

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

Karine Gabriela da Costa Sobral

**ASSOCIAÇÃO ENTRE B-CARIOFILENO E PREGABALINA APRESENTA
AÇÃO ANTICONVULSIVANTE AGUDA EM MODELO DE CRISES
EPILÉPTICAS INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL EM RATOS**

Santa Maria, RS
2021

Karine Gabriela da Costa Sobral

**ASSOCIAÇÃO ENTRE B-CARIOFILENO E PREGABALINA APRESENTA AÇÃO
ANTICONVULSIVANTE AGUDA EM MODELO DE CRISES EPILÉPTICAS
INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestra em Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira

Coorientadora: Profa. Dra. Tuane Bazanella Sampaio

Santa Maria, RS
2021

FICHA CATALOGRAFICA

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

Sobral, Karine Gabriela da Costa
ASSOCIAÇÃO ENTRE γ -CARIOFILENO E PREGABALINA APRESENTA
AÇÃO ANTICONVULSIVANTE AGUDA EM MODELO DE CRISES
EPILÉPTICAS INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL EM RATOS /
Karine Gabriela da Costa Sobral.- 2021.
52 p. ; 30 cm

Orientador: Mauro Schneider Oliveira
Coorientadora: Tuane Bazanella Sampaio
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2021

1. beta-cariofileno 2. Pregabalina 3. Epilepsia 4.
Neuroproteção 5. Agonista canabinoide tipo 2 I. Oliveira,
Mauro Schneider II. Sampaio, Tuane Bazanella III. 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 Petta CRB 10/1728.

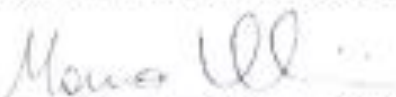
Declaro, KARINE GABRIELA DA COSTA SOBRAL, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, 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.

Karine Gabriela da Costa Sobral

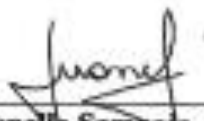
**ASSOCIAÇÃO ENTRE B-CARIOFILENO E PREGABALINA APRESENTA
AÇÃO ANTICONVULSIVANTE AGUDA EM MODELO DE CRISES
EPILEPTICAS INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestra em Farmacologia**.

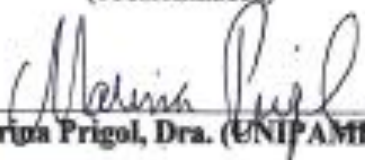
Aprovada em 23 de Julho de 2021



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



Tuane Bazanella Sampaio, Dra. (UFSM)
(coorientadora)



Mariana Prigol, Dra. (UNIPAMPA)



Marcel Henrique Marcondes Sari, Dr. (IDEAU)

Santa Maria, RS 2021

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, em especial aos meus pais Cláudio e Marinês pelo apoio em todas minhas decisões.

Ao meu esposo Lucas, por ser meu porto seguro, por segurar minha mão e não me deixar desistir.

Às minhas professoras, Ana Cristina e Karen Freitas por acreditarem em mim e me guiarem no caminho da pesquisa e da docência.

AGRADECIMENTOS

De maneira especial inicio esta dissertação agradecendo à Deus, pela saúde e por me dar forças para chegar até aqui.

Manifesto minha gratidão ao Prof. Dr. Mauro pela oportunidade de tê-lo como orientador de mestrado, por ter me permitido em 2018 realizar meu estágio final no Labneuro proporcionando-me uma experiência científica única. Agradeço pela confiança e por me permitir efetuar este trabalho, por toda sua dedicação, simplicidade, sabedoria, paciência e principalmente, pela acessibilidade que sempre demonstrou durante os anos em que estive no laboratório.

À Tuane, pela coorientação, amizade e carinho especial durante os 2 anos de mestrado. Obrigada por estar sempre pronta a me ajudar, por me ouvir, me aconselhar e principalmente, por acreditar em mim quando eu mais precisava.

Aos meus pais Claudio e Marinês, por todo amor e carinho verdadeiro, por me apoiarem neste sonho. Às minhas irmãs Adaiane e Laura, meus cunhados e sobrinhos por sempre acreditarem no meu sucesso.

Ao meu esposo Lucas, por ser minha segurança, meu abrigo e pelo apoio incondicional.

Aos meus amigos e colegas do Labneuro e Bioex, em especial às minhas amigas Bruna, Michele e Fernanda pela amizade verdadeira que construímos, por me acolherem tão bem e por terem se tornado uma família para mim em Santa Maria. Obrigada por tudo, vocês foram essenciais nesta minha jornada.

Aos IC's Marcela e Marcello, por estarem sempre dispostos a me ajudar, sou grata por tê-los conhecido.

Aos meus professores de graduação da URI-FW, em especial à professora Ana Cristina Stein por ter feito com que eu me apaixonasse pela farmacologia, por me aceitar como sua aluna de iniciação científica e principalmente, por pegar na minha mão e me guiar até este mestrado. Serei eternamente grata por tudo. Meu agradecimento especial também a professora Karen Freitas, por tantas coisas lindas que me falaste na minha defesa de TCC, nunca me esqueci, e graças ao seu apoio acreditei que seria capaz de ingressar no mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, que contribuíram para a minha formação científica. Aos animais, parte fundamental desse trabalho, obrigada por suas contribuições à ciência. Agradeço, também, à CAPES pelo apoio financeiro.

Finalmente, gostaria de agradecer à Universidade Federal de Santa Maria por proporcionar o conhecimento científico através da sua pós-graduação.

"E não nos cansemos de fazer o bem, pois no tempo próprio colheremos, se não desanimarmos"

(Gálatas 6:9).

