

MODELO DE CRISE EPILEPTICA INDUZIDA POR PILOCARPINA: AVALIAÇÃO DE UM COMPOSTO NATURAL

Paula Benvindo Ferreira (Bolsista do PIBIC/CNPq), Jessica Pereira da Costa (Colaboradora, Doutoranda do Programa RENORBIO – UFPI), Rivelilson Mendes de Freitas (Orientador, Departamento de Bioquímica e Farmacologia – UFPI)

INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma doença neurológica crônica comum caracterizada por crises epiléticas espontâneas recorrentes. Essa doença é um importante problema de saúde que acomete de 1 a 2% da população mundial (MARTIN; ARAQUE; BUNO, 2001). Este fato tem estimulado pesquisas consideráveis para o desenvolvimento de novas drogas antiepilépticas com maior segurança e eficácia que os anticonvulsivantes disponíveis atualmente, sendo que as plantas medicinais têm sido uma importante fonte para o desenvolvimento de novas drogas isoladas de produtos naturais com atividade no sistema nervoso central (CARLINE, 2003).

Neste sentido, estudos têm relatado que os monoterpenos presentes em vários óleos essenciais em experimentos realizados com animais com a timoquinona (HOSSEINZADEH et al., 2005), citrionelol (DE SOUSA et al., 2006) e α,β -epóxi-carvona (DE SOUSA et al., 2007) possuem atividade anticonvulsivante. Dentro deste contexto, podemos destacar o efeitos do diterpenóide fitol (3,7,11,15-tetrametilhexadec-2-en-1-ol) no Sistema Nervoso Central sobre o qual foi realizado o depósito de pedido de patente junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial por meio da Universidade Federal do Piauí, sob o número de protocolo de 000170/0211. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito anticonvulsivante do fitol no modelo de crises epiléticas induzidas por pilocarpina, bem como investigar sua ação sobre o aparecimento da primeira crise epilética e no desenvolvimento do estado de mal epilético em camundongos.

Além disso, durante a avaliação da atividade anticonvulsivante do fitol foi realizado o estudo para esclarecer seu provável mecanismo de ação sobre as crises epiléticas induzidas por pilocarpina, com a finalidade de subsidiar dados para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas mais eficazes e seguras para o tratamento da epilepsia.

MATERIAL E MÉTODOS

Para os estudos comportamentais de avaliação da atividade anticonvulsivante foi seguido a metodologia descrita previamente por Freitas e colaboradores (2003b).

Para tanto, camundongos *Swiss*, machos adultos (25 a 30 g, 2 meses de idade) foram utilizados nos experimentos. Os camundongos foram divididos em nove grupos de 24 camundongos. O primeiro grupo foi tratado com cloridrato de pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). Os demais grupos foram tratados com fitol (FIT) nas doses de 25, 50 e 75 mg/kg e trinta minutos após a administração da droga, os camundongos foram tratados com pilocarpina (i.p.) na dose de 400 mg/kg e observados durante 1 h para avaliação comportamental. Em outra etapa de experimentos, 30 min após o tratamento com 75 mg/kg de FIT e 25 mg/kg de atropina, os camundongos (**n = 24**) receberam pilocarpina (i.p.) na dose de 400 mg/kg e foram observados durante 1 h. Em outra série de experimentos, 30 min após o tratamento com 75 mg/kg de FIT,

5 mg/kg de diazepam (DZP), e 25 mg/kg de flumazenil (FLU), os camundongos (**n = 24**) receberam pilocarpina (i.p.) na dose de 400 mg/kg e foram observados também durante 1 hora.

Os resultados da latência para primeira crise epiléptica e do estado de mal epiléptico foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste *t-Student-Neuman-Keuls* como teste *post hoc*. O número de animais que convulsionaram e número que sobreviveu foram calculados como porcentagens e comparado com um teste não paramétrico (χ^2). Em ambas as situações, a significância estatística foi considerada em $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma alta porcentagem de pacientes com epilepsia tem alguma comorbidade, e este é um fator importante na escolha do medicamento antiepiléptico mais adequado. Embora o nível de evidência científica relativa ao tratamento de epilepsia em pacientes com outras doenças associadas é baixo e raramente apoiado por ensaios clínicos, há uma necessidade de avaliar os dados disponíveis que suportem o uso de certas drogas antiepilépticas na presença de doenças específicas (COSTA et al., 2012). Assim, essa informação reforça o interesse de nosso estudo que apresenta um importante interesse clínico, uma vez que estamos procurando novas formas para tratar a epilepsia, provavelmente, com menos efeitos colaterais e atividade antioxidante capaz de reduzir o estresse oxidativo induzido por crises epiléticas já descritas neste modelo (FREITAS et al., 2005) .

