua, T., De Boer, H. M., Prilipko, L. L., Saxena, S. (2006). Epilepsy care in the world: results of an ILAE/IBE/WHO global campaign against epilepsy survey. *Epilepsia*, 47(7), 1225-1231.
- Eggen, B.J., Raj, D., Hanisch, U.K., Boddeke, H.W. (2013). Microglial phenotype and adaptation. *J Neuroimmune Pharmacol*, 8, 807-823.
- Engel, T., Henshall, D. C. (2009). Apoptosis, Bcl-2 family proteins and caspases: the ABCs of seizure-damage and epileptogenesis. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, 1(2), 97-115.
- Eyo, U.B., Murugan, M., Wu, L.J. (2016). Microglia-Neuron Communication in Epilepsy. *Glia*, 2016.
- Fabene, P. F., Bramanti, P., Constantin, G. (2010). The emerging role for chemokines in epilepsy. *J Neuroimmunol*, 224, 22-27.
- Fallarini, S., Miglio, G., Paoletti, T., Minassi, A., Amoruso, A., Bardelli, C., Brunelleschi, M., Lombardi, G. (2009). Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in in vitro models of neuronal death. *British journal of pharmacology*, 157(6), 1072-1084.

- Fazel Nabavi, S., Carlo Tenore, G., Daglia, M., Tundis, R., Rosa Loizzo, M., Mohammad Nabavi, S. (2015). The cellular protective effects of rosmarinic acid: from bench to bedside. *Current neurovascular research*, 12(1), 98-105.
- Fernando, P. M. D. J., Piao, M. J., Kang, K. A., Ryu, Y. S., Hewage, S. R. K. M., Chae, S. W., Hyun, J. W. (2016). Rosmarinic acid attenuates cell damage against UVB radiation-induced oxidative stress via enhancing antioxidant effects in human HaCaT cells. *Biomolecules & therapeutics*, 24(1), 75-84.
- Fisher, R. S., Acevedo, C., Arzimanoglou, A., Bogacz, A., Cross, J. H., Elger, C. E., Engel Jr, J., Forsgren, L., French, J.A., Glynn, Mike., Hesdorffer, D. C., Lee, B.I., Mathern, G.W., Moshé, S.L., Perucca, E., Scheffer, I.E., Tomson, T., Watanabe, M., Wiebe, S. (2014). ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia*, 55(4), 475-482.
- Fisher, R. S., Boas, W. V. E., Blume, W., Elger, C., Genton, P., Lee, P., Engel, J. (2005). Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia*, 46(4), 470-472.
- Fujikawa, D. G. (2005). Prolonged seizures and cellular injury: understanding the connection. *Epilepsy & behavior*, 7, 3-11.
- Gamaro, G. D., Suyenaga, E., Borsoi, M., Lermen, J., Pereira, P., Ardenghi, P. (2011). Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats. *International Scholarly Research Notices*, 2011, 1-6.
- Gao, L. P., Wei, H. L., Zhao, H. S., Xiao, S. Y., Zheng, R. L. (2005). Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(1), 62-65.
- Gertig, U., Hanisch, U.K. (2014). Microglial diversity by responses and responders. *Front Cell Neurosci*, 8: 101.
- Ghaffari, H., Venkataramana, M., Ghassam, B. J., Nayaka, S. C., Nataraju, A., Geetha, N. P., Prakash, H. S. (2014). Rosmarinic acid mediated neuroprotective effects against H₂O₂-induced neuronal cell damage in N2A cells. *Life sciences*, 113(1), 7-13.
- Glauser, T., Ben-Menachem, E., Bourgeois, B., Cnaan, A., Chadwick, D., Guerreiro, C., Kalviainen, R., Mattson, R., Perucca, E., Tomson, T. (2006). ILAE treatment