RESUMO

ASSOCIAÇÃO ENTRE B-CARIOFILENO E PREGABALINA APRESENTA AÇÃO ANTICONVULSIVANTE AGUDA EM MODELO DE CRISES EPILÉPTICAS INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL EM RATOS

AUTORA: Karine Gabriela da Costa Sobral

ORIENTADOR: Mauro Schneider Oliveira

COORIENTADORA: Tuane Bazanella Sampaio

A epilepsia é uma doença neurológica crônica caracterizada por crises epiléticas recorrentes. No entanto, os anticonvulsivantes atuais são ineficazes em quase um terço dos pacientes além de causar efeitos adversos. O beta-cariofileno é um agonista dos receptores canabinóides do tipo 2 que exhibe atividades antioxidantes, antiinflamatórias e neuroprotetoras. A pregabalina é um anticonvulsivante usado como adjuvante no tratamento da epilepsia. Dado que a resistência aos medicamentos é cada vez mais frequente em pacientes com epilepsia, testamos a hipótese de que o beta-cariofileno associado à pregabalina apresenta efeito anticonvulsivante em um modelo de crises agudas induzida por pentilenotetrazol (PTZ) em ratos. Além disso, foi avaliado o possível efeito neuroprotetor da associação farmacológica no córtex frontal. Para tanto, ratos Wistar machos adultos foram submetidos a cirurgia estereotáxica para implantação de um eletrodo para conexão ao aparelho de eletroencefalograma. Os animais foram organizados em 8 grupos onde receberam os seguintes tratamentos: (i) beta-cariofileno 100 mg / kg, i.p .; (ii) pregabalina 40 mg / kg, i.p .; (iii) PTZ 60 mg / kg, i.p .; e / ou seus veículos com intervalo de 30 minutos entre cada administração e observados por 15 minutos após o último tratamento. Latência para crises mioclônicas, tônico-clônicas, duração e pontuação das crises foram medidas. Nossos resultados demonstraram que o beta-cariofileno em combinação com pregabalina aumenta a latência para o início das crises mioclônicas e tônico-clônicas induzidas por PTZ, bem como reduz a duração e o escore dessas crises. Esses dados foram corroborados pelo registro eletroencefalográfico. Em relação às análises moleculares, as crises epiléticas induzidas por PTZ causaram uma redução nos níveis do fator 2 relacionado ao eritroide 2 (Nrf2), que não foi evitada pelo tratamento combinado de beta-cariofileno com pregabalina. Digno de nota, níveis reduzidos de proteína glial fibrilar ácida (GFAP), c-Fos e 3-NT foram observados em animais que receberam ambos os tratamentos. Esses resultados são possivelmente devido a uma interação do tipo adição entre as duas substâncias. No entanto, estudos adicionais são necessários para investigar como esses achados são clínicos, bem como seus componentes subjacentes.

Palavras-chave: beta-cariofileno, pregabalina, epilepsia, neuroproteção, agonista canabinóide tipo 2

ABSTRACT

EVALUATION OF ANTICONVULSIVE ACTIVITY OF BETA-CARYOPHYLLENE IN ASSOCIATION WITH PREGABALIN IN A SEIZURE MODEL IN RATS

AUTHOR: Karine Gabriela da Costa Sobral

ADVISOR: Mauro Schneider Oliveira

CO-ADVISOR: Tuane Bazanella Sampaio

Epilepsy is a chronic neurological disease characterized by recurrent seizures. However, current anticonvulsants are ineffective in nearly a third of patients and can cause adverse effects. Beta-caryophyllene is agonist of type 2 cannabinoid receptors, which exhibits antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective activities. Pregabalin is an anticonvulsant used as an adjunct in the treatment of epilepsy. Given the fact that drug resistance is increasingly frequent in patients with epilepsy, we tested the hypothesis that the beta-caryophyllene associated with pregabalin exhibits anticonvulsant effect in a model of acute seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ) in rats. Furthermore, the possible neuroprotective effect of the pharmacological association in the frontal cortex were evaluated. For this purpose, adult male Wistar rats were connected to the electroencephalogram equipment, where they received the following treatments: (i) beta-caryophyllene 100 mg / kg, i.p.; (ii) pregabalin 40 mg / kg, i.p.; (iii) PTZ 60mg / kg, i.p.; and/or their vehicles with a 30-minute interval between each administration and observed for 15 minutes after the last treatment. Latency for myoclonic, tonic-clonic seizures, duration and seizure score were measured. Our results demonstrated that beta-caryophyllene in combination with pregabalin increases the latency to onset of PTZ-induced myoclonic and tonic-clonic seizures, as well as reducing the duration and score of these crises. These data were corroborated by the electroencephalographic recording. Regarding molecular analyses, PTZ-induced seizures caused a reduction in the Nuclear Factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) levels, which was not prevented by the combined treatment of beta-caryophyllene with pregabalin. Of note, decreased levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP), c-Fos and 3-NT was observed in animals that received both treatments. These results are possibly due to an addition-type interaction between both substances. However, additional studies are examined to investigate how clinical these findings are, as well as their underlying components.

Keywords: beta-caryophyllene, pregabalin, epilepsy, neuroprotection, type 2 cannabinoid agonist

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Referencial teórico

Figura 1- Classificação das crises epiléticas (nº licença: 5135660605615).....	15
Figura 2- Alterações moleculares decorrentes das crises epiléticas	18
Figura 3- Mecanismo de ação da pregabalina.....	21
Figura 4-Estrutura molecular do BCP e seus isômeros.....	23

Resultados:

Figura 1. Experimental design. Animals were subjected to stereotaxic surgery for electrodes implantation.....	41
Figura 2. Effect of BCP (100 mg / kg; i.p.) plus and PGB (40 mg / kg; i.p.) on the behavioral (A-D) and EEG (E-H) parameters induced by PTZ -induced seizures.	42
Figura 3. Effects of BCP (100 mg / kg, i.p.) plus PGB (40 mg / kg, i.p.) treatment and/or PTZ administration on the levels of GFAP, Nrf2, and c-Fos in the frontal cortex... ..	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-NT	3-nitrotirosina
AED	Fármacos anticonvulsivantes
AMPA	Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclica
BCP	Beta-cariofileno
CB1R	Receptor canabinóide tipo 1
CB2R	Receptor canabinóide tipo 2
EEG	Eletroencefalograma
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida
GPIs	Genes precoces imediatos
ILAE	Liga Internacional Contra a Epilepsia
Nrf2	Fator Nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2
PGB	Pregabalina
PTZ	Pentilenotetrazol
SNC	Sistema Nervoso Central
SUDEP	Morte súbita e inesperada na epilepsia
THC	Δ^9 -tetrahydrocannabinol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 EPILEPSIA.....	13
2.1.1 Definição	13
2.1.2 Causas	14
2.1.3 Epidemiologia	14
2.2 CRISES EPILÉPTICAS	15
2.2.1 Definição e classificação	15
2.2.2 Fisiopatologia e alterações moleculares	16
<i>2.2.2.1 Envolvimento astrocitário</i>	17
<i>2.2.2.2 Hiperexcitabilidade neuronal e estresse oxidativo</i>	17
2.2.3 Modelo de crises epiléticas: Pentilenotetrazol	18
2.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO.....	19
2.3.1 Fármacos anticonvulsivantes	19
<i>2.3.1.1 Pregabalina</i>	20
<i>2.3.1.2 Resistência farmacológica</i>	21
2.4 BETA-CARIOFILENO.....	22
2.4.1 Estrutura molecular	23
2.4.2 Características farmacocinéticas	23
2.4.3 Características farmacodinâmicas	24
<i>2.4.3.1 Envolvimento com o receptor canabinoide tipo 2</i>	24
3. OBJETIVO	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4. ARTIGO CIENTÍFICO	27
4.1 MANUSCRITO.....	28
5. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46
ANEXO A. CARTA DE APROVAÇÃO DA CEUA	51
ANEXO B- PERMISSÃO PARA REUSO E TRADUÇÃO DA FIGURA 1	52

1. INTRODUÇÃO

A epilepsia é uma doença neurológica que afeta cerca de setenta milhões de pessoas no mundo (WHO, 2019). Sua principal característica é a presença de crises epiléticas espontâneas e recorrentes com ocorrência transitória de sinais e / ou sintomas devido à atividade neuronal anormal excessiva ou síncrona no cérebro. De acordo com a manifestação inicial da crise, podem ser classificadas como focais, generalizadas ou de início desconhecido (FISHER *et al.*, 2017). O aumento da excitabilidade neuronal e a diminuição da inibição dessa excitabilidade, características das crises epiléticas, induzem a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), tornando o cérebro vulnerável a danos oxidativos e ao desenvolvimento de novas crises que também podem levar a lesões e morte celular (HALLIWELL, 2006).

O tratamento da epilepsia está focado no controle das crises por meio de medicamentos anticonvulsivantes. No entanto, cerca de 30% dos pacientes permanecem refratários, mesmo com o uso de politerapia (JAFARPOUR *et al.*, 2019). A pregabalina (PGB) é um exemplo de anticonvulsivante usado como adjuvante no tratamento da epilepsia. Sua estrutura molecular é semelhante à da gabapentina e seu mecanismo de ação é baseado em sua ligação à subunidade $\alpha 2\text{-}\delta$ do canal de cálcio dependente de voltagem, reduzindo o influxo de cálcio no terminal neuronal que determina seus efeitos analgésico, ansiolítico e anticonvulsivante (TAYLOR; ANGELOTTI; FAUMAN, 2007)

Uma vez que a monoterapia não é eficaz para todos os pacientes e que a politerapia pode causar efeitos adversos e alterações cognitivas, a descoberta de novos compostos com melhor eficácia e perfil de segurança é de fundamental importância (LÖSCHER *et al.*, 2020). Nesse contexto, os agonistas canabinoides têm sido eficazes no tratamento da epilepsia (MIZIAK *et al.*, 2019). O β -cariofileno (BCP) é um sesquiterpeno bicíclico natural encontrado em muitas plantas, e devido à sua ligação aos receptores canabinoides tipo 2 (CB2R) (ZHENG; KENNEY; LAM, 1992) exibe várias atividades biológicas, incluindo anti-inflamatória (GERTSCH *et al.*, 2008) antinociceptiva, anestésica local (GHELARDINI *et al.*, 2001), propriedades ansiolíticas e antidepressivas (BAHI *et al.*, 2014) e anticonvulsivante (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de um canabinoide natural (BCP) associado a um anticonvulsivante convencional (PGB) frente as crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) em ratos. Para isso, foram analisados parâmetros eletroencefalográficos (EEG), comportamentais e moleculares.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EPILEPSIA

A epilepsia é uma doença neurológica crônica, não transmissível, que afeta cerca de 70 milhões de pessoas em todo o mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). A definição e classificação correta desta doença é crucial para o diagnóstico e desenvolvimento de novos tratamentos. Até o momento, não há cura para a epilepsia, no entanto ela pode ser considerada resolvida em alguns indivíduos. Por exemplo, pacientes com o diagnóstico de uma síndrome epiléptica dependente da idade que ultrapassaram a idade aplicável ou aqueles que permaneceram livres de crises nos últimos 10 anos, sem uso de anticonvulsivantes nos últimos 5 anos (FISHER *et al.*, 2014).

Neste tópico, será abordado a definição atual da epilepsia de acordo com a Liga Internacional contra a Epilepsia (ILAE), sua etiologia, classificação, epidemiologia no Brasil e no mundo.

2.1.1 Definição

A epilepsia foi definida inicialmente em 2005, quando ainda era considerada uma “desordem ou distúrbio cerebral, vinculado a ocorrência de apenas uma crise epiléptica não provocada”(FISHER *et al.*, 2005). Tal definição criava muitas dúvidas aos pesquisadores e médicos, tendo em vista que o termo “desordem” pode ser mal compreendido pelo público minimizando a gravidade da epilepsia. Além disso, percebeu-se que a ocorrência de uma única crise epiléptica não tornava o indivíduo portador da epilepsia, pois estima-se que até 10% das pessoas em todo o mundo tenha ao menos uma crise durante a vida (FISHER, 2015).

