

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Bruna Neuberger

**EFEITOS BENÉFICOS DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EM MODELOS DE
ATIVIDADE EPILEPTIFORME IN VIVO E IN VITRO INDUZIDOS
POR PILOCARPINA**

**SANTA MARIA, RS
2021**

Bruna Neuberger

**EFEITOS BENÉFICOS DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EM MODELOS DE
ATIVIDADE EPILEPTIFORME IN VIVO E IN VITRO INDUZIDOS POR
PILOCARPINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira

Santa Maria, RS
2021

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Neuberger, Bruna

EFEITOS BENÉFICOS DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EM MODELOS DE ATIVIDADE EPILEPTIFORME IN VIVO E IN VITRO INDUZIDOS POR PILOCARPINA / Bruna Neuberger.- 2021.

48 p.; 30 cm

Orientador: Mauro Schneider Oliveira

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, RS, 2021

1. Epilepsia 2. Pilocarpina 3. Ácido Rosmarínico 4. Dano neuromotor I. Schneider Oliveira, Mauro II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

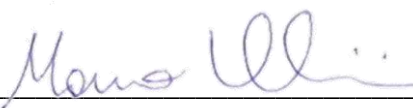
Declaro, BRUNA NEUBERGER, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Bruna Neuberger

**EFEITOS BENÉFICOS DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EM MODELOS DE
ATIVIDADE EPILEPTIFORME IN VIVO E IN VITRO INDUZIDOS POR
PILOCARPINA**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado
do Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia, da Universidade Federal de
Santa Maria (UFSM, RS), como requisito
parcial para obtenção do grau de **Mestre em
Farmacologia**.

Aprovada em 17 de Dezembro de 2021



**Mauro Schneider Oliveira, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)**



Marcel Henrique Marcondes Sari, Dr. (IDEAU)



Eliane Maria Zanchet, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos meu pais, Elemar e Adriana, por sempre incentivarem meus voos, por todo amor e ensinamentos que me fizeram ser quem eu sou, minhas conquistas são de vocês também.

Aos meus irmãos, Guilherme e Vitória, por compreenderem a minha falta e serem meus melhores amigos sempre.

Ao Luiz Antonio, por ser amparo, carinho, amor e paciência em todos esses anos.

Em especial ao Prof. Dr. Mauro, obrigado por ter guiado minha trajetória na pesquisa desde 2017, por toda dedicação, paciência e acessibilidade que sempre teve com todos os teus orientados, obrigado por sempre nos acolher e ser um exemplo para todos.

Ao Prof. Nando por permitir que parte desses experimentos fossem realizados em seu laboratório, e os seus alunos do BioEx pela amizade e parceria dentro e fora do laboratório.

Com muito carinho agradeço a minhas amigas e colegas do LabNeuro. Gurias, nada disso seria possível sem vocês, obrigada pela amizade e companheirismo nos longos dias de experimento, por sermos uma família e sempre poder contar com vocês nos bons e maus momentos.

Agradeço a todos os meus amigos, que independente da distância sempre se fazem presentes em minha vida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, assim como a todos os professores e funcionários do departamento. Agradeço também a CAPES pelo apoio financeiro.

A Universidade Federal de Santa Maria, por ser minha segunda casa desde 2014, por me permitir crescer e me proporcionar tanto conhecimento e oportunidades.

Agradeço pela minha vida e pela saúde dos meus, em um momento em que o mundo está tão turbulento.

RESUMO

EFEITOS BENÉFICOS DO ÁCIDO ROSMARÍNICO EM MODELOS DE ATIVIDADE EPILEPTIFORME IN VIVO E IN VITRO INDUZIDOS POR PILOCARPINA

AUTORA: Bruna Neuberger

ORIENTADOR: Mauro Schneider Oliveira

A epilepsia é uma condição neurológica crônica marcada por ocorrência de crises epilépticas que acarretam enorme prejuízo à qualidade de vida dos pacientes afetados. Assim, o entendimento das bases moleculares responsáveis pelo desenvolvimento da epilepsia e comorbidades associadas é de fundamental importância. O status epilepticus (*SE*) é um tipo grave de convulsão que geralmente é difícil de controlar e pode levar a morte. O ácido rosmarínico (*AR*) tem sido relacionado a diversas atividades biológicas, incluindo ação antioxidante e anti-inflamatória. Nesse sentido, o presente estudo avaliou o potencial efeito benéfico do ácido rosmarínico em modelos de atividade epileptiforme induzido por pilocarpina *in vivo* e *in vitro*. Para isso no modelo *in vivo* o *SE* foi induzido em camundongos machos C57BL / 6 utilizando baixas doses de pilocarpina (100mg/kg/i.p.), que receberam *AR* (30 mg / kg / v.o.) 1, 24 e 48 h após o término do *SE*, avaliamos atividade neuromotora por neuroscore e os níveis de proteínaa carbonil no córtex. Usando um modelo *in vitro* em combinação córtex entorrinal-hipocampo de ratos Wistar, avaliamos os efeitos da *AR* (10 µg / ml) na liberação de lactato e análogo fluorescente de glicose 2-NBDG após incubação em aCSF de alto potássio suplementado ou não com pilocarpina, avaliamos a expressão de proteínas por dot blot e western blot. O tratamento com *AR* atenuou o comprometimento neuromotor em 48h e diminuiu os níveis de proteínas carboniladas. Em ambos os modelos *in vitro*, *AR* foi capaz de diminuir a liberação de lactato estimulada das fatias, enquanto nenhum efeito sobre a captação de 2-NBDG foi encontrado. Os modelos *in vitro* não induziram alterações nos marcadores de estresse oxidativo, bem como o *AR* sozinho não teve nenhum efeito. Os resultados sugerem que o *AR* é um bom candidato complementar na terapia da epilepsia, visto que ele apresentou efeitos benéficos em modelo de atividade epileptiforme *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: epilepsia, ácido rosmarínico, dano neuromotor, antioxidante.

ABSTRACT

BENEFICIAL EFFECTS OF ROSMARINIC ACID IN VIVO AND IN VITRO MODELS OF EPILEPTIFORM ACTIVITY INDUCED BY PILOCARPINE

AUTHOR: Bruna Neuberger

ADVISOR: Mauro Schneider Oliveira

Epilepsy is a chronic neurological condition marked by the occurrence of epileptic seizures that cause enormous damage to the quality of life of affected patients. Thus, understanding the molecular bases responsible for the development of epilepsy and associated comorbidities is of fundamental importance. Status epilepticus (SE) is a severe type of seizure that is often difficult to control and can lead to death. Rosmarinic acid (RA) has been linked to several biological activities, including anti-oxidant and anti-inflammatory action. In this sense, the present study evaluated the potential beneficial effect of rosmarinic acid in models of epileptiform activity induced by pilocarpine in vivo and in vitro. For this, in the in vivo model, SE was induced in male C57BL/6 mice by low doses of pilocarpine (100mg/kg/i.p.), which received RA (30 mg / kg / vo) 1, 24 and 48 h after the end of SE, we evaluated neuromotor activity by neuroscore and protein levels. carbonyl in the cortex. Using an in vitro model in combination entorhinal cortex-hippocampus of Wistar rats, we evaluated the effects of RA (10 µg / ml) on the release of lactate and fluorescent glucose analogue 2-NBDG after incubation in high potassium aCSF supplemented or not with pilocarpine, we evaluated protein expression by dot blot and western blot. Treatment with RA attenuated neuromotor impairment within 48 hours and decreased levels of carbonyl proteins. In both in vitro models, RA was able to decrease the stimulated lactate release from the slices, while no effect on 2-NBDG uptake was found. In vitro models induced no changes in oxidative stress markers, and AR alone had no effect. The results obtained that AR is a good complementary candidate in the therapy of epilepsy, since it has beneficial effects in an in vitro and in vivo model of epileptiform activity.

Keywords: epilepsy, rosmarinic acid, neuromotor damage, antioxidant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão bibliográfica:

Figura 1 – Classificação das crises epiléticas.....	13
Figura 2- Estrutura química do ácido rosmarínico.....	17

Manuscrito:

Figura 1 – Experimental design.....	34
Figura 2 – Results of in vivo experiments.....	35
Figura 3 –Results of in vitro experiments.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

AR	Ácido Rosmarínico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
ILAE	<i>International League against Epilepsy</i>
EEG	Eletroencefalograma
SE	Status Epilepticus
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
2-NBDG	2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxy-D-glucose
NS	Neuroscore
3-NT	3-nitrotirosina
HNE	4-hidroxi-2-nonenal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 EPILEPSIA.....	11
2.1.1 Etiologia.....	12
2.1.2 Epidemiologia.....	12
2.2 CRISES EPILÉPTICAS	13
2.2.1 <i>Status Epilepticus (SE)</i>	14
2.2.2 Fisiopatologia e alterações moleculares	15
2.3 MODELOS EXPERIMENTAIS	15
2.3.1 <i>In vivo</i>	15
2.3.2 <i>In vitro</i>	16
2.4 ÁCIDO ROSMARÍNICO.....	17
3. OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL.....	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	21
4.1 MANUSCRITO.....	22
5. OUTROS RESULTADOS	40
6. CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS.....	42
ANEXO A. CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (<i>in vivo</i>).....	46
ANEXO B. CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (<i>in vitro</i>).....	47

1. INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma doença neurológica crônica com prevalência de 1-2 % na população em geral. A principal e mais marcante característica da epilepsia é a ocorrência de crises epiléticas, que são eventos transitórios resultantes de descargas máximas excessivas e sincrônicas de grupos de neurônios no cérebro, essas crises podem ser classificadas em: crises focais, generalizadas ou de início desconhecido (FISHER *et al.*, 2017).

A qualidade de vida dos pacientes com epilepsia também é afetada negativamente por diversas comorbidades neurológicas de difícil tratamento, incluindo depressão, transtornos de ansiedade e déficits cognitivos (FISHER, 2015). Embora a origem dessas comorbidades tenham sido historicamente atribuídas à consciência do paciente de sua condição crônica, à presença de neuropatologia primária (por exemplo, esclerose do lobo temporal) ou mesmo consideradas efeitos adversos indissociáveis dos fármacos anticonvulsivantes, diversos estudos recentes têm mostrado que alterações neuroquímicas e estruturais podem contribuir de maneira crucial para o aparecimento de comorbidades como transtornos de humor e ansiedade e problemas cognitivos (GALLUCCI NETO; MARCHETTI, 2005; HERMANN; SEIDENBERG; JONES, 2008).