- guidelines: evidence-based analysis of antiepileptic drug efficacy and effectiveness as initial monotherapy for epileptic seizures and syndromes. *Epilepsia*, 47(7), 1094-1120.
- Gogvadze, V., Orrenius, S., Zhivotovsky, B. (2003). Analysis of mitochondrial dysfunction during cell death. *Current Protocols in Cell Biology*, 18-5.
- Greenfield, L. J. (2013). Molecular mechanisms of antiseizure drug activity at GABA A receptors. *Seizure*, 22(8), 589-600.
- Guginski, G., Luiz, A. P., Silva, M. D., Massaro, M., Martins, D. F., Chaves, J., Mattos, R.W., Silveira, D., Ferreira, V.M.M., Calixto, J.B., Santos, A. R. (2009). Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 93(1), 10-16.
- Hasanein, P., Mohammad Zaheri, L. (2014). Effects of rosmarinic acid on an experimental model of painful diabetic neuropathy in rats. *Pharmaceutical biology*, 52(11), 1398-1402.
- Hasanein, P., Seifi, R., Hajinezhad, M. R., & Emamjomeh, A. (2016). Rosmarinic acid protects against chronic ethanol-induced learning and memory deficits in rats. *Nutritional Neuroscience*, 1-8.
- Henshall, D.C., Meldrum, B.S. Cell death and survival mechanisms after single and repeated brief seizures. In: Noebels JL, Avoli M, Rogawski MA, et al., editors. *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* [Internet]. 4th edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2012.
- Ilhan, A., Aladag, M.A., Kocer, A., Boluk, A., Gurel, A., Armutcu, F. (2005). Erdosteine ameliorates PTZ-induced oxidative stress in mice seizure model. *Brain Research Bulletin*, 65, 495–499.
- Jin, X., Liu, P., Yang, F., Zhang, Y. H., Miao, D. (2013). Rosmarinic acid ameliorates depressive-like behaviors in a rat model of CUS and up-regulates BDNF levels in the hippocampus and hippocampal-derived astrocytes. *Neurochemical research*, 38(9), 1828-1837.

- Johnston, G. A. (2013). Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists. *British journal of pharmacology*, 169(2), 328-336.
- Kaminski, R.M., Rogawski M.A., Klitgaard, H. The potential of antiseizure drugs and agents that act on novel molecular targets as antiepileptogenic treatments, *Neurotherapeutics*, 11, (2014), 385–400.
- Kaneko, K., Itoh, K., Berliner, L.J., Miyasaka, K., Fujii, H. (2002). Consequences of nitric oxide generation in epileptic-seizure rodent models as studied by in vivo EPR. *Magn Reson Med*, 48, 1051-1056.
- Karthikkumar, V., Sivagami, G., Viswanathan, P., Nalini, N. (2015). Rosmarinic acid inhibits DMH-induced cell proliferation in experimental rats. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology*, 26(2), 185-200.
- Kaur, H., Bal, A., Sandhir, R. (2014). Curcumin supplementation improves mitochondrial and behavioral deficits in experimental model of chronic epilepsy. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 125, 55-64.
- Kelsey, N. A., Wilkins, H. M., Linseman, D. A. (2010). Nutraceutical antioxidants as novel neuroprotective agents. *Molecules*, 15(11), 7792-7814.
- Kettenmann, H., Hanisch, U. K., Noda, M., Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological reviews*, 91(2), 461-553.
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., Verkhratsky, A. (2013). Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*, 77(1), 10-18.
- Khamse, S., Sadr, S. S., Roghani, M., Hasanzadeh, G., Mohammadian, M. (2015). Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect in the kainate rat model of temporal lobe epilepsy: Underlying mechanisms. *Pharmaceutical biology*, 53(12), 1818-1825.
- Kim, H. G., Oh, M. S. (2012). Natural products as potential anticonvulsants: caffeoylquinic acids. *Archives of pharmacal research*, 35(3), 389-392.
- Kim, J. H., Wang, Q., Choi, J. M., Lee, S., Cho, E. J. (2015). Protective role of caffeic acid in an A β 25-35-induced Alzheimer's disease model. *Nutrition research and practice*, 9(5), 480-488.
- Kleen, J. K., Holmes, G. L. (2008). Brain inflammation initiates seizures. *Nat Med*, 14,1309-1310.