Sendo assim, em 2014 a ILAE atualizou o conceito de epilepsia com o intuito de facilitar o diagnóstico desta. A epilepsia passou a ser definida como a ocorrência de (i) ao menos duas crises espontâneas – não provocadas por febre, insultos agudos ao sistema nervoso central (SNC) ou desequilíbrios tóxico-metabólicos graves - em um intervalo de pelo menos 24 horas; (ii) uma crise não provocada (ou reflexa) e uma probabilidade de novas crises semelhante ao risco de recorrência em geral (pelo menos 60%) após duas crises não provocadas, ocorrendo nos próximos 10 anos; ou (iii) o diagnóstico de uma síndrome epiléptica (FISHER *et al.*, 2014).

2.1.2 Causas

Embora muitos mecanismos estejam envolvidos na fisiopatologia da epilepsia, a causa da doença ainda é desconhecida em cerca de 50% dos casos em todo o mundo. As causas da epilepsia podem ser divididas nas seguintes categorias: estruturais, genéticas, infecciosas, metabólicas, imunológicas e desconhecidas (BERG; SCHEFFER, 2011). Alguns exemplos etiológicos em epilepsia incluem:

- Lesão cerebral associada a condições pré-natais ou perinatais, como hipóxia ou trauma durante o nascimento e baixo peso ao nascer;
- Anomalias congênitas ou condições genéticas com malformações cerebrais associadas;
- Trauma cranioencefálico
- Derrame com restrição de oxigênio para o cérebro;
- Infecções no SNC, como meningite, encefalite ou neurocisticercose,
- Certas alterações genéticas como canalopatias (alterações nos canais controlados por nucleotídeos)
- Tumor cerebral.

2.1.3 Epidemiologia

Globalmente, cerca de cinco milhões de pessoas são diagnosticadas com epilepsia a cada ano, sendo que quase 80% destes pacientes vivem em países de baixa e média renda (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2019). Isso se deve, provavelmente, ao aumento do risco de doenças endêmicas que afetam o SNC como malária e neurocisticercose, maior incidência de trauma cranioencefálico devido a acidentes de trânsito, infraestrutura médica, disponibilidade de programas preventivos de saúde e cuidados acessíveis (BEGHI, 2020).

No Brasil há poucos estudos sobre prevalência e incidência de epilepsia. Tendo em vista que a população estimada atualmente no Brasil pelo IBGE é de 211,8 milhões de pessoas, e baseando-se nos estudos internacionais, poderíamos então inferir aproximadamente 402 mil casos novos ao ano (estimativa de incidência anual de 190/100.000), 2,1 milhões de pessoas com epilepsia ativa (estimativa de 1% de prevalência pontual) e 10,6 milhões de pessoas que já

apresentaram crises epilépticas alguma vez nas suas vidas (IBGE, 2020; NETO; MARCHETTI, 2005).

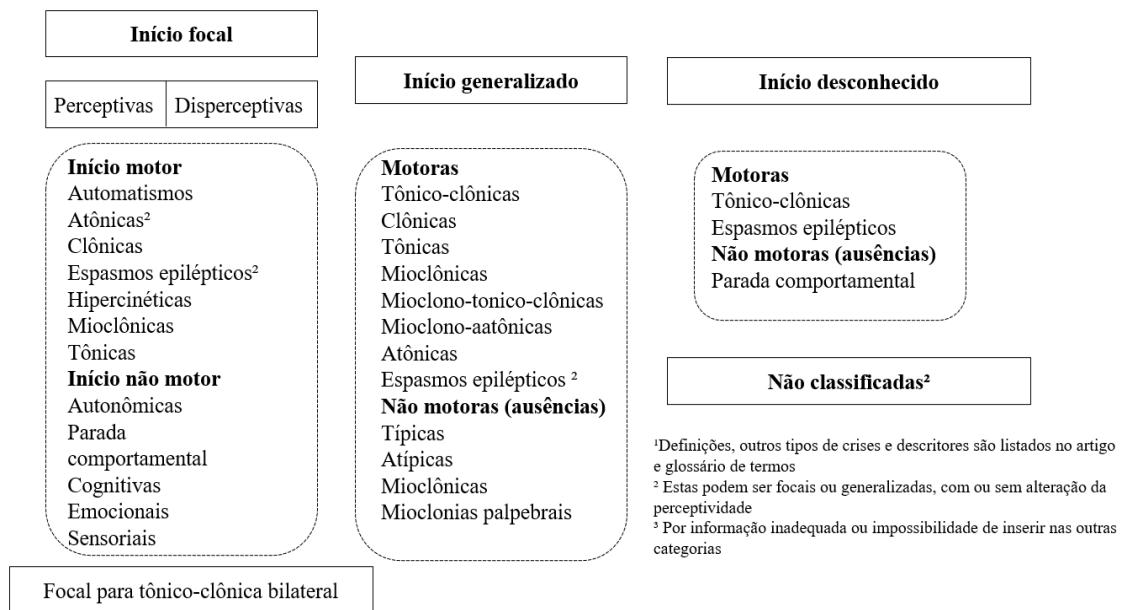
2.2 CRISES EPILÉPTICAS

As crises epilépticas podem ser consideradas como a principal característica para diagnóstico da epilepsia. Neste tópico, será abordado a classificação correta e atualizada desse sintoma, bem como uma breve revisão sobre sua fisiopatologia, importantes marcadores moleculares e o modelo considerado padrão ouro para pesquisa de novos anticonvulsivantes.