O tratamento da epilepsia atualmente é focado no controle das crises e embora haja uma variedade de fármacos anticonvulsivantes disponíveis estima-se que 30% dos pacientes permanecem não responsivos aos fármacos mesmo com diferentes esquemas de tratamento e politerapia (JAFARPOUR *et al.*, 2019).

Assim, o entendimento das bases moleculares responsáveis pelo desenvolvimento de epilepsia e comorbidades associadas é de fundamental importância para a concepção de estratégias terapêuticas eficazes para prevenção da epilepsia ou modificação da doença. Com isso o estudo dos processos inflamatórios e o estresse oxidativo e suas relações com patologias do sistema nervoso central têm apresentado uma grande importância nas pesquisas da última década. Evidências experimentais e clínicas indicam a inflamação cerebral (ou neuroinflamação) e o aumento do estresse oxidativo como um constituinte comum e crucial na epileptogênese e no desenvolvimento das crises recorrentes espontâneas (LORES ARNAIZ *et al.*, 1998; VEZZANI, 2005; VEZZANI *et al.*, 2011).

Nesse contexto, sabendo que diversas atividades biológicas vêm sendo descritas para o Ácido Rosmarínico (AR), incluindo atividade antioxidante (PIETSCH *et al.*, 2011) a qual é em grande parte responsável pela ação neuroprotetora e anti-inflamatória (GAMARO *et al.*, 2011) e que os produtos naturais vêm desempenhando um papel importante na pesquisa de moléculas

bioativas e no desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003), o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos protetores do AR em modelo *in vivo* de *status epilepticus* e *in vitro* de atividade epileptiforme.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EPILEPSIA

Segundo a ILAE (International League Against Epilepsy) a epilepsia é uma doença causada por uma predisposição do cérebro a gerar crises epiléticas. Mais especificamente é diagnosticada quando: a) o indivíduo tem duas crises não provocadas em 24 horas, b) uma crise não provocada com probabilidade de ter outra crise, semelhante ao risco de recorrência geral após duas crises, ou c) síndrome de epilepsia (FISHER, 2015).

Recentemente uma nova classificação das Epilepsias foi normatizada a fim de auxiliar na classificação em diferentes níveis e ambientes clínicos dado o fato que sabe se das diferenças em relação a recursos e diagnóstico em diferentes regiões do mundo. Os tipos de Epilepsia são: a) focais, que incluem distúrbios uni ou multifocais e podem ocorrer crises com ou sem preservação da consciência, motoras, não motoras e com evolução para tonico-clônicas bilaterais. b) generalizadas, onde os indivíduos podem ter crises de ausência, generalizadas, mioclônicas e tonico-clônicas. c) focais e generalizadas onde se tem tanto crises focais como generalizadas e d) desconhecida que é o termo utilizada quando não se tem dados clínicos suficientes para determinar o tipo da epilepsia (SCHEFFER *et al.*, 2017).

Em um relatório recente a OMS traz que a epilepsia é uma das doenças neurológicas mais comuns em todo o mundo, afetando cerca de 50 milhões de pessoas e que a falta de ações para resolver os problemas de tratamento tem consequências terríveis para o bem-estar dos pacientes e impacta no desenvolvimento social e econômico (WHO, 2018).

Do ponto de vista etiológico, a epilepsia pode ser dividida em três grandes categorias (BERG; SCHEFFER, 2011) a epilepsia genética, em que um defeito genético contribui diretamente para a epilepsia (por exemplo, canalopatias); a epilepsia estrutural/metabólica, causada por distúrbio estrutural e/ou metabólico cerebral (por exemplo, malformação cerebral, infecção, tumor, acidente vascular cerebral ou estado de mal epilético - status epilepticus) e a epilepsia com etiologia desconhecida, em que não há evidência clara de um fator etiológico.

Enquanto a terapia com anticonvulsivantes promove o controle das crises epiléticas em aproximadamente 60-70 % dos pacientes, as crises permanecem não controláveis em um número significativo de indivíduos, mesmo com o uso de várias drogas e diferentes esquemas de tratamento (BEM-MENACHEM *et al.*, 2007).

2.1.1 Etiologia

Embora uma variedade de alterações moleculares e celulares ocorra durante a epileptogênese e a epilepsia, os mecanismos exatos que levam ao aparecimento de crises epiléticas espontâneas e comorbidades permanecem desconhecidos (BERG; SCHEFFER, 2011), mas atualmente, conforme indicado por Scheffer et al. 2017 a epilepsia pode ser classificada em seis grupos de acordo com a sua origem:

- 1- Estrutural, onde há uma lesão estrutural, uma anomalia visível e pode ser devido a acidente vascular cerebral, traumatismo ou infecção.
- 2- Genética, devido a mutação genética conhecida ou sugerida.
- 3- Infecciosa, é o tipo mais comum em todo o mundo, refere-se a um indivíduo com epilepsia e não que teve crises a fase aguda de uma doença. Infecções, comumente relacionadas são Malária, tuberculose, HIV.
- 4- Metabólica, devido a um defeito metabólico como a uremia e porfiria.
- 5- Imunológica, quando ocorre inflamação do sistema nervoso central, as encefalites.
- 6- Origem desconhecida quando a causa ainda não foi determinada.

2.1.2 Epidemiologia

Segundo a OMS, 2019, cerca de 50 milhões de pessoas de todas as idades em diferentes países são afetadas pela epilepsia e ainda, 80% das pessoas que vivem com essa doença são de países de baixa e média renda e não tem acesso a um tratamento adequado.

Embora seja uma doença global, a maioria dos casos se encontra em países com recursos limitados, o que deriva principalmente de doenças infecciosas como malária, neurocisticercose e HIV (MOSHÉ *et al.*, 2015)

Em 2005, o Ministério da Saúde do Brasil, por meio de uma portaria reconheceu a importância e magnitude das doenças neurológicas, o que inclui a epilepsia. No Brasil há poucos dados sobre a epidemiologia dessa doença, mas com base em estudos internacionais e dados da população brasileira, podemos compreender que temos aproximadamente 402mil novos casos ao ano, sendo que 10,6 milhões de pessoas já apresentaram crises epiléticas alguma vez (GALLUCCI NETO; MARCHETTI, 2005; IBGE)

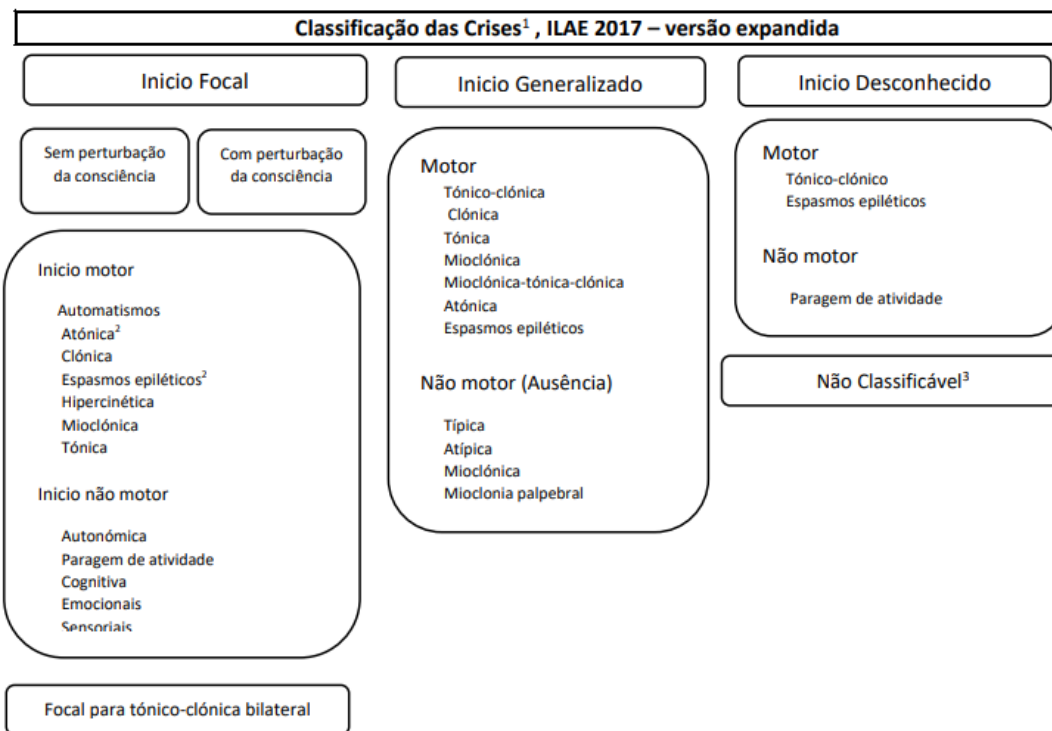
A epilepsia é considerada uma doença tratável, pois cerca de 70% dos indivíduos podem ficar livre das crises com o uso correto de medicamento, mas em todo o mundo, as pessoas com epilepsia sofrem com discriminação e vivem com um estigma da doença, o que pode desestimular a procura por tratamento (WHO, 2019).

2.2 CRISES EPILÉPTICAS

As crises epilépticas são a principal característica da epilepsia. Anteriormente as classificações eram baseadas na anatomia cerebral, mas com cada vez mais estudos demonstrando os mecanismos fisiopatológicos das crises, hoje sabe-se que a epilepsia é uma doença de redes neuronais (FISHER et al., 2017).

A ILAE classifica uma crise epiléptica como “a presença de sinais e/ou sintomas transitórios resultantes de uma atividade neuronal síncrona e excessiva”, onde as crises podem ser classificadas de acordo com o seu início conforme a figura 1. A classificação tem o intuito de melhorar a comunicação em cuidados clínicos e investigação, além de ser melhor compreendida por pacientes e familiares de diferentes idades (FISHER et al., 2017).

Figura 1- Classificação das crises epilépticas



¹ No artigo que acompanha este relatório e no glossário encontram-se as definições, outros tipos de crises e a sua descrição. ² A gravidade da perturbação do estado de consciência não é especificada. ³ Devido a informação inadequada ou incapacidade para a localizar noutras categorias.