- Kowalczyk, P., Kulig, K. (2014). GABA system as a target for new drugs. *Current medicinal chemistry*, 21(28), 3294-3309.
- Kupferberg, H. (2001). Animal models used in the screening of antiepileptic drugs. *Epilepsia*, 42(s4), 7-12.
- Larsson, O.M., Gram, L., Schousboe, I., Schousboe, A. (1986). Differential effect of gamma-vinyl GABA and valproate on GABA-transaminase from cultured neurones and astrocytes. *Neuropharmacology*, 25, 617-625.
- Lee, A. Y., Hwang, B. R., Lee, M. H., Lee, S., Cho, E. J. (2016). Perilla frutescens var. japonica and rosmarinic acid improve amyloid- β 25-35 induced impairment of cognition and memory function. *Nutrition research and practice*, 10(3), 274-281.
- Lee, H. J., Cho, H. S., Park, E., Kim, S., Lee, S. Y., Kim, C. S., Kim, D.K., Kim, S.J., Chun, H.S. (2008). Rosmarinic acid protects human dopaminergic neuronal cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Toxicology*, 250(2), 109-115.
- Li, Y., Chen, L. J., Jiang, F., Yang, Y., Wang, X. X., Zhang, Z., Li, Z., Li, L. (2015). Caffeic acid improves cell viability and protects against DNA damage: involvement of reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(6), 502-508.
- Liang, G., Shi, B., Luo, W., Yang, J. (2015). The protective effect of caffeic acid on global cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *Behavioral and Brain Functions*, 11(1), 1-10.
- Löscher, W. (2011). Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Seizure*, 20(5), 359-368.
- Löscher, W., Klitgaard, H., Twyman, R. E., Schmidt, D. (2013). New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nature reviews drug discovery*, 12(10), 757-776.
- Luan, H., Kan, Z., Xu, Y., Lv, C., Jiang, W. (2013). Rosmarinic acid protects against experimental diabetes with cerebral ischemia: relation to inflammation response. *Journal of neuroinflammation*, 10(1), 1-10.

- Lugrin, J., Rosenblatt-Velin, N., Parapanov, R., Liaudet, L. (2014). The role of oxidative stress during inflammatory processes. *Biological chemistry*, 395(2), 203-230.
- Ma, L., Jia, J., Liu, X., Bai, F., Wang, Q., Xiong, L. (2015). Activation of murine microglial N9 cells is attenuated through cannabinoid receptor CB2 signaling. *Biochemical and biophysical research communications*, 458(1), 92-97.
- Martinc, B., Grabnar, I., Vovk, T. (2014). Antioxidants as a preventive treatment for epileptic process: a review of the current status. *Current neuropharmacology*, 12(6), 527-550.
- Martinc, B., Grabnar, I., Vovk, T. (2012). The Role of Reactive Species in Epileptogenesis and Influence of Antiepileptic Drug Therapy on Oxidative Stress. *Curr. Neuropharmacol*, 10(4), 328-343.
- Matos, G., Ribeiro, D. A., Alvarenga, T. A., Hirotsu, C., Scorza, F. A., Le Sueur-Maluf, L., Noguti, J., Cavaleiro, E.A., Tufik, S., Andersen, M. L. (2012). Behavioral and genetic effects promoted by sleep deprivation in rats submitted to pilocarpine-induced status epilepticus. *Neuroscience letters*, 515(2), 137-140.
- McMorrow, J. P., Murphy, E. P. (2011). Inflammation: a role for NR4A orphan nuclear receptors? *Biochem. Soc. Trans.*, 39, 688-93.
- Mcnamara, J. O. (1999). Emerging insights into the genesis of epilepsy. *Nature*, 399 (6738), 15-22.
- Méndez-Armenta, M., Nava-Ruíz, C., Juárez-Rebollar, D., Rodríguez-Martínez, E., Yescas Gómez, P. (2014). Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014, 1-12.
- Meyer, J. S., Quenzer, L. F. (2013). *Psychopharmacology: Drugs, the brain, and behavior*. <http://sites.sinauer.com/psychopharm2e/webbox18.04.html>
- Montgomery, S. L., Bowers, W. J. (2012). Tumor necrosis factor-alpha and the roles it plays in homeostatic and degenerative processes within the central nervous system. *Journal of neuroimmune pharmacology*, 7(1), 42-59.