Depois de 3 a 5 min após a administração de pilocarpina, todos os animais apresentaram sinais colinérgicos periféricos e movimentos estereotipados (*sniffing, grooming e rearing*), seguido de crises motoras límbicas em 100% (24/24) dos animais testados ($p < 0,001$). A crise epiléptica persistiu e evoluiu até um estado de mal epiléptico em 100% (24/24) desses camundongos, levando-os a morte ($p < 0,001$) (**Ilustração 2**).

A administração do fitol, 30 minutos antes da pilocarpina, causou uma proteção significativa dose-dependente contra crises epiléticas e estado de mal epiléptico, conforme descrito a seguir: 25 (58,34%, $p < 0,001$), 50 (66,67%, $p < 0,001$), 75 mg/kg (83,34 %, $p < 0,001$), bem como também produziu uma alteração significativa na taxa de mortalidade induzidas por pilocarpina (**Ilustração 2**). Além disso, demonstrou um efeito protetor contra as crises epiléticas e a taxa de mortalidade superior as produzidas pela administração de atropina (25 mg/kg) e diazepam (5 mg/kg) utilizadas como drogas de referências (**Tabelas 1 e 2**).

A administração de pilocarpina induziu a primeira crise epiléptica em $7,90 \pm 1,68$ min e um estado de mal epiléptico em $14,95 \pm 1,57$ min. De acordo com a **ilustração 2**, o fitol causou um aumento significativo da latência para a primeira crise epiléptica induzida por P400 nas doses de 25 ($19,10 \pm 3,83$ min), 50 ($24,25 \pm 5,17$ min) ou 75 mg/kg ($27,50 \pm 6,36$ min), e também produziu de maneira dose-dependente, um aumento na latência para o desenvolvimento do estado de mal epiléptico induzido pela pilocarpina nas doses de 25 ($29,20 \pm 3,75$ min), 50 ($34,10 \pm 3,46$ min) ou 75 mg/kg ($37,50 \pm 4,50$ min) ambos em comparação com grupo P400 ($14,95 \pm 1,57$ min, $p < 0,001$).

Estes efeitos farmacológicos atribuídos ao fitol podem ser responsáveis pelo controle da função neuronal, influenciando sistemas de neurotransmissores e modulando a liberação e/ou síntese de neurotransmissores inibitórios relacionados com o processo convulsivo (COSTA et al., 2012). Nossos resultados sugerem a atividade anticonvulsivante do fitol em crises epiléticas e no estado de mal epilético induzidos pela pilocarpina, conforme pode ser observado pelos dados que revelam um aumento nas latência para o aparecimento da primeira crise e do estado de mal epilético. Além disso, pode ser sugerido um efeito protetor já que foi capaz também de reduzir a taxa de mortalidade induzidas pelas crises epiléticas.