2.2.1 Definição e classificação

A ILAE, por meio da Comissão de Classificação e Terminologia, classifica uma crise epiléptica como “uma ocorrência transitória de sinais e / ou sintomas devido a atividade neuronal anormal excessiva ou síncrona no cérebro” (FISHER *et al.*, 2017). A figura 1 esquematiza a classificação atual dos diferentes tipos de crises, de acordo com a atualização da ILAE.

Figura 1- Classificação das crises epilépticas (nº licença: 5135660605615)



Fonte: Adaptado de Fisher et al. (2017)

As crises são classificadas primeiramente como focais, generalizadas ou de início desconhecido, referindo-se à manifestação inicial da crise. As crises de início focal podem ser então classificadas como perceptivas (quando não há perda de consciência) ou disperceptivas (quando há perda de consciência). Além disso, as crises focais também podem ser subclassificadas de acordo com sinais e sintomas motores ou não motores de início de crise (FISHER *et al.*, 2017).

As crises generalizadas são assim chamadas por originarem-se nas redes neurais de ambos os hemisférios (direito e esquerdo), e podem ser divididas em crises motoras e não motoras, sendo a segunda conhecida como crises de ausência. É comum que durante uma crise generalizada a consciência do paciente seja prejudicada. As crises motoras de início generalizado podem ser classificadas como: tônico-clônicas, clônicas, tônicas, atônicas, mioclônicas, mioclônica-tônico-clônicas, mioclônicas- atônicas e espasmos epiléticos. Já as crises não motoras de início generalizado são classificadas como crises de ausência típicas ou atípicas (por exemplo, com início ou término menos abruptos ou com alterações anômalas do tônus), convulsões mioclônicas e mioclonia palpebral (FISHER *et al.*, 2017).

É importante ressaltar que a força tarefa recomenda que uma crise só pode ser classificada como de início focal ou generalizado quando há um alto grau de confiança, caso contrário classifica-se a crise como sendo de início desconhecido. Tais crises podem apresentar espasmos motores, não motores, tônico-clônicos, epiléticos e parada comportamental, e mais tarde pode ser classificada como de início focal ou generalizado (FISHER *et al.*, 2017).

2.2.2 Fisiopatologia e alterações moleculares

Existem diferentes mecanismos para explicar como as crises epiléticas iniciam, sendo o desequilíbrio entre a excitação e a inibição dos neurônios o mais aceito (CARDOZO, 2016).

Em situações de repouso, há uma alta concentração de potássio intracelular e uma alta concentração de sódio extracelular, que somados a outros íons culminam em um potencial transmembrana líquido de -60 mV (CARDOZO, 2016). Sendo assim, o potencial de repouso é um estado de equilíbrio eletroquímico em que não há disparo neuronal. Por outro lado, quando há uma mudança no potencial de membrana ocorre a abertura dos canais de sódio, iniciando-se assim o processo de despolarização e geração do potencial de ação, sendo essencial para a comunicação neuronal no SNC. Portanto, qualquer alteração neste equilíbrio eletroquímico pode causar despolarização e promover uma excitabilidade anormal, contribuindo para o

desenvolvimento de novas crises e, conseqüentemente, a epileptogênese (FARRELL; WOLFF; TESKEY, 2017). As principais alterações abordadas neste tópico estão ilustradas na figura 5.

2.2.2.1 *Envolvimento astrocitário*

Evidências crescentes sugerem que alterações na função dos astrócitos contribuem para o desenvolvimento da epilepsia (BINDER; STEINHÄUSER, 2021; BOISON; STEINHÄUSER, 2018; SANZ; GARCIA-GIMENO, 2020). Os astrócitos são células gliais que executam uma gama de funções essenciais para o desenvolvimento e fisiologia do sistema nervoso participando da homeostase iônica, metabolismo energético, formação de redes sinápticas e modulação da transmissão sináptica (FREEMAN, 2010).

Porém, durante uma crise epiléptica pode ocorrer a formação de astrócitos reativos, processo denominado astrogliose ou astrogliose reativa (ESCARTIN; GUILLEMAUD; CARRILLO-DE SAUVAGE, 2019). Os astrócitos reativos apresentam mudanças marcantes na sua forma e função, que são frequentemente mensurados pelos níveis da proteína ácida fibrilar glial do filamento intermediário (GFAP). Devido a alterações na expressão de canais e receptores, estes astrócitos podem contribuir para o aumento da excitabilidade neuronal e para o desenvolvimento da epilepsia (HUBBARD *et al.*, 2016).

2.2.2.2 *Hiperexcitabilidade neuronal e estresse oxidativo*

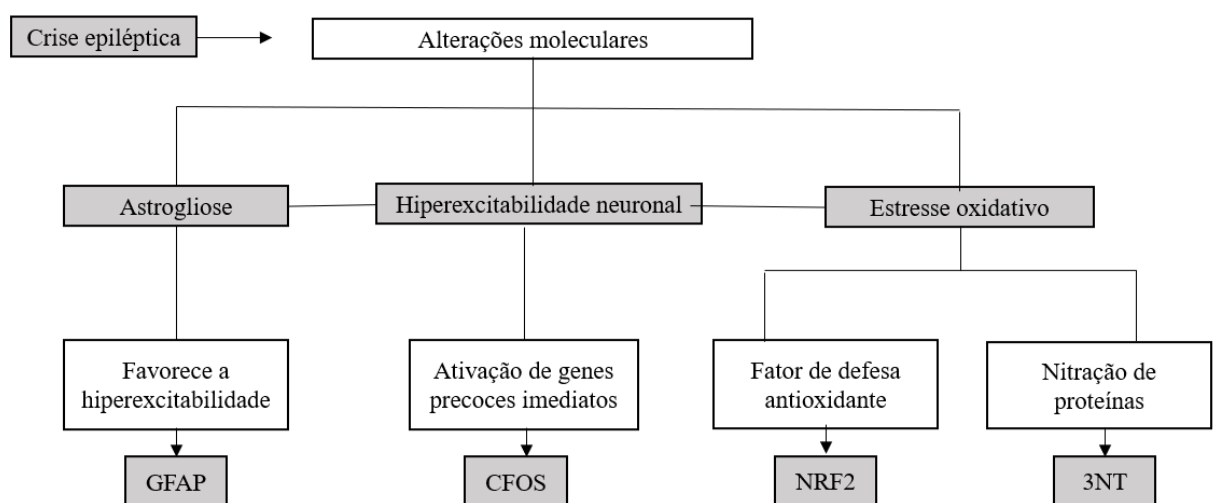
O aumento da excitabilidade neuronal induz a ativação de genes precoces imediatos (GPIs), como o proto-oncogene c-Fos, que desencadeiam a expressão de outros genes responsáveis por alterações a longo prazo nos neurônios (SZYNDLER *et al.*, 2009). A expressão de c-Fos é elevada de forma rápida e transitória durante as crises epilépticas e por isso é comumente utilizado para avaliar a atividade neuronal após estímulos externos como é o caso do modelo de crises epilépticas induzidas por PTZ (NEHLIG, 1998).