- Muñoz-Muñoz, J. L., Garcia-Molina, F., Ros, E., Tudela, J., García-Canovas, F., Rodriguez-Lopez, J. N. (2013). Prooxidant and antioxidant activities of rosmarinic acid. *Journal of Food Biochemistry*, 37(4), 396-408.
- Myers, C. T., Mefford, H. C. (2015). Advancing epilepsy genetics in the genomic era. *Genome medicine*, 7(1), 1.
- Najjar, S., Bernbaum, M., Lai, G., Devinsky, O. (2007). Immunology and epilepsy. *Reviews in neurological diseases*, 5(3), 109-116.
- Najjar, S., Pearlman, D., Miller, D. C., Devinsky, O. (2011). Refractory epilepsy associated with microglial activation. *The neurologist*, 17(5), 249-254.
- Neto, J. G., Marchetti, R. L. (2005). Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, 27, 323-328.
- Nie, H., Peng, Z., Lao, N., Wang, H., Chen, Y., Fang, Z., Hou, W., Gao, F., Li, X., Xion, L., Tan, Q. (2014). Rosmarinic acid ameliorates PTSD-like symptoms in a rat model and promotes cell proliferation in the hippocampus. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 51, 16-22.
- Nugroho, A., Kim, M. H., Choi, J., Choi, J. S., Jung, W. T., Lee, K. T., Park, H. J. (2012). Phytochemical studies of the phenolic substances in *Aster glehni* extract and its sedative and anticonvulsant activity. *Archives of pharmacal research*, 35(3), 423-430.
- Ojo, J. O., Rezaie, P., Gabbott, P. L., Stewart, M. G. (2014). Impact of age-related neuroglial cell responses on hippocampal deterioration. *Frontiers in aging neuroscience*, 7, 57-57.
- Okuneva, O., Körber, I., Li, Z., Tian, L., Joensuu, T., Kopra, O., Lehesjoki, A. E. (2015). Abnormal microglial activation in the *Cstb*^{-/-} mouse, a model for progressive myoclonus epilepsy, EPM1. *Glia*, 63(3), 400-411.
- Olsen, R. W., e Sieghart, W. (2009). GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology*, 56(1), 141-148.
- OMS. Organização Mundial de Saúde. Tópicos de saúde . Disponível em < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/> acesso em: 20/07/2016.

- Ono, K., Li, L., Takamura, Y., Yoshiike, Y., Zhu, L., Han, F., , Mao, X., Ikeda, T., Takasaki, J., Nishijo, H., Takashima, A., Teplow, D.B., Zagorski, M.G., Yamada, M. (2012). Phenolic compounds prevent amyloid β -protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding. *Journal of Biological Chemistry*, 287(18), 14631-14643.
- Otera, H., Mihara, K. (2012). Mitochondrial dynamics: functional link with apoptosis. *International journal of cell biology*, 2012.
- Owens, D. F., Kriegstein, A. R. (2002). Is there more to GABA than synaptic inhibition?. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(9), 715-727.
- Pedata, F., Dettori, I., Coppi, E., Melani, A., Fusco, I., Corradetti, R., Pugliese, A. M. (2016). Purinergic signalling in brain ischemia. *Neuropharmacology*, 104, 105-130.
- Pellock, J. M. (2011). Balancing clinical benefits of vigabatrin with its associated risk of vision loss. *Acta Neurologica Scandinavica*, 124(s192), 83-91.
- Pereira, M. B., Freitas, R. L. M., Assis, M. A. G., Silva, R. F., Fonteles, M. M. F., Freitas, R. M., Takahashi, R. N. (2007). Study pharmacologic of the GABAergic and glutamatergic drugs on seizures and status epilepticus induced by pilocarpine in adult Wistar rats. *Neuroscience letters*, 419(3), 253-257.
- Pereira, P., De Oliveira, P. A., Ardenghi, P., Rotta, L., Henriques, J. A. P., Picada, J. N. (2006). Neuropharmacological analysis of caffeic acid in rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 99(5), 374-378.
- Pereira, P., Tysca, D., Oliveira, P., da Silva Brum, L. F., Picada, J. N., Ardenghi, P. (2005). Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. *Pharmacological research*, 52(3), 199-203.
- Perez-Pinzon, M. A., Stetler, R. A., Fiskum, G. (2012). Novel mitochondrial targets for neuroprotection. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32(7), 1362-1376.
- Picada, J. N., Flores, D. G., Zettler, C. G., Marroni, N. P., Roesler, R., Henriques, J. A. P. (2003). DNA damage in brain cells of mice treated with an oxidized form of apomorphine. *Molecular brain research*, 114(1), 80-85.
- Pinard, A., Seddik, R., Bettler, B. (2010). GABA B receptors: physiological functions and mechanisms of diversity. *Advances in pharmacology*, 58, 231-255.