Fonte: Adaptado de FISHER et al., 2017

A classificação começa diferenciando as crises entre de início focal, quando se originam em um hemisfério cerebral, generalizado quando a crise inicia em ambos os hemisférios ou ainda de início desconhecido. As crises focais podem ser subclassificadas de acordo com o

estado de consciência do paciente durante a crise: se está consciente de si e do meio (sem perturbação da consciência) ou com perturbação da consciência. De forma complementar, as crises focais podem ser categorizadas de acordo com os sinais e sintomas motores e não motores que o paciente apresentar primeiro, início motor ou não motor.

Quando falamos de crises de início generalizado podemos classificá-las em motoras ou de ausência (não motoras). As crises de início desconhecido podem ter características motoras ou não motoras e posteriormente serem classificadas em focal ou generalizada, conforme for possível ser feita a identificação pelos médicos.

Muitas vezes não se consegue classificar a crise por diversos motivos, seja porque o paciente estava sozinho ou dormindo ou ainda por que não foi possível identificar características focais. São utilizados elementos de apoio para tentar classificar corretamente as crises de um paciente, como padrões de eletroencefalograma (EEG), lesões por neuroimagem e ainda vídeos gravados pela família, mas ainda assim a classificação entre focal e generalizada só deve ser feita quando se tem um alto grau de confiança em relação a sua origem (FISHER et al., 2017).

2.2.1 Status Epilepticus (SE)

O *SE* é definido como uma convulsão que não para após um longo período e é uma grave emergência médica. Pode estar associado a crises convulsivas ou não convulsivas e se for muito longo pode levar a um coma com sintomas leves ou nenhum sintoma. (WRAY e KNUPP, 2011). Recentemente a ILAE revisou a definição de *SE* em humanos e traz dois recursos, T1 que se define como o tempo em que o tratamento deve ser iniciado, que é de 5 minutos para *SE* convulsivo e T2 como o tempo em que as consequências a longo prazo podem ocorrer, que é após 30 minutos (TRINKA et al., 2015)

As causas de *SE* são numerosas e variam conforme a idade do paciente. Em adultos as principais causas são traumas, doenças vasculares e abandono dos medicamentos anticonvulsivantes, já em crianças são mais comuns casos agudos de febre e infecções ou ainda causas desconhecidas (MAYTAL et al., 1989).

Ao estudar o *SE* em modelos animais podemos avaliar rigorosamente a fisiopatologia, resposta aos medicamentos e a patologia da doença, existem diversos estudos envolvendo animais e esses apresentam dados consistentes com os dados humanos obtidos na clínica (SEINFELD; GOODKIN; SHINNAR, 2016).

2.2.2 Fisiopatologia e alterações moleculares

As crises epilépticas geram uma excitabilidade que leva a uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são importantes mediadores de lesão cerebral e tornam o cérebro mais vulnerável ao dano oxidativo e ao desenvolvimento de novas crises. As células têm uma série de mecanismos antioxidantes para tentar manter o equilíbrio, mas quando ERO's ultrapassam os mecanismos de defesa temos o estresse oxidativo (HALLIWELL, 2006).

Durante o estresse oxidativo pode ocorrer peroxidação lipídica nas células bem como danos às proteínas, que resulta em modificações irreversíveis em suas estruturas, como a introdução de grupamentos carbonil e a nitração. Sabendo disso, evidências ligaram o estresse oxidativo a danos nos tecidos e disfunções comportamentais em diversos modelos de doenças neurológicas (BREITZIG *et al.*, 2016; PATEL, 2016)

A resposta celular a diversos tipos de estresse caracteriza-se por alterações no metabolismo, estudos indicam que o metabolismo energético está comprometido na epilepsia, durante as crises ocorre hipermetabolismo de glicose e conseqüentemente aumento nos níveis de lactato, já na condição crônica da doença pode ser observado hipometabolismo de glicose. Aumento nos níveis de lactato extracelular foram detectados em hipocampo humano durante convulsões e pode ser considerado um biomarcador de convulsão em modelos agudos (LAMUSUO *et al.*, 2001; SHARMA *et al.*, 2008).

Além das crises epilépticas os pacientes acometidos por essa doença sofrem com diversas comorbidades neurológicas de difícil tratamento, como depressão e déficits cognitivos, que podem ser pioradas pelos efeitos adversos causados pelos fármacos utilizados no tratamento, geralmente em politerapia (HERMANN; SEIDENBERG; JONES, 2008). Visto isso terapias que visam minimizar o estresse oxidativo e o dano neuronal tem sido muito utilizadas para diminuir o prejuízo causado pela epilepsia (SANTOS *et al.*, 2018).

2.3 MODELOS EXPERIMENTAIS

2.3.1 In vivo

A pilocarpina é um agonista colinérgico muscarínico que quando injetado sistemicamente em ratos produz crises convulsivas e danos semelhantes aos encontrados em cérebros de humanos (TURSKI *et al.*, 1984). Esse modelo representa diferentes estágios onde pode ser possível estudar fármacos com diferentes propósitos, na fase aguda pode-se testar compostos com eficácia sobre o SE e neuroproteção contra os danos causados pelas crises, no

período latente podemos identificar contribuintes para a epileptogênese e sua prevenção, e na fase crônica, quando o animal tem as crises espontâneas e recorrentes pode-se testar fármacos que atuem frente a essas crises (CURIA *et al.*, 2008; LEITE *et al.*, 1990)

Os modelos animais permitem uma boa compreensão da farmacocinética, efeitos colaterais, eficácia e tolerância, além disso deve mimetizar os sinais observados em humanos. O modelo experimental de indução do *SE* pela pilocarpina tem sido usado para a caracterização dos mecanismos de ações de drogas anticonvulsivantes no tratamento da epilepsia (PEREIRA *et al.*, 2007). Este modelo foi descrito nos anos 80, a principal via de administração da substância é intraperitoneal ou injeções intra-hipocampal, esse modelo provoca efeitos eletrográficos, comportamentais e alterações histopatológicas (AHMED JUVALE; CHE HAS, 2020).

As alterações provocadas pela administração de pilocarpina em ratos em um modelo de status epilepticus podem ser divididas em 3 períodos: 1) período agudo que evolui para um estado epiléptico límbico e que pode durar 24 horas, 2) um período com normalização do eletroencefalograma que pode durar de 4 a 44 dias e 3) um período crônico com crises recorrentes e espontâneas (SCORZA *et al.*, 2009).

2.3.2 In vitro

Sabendo que cada vez mais tem se procurado utilizar modelos *in vitro* visando diminuir o número de animais por experimento e que modelos *in vitro* de eventos tipo-convulsivos oferecem uma variedade de opções para o estudo dos mecanismos envolvidos em crises convulsivas, bem como o potencial de novas abordagens terapêuticas, o uso *in vitro* de fatias da estrutura cerebral traz novas opções para o estudo do sistema nervoso central (DULLA *et al.*, 2018).

Diferentes modelos *in vitro* são descritos para a mimetização das crises epiléticas, dentre eles a manipulação da concentração iônica do meio extracelular, como o modelo de baixa concentração de Ca^{2+} , onde a remoção do Ca^{2+} extracelular provoca atividade epileptiforme (DULLA *et al.*, 2018). Ainda, Jensen & Yaari 1997, utilizaram um modelo *in vitro* de fatias de hipocampo com baixa concentração de $CaCl_2$ (1,2mM) e alta concentração de KCl (7,5mM) e observaram episódios ictais em CA3 que logo se espalhou para CA1. Além disso, também existem modelos induzidos por substâncias químicas como a pilocarpina, porém foi demonstrado que a pilocarpina *in vitro* causa descargas epileptiformes espontâneas apenas quando utilizada em altas concentrações, uma alternativa para isso é associa-la com aumento

do K⁺ extracelular em 7,5mM (RUTECKI; YANG, 1998). Nesse contexto, Marchi et al., 2007 observou que in vitro a pilocarpina não promoveu atividade epileptiforme quando usada em concentrações idênticas ao in vivo do mesmo estudo, porém quando associada a mudança no meio extracelular utilizando solução aCSF com K⁺ 6mM promoveu eventos semelhantes a crises intensas.

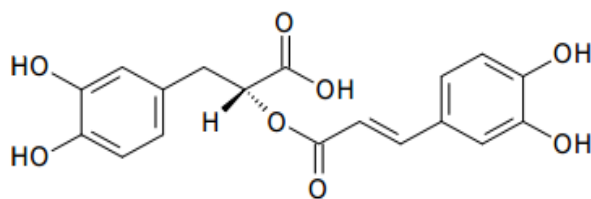
Sabendo das diversas alterações que podem ser causadas pelas crises epiléticas e pela epilepsia, bem como dos diversos modelos experimentais que podem ser usados para estudar e avaliar substâncias frente a essas alterações, nesse trabalho buscamos avaliar o ácido rosmarínico.

2.4 ÁCIDO ROSMARÍNICO

Os produtos naturais vêm desempenhando um papel importante na pesquisa de moléculas bioativas e no desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). O Brasil é possuidor de uma flora rica, composta de uma infinidade de espécies com aplicações terapêuticas e constitui-se o mais rico do mundo em espécies vegetais, e que muito pode contribuir para o avanço da medicina mundial (SARITA ALBAGLI, 2001)

O AR é um éster dos ácidos caféicos e 3,4-dihidroxifenilático, como mostra a figura abaixo (Figura 2), que foi isolado pela primeira vez em 1958 da planta Rosemary (*Rosmarinus officinalis*), popularmente conhecida como Alecrim, e está presente em diversas outras espécies de plantas como *Salvia officinalis*, and *Perilla frutescens* (KIM *et al.*, 2015).

Figura 2- Estrutura química do ácido rosmarínico



Fonte: Adaptação da Wikipédia

Culturalmente essas plantas são muito utilizadas como infusões de chá e na forma seca como temperos, o que torna a ingestão e administração oral do AR muito interessante. Esse composto também pode ser aplicado topicamente, onde ocorre acúmulo epidérmico, via intranasal, pulmonar e intravenosa. Após a ingestão oral sofre impacto do trato gastrointestinal

e é degradado em 2 ácidos fenólicos que facilita sua absorção. De acordo com estudo *in silico* a absorção de AR é de 59,14% (SREE et al., 2014) no entanto investigações *in vivo* e *in vitro* sugerem que a permeabilidade intestinal é muito menor. Estudos mostram que o AR puro é estável em diversos meios de pH, enquanto extratos apresentaram redução de até 99% no conteúdo de AR (HITL et al., 2021).