Uma das principais conseqüências da alta excitabilidade provocada pelas crises epilépticas é a produção excessiva de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) que tornam o cérebro vulnerável ao dano oxidativo e ao desenvolvimento de novas crises, podendo também levar a injúria e morte celular (HALLIWELL, 2006). Para manter o equilíbrio redox fisiológico, as células são dotadas de uma série de mecanismos de defesa antioxidante, tanto enzimáticos como não enzimáticos. Neste sentido, a transcrição dessas proteínas citoprotetoras é controlada pelo Fator Nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), que desempenha um

papel central na regulação do estado redox celular regulando mais de 200 genes envolvidos nos mecanismos de defesa antioxidante, citoproteção, metabolismo intermediário e função mitocondrial, sendo considerado um potencial alvo terapêutico para muitas doenças neurológicas, incluindo a epilepsia (WANG *et al.*, 2014).

No entanto, quando a produção de EROs e ERN ultrapassa a capacidade de controle dos mecanismos de defesa antioxidante, temos o estado de estresse oxidativo. As EROs contribuem para o dano oxidativo de proteínas, resultando em modificações estruturais irreversíveis, como a introdução de grupamentos carbonil em resíduos de aminoácidos (carbonilação) e a nitração/nitrosilação destas (resíduos de tirosina de proteínas sofrem ataque por ONOO-) (FEDOROVA; BOLLINENI; HOFFMANN, 2014; PEARSON-SMITH; PATEL, 2017). Tais alterações induzem perda de função proteica, que resulta em um aumento da susceptibilidade do neurônio à neurodegeneração e eventos deletérios subcelulares que promovem a epileptogênese (FEDOROVA; BOLLINENI; HOFFMANN, 2014).

Figura 2. Alterações moleculares decorrentes das crises epiléticas



Fonte: Autora (2021)

2.2.3 Modelo de crises epiléticas: Pentilenotetrazol

O PTZ é uma substância pró-convulsivante que age como antagonista do receptor ácido gama aminobutírico (GABA)_A, suprimindo a função das sinapses inibitórias, resultando em um aumento da atividade neuronal. Muitos anticonvulsivantes foram descobertos por meio deste teste, como etossuximida, trimetadona e valproato, assim como os benzodiazepínicos e barbitúricos, por exemplo (LÖSCHER, 2009).

Ademais, este modelo pode ser utilizado tanto para induzir crises epilépticas agudas, como em modelos de epilepsia, tendo em vista que se utilizado cronicamente pode induzir o aparecimento de crises epilépticas espontâneas recorrentes (SCHMIDT, J., 1987). Portanto, as doses administradas variam de acordo com o objetivo do trabalho. Por exemplo, quando o objetivo é induzir uma única crise epiléptica, doses baixas de 20 a 40 mg/kg, de PTZ administradas intraperitonealmente resultam em crises do tipo ausência, enquanto doses maiores (acima de 40mg/kg) podem resultar em crises clônicas, tônicas e tônico-clônicas (LÖSCHER, 2009).

No entanto, para que um protocolo seja considerado um modelo de epilepsia é necessário que o animal apresente crises epilépticas que evoluam espontaneamente após um período latente pós-insulto ou dentro de um período de desenvolvimento consistente com a condição humana (BARKER-HALISKI; STEVE WHITE, 2020). Nestes casos, utiliza-se o modelo chamado “kindling químico” onde o PTZ é injetado de forma sequencial ao longo de vários dias, até que o animal apresente crises espontâneas, favorecendo o estudo da fisiopatologia e epileptogênese (SHIMADA; YAMAGATA, 2018).

2.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

Nos últimos anos, novos fármacos anticonvulsivantes (AEDs) foram lançados no mercado, porém, apesar da liberação de um novo agente farmacológico quase anualmente, a epilepsia permanece não controlada em um terço dos pacientes (GOLYALA; KWAN, 2017). Os pacientes que não respondem a um mínimo de dois AEDs são considerados pacientes refratários, ou seja, que apresentam resistência farmacológica (PANEBIANCO *et al.*, 2019).

A epilepsia não controlada está associada a uma pior qualidade de vida, aumento de comorbidades físicas e psicológicas e aumento do risco de morte súbita inexplicada (SUDEP) (SILLS; ROGAWSKI, 2020). Portanto, neste tópico serão abordados os principais mecanismos de ação dos AEDs, dentre eles a PGB - um AED novo utilizado como adjuvante em pacientes com epilepsia refratária - bem como alguns fatores que contribuem para o entendimento da resistência farmacológica.