- Prasad, N. R., Jeyanthimala, K., Ramachandran, S. (2009). Caffeic acid modulates ultraviolet radiation-B induced oxidative damage in human blood lymphocytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 95(3), 196-203.
- Qiao, S., Li, W., Tsubouchi, R., Haneda, M., Murakami, K., Nisimoto, Y., Takeuchi, F., Yoshino, M. (2009). Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264. 7 macrophages. *Free radical research*.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J., Henderson, G. (2011). *Farmacologia*. In *Farmacologia*. Elsevier.
- Rauca, C., Wiswedel, I., Zerbe, R., Keilhoff, G., Krug, M. (2004). The role of superoxide dismutase and α -tocopherol in the development of seizures and kindling induced by pentylenetetrazol-influence of the radical scavenger α -phenyl-N-tert-butyl nitron. *Brain research*, 1009(1), 203-212.
- Rauca, C., Zerbe, R., Jantze, H. (1999). Formation of free hydroxyl radicals after pentylenetetrazol-induced seizure and kindling. *Brain research*, 847(2), 347-351.
- Rowles, J., Olsen, M. (2012). Perspectives on the development of antioxidant antiepileptogenic agents. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 12(10), 1015-1027.
- Saha, L., Chakrabarti, A. (2014). Understanding the anti-kindling role and its mechanism of Resveratrol in Pentylenetetrazole induced-kindling in a rat model. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 120, 57-64.
- Santulli, L., Coppola, A., Balestrini, S., Striano, S. (2016). The challenges of treating epilepsy with 25 antiepileptic drugs. *Pharmacological research*, 107, 211-219.
- Sayin, U., Timmerman, W., Westerink, B. H. (1995). The significance of extracellular GABA in the substantia nigra of the rat during seizures and anticonvulsant treatments. *Brain research*, 669(1), 67-72.
- Sayyah, M., Yousefi-Pour, M., Narenjkar, J. (2005). Anti-epileptogenic effect of β -carotene and vitamin A in pentylenetetrazole-kindling model of epilepsy in mice. *Epilepsy research*, 63(1), 11-16.
- Scharfman, H. E. (2007). The neurobiology of epilepsy. *Current neurology and neuroscience reports*, 7(4), 348-354.
- Sevgi, K., Tepe, B., Sarikurucu, C. (2015). Antioxidant and DNA damage protection potentials of selected phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology*, 77, 12-21.