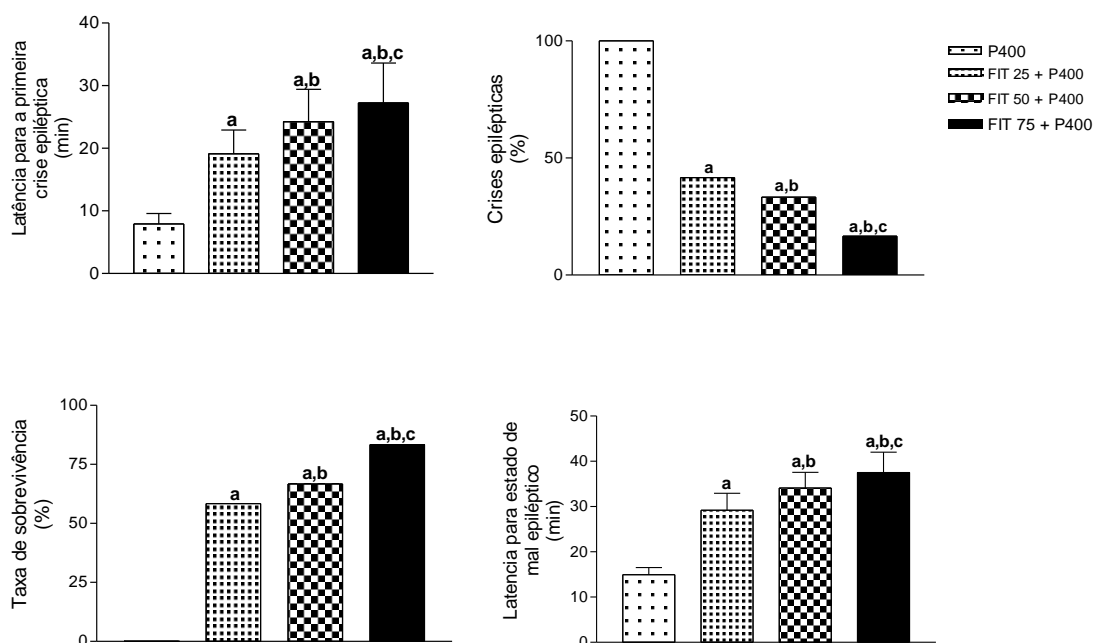


Ilustração 2. Alterações comportamentais após pré-tratamento com fitol (FIT) no modelo de crises epiléticas induzidas por pilocarpina.

A dose de 75 mg/kg do diterpeno foi a selecionada para as análises do seu mecanismo de ação, uma vez que demonstrou um maior aumento dos parâmetros analisados durante as crises epiléticas quando comparado com as outras doses, conforme pode ser verificado na **Ilustração 2**.

Tabela 1. Avaliação do mecanismo de ação dos efeitos anticonvulsivantes do fitol após as crises epiléticas induzidas por pilocarpina e sobre a taxa de sobrevivência em camundongos.

Grupos	Latência da primeira crise epilética (min)	Crises epiléticas (%)	Latência do estado de mal epilético (min)	Taxa de sobrevivência (%)	N
P400	7,90 ± 1,68	100	14,95 ± 1,57	00	24
ATR 25	00	00	00	100	24
ATR 25 + P400	00 ^a	00 ^b	00 ^a	100 ^b	24
FIT 75 + P400	27,50 ± 6,36 ^a	16,66 ^b	37,50 ± 4,50 ^a	83,33 ^b	24
FIT 75	00	00	00	100	24
ATR 25 + FIT 75	00	00	00	100	24
ATR 25 + FIT 75 + P400	00	00	00	100	24

Resultados para a latência para primeira crises epilética e latência para o estado de mal epilético foram expressos como média ± erro padrão da média do número de animais usados nos experimentos conforme descritos na tabela.

O modelo de pilocarpina apresenta relevância preditiva em relação aos testes de compostos com potencial atividade clínica (BARROS et al., 2007; MILITÃO; FERREIRA; FREITAS, 2010). Além disso, o modelo de pilocarpina é assumido para identificar a eficácia de compostos anticonvulsivantes (BARROS et al., 2007). Os resultados do presente estudo mostram que o fitol pode ser eficaz no bloqueio de crises epiléticas tônico-clônicas generalizadas. Por outro lado, a gênese das crises originadas devido à atividade da pilocarpina envolve o efeito agonista desta droga em receptores colinérgicos muscarínicos, que reduz a transmissão sináptica inibitória para promover a neurotransmissão excitatória (TURSKI et al., 1983).

Tabela 2. Avaliação do mecanismo de ação dos efeitos anticonvulsivantes do fitol após as crises epiléticas induzidas por pilocarpina e sobre a taxa de sobrevivência em camundongos.

Grupos	Latência da primeira crise epilética (min)	Crises epiléticas (%)	Latência do estado de mal epilético (min)	Taxa de sobrevivência (%)	N
P400	7,90 ± 1,68	100	14,95 ± 1,57	00	24
DZP 5	00	00	00	100	24
DZP 5 + P400	15,40 ± 3,50 ^a	25 ^d	23,33 ± 0,58 ^a	75 ^d	24
FIT 75 + P400	27,50 ± 6,36 ^a	16,66 ^d	37,50 ± 4,50 ^a	83,33 ^d	24
FLU 25	00	00	00	100	24
FLU 25 + P400	7,92 ± 0,57	100	14,91 ± 0,57	00	24
FLU 25 + DZP 5 + P400	7,89 ± 0,59 ^b	100 ^e	14,88 ± 0,43 ^b	00 ^e	24
FLU 25 + FIT 75 + P400	27,42 ± 1,94	16,66	37,45 ± 0,85	83,33	24

Resultados para a latência para primeira crises epilética e latência para o estado de mal epilético foram expressos como média ± erro padrão da média do número de animais usados nos experimentos conforme descritos na tabela.