2.3.1 Fármacos anticonvulsivantes

Os AEDs têm como principal objetivo a prevenção da ocorrência de crises epilépticas, embora não haja evidências de que eles tenham propriedades modificadoras da doença. Tais

fármacos atuam, basicamente, por quatro mecanismos diferentes: (1) modulação de canais de sódio dependentes de voltagem (por exemplo, fenitoína, carbamazepina, lamotrigina), canais de cálcio dependentes de voltagem (por exemplo etossuximida) e canais de potássio dependentes de voltagem (por exemplo, retigabina); (2) aumento da neurotransmissão inibitória mediada por GABA (por exemplo, benzodiazepínicos, tiagabina, vigabatrina); (3) atenuação da neurotransmissão excitatória mediada pelo glutamato (por exemplo, perampanel); e (4) modulação da liberação de neurotransmissores por meio de uma ação pré-sináptica (por exemplo, levetiracetam, brivaracetam, gabapentina, pregabalina) (ROGAWSKI; LÖSCHER; RHO, 2016).

Como resultado principal da ação destes fármacos, ocorre a modificação das propriedades de excitabilidade intrínseca dos neurônios ou alteração da neurotransmissão inibitória ou excitatória rápida, reduzindo a capacidade dos neurônios de disparar potenciais de ação em alta taxa e reduzindo a sincronização em conjuntos neuronais localizados (GOLYALA; KWAN, 2017).

2.3.1.1 Pregabalina

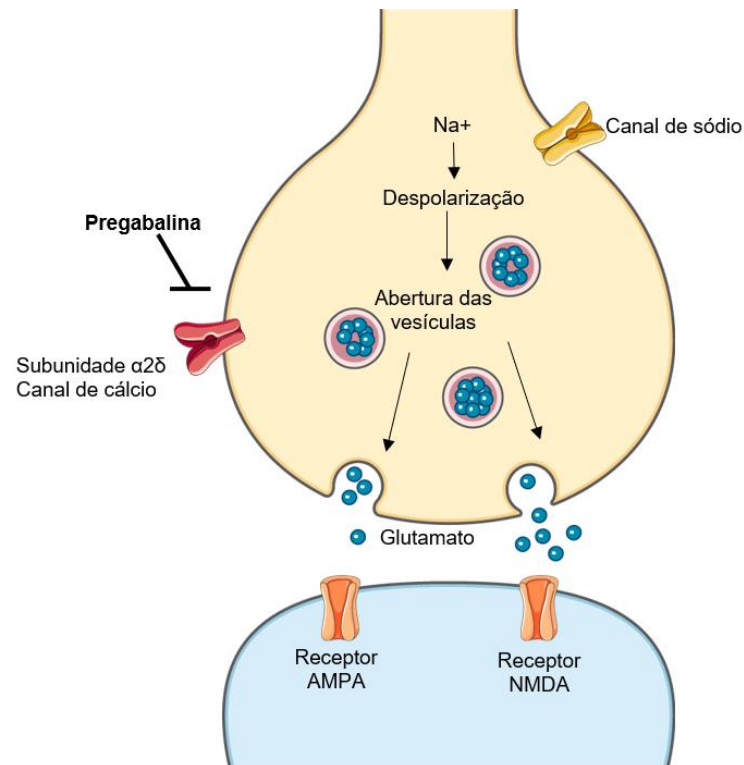
A pregabalina (PGB) é um aminoácido relacionado ao ácido gama-aminobutírico (GABA), que devido a seus resultados promissores em vários modelos de crises epiléticas, como eletrochoque máximo, PTZ, bicuculina e pirotoxina foi aprovado na União Europeia e nos Estados Unidos entre os anos de 2004 e 2005, respectivamente, como terapia adjuvante em crises parciais refratárias (RYVLIN, 2008).

Sua estrutura molecular é similar à do GABA e a da Gabapentina, no entanto, seu mecanismo de ação não parece estar relacionado ao GABA, conforme representado na figura 4. Por possuir uma alta afinidade com a subunidade α -2- δ -uma proteína auxiliar do canal de cálcio dependente de voltagem tipos P, Q e N no SNC- a PGB age reduzindo o influxo de cálcio no terminal neuronal e, conseqüentemente, reduzindo a liberação de neurotransmissores como glutamato, noradrenalina e substância P (DELAHOY; THOMPSON; MARSCHNER, 2010). Acredita-se que esse mecanismo de ação também medeie seus efeitos ansiolítico e analgésico. Adicionalmente, a PGB também atua nos receptores AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropilônico), reduzindo indiretamente a liberação sináptica de noradrenalina (TAYLOR; ANGELOTTI; FAUMAN, 2007).

Estudos clínicos revelam vantagens significativas da PGB quando comparada à gabapentina. Devido a algumas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas, como a

melhor absorção pela via oral e maior potência (3 a 6 vezes maior), possui maior efetividade no controle de crises parciais com ou sem generalização secundária, em pacientes polimedicados ou com epilepsia decorrente de tumores cerebrais, neuropatia diabética dolorosa e neuralgia pós herpética, fibromialgia, transtorno de ansiedade generalizada, síndrome das pernas inquietas, entre outras (PANEBIANCO *et al.*, 2019).

Figura 3: Mecanismo de ação da pregabalina



Fonte: Autora (2021)

2.3.1.2 Resistência farmacológica

A resistência farmacológica consiste na persistência das crises epilépticas espontâneas e recorrentes quando o paciente utiliza corretamente os medicamentos e/ou quando se faz necessária a combinação de diferentes fármacos. Cerca de 30% dos pacientes com epilepsia possuem esta resistência, resultando em aumento de hospitalizações, visitas ao pronto-socorro, prejuízo significativo na qualidade de vida, impactando negativamente a produtividade, interrompendo as atividades diárias, como os estudos e o trabalho dos pacientes e cuidadores (JAFARPOUR *et al.*, 2019). Além disso, crises epilépticas não são controladas especialmente

do tipo tônico-clônicas, são o principal fator de risco para SUDEP (RYVLIN; RHEIMS; LHATOO, 2019).