- Shan, Y., Wang, D. D., Xu, Y. X., Wang, C., Cao, L., Liu, Y. S., Zhu, C. Q. (2015). Aging as a Precipitating Factor in Chronic Restraint Stress-Induced Tau Aggregation Pathology, and the Protective Effects of Rosmarinic Acid. *Journal of Alzheimer's Disease*, 49(3), 829-844.
- Shin, E. J., Jeong, J. H., Chung, Y. H., Kim, W. K., Ko, K. H., Bach, J. H., Hong, J.S., Yoneda, Y., Kim, H. C. (2011). Role of oxidative stress in epileptic seizures. *Neurochemistry international*, 59(2), 122-137.
- Shinoda, S., Schindler, C. K., Quan-Lan, J., Saugstad, J. A., Taki, W., Simon, R. P., Henshall, D. C. (2003). Interaction of 14-3-3 with Bid during seizure-induced neuronal death. *Journal of neurochemistry*, 86(2), 460-469.
- Silva, T., Oliveira, C., Borges, F. (2014). Caffeic acid derivatives, analogs and applications: A patent review (2009–2013). *Expert opinion on therapeutic patents*, 24(11), 1257-1270.
- Smolders, I., Khan, G. M., Lindekens, H., Prikken, S., Marvin, C. A., Manil, J., Ebinger, G., Michotte, Y. (1997). Effectiveness of vigabatrin against focally evoked pilocarpine-induced seizures and concomitant changes in extracellular hippocampal and cerebellar glutamate, γ -aminobutyric acid and dopamine levels, a microdialysis-electrocorticography study in freely moving rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 283(3), 1239-1248.
- Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev. Nutr*, 15(1), 71-81.
- Sova, M. (2012). Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 12(8), 749-767.
- Stollg, G., Jander, S. (1999). The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Progress in neurobiology*, 58(3), 233-247.
- Sucher, N. J., Carles, M. C. (2015). A pharmacological basis of herbal medicines for epilepsy. *Epilepsy & Behavior*, 52, 308-318.
- Swarup, V., Ghosh, J., Ghosh, S., Saxena, A., Basu, A. (2007). Antiviral and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid in an experimental murine model of Japanese encephalitis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(9), 3367-3370.

- Takeda, H., Tsuji, M., Inazu, M., Egashira, T., Matsumiya, T. (2002a). Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *European journal of pharmacology*, 449(3), 261-267.
- Takeda, H., Tsuji, M., Miyamoto, J., Matsumiya, T. (2002b). Rosmarinic acid and caffeic acid reduce the defensive freezing behavior of mice exposed to conditioned fear stress. *Psychopharmacology*, 164(2), 233-235.
- Tang, V. J., Konigsfeld, K. M., Aguilera, J. A., Milligan, J. R. (2012). DNA binding hydroxyl radical probes. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(1), 46-51.
- Tang, Y., Le, W. (2016). Differential roles of M1 and M2 microglia in neurodegenerative diseases. *Molecular neurobiology*, 53(2), 1181-1194.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35(3), 206-221.
- Touaibia, M., Jean-Francois, J., Doiron, J. (2011). Caffeic acid, a versatile pharmacophore: an overview. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11(8), 695-713.
- Tsuji, M., Miyagawa, K., Takeuchi, T., Takeda, H. (2008). [Pharmacological characterization and mechanisms of the novel antidepressive-and/or anxiolytic-like substances identified from *Perillae Herba*]. *Nihon shinkei seishin yakurigaku zasshi= Japanese journal of psychopharmacology*, 28(4), 159-167.
- Vezzani, A., Balosso, S., Ravizza, T. (2008). The role of cytokines in the pathophysiology of epilepsy. *Brain, behavior, and immunity*, 22(6), 797-803.
- Vezzani, A., French, J., Bartfai, T., Baram, T. Z. (2011). The role of inflammation in epilepsy. *Nature Reviews Neurology*, 7(1), 31-40.
- Vezzani, A., Viviani, B. (2015). Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. *Neuropharmacology*, 96, 70-82.
- Villalpando-Vargas, F., Medina-Ceja, L. (2015). Effect of sparteine on status epilepticus induced in rats by pentylenetetrazole, pilocarpine and kainic acid. *Brain research*, 1624, 59-70.