Diversas atividades biológicas vêm sendo descritas para o AR, incluindo atividade antioxidante a qual é em grande parte responsável pela ação neuroprotetora e anti-inflamatória (KIM et al. 2015). As primeiras propriedades anti-inflamatórias do AR foram demonstradas por meio da sua capacidade de bloquear a fixação do complemento e inibir as lipooxigenases e ciclooxigenases (KIMURA et al., 1987).

Evidências experimentais e clínicas sugerem que mediadores inflamatórios desempenham papel nas comorbidades associadas a neuropatologia da epilepsia (VEZZANI; VIVIANI, 2015) reforçando a importância de controlar a inflamação pós status epilepticus. Ainda, recentemente foi relatado que o AR apresentou atividade neuroprotetora em diferentes modelos de doenças neurodegenerativas, como isquemia cerebral e Alzheimer (IUVONE *et al.*, 2006; LUAN *et al.*, 2013).

A perda progressiva de neurônios em regiões específicas do cérebro é uma característica que as doenças neurodegenerativas tem em comum. O que ocorre por mecanismos apoptóticos e necróticos, onde o estresse oxidativo juntamente com a excitotoxicidade e a ativação da caspase são causas subjacentes da morte neuronal. Quando testado frente ao estresse nitrosativo em um modelo *in vitro*, o AR (50 uM) protegeu culturas primárias de neurônios granulares cerebelares de ratos, tendo esse efeito provavelmente por eliminar diretamente o óxido nítrico (TARAM et al., 2018).

Estudos mostraram que o tratamento com extrato de alecrim pode melhorar a degeneração neuronal induzida por ácido caínico e também os déficits de memória (RAHBARDAR; HOSSEINZADEH, 2020). Já em Naderali et al., 2018 viu-se que a gravidade e o início das crises em ratos diminuíram significativamente, bem como houve uma redução na perda neuronal na região CA1, quando tratados com extrato de alecrim (100mg/kg oral).

Também foi demonstrado que o ácido rosmarínico é capaz de inibir a atividade de enzimas chave da resposta inflamatória, como a ciclooxigenase-1 e ciclooxigenase-2 (KELM *et al.*, 2000). Recentemente, Coelho et al., 2016 mostrou que o ácido rosmarínico possui atividade antiepiléptogênica em modelo de kindling induzido por pentilenotetrazol. Em outro estudo Grigoletto et al., 2016 demonstrou que o tratamento com AR na dose de 30mg/kg foi capaz de atenuar convulsões agudas em camundongos.

Diante dos diversos dados relatando o potencial efeito neuroprotetor e anti-inflamatório do AR e sabendo que a oxidação e a inflamação estão associadas a fisiopatologia das crises epiléticas, o presente trabalho foi desenvolvido buscando verificar se o AR possui efeito protetor em modelo de *SE in vivo* e tipo-convulsivo *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do AR in vivo após *SE* induzido por pilocarpina, e in vitro em dois modelos de atividade epileptiforme.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Definir qual a maior concentração de AR (1 ou 10 μ M) e tempo de incubação (60, 120, 240min) em que as fatias se manteriam viáveis.
- b) Avaliar o efeito protetor do AR sobre níveis de lactato e captação de glicose.
- c) Avaliar o efeito do AR sobre parâmetros neuromotores e carbonilação de proteínas pós *SE*.

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os materiais e métodos, assim como resultados e a discussão que fazem parte desta dissertação estão apresentados na forma de artigo científico intitulado “*Beneficial effects of Rosmarinic Acid in vitro and in vivo models of epileptiform activity induced by pilocarpine*”, que foi submetido para publicação.

Os procedimentos experimentais do presente artigo científico iniciaram-se após a obtenção da carta de aprovação do CEUA (comitê de ética na utilização de animais) da Universidade Federal de Santa Maria (ANEXO A e B).

4.1 MANUSCRITO

Beneficial effects of Rosmarinic acid *in vitro* and *in vivo* models of epileptiform activity induced by pilocarpine

Bruna Neuberger¹, Fernanda Kulinski Mello¹, Michele Pereira Mallmann¹, Karine Gabriela da Costa Sobral¹, Michele Rechia Figuera^{1,2}, Luiz Fernando Freire Royes², Ana Flávia Furian^{1,3}, Tuane Bazanella Sampaio¹, Mauro Schneider Oliveira^{1*}

¹Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

²Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

³Graduate Program in Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

*Corresponding author: Mauro Schneider Oliveira, Ph.D

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Av. Roraima, nº 1000, Prédio 21, sala 5207 - CEP 97105-900, Santa Maria - RS, Brasil

E-mail: ms.oliveira@ufsm.br

Phone: 55 55 3220 9378

Abstract

Epilepsy is characterized by a predisposition to generate recurrent and spontaneous seizures; it affects millions of people worldwide. *Status epilepticus (SE)* is a severe type of seizure. In this context, screening potential treatments is very important. In the present study we evaluated the beneficial effects of Rosmarinic acid (RA) in pilocarpine-induced *in vitro* and *in vivo* models of epileptiform activity. Using an *in vitro* model in combined entorhinal cortex-hippocampal from Wistar rats we evaluated the effects of RA (10 $\mu\text{g/ml}$) on lactate release and glucose fluorescent analogue 2-NBDG after incubation in high potassium aCSF supplemented or not with pilocarpine. In *in vivo* model, *SE* was induced in male C57BL/6 mice, which received RA (30 mg/kg/v.o.) at 1, 24 and 48 h after the end of *SE*. We evaluated the neuromotor impairment by neuroscore test and protein carbonyl levels in the cerebral cortex. In both *in vitro* models, RA was able to decrease the stimulated lactate release, while no effect on 2-NBDG uptake was found. RA has beneficial effects in models of epileptiform activity *in vivo* and *in vitro*. We found that RA treatment attenuated *SE*-induced neuromotor impairment at 48 h timepoint. Moreover, post-*SE* treatment with RA decreased levels of protein carbonyls in cerebral cortex of mice when compared to their vehicle-treated counterparts. Importantly, RA was effective in a model of *SE* which is relevant for the human condition. Present data adds to the literature on the biological effects of RA, who could be a good candidate to add-on therapy in epilepsy.

Keywords: Rosmarinic acid, seizures-like, pilocarpine, antioxidant, neuromotor damage

1.Introduction

Epilepsy is a chronic neurological disease characterized by a predisposition to generate recurrent and spontaneous seizures with an incidence of 1-2% in the general population. In addition to seizures, the quality of life of epilepsy patients and their families is affected by several difficult-to-treat neurological comorbidities, including depression, anxiety disorders and cognitive deficits [1].

Understanding the molecular bases underlying seizures, epilepsy, and their comorbidities, as well as the screening of new treatments is of fundamental importance for the design of effective therapeutic strategies for preventing epilepsy or modifying the disease. The study of inflammatory processes and oxidative stress and their relationship with pathologies of the central nervous system have been of great importance in research in the last decade. In this context, experimental and clinical evidence indicates neuroinflammation and increased oxidative stress as a common and crucial constituent in epileptogenesis and the development of spontaneous recurrent seizures [2, 3].

Rosmarinic acid (RA) is an ester of caffeic and 3,4-dihydroxyphenyllactic acids, which was first isolated in 1958 from the Rosemary plant (*Rosmarinus officinalis*), popularly known as Rosemary, and is present in several other plant species such as *Salvia officinalis*, and *Perilla frutescens* [4]. Interestingly, several biological activities have been described for RA [5], including antioxidant activity [6] which has been largely linked to the neuroprotective and anti-inflammatory actions of RA [7]. In the context of epilepsy, the potential beneficial effects of RA have been evaluated, with discrepant results. For instance, pretreatment with RA decreased seizure activity induced by kainate in rats [8] and by pentylenetetrazole (PTZ) and pilocarpine in mice [9]. On the other hand, RA was not able to modify PTZ-induced kindling in mice [10] or mid-term consequences of pilocarpine-induced SE in mice [9]. Therefore, to shed further light on the anticonvulsant/neuroprotective

potential of RA, in the present study we tested the effects of RA on *in vitro* and *in vivo* paradigms of epileptic activity in which it has not been used to date. Specifically, we evaluated the effects of RA on neuromotor status and protein carbonylation in acute phase (48 h) of pilocarpine-induced *SE* and in acute brain slice model for anticonvulsant screening which is based on lactate release [11].

2. Material and methods

2.1. Animals

Male Wistar rats aged 21 to 28 days (50 to 100 g) from the central vivarium of Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS, Brazil) and Male C57BL/6 mice aged 30 to 60 days (25 to 30 g) from the central vivarium of Federal University of Santa Maria (UFSM, Brazil) were used. The animals were adapted to laboratory vivarium for at least 15 days before the experiments to avoid any stress due to transport and housing change. All experimental protocols aimed to limit the suffering and the number of animals used. Studies were conducted in accordance with national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. Public Health Service’s Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals), and with the approval of the institutional animal care and use committee of the Federal University of Santa Maria (approval numbers 9336090920 and 7594020715 for *in vitro* and *in vivo* studies, respectively).

2.2. Reagents

Rosmarinic acid was obtained from Sigma-Aldrich (product no. 536954, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and was dissolved in vehicle solution (0.9% NaCl containing 0.05 % Tween) for *in vivo* testing and in artificial cerebrospinal fluid (aCSF) for *in vitro* studies. Pilocarpine was obtained from Sigma-Aldrich and dissolved in 0.9% NaCl for *in*

vivo experiments and in aCSF for *in vitro* testing. The fluorescent glucose analogue 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG) was purchased from Thermo Fisher Scientific Inc (Waltham, MA, USA).