A resistência farmacológica representa hoje um dos maiores desafios para o tratamento da epilepsia. Apesar de muitos anos de pesquisa, os mecanismos subjacentes à resistência aos medicamentos permanecem amplamente desconhecidos (LÖSCHER *et al.*, 2020). Teoricamente, existem pelo menos três padrões clínicos de resistência, sendo eles: 1) Resistência *ab initio*, quando o paciente nunca apresenta liberdade das crises, desde o início da doença; 2) Resistência retardada, quando inicialmente o paciente fica livre das crises mas em um determinado momento elas retornam de forma incontrolável; e 3) Resistência flutuante, consistindo em um padrão crescente ou decrescente de controle das crises (SCHMIDT, D.; LÖSCHER, 2009).

Alguns fatores clínicos também podem estar relacionados, como idade de início, epilepsia sintomática, neuroimagem anormal, eletroencefalografia anormal, histórico de retardo mental, distúrbios neuropsiquiátricos, convulsão febril prolongada e status epilepticus (KALILANI *et al.*, 2018). Outros fatores de risco foram propostos e modelos de previsão de resistência aos medicamentos gerados, mas, como em muitos estudos nesta área, normalmente há uma falta de replicação e evidências robustas para muitas dessas sugestões.

2.4 BETA-CARIOFILENO

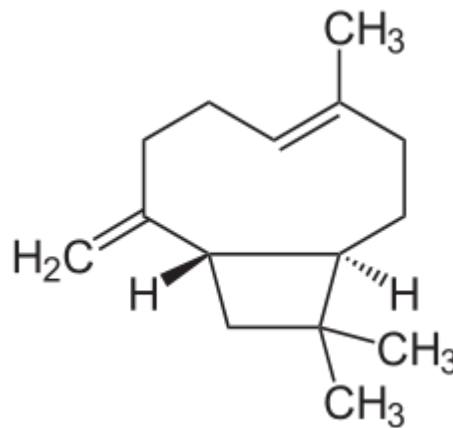
O BCP é um sesquiterpeno bicíclico volátil composto de lactona abundantemente encontrado nos óleos essenciais de muitas plantas comestíveis, incluindo especiarias como cravo (*Syzygium aromaticum*), orégano (*Origanum vulgare*), canela (*Cinnamomum spp.*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e pimenta-do-reino (*Piper nigrum*). Além disso, é aprovado pela Food and Drug Administration (FDA) dos Estados Unidos e agências europeias como aditivo alimentar, intensificador de sabor e agente aromatizante (CHICCA *et al.*, 2014).

Foi relatado existir em mais de mil plantas fornecendo ampla disponibilidade natural e acessibilidade. É também um dos mais importantes constituintes (cerca de 35%) do óleo essencial da *Cannabis sativa L.*, importante fonte tradicional de canabinoides derivados de plantas ou fitocannabinoides (GHELARDINI *et al.*, 2001).

2.4.1 Estrutura molecular

O BCP concentra-se em praticamente todas as partes das plantas incluindo folhas, flores, raízes, rizomas, caules e cascas. Quimicamente, o BCP é conhecido como trans- (1R, 9S) -8-Metileno-4,11,11 trimetilbiciclo (7.2.0) undeceno e também reconhecido por vários outros sinônimos, como cariofileno, trans-cariofileno, (-)-trans-cariofileno, β - (E)-cariofileno e L-cariofileno. Na natureza, o (E)-BCP é geralmente encontrado junto com pequenas quantidades de seus isômeros (Z)- β -caryophyllene [(Z)-BCP ou isocariofileno] e α -umuleno (ou alfa-cariofileno) ou em mistura com seu produto de oxidação, óxido de BCP (figura 2).

Figura 4-Estrutura molecular do BCP



Fonte: Wikimedia Commons (2020)

2.4.2 Características farmacocinéticas

Por se tratar de uma molécula volátil e sensível a oxidação o BCP se oxida com facilidade quando exposto ao ar, formando o óxido de BCP. Como consequência, apresenta baixa solubilidade em meio aquoso afetando significativamente sua absorção no trato gastrointestinal, o que pode diminuir substancialmente sua biodisponibilidade e eficácia pela via oral (SANTOS *et al.*, 2018).

Entretanto, apresenta alta lipofilicidade representada por valores de log P 6,78, o que é indicativo de sua alta penetração através da barreira hematoencefálica e transferência placentária. Porém, ainda não existem estudos em humanos que determinem sua farmacocinética incluindo metabolismo e biodisponibilidade (SHARMA *et al.*, 2016).

2.4.3 Características farmacodinâmicas

Com base em suas propriedades variadas, o BCP pode ser considerado um agente multifuncional e polifarmacológico para fins terapêuticos de doenças complexas. Até o momento o BCP parece apresentar efeitos farmacológicos importantes como gastroprotetor, cardioprotetor, antioxidante, hepatoprotetor, nefroprotetor, anti-inflamatório, antimicrobiano, imunomodulador (MACHADO *et al.*, 2018) e anticâncer (FIDYT *et al.*, 2016).

Resumidamente, foi relatado que o BCP regula a expressão e liberação de várias citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, fatores de crescimento, fatores de transcrição, genes, enzimas, moléculas de adesão, receptores, proteínas de choque térmico e apoptose, bem como proteínas associadas ao ciclo celular, modula numerosos alvos moleculares em diferentes doenças e distúrbios alterando a expressão gênica além de vias de sinalização molecular e celular por interação direta com os alvos para impedir a progressão e o desenvolvimento de vários processos patológicos (SHARMA *et al.*, 2016).

Devido a sua capacidade de ligação aos CB2R, o BCP é cada vez mais estudado para o tratamento de doenças neurológicas como dor, ansiedade, epilepsia, depressão e doença de Alzheimer (PERTWEE, 2009). A seguir, pretende-se abordar seu mecanismo de ação baseado na ligação aos CB2R.

2.4.3.1 Envolvimento com o receptor canabinoide tipo 2

Existem dois tipos de receptores canabinoides sendo eles os receptores canabinoides tipo 1 (CB1R