- Viviani, B., Bartesaghi, S., Gardoni, F., Vezzani, A., Behrens, M. M., Bartfai, T., et al. (2003). Interleukin-1beta enhances NMDA receptor-mediated intracellular calcium increase through activation of the Src family of kinases. *J. Neurosci.* 23, 8692–8700.
- Wang, S., Cheng, Q., Malik, S., Yang, J. (2000). Interleukin-1beta inhibits gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptor current in cultured hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 292(2), 497–504.
- Wilcox, K. S., Vezzani, A. (2014). Does brain inflammation mediate pathological outcomes in epilepsy? In *Issues in Clinical Epileptology: A View from the Bench* (pp. 169-183). Springer Netherlands.
- Woodbury, A., Yu, S. P., Wei, L., García, P. (2013). Neuro-modulating effects of honokiol: a review. *Frontiers in neurology*, 4, 130.
- Xu, F., Huang, J., He, Z., Chen, J., Tang, X., Song, Z., Guo, Q., Huang, C. (2016). Microglial polarization dynamics in dorsal spinal cord in the early stages following chronic sciatic nerve damage. *Neuroscience letters*, 617, 6-13.
- Xu, Y., Han, S., Lei, K., Chang, X., Wang, K., Li, Z., Liu, J. (2015). Anti-Warburg effect of rosmarinic acid via miR-155 in colorectal carcinoma cells. *European journal of cancer prevention: the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*.
- Yang, G., Fu, Y., Malakhova, M., Kurinov, I., Zhu, F., Yao, K., Li, H., Chen, H., Li, W., Lim, D.Y., Sheng, Y., Bode, A.M., Dong, Z. (2014). Caffeic acid directly targets ERK1/2 to attenuate solar UV-induced skin carcinogenesis. *Cancer Prevention Research*, 7(10), 1056-1066.
- Yang, J. Q., Zhou, Q. X., Liu, B. Z., He, B. C. (2008). Protection of Mouse Brain from Aluminum-induced Damage by Caffeic Acid. *CNS neuroscience & therapeutics*, 14(1), 10-16.
- Yin, Y. H., Ahmad, N., Makmor-Bakry, M. (2013). Pathogenesis of epilepsy: Challenges in animal models. *Iranian journal of basic medical sciences*, 16(11), 1119-1132.
- Yu, X. M., Askalan, R., Keil, G. J., Salter, M. W. (1997). NMDA channel regulation by channel-associated protein tyrosin kinase Src. *Science* 31, 674–678.

7. Anexos



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 23616

Título: Avaliação comportamental, neurotóxica e neuroquímica do ácido rosmarínico e ácido caféico em roedores: uma abordagem sobre o sistema GABAérgico.

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

PATRÍCIA PEREIRA - coordenador de 01/10/2012 até 30/06/2016
ANAPAUOLA SOMMER VINAGRE - pesquisador de 01/10/2012 até 30/06/2016
Vanessa Rodrigues Coelho - pesquisador de 01/10/2012 até 30/06/2016

Equipe Externa:

Jaqueline Nascimento Picada - pesquisador de 01/10/2012 até 30/06/2016

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo, em reunião realizada em 03/09/2012 - Sala de Reuniões do 2º andar da Reitoria, Campus Central, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 269 Ratos wistar e 220 camundongos, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

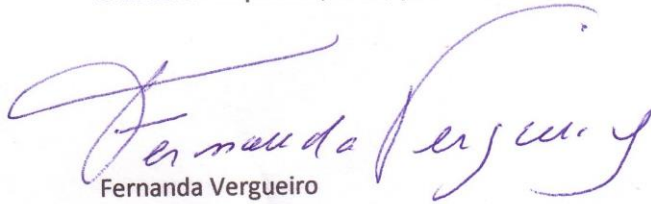
Porto Alegre, Terça-Feira, 11 de Setembro de 2012

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética

ANEXO II

Autorizamos a utilização da foto que publicada em nossa revista na tese de doutorado a ser defendida na UFRGS pelo PPG em Neurociências desde que seja citada a fonte:

CAROBREZ, A.P. Transmissão pelo glutamato como alvo molecular na ansiedade. Revista Brasileira Psiquiatria, v. 25, p. 52 - 58, 2003.



Fernanda Vergueiro
Assistente Executiva
Revista Brasileira de Psiquiatria