2.3. *In vitro* experiments

All the experimental design is shown in Figure 1. Rats were euthanized by decapitation and combined entorhinal cortex-hippocampal slices were obtained with a motorized vibratome (Campden Instruments, model 5100mz). We decided to carry out the *in vitro* experiments in rats because they provide larger slices which are therefore easier to handle and maintain. Detailed protocol of sectioning is described elsewhere [12]. After sectioning, slices were allowed to rest in artificial cerebrospinal fluid (124 mM NaCl, 3 mM KCl, 1.8 mM MgSO₂, 1.6 mM CaCl₂, 1.25 mM NaH₂PO₄, 26 mM NaHCO₃ and 10 mM glucose; 95% O₂/ 5% CO₂; pH 7.4) at 35 °C for 60 min. To ensure the results were not impacted by loss of slice viability, we assessed time-dependent lactate dehydrogenase release (LDH) after 1, 2 and 4 hours of incubation in the presence or absence of increasing concentrations of RA (1-100 µg/ml). These experiments were conducted in continuously aerated (95% O₂/ 5% CO₂) glass tubes containing aCSF. At appropriated timepoints, one slice and 1 mL of the incubation medium were collected for analysis of LDH release. Concentrations of RA used in the present study were selected based in the literature [13] and in pilot concentration-response experiments.

The effect of RA (10 µg/ml) on lactate release [11] and glucose uptake [12] was performed in two models of *in vitro* epileptiform activity. The models were established by altering the composition of the aCSF. In the high concentration of K⁺ model, KCl was supplemented to achieve a final K⁺ concentration of 7.5 mM [14]. In the pilocarpine model the high K⁺ aCSF was supplemented with 50 µM pilocarpine [15]. The incubation time of

the slices in these experiments was 4 hours as chosen based on the time-response curves. RA was added always at the beginning of incubation. At the end of incubation, the slices and incubation medium were collected and processed for analysis of LDH release, lactate release and 2-NBDG uptake [12].

2.4. LDH release

LDH release was measured using commercially available kits (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil) following the manufacturer's instructions. The total content of LDH in samples was considered as the sum of LDH in slices plus incubation media and was set as 100 % for calculation purposes. LDH release in the media was expressed as percent values of total LDH content.

2.5. Lactate release

Lactate release in the incubation media has been demonstrated as rapid assays for seizure-like activity in brain slice model for staged anticonvulsant screening [11]. Lactate content was measured using commercially available kits (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brazil) following the manufacturer's instructions.

2.6. Glucose uptake

Glucose uptake was measured on slices using the fluorescent glucose analogue 2-NBDG according to [12]. After the end of the incubation, one slice of each treatment was carefully relocated to a tube containing aCSF supplemented with 2-NBDG (30 μ M) and maintained in the media for 15 minutes. Following 2-NBDG uptake, the slices were washed with aCSF and homogenized in 30 mM Tris-HCl (pH 7.4). Homogenates were centrifuged at 3000 x g for 10 min and supernatant fluorescence was measured in FlexStation 3 Multi-

Mode Microplate Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). One 2-NBDG uptake sample from experiments with K^+ and pilocarpine is missing because it was lost during processing.

2.7. *In vivo* experiments

SE was induced in C57BL/6 mice following standard protocol [16] where repeated low doses of pilocarpine (100 mg/kg, ip) are injected every 20 minutes until *SE* onset. Sixty minutes thereafter *SE* was quelled with diazepam (10 mg/kg, i.p.). We decided to carry out the *in vivo* experiments in mice to allow a more straightforward comparison with our previous studies [9]. After 60 min of *SE*, we started the treatment with RA (30 mg/kg, v.o.). Animals received 3 doses of RA: 1 h, 24 h and 48 h after *SE* [9]. One hour after the last treatment mice were euthanized and the cerebral cortex removed for analysis of protein carbonyls content. Control animals went through the same protocols but received vehicle instead of other drugs.

2.8. Neuroscore

Neuromotor impairment was assessed using the neuroscore (NS) method [17]. Animals were scored according to the degree of neuromotor impairment (0 = severely impaired to 4 = normal). First, the animals were placed on a grid to measure how many times he misses walking. Upper limb function is assessed by observing whether the animals grip the cage when lifted and brought towards it. Afterwards, the animals were suspended, and the ability extend their lower limbs was noted. Finally, the animals are tested for right and left lateral drive to determine resistance. This assessment was performed before *SE* induction to establish a baseline measure and at 24 h and 48 h after *SE*.

2.9. Dot blot assay

Levels of oxidative injury marker protein carbonyls were measured in the frontal cortex by dot blot method [18] using anti-DNP primary antibodies (Sigma-Aldrich product # D9656).

2.10. Protein content

Protein content was measured through using Sigma-Aldrich's BCA Protein Assay Kit (product #BCA-1) as per manufacturer's instructions.

2.11. Statistical analyses

Slice viability (LDH release) was evaluated by two-way ANOVA (time of incubation x incubation media) followed by Newman-Keuls *post hoc* test. Lactate release and 2-NBDG uptake were evaluated by one-way ANOVA followed by a Newman-Keuls *post hoc* test. Latency to *SE* was analyzed using unpaired Student's *t* test. Parameters obtained from *in vivo* experiments (NS and protein carbonyls) were evaluated by two-way ANOVA followed by Newman-Keuls *post hoc* test. P values smaller than 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. *In vitro* results

To assess the time course of sample viability in our conditions, slices were incubated in continuously aerated aCSF, in the presence or absence of RA (Figure 2A). The viability was maintained stable at high values for at least 240 minutes, except for slices incubated water instead of aCSF [$F(3,48) = 11.93$; $P < 0.05$]. Therefore, subsequent experiments were performed at the longer timepoint (240 minutes). RA (1 or 10 $\mu\text{g/ml}$) did not impact slice

viability in the time window analyzed. However, we noticed that the highest concentration of RA (100 $\mu\text{g/ml}$) had strong interference in LDH readings, precluding the use of that concentration of RA in our experimental conditions.

The effect of RA on lactate release and 2-NBDG after slice incubation in high concentration of K^+ model is shown in figure 2B-E. Lactate levels increased by ~ 1.6 fold in average in the media supplemented with a high concentration of K^+ , and co-incubation with RA (10 $\mu\text{g/ml}$) attenuated the rise in lactate levels (Figure 2B) [$F(3,24) = 4.735$; $P < 0.05$]. On the other hand, no effect of high concentration of K^+ , RA or their combination was found in 2-NBDG uptake (Figure 2C) [$F(3,24) = 0.7356$; $P > 0.05$].

In the last set of *in vitro* experiments, a high concentration of K^+ plus pilocarpine was employed. Lactate levels increased by ~ 2.2 fold in average in the incubation media, suggesting that pilocarpine had a facilitatory effect on lactate release. Interestingly, co-incubation with RA blunted the increase in lactate levels in the incubation media supplemented with K^+ and pilocarpine (Figure 2D) [$F(3,20) = 4.116$; $P < 0.05$], suggesting RA was effective even considering the higher lactate release potential of the pilocarpine-containing media. Once again, 2-NBDG uptake was not altered by the epileptogenic media, RA, or their combination (Figure 2E) [$F(3,16) = 0.2111$; $P > 0.05$].

3.2. *In vivo* studies

All animals had a normal basal NS, with a value equal to 12, indicating that all animals were in healthy condition at the beginning of the study (data not shown). When analyzing the NS 48 hours after *SE* (Fig. 3A), we found that pilocarpine-induced *SE* impaired neuromotor abilities, as they show a worsening in the test performance [$F(1,15) = 23.54$; $P < 0.05$]. Interestingly, post-hoc analyses indicated that RA-treated animals had higher NS

values after *SE* than their vehicle-treated counterparts ($P < 0.05$), suggesting that RA improved neuromotor impairment in the acute phase of pilocarpine-induced *SE*.

The results of the carbonyl protein measurements are shown in Figure 3B. Levels of the oxidative stress indicator increased in the animals that underwent *SE*, presenting a significant difference when compared to control animals [$F(1,15) = 10.22$; $P < 0.05$]. Importantly, treatment with RA attenuated the *SE*-elicited oxidative damage to proteins, since post hoc analyses revealed significant difference between RA- and vehicle treated *SE* groups ($P < 0.05$).

4. Discussion

Several biological activities have been described for Rosmarinic Acid [5]. In a previous study by our group [9], showed that acute treatment with RA was able to increase the latency for myoclonic seizures induced by PTZ or pilocarpine in mice. However, no effect of RA was detected on mid-term (14 days) consequences of pilocarpine-induced *SE*. In the present study we used the same treatment dosing and schedule [9], but we focused on short-term (48 h) consequences of pilocarpine-induced *SE*. Our results revealed that the treatment with RA promoted an improvement in the animals' neuromotor performance, as measured by the neuroscore test. Moreover, we found a decrease in the level of protein carbonylation after *SE* in RA-treated animals, indicating that the treatment was able to reduce oxidative damage in the cerebral cortex of these animals. We believe these results are of importance since *SE* is a medical emergency with high potential of morbidity and mortality and that is often very difficult to treat. In this context, the pilocarpine-induced *SE* is an animal model capable of simulating many features of human *SE* and temporal lobe epilepsy depending on the timepoint employed for analysis for behavioral and neurochemical parameters [19]. Regarding this point, *SE* is a very drastic event, and such widespread seizure

activity causes brain oxidative stress [3]. Therefore, therapies that minimize oxidative stress and neuronal damage caused by *SE* have been sought [20]. Accordingly, our present results further support the idea that RA may be of value in managing neuromotor and oxidative damage after a *SE* episode.

To further investigate the beneficial effects of RA on epileptiform activity we used two in vitro models. These have been increasingly valuable to the study of the mechanisms involved in seizures, as well as the potential for new therapeutic approaches [21]. In the present study we found an increase in lactate levels that were reduced when treated with RA. These data seem interestingly since lactate has been considered a useful seizure-like activity biomarker, as demonstrated by an increase in its levels in the extracellular environment of the human hippocampus during seizures [22]. Moreover, measurement of lactate release in incubation media of organotypic hippocampal cultures has been shown to be an excellent strategy in anticonvulsant screening, allowing for high-throughput search of potential new drugs with antiseizure activity [11]. Despite its role as energy substrate and biomarker of seizure activity, recent studies have suggested lactate act as a signaling molecule in the brain [23]. For instance, it has been reported that lactate increases neuronal activity through mechanisms involving NMDA receptors, Erk1/2 phosphorylation and Ca^{2+} influx [23]. In this context, the ability of RA in preventing lactate increase in epileptogenic media may represent not only mitigation of a seizure-like activity biomarker, but also a mechanism underlying the anticonvulsant and neuroprotective effects. Nevertheless, this interesting possibility has yet to be investigated.