Complementando este estudo, e com a finalidade de determinar se os efeitos anticonvulsivantes de fitol são exercidos por meio de sistema GABAérgico, os camundongos tratados com fitol foram submetidos ao co-tratamento com flumazenil, um antagonista do receptor benzodiazepínico. No entanto, a presença de flumazenil não reverteu o efeito anticonvulsivante de fitol, mas bloqueou o efeito do diazepam (**Tabela 2**), sugerindo que o mecanismo de ação do fitol, provavelmente, não envolve receptores GABAérgicos e muscarínicos, uma vez que os antagonistas destes sistemas, quando utilizados em combinação com fitol no tratamento dos animais antes da pilocarpina não promoveram diferença significativa entre os grupos tratados apenas com fitol, podendo ser sugerido assim que a atividade anticonvulsivante exercida pelo fitol pode não estar associada a efeitos modulatórios nos sistemas muscarínico e GABAérgico. A ativação direta e/ou indireta do fitol sobre os sistemas de neurotransmissores cerebrais é desconhecida e precisa ser melhor investigada.

CONCLUSÃO

Nesse estudo pode ser verificado que o fitol diminuiu a freqüência das crises epiléticas induzidas por pilocarpina, bem como aumentou a taxa de sobrevivência. A literatura não reporta estes dados para o diterpeno avaliado no modelo de crises epiléticas induzidas

por pilocarpina e os mesmos subsidiaram recentemente em 2012 a publicação de um artigo na revista *Neuroscience Letters* que apresenta *qualis* 2,055 pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Assim, esses achados demonstram implicações importantes para a compreensão do mecanismo de ação de um composto de origem natural para subsidiar o desenvolvimento de uma nova formulação farmacêutica para o tratamento da epilepsia no delineamento de uma droga antiepiléptica seletiva e segura.

REFERÊNCIAS

BARROS, D.O.; XAVIER, S.M.; BARBOSA, C.O.; SILVA, R.F.; FREITAS, R.L.; MAIA, F.D.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M.; TAKAHASHI, R.N. Effects of the vitamin E in catalase activities in hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. **Neuroscience Letters**, v. 416, p. 227-230, 2007.

CARLINE, E.A. Plants and the central nervous system, **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 3, p. 501-512, 2003.

COSTA, J.P.; FERREIRA, P.B.; DE SOUSA, D.P.; JORDAN, J.; FREITAS, R.M. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. **Neuroscience Letters**, v. 523, p. 115 – 118, 2012.

DE SOUSA D. P.; GONÇALVES J.C.R.; QUINTANS-JÚNIOR L.; CRUZ J. S.; ARAÚJO D. A. M.; ALMEIDA, R.N., Study of Anticonvulsant Effect of Citronellol, a Monoterpene Alcohol, in Rodents. **Neuroscience Letters**, v. 401, p. 231-235, 2006.

DE SOUSA, D.P.; NOBREGA, F.F.F.; CLAUDINO, F.S.; DE ALMEIDA, R.N.; LEITE, J.R.; MATTEI, R. Pharmacological effects of the monoterpene α - β -epoxy-carvone in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 170-175, 2007a.

FREITAS, R.M.; FELIPE, C.F.B.; NASCIEMENTO, V.S.; OLIVEIRA, A.A.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Pilocarpine-induced seizures in adult rats: monoamine content and muscarinic and dopaminergic receptor changes in the striatum. **Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 136, n. 2, p. 103-108, 2003b.

FREITAS, R.M.; SOUZA, F.C.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA G.S.B.; FONTELES M.M.F. Oxidative stress in the hippocampus after status epilepticus in rats. **The FEBS Journal**, v. 272, p. 1307-1312, 2005.

HOSSEINZADEH, H.; PARVARDEH, S.; NASSIRI-ASL, M.; MANSOURI, M.T. Intracerebroventricular administration of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, suppress epileptic seizures in rats. **Medical Science Monitor**, v. 11, p. 106-110, 2005.

MARTIN, E.D.; ARAQUE, A.; BUNO, W. Synaptic regulation of the slow Ca^{2+} -activated K^{+} current in hippocampal CA1 pyramidal neurons: implication in epileptogenesis. **Journal of Neurophysiology**, v. 86, p. 2878-2886, 2001.

MILITÃO, G.C.G.; FERREIRA, P.M.P.; FREITAS, R.M. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. **Neurochemistry International**, v. 56, p. 16-20, 2010.

OHLSSEN, R.I.; PILOWSKY, L.S. The place of partial agonism in psychiatry: recent developments. **J. Psychopharmacol.** v. 19, n. 4, p. 408–413, 2005.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S.J.; KLEIROK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, v. 9, p. 315-335, 1983.

Palavras-chave: Anticonvulsivante. Crises epilépticas. Fitol.