Regarding the 2-NBDG uptake, none of the two in vitro models altered the uptake of the fluorescent glucose analog, suggesting that glucose uptake by slices was not affected by epileptiform activity. In this context, it is known that during crises there is an increase in glucose metabolism, whereas in chronic conditions there is glucose hypometabolism [24].

4. Conclusion

In summary, our results suggest that RA can attenuate the acute neuromotor and oxidative damage caused by *SE* in mice and has beneficial effects in *in vitro* models of epileptiform activity as measured by lactate release. Thus, RA can be considered a promising candidate to add-on treatment with anticonvulsant drugs, although more studies are needed to define the full potential of this naturally occurring molecule.

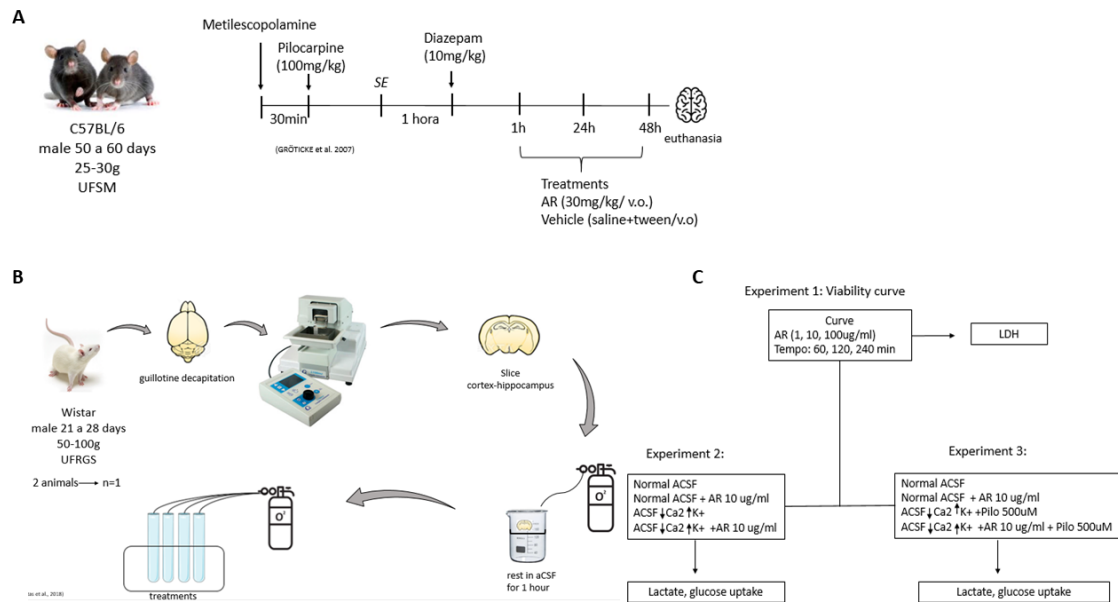
Acknowledgements

Authors gratefully acknowledge the student fellowships from CAPES (to B.N., F.K.M., M.P.M., K.G.S. and T.B.S.). M.R.F., L.F.F.R., A.F.F. and M.S.O. are grantees of CNPq research productivity fellowships. This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grants #304708/2015-1 and 308011/2019-8) and financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

Conflict of Interest statement

The authors declare no conflict of interest.

Figure captions

Figure 1. (A) *In vivo* SE induction protocol and treatments. (B) *In vitro* experimental design.(C) Diagram representing how the three *in vitro* experiments were carried out.

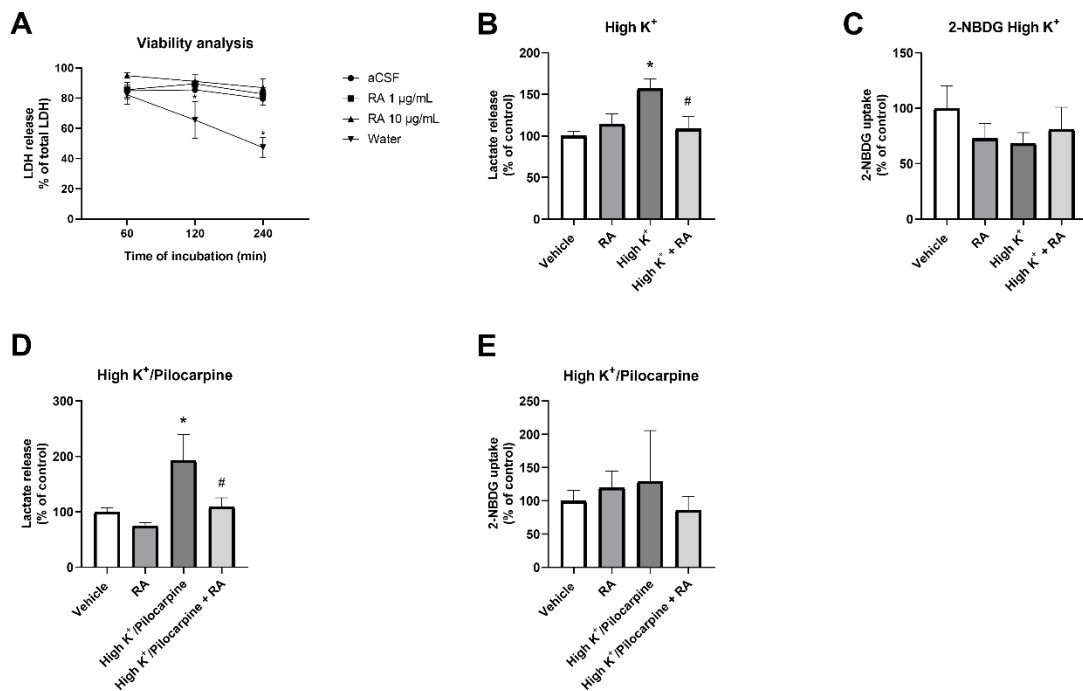


Figure 2. (A) Concentration-response and time-response experiments aimed to check viability of slices. The asterisk (*) indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$) when compared to the other conditions at the same timepoint. Data are presented as mean with standard error of mean for $n = 5$ per group. Effect of high concentration of K^+ or RA (10 $\mu\text{g/ml}$) on lactate release (B, $n = 7$) or 2-NBDG uptake (C, $n = 7$) in combined entorhinal cortex-hippocampal slices from rats. Data are presented as mean with standard error of mean. The asterisk (*) indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$) when compared to control aCSF. The hashtag (#) indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$) when compared to RA-supplemented epileptogenic media. Effect of high concentration of K^+ plus pilocarpine or RA (10 $\mu\text{g/ml}$) on lactate release (D, $n = 6$) or 2-NBDG uptake (E, $n = 5$) in combined entorhinal cortex-hippocampal slices from rats. Data are presented as mean with standard error of mean. The asterisk (*) indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$) when compared to control aCSF. The hashtag (#) indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$) when compared to RA-supplemented epileptogenic media.

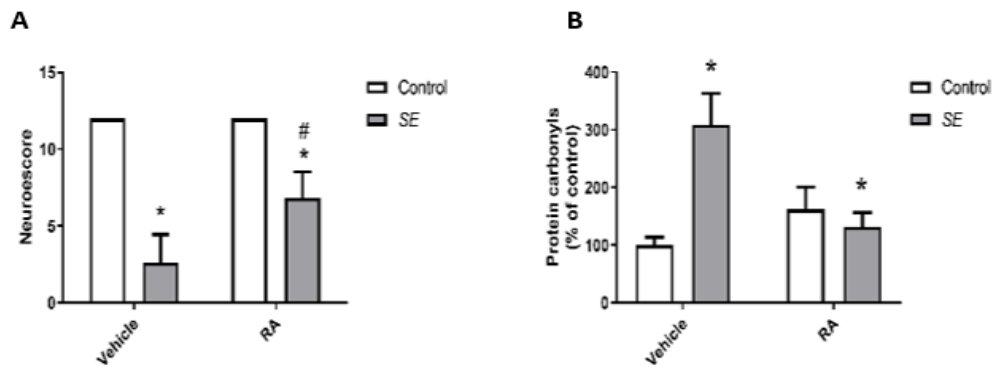


Figure 3. (A) Effect of RA (30 mg/kg; v.o.) on mice neuromotor performance (NS test) 48 h after *SE*. (B) Protein carbonyls content in the cerebral cortex of mice 48 h after *SE*. The asterisk (*) indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$) when compared to vehicle-treated control animals. The hashtag (#) indicates a statistically significant difference ($P < 0.05$) when compared to RA-treated *SE* animals. Data are presented as mean with standard error of mean for $n = 4-6$ per group.

References

- [1] Fisher RS. Redefining epilepsy. *Curr Opin Neurol* 2015;28: 130-5.
- [2] Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol* 2011;7: 31-40.
- [3] Rowley S, Patel M. Mitochondrial involvement and oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Free Radic Biol Med* 2013;62: 121-131.
- [4] Kim GD, Park YS, Jin YH, Park CS. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;99: 2083-92.
- [5] Ghasemzadeh Rahbardar M, Hosseinzadeh H. Effects of rosmarinic acid on nervous system disorders: an updated review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2020;393: 1779-1795.
- [6] Pietsch K, Saul N, Chakrabarti S, Sturzenbaum SR, Menzel R, Steinberg CE. Hormetins, antioxidants and prooxidants: defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*. *Biogerontology* 2011;12: 329-47.
- [7] Gamaro GD, Suyenaga E, Borsoi M, Lermen J, Pereira P, Ardenghi P. Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats. *ISRN Pharmacol* 2011;2011: 451682.
- [8] Khamse S, Sadr SS, Roghani M, Hasanzadeh G, Mohammadian M. Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect in the kainate rat model of temporal lobe epilepsy: Underlying mechanisms. *Pharm Biol* 2015;53: 1818-25.
- [9] Grigoletto J, Oliveira CV, Grauncke AC, Souza TL, Souto NS, Freitas ML, Furian AF, Santos AR, Oliveira MS. Rosmarinic acid is anticonvulsant against seizures induced by pentylenetetrazol and pilocarpine in mice. *Epilepsy Behav* 2016;62: 27-34.

- [10] Coelho VR, Vieira CG, de Souza LP, Moyses F, Basso C, Papke DK, Pires TR, Siqueira IR, Picada JN, Pereira P. Antiepileptogenic, antioxidant and genotoxic evaluation of rosmarinic acid and its metabolite caffeic acid in mice. *Life Sci* 2015;122: 65-71.
- [11] Berdichevsky Y, Saponjian Y, Park KI, Roach B, Pouliot W, Lu K, Swiercz W, Dudek FE, Staley KJ. Staged anticonvulsant screening for chronic epilepsy. *Ann Clin Transl Neurol* 2016;3: 908-923.
- [12] Freitas ML, Oliveira CV, Mello FK, Funck VR, Figuera MR, Royes LFF, Furian AF, Larrick JW, Oliveira MS. Na(+), K(+)-ATPase Activating Antibody Displays in vitro and in vivo Beneficial Effects in the Pilocarpine Model of Epilepsy. *Neuroscience* 2018;377: 98-104.
- [13] Hwang ES, Kim HB, Choi GY, Lee S, Lee SO, Kim S, Park JH. Acute rosmarinic acid treatment enhances long-term potentiation, BDNF and GluR-2 protein expression, and cell survival rate against scopolamine challenge in rat organotypic hippocampal slice cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;475: 44-50.
- [14] Jensen MS, Yaari Y. Role of intrinsic burst firing, potassium accumulation, and electrical coupling in the elevated potassium model of hippocampal epilepsy. *J Neurophysiol* 1997;77: 1224-33.
- [15] Marchi N, Oby E, Batra A, Uva L, De Curtis M, Hernandez N, Van Boxel-Dezaire A, Najm I, Janigro D. In vivo and in vitro effects of pilocarpine: relevance to ictogenesis. *Epilepsia* 2007;48: 1934-46.
- [16] Groticke I, Hoffmann K, Loscher W. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Exp Neurol* 2007;207: 329-49.
- [17] Raghupathi R, Fernandez SC, Murai H, Trusko SP, Scott RW, Nishioka WK, McIntosh TK. BCL-2 overexpression attenuates cortical cell loss after traumatic brain injury in transgenic mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998;18: 1259-69.

- [18] Souza TL, Grauncke ACB, Ribeiro LR, Mello FK, Oliveira SM, Brant F, Machado FS, Oliveira MS. Cerebral Malaria Causes Enduring Behavioral and Molecular Changes in Mice Brain Without Causing Gross Histopathological Damage. *Neuroscience* 2018;369: 66-75.
- [19] Levesque M, Biagini G, de Curtis M, Gnatkovsky V, Pitsch J, Wang S, Avoli M. The pilocarpine model of mesial temporal lobe epilepsy: Over one decade later, with more rodent species and new investigative approaches. *Neurosci Biobehav Rev* 2021;130: 274-291.
- [20] Patel M. Targeting Oxidative Stress in Central Nervous System Disorders. *Trends Pharmacol Sci* 2016;37: 768-778.
- [21] Dulla CG, Janigro D, Jiruska P, Raimondo JV, Ikeda A, Lin CK, Goodkin HP, Galanopoulou AS, Bernard C, de Curtis M. How do we use in vitro models to understand epileptiform and ictal activity? A report of the TASK1-WG4 group of the ILAE/AES Joint Translational Task Force. *Epilepsia Open* 2018;3: 460-473.
- [22] Castillo M, Smith JK, Kwock L. Proton MR spectroscopy in patients with acute temporal lobe seizures. *AJNR Am J Neuroradiol* 2001;22: 152-7.
- [23] Mosienko V, Teschemacher AG, Kasparov S. Is L-lactate a novel signaling molecule in the brain? *J Cereb Blood Flow Metab* 2015;35: 1069-75.
- [24] Sharma AK, Jordan WH, Reams RY, Hall DG, Snyder PW. Temporal profile of clinical signs and histopathologic changes in an F-344 rat model of kainic acid-induced mesial temporal lobe epilepsy. *Toxicol Pathol* 2008;36: 932-43.

5. OUTROS RESULTADOS

Neste tópico serão descritos os demais resultados encontrados durante os experimentos *in vitro* e que não foram descritos e discutidos no artigo.

Para isso as fatias foram homogeneizadas conforme citado no artigo. Para técnica de western blot foram utilizados 50ug de proteína pré-corada em gel de SDS-poliacrilamida a 10% que foi posteriormente transferido para membrana de nitrocellulose 0,45um. As membranas foram bloqueadas com albumina sérica 5% por 1 hora e incubadas durante a noite com anticorpo contra c-Fos (1: 1000, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri), Caspase- 9 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Califórnia, EUA) e HSP60 (1:1000, Cell), foram utilizados anticorpos secundário apropriados de acordo com o primário (ROMERO-CALVO *et al.*, 2010).

Já os marcadores oxidativos carbonilação de proteínas, o conteúdo de 3-nitrotirosina (3-NT) e 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) foram analisados por método de dot blot de acordo com Souza, et, al. 2018 com algumas modificações.

Nos resultados obtidos por western blot e dot blot de fatias do modelo experimental *in vitro* 2, indução dos eventos epileptiformes por alto nível de K⁺ não foi observado alteração nos marcadores c-fos, hsp60 e caspase 9, o modelo de indução não alterou os valores como também o tratamento com AR não apresentou nenhuma modificação, todos os grupos se mantiveram estatisticamente iguais ao grupo controle.

Sabe-se que durante as crises epiléticas ocorre uma expressão elevada mas transitória da c-fos (NEHLIG *et al.*, 1998) e que a proteína hsp60 pode apresentar níveis aumentados em situações de estresse celular e processos crônicos inflamatórios, como ocorreu no estudo de Gamanazzo et al., 2015 onde ratos epilepticos apresentaram elevados níveis de hsp60.

Em ambas as análises de carbonilação das proteínas e 4-HNE não detectamos diferença no grupo High K⁺. Os níveis de 3-NT foram elevados nas fatias que passaram pela indução do modelo tipo-convulsivo por alto nível de K⁺, porém o tratamento com AR não apresentou efeito benéfico sobre esse marcador de dano oxidativo.

Embora o AR tenha atividade antioxidante bem relatada (KIM *et al.*, 2015) e tenha apresentado efeito benéfico no modelo *in vivo*, na concentração de 10uM não foi capaz de controlar o aumento nos níveis de 3-NT. Podemos atribuir a isso o fato de que no modelo *in vivo* os animais receberam um total de 3 doses de AR (30mg/kg) e no modelo tipo-convulsivo *in vitro* as fatias foram tratadas uma única vez com AR 10uM.

No experimento in vitro 3, onde utilizamos altos níveis de K^+ associado a pilocarpina não observamos diferença causada pela indução do modelo, bem como o AR sozinho ou junto com o modelo de indução não alterou os níveis dos marcadores testados.

Acreditamos que os nossos resultados se devem ao modelo tipo-convulsivo ser agudo e análise ser feita poucas horas depois da indução do modelo, o que pode não ser suficiente para vermos diferenças nesses marcadores.

6. CONCLUSÃO

Por fim, os resultados desse trabalho sugerem que o AR é um bom candidato complementar na terapia da epilepsia, visto que ele apresentou efeitos benéficos em modelo de atividade epileptiforme in vitro, diminuindo os altos níveis de lactato induzidos pelo modelo. Também foi eficaz diminuindo o estresse oxidativo e atenuando as comorbidades neuromotores em modelo de *SE* que é muito relevante pensando na prática clínica e na realidade dos pacientes acometidos por essa doença.

REFERÊNCIAS

- AHMED JUVALE, I. I.; CHE HAS, A. T. **The evolution of the pilocarpine animal model of status epilepticus**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2020.
- BERG, A. T.; SCHEFFER, I. E. New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century. **Epilepsia**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 1058–1062, 2011.
- BREITZIG, M. *et al.* 4-Hydroxy-2-nonenal: a critical target in oxidative stress?. **Am J Physiol Cell Physiol**, [s. l.], v. 311, p. 537–543, 2016. Disponível em: www.ajpcell.org.
- COELHO, V. R. *et al.* Behavioral and genotoxic evaluation of rosmarinic and caffeic acid in acute seizure models induced by pentylentetrazole and pilocarpine in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [s. l.], v. 389, n. 11, p. 1195–1203, 2016.
- CURIA, G. *et al.* The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Journal of Neuroscience Methods**, [s. l.], v. 172, n. 2, p. 143–157, 2008.
- DULLA, C. G. *et al.* How do we use in vitro models to understand epileptiform and ictal activity? A report of the TASK1-WG4 group of the ILAE/AES Joint Translational Task Force. **Epilepsia Open**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 460–473, 2018.
- FISHER, R. S. *et al.* Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 522–530, 2017.
- FISHER, R. S. Redefining epilepsy. **Current Opinion in Neurology**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 130–135, 2015.
- GALLUCCI NETO, J.; MARCHETTI, R. L. Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 323–328, 2005.
- GAMARO, G. D. *et al.* Effect of Rosmarinic and Caffeic Acids on Inflammatory and Nociception Process in Rats. **ISRN Pharmacology**, [s. l.], v. 2011, p. 1–6, 2011.
- GRIGOLETTO, J. *et al.* Rosmarinic acid is anticonvulsant against seizures induced by pentylentetrazol and pilocarpine in mice. **Epilepsy and Behavior**, [s. l.], v. 62, p. 27–34, 2016.
- HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now?. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 97, n. 6, p. 1634–1658, 2006.
- HERMANN, B.; SEIDENBERG, M.; JONES, J. The neurobehavioural comorbidities of epilepsy: can a natural history be developed?. **The Lancet Neurology**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 151–160, 2008.
- HITL, M. *et al.* **Rosmarinic Acid-Human Pharmacokinetics and Health Benefits**. [S. l.]: Georg Thieme Verlag, 2021.
- IBGE. **Projeção da população**. [S. l.], [s. d.].
- IUVONE, T. *et al.* The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid- β peptide-induced neurotoxicity. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 317, n. 3, p. 1143–1149, 2006.

- JAFARPOUR, S. *et al.* Seizure cluster: Definition, prevalence, consequences, and management. **Seizure**, [s. l.], v. 68, p. 9–15, 2019.
- JENSEN, M. S.; YAARI, Y. **Role of Intrinsic Burst Firing, Potassium Accumulation, and Electrical Coupling in the Elevated Potassium Model of Hippocampal Epilepsy**. [S. l.: s. n.], 1997. Disponível em: www.physiology.org/journal/jn. .
- KELM, M. A. *et al.* Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. **Phytomedicine**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 7–13, 2000.
- KIM, G. D. *et al.* **Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds**. [S. l.]: Springer Verlag, 2015.
- KIMURA, Y. *et al.* Studies on the Activities of Tannins and Related Compounds, X. Effects of Caffeetannins and Related Compounds on Arachidonate Metabolism in Human Polymorphonuclear Leukocytes. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 392–399, 1987.
- LAMUSUO, S. *et al.* [18F]FDG-PET Reveals Temporal Hypometabolism in Patients With Temporal Lobe Epilepsy Even When Quantitative MRI and Histopathological Analysis Show Only Mild Hippocampal Damage. **Archives of Neurology**, [s. l.], v. 58, n. 6, p. 933, 2001.
- LEITE, J. P. *et al.* Learning impairment in chronic epileptic rats following pilocarpine-induced status epilepticus. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, [s. l.], v. 23, n. 8, p. 681–683, 1990.
- LORES ARNAIZ, S. *et al.* Regional vulnerability to oxidative stress in a model of experimental epilepsy. **Neurochemical Research**, [s. l.], v. 23, n. 12, p. 1477–1483, 1998.
- LUAN, H. *et al.* **Rosmarinic acid protects against experimental diabetes with cerebral ischemia: relation to inflammation response**. [S. l.: s. n.], 2013. Disponível em: <http://www.jneuroinflammation.com/content/10/1/28>. .
- MARCHI, N. *et al.* In vivo and in vitro effects of pilocarpine: Relevance to ictogenesis. **Epilepsia**, [s. l.], v. 48, n. 10, p. 1934–1946, 2007.
- MAYTAL, J. *et al.* Low morbidity and mortality of status epilepticus in children. **Pediatrics**, [s. l.], v. 83, n. 3, p. 323–331, 1989.
- MOSHÉ, S. L. *et al.* Epilepsy: new advances. **The Lancet**, [s. l.], v. 385, n. 9971, p. 884–898, 2015.
- NADERALI, E. *et al.* The role of rosemary extract in degeneration of hippocampal neurons induced by kainic acid in the rat: A behavioral and histochemical approach. **Journal of integrative neuroscience**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 31–43, 2018.
- NEHLIG, A. *et al.* Local cerebral glucose utilization in adult and immature GAERS. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 32, n. 1–2, p. 206–212, 1998.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 66, n. 7, p. 1022–1037, 2003.
- PATEL, M. **Targeting Oxidative Stress in Central Nervous System Disorders**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2016.

- PEREIRA, M. B. *et al.* Study pharmacologic of the GABAergic and glutamatergic drugs on seizures and status epilepticus induced by pilocarpine in adult Wistar rats. **Neuroscience Letters**, [s. l.], v. 419, n. 3, p. 253–257, 2007.
- PIETSCH, K. *et al.* Hormetins, antioxidants and prooxidants: defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*. **Biogerontology**, [s. l.], v. 12, n. 4, p. 329–347, 2011.
- RAHBARDAR, M. G.; HOSSEINZADEH, H. Therapeutic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its active constituents on nervous system disorders. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 1100–1112, 2020.
- ROMERO-CALVO, I. *et al.* Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 401, n. 2, p. 318–320, 2010.
- RUTECKI, P. A.; YANG, Y. Ictal Epileptiform Activity in the CA3 Region of Hippocampal Slices Produced by Pilocarpine. **Journal of Neurophysiology**, [s. l.], v. 79, n. 6, p. 3019–3029, 1998.
- SANTOS, P. S. *et al.* β -caryophyllene Delivery Systems: Enhancing the Oral Pharmacokinetic and Stability. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 24, n. 29, p. 3440–3453, 2018.
- SARITA ALBAGLI. Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade. In: BIODIVERSIDADE, PESQUISA E DESENVOLVIMENTO NA AMAZÔNIA. [S. l.: s. n.], [s. d.].
- SCHEFFER, I. E. *et al.* ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 512–521, 2017.
- SCORZA, F. A. *et al.* The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned?. [s. l.], Disponível em: www.scielo.br/aabc.
- SEINFELD, S.; GOODKIN, H. P.; SHINNAR, S. Status Epilepticus. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 3, p. a022830, 2016.
- SHARMA, A. K. *et al.* Temporal profile of clinical signs and histopathologic changes in an F-344 rat model of kainic acid-induced mesial temporal lobe epilepsy. **Toxicologic Pathology**, [s. l.], v. 36, n. 7, p. 932–943, 2008.
- SOUZA, T. L. de *et al.* Cerebral Malaria Causes Enduring Behavioral and Molecular Changes in Mice Brain Without Causing Gross Histopathological Damage. **Neuroscience**, [s. l.], v. 369, p. 66–75, 2018.
- SREE NATH, L.; ALAM KHAN, S.; AHMAD, A. Computer aided screening of natural products in search of lead molecules for design and development of potent anti-inflammatory agents. **Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP)**, [s. l.], v. 3, n. 6, p. 496–503, 2014. Disponível em: www.sasublisher.com.
- TARAM, F. *et al.* Neuroprotection comparison of rosmarinic acid and carnosic acid in primary cultures of cerebellar granule neurons. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 11, 2018.
- TRINKA, E. *et al.* A definition and classification of status epilepticus - Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. **Epilepsia**, [s. l.], v. 56, n. 10, p. 1515–1523, 2015.

TURSKI, W. A. *et al.* **Seizures Produced by Pilocarpine in Mice: A Behavioral, Electroencephalographic and Morphological Analysis** *Brain Research*. [S. l.: s. n.], 1984.

VEZZANI, A. **CURRENT REVIEW IN BASIC SCIENCE Inflammation and Epilepsy**. [S. l.: s. n.], [s. d.].

VEZZANI, A. *et al.* **The role of inflammation in epilepsy**. [S. l.: s. n.], 2011.

VEZZANI, A.; VIVIANI, B. Neuromodulatory properties of inflammatory cytokines and their impact on neuronal excitability. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 96, p. 70–82, 2015.

ANEXO A. CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA (*in vivo*)



Comissão de Ética no Uso de Animais

de

Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do potencial efeito neuroprotetor do ácido rosmarínico no modelo de status epilepticus induzido pela pilocarpina em camundongos C57BL/6", protocolada sob o CEUA nº 7594020715, sob a responsabilidade de **Mauro Schneider Oliveira** e equipe: Clarissa Vasconcelos de Oliveira; Jéssica Grigoletto; Ana Cláudia Beck Graunck; Thaíde Lopes de Souza - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 24/09/2015.

We certify that the proposal "Evaluation of neuroprotective effect of rosmarinic acid in model of status epilepticus induced by pilocarpine in C57BL/6 mice", utilizing 240 isogenic mice (males and females), protocol number CEUA 7594020715, under the responsibility of **Mauro Schneider Oliveira** and team: Clarissa Vasconcelos de Oliveira; Jéssica Grigoletto; Ana Cláudia Beck Graunck; Thaíde Lopes de Souza - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 09/24/2015.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **07/2015** a **12/2017**

Área: **Fisiologia E Farmacologia**

Origem: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **2 a 2 meses**

N: **240**

Linhagem: **C57BL/6**

Peso: **20 a 30 g**

Local do experimento: Os experimentos propostos serão realizados em dois laboratórios no prédio 21 do Campus sede da Universidade Federal de Santa Maria: 1) Sala 5219 (prédio 21): Sala climatizada de 50m², dispõe de um espectrofotômetro UV-Visível, vibratomo, sistema completo para realização de experimentos de western blot, capela de exaustão, estufa para secagem de material, agitadores diversos, balanças digitais com precisão de 0,01 g, 0,001 g e 0,0001 g, potenciômetro, microscópio óptico comum, refrigeradores, freezers e vidraria em geral. Neste laboratório há também dois computadores ligados à internet e rede de internet sem fio para uso dos alunos assim como bibliografia específica da área (livros especializados). 2) Sala 5202 (prédio 21): Sala climatizada de 15m², subdividida em três salas menores onde são realizados os testes comportamentais. Possui computador com sistema de vídeo-monitoramento para labirinto de Barnes, testes de beam walk, campo aberto, nado forçado, anedônia, medo condicionado e esquia inibitória. Possui balança digital para pesagem de animais, assim como contadores manuais e cronômetros. Além disso, a equipe executora possui acesso à estrutura multiusuária que inclui sistema de purificação de água para fornecimento de água destilada e ultrapura, leitor de placas, fotodocumentador, centrifugas, máquina de gelo e freezer a -80°C entre outros equipamentos, bem como o biotério de experimentação animal do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFSM.

Santa Maria, 09 de novembro de 2021

Prof. Dra. Patrícia Severo de Nascimento

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria



Comissão de Ética no Uso de Animais

de
Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos antioxidante e anti-inflamatório do ácido rosmarínico em eventos tipo-convulsivo induzidos in vitro", protocolada sob o CEUA nº 9336090920 (00 00000), sob a responsabilidade de **Mauro Schneider Oliveira** e equipe; Tsane Bazanella Sampaio; Michele Pereira Moreira; Karine Gabriela da Costa; Fernanda Kulinski Mello; Bruna Neuberger; Marcela Buzetatto; Marcelo Calheiro Mendes - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 17/11/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of antioxidant and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid against in vitro-induced seizure-like events", utilizing 14 Heterogenics rats (14 males), protocol number CEUA 9336090920 (00 00000), under the responsibility of **Mauro Schneider Oliveira** and team; Tsane Bazanella Sampaio; Michele Pereira Moreira; Karine Gabriela da Costa; Fernanda Kulinski Mello; Bruna Neuberger; Marcela Buzetatto; Marcelo Calheiro Mendes - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 11/17/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 01/2021 a 12/2024

Área: **Departamento de Fisiologia E Farmacologia**

Origem: **Biotério externo**

Espécie: **Rates heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **21 a 28 dias**

N: **14**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **50 a 100 g**

Local do experimento: **Laboratório de Neurotoxicidade e Psicofarmacologia, prédio 21, sala 5219, UFSM.**

Santa Maria, 09 de novembro de 2021

Prof. Dra. Patrícia Severo do Nascimento
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Saulo Tadeu Lemos Pinto Filho
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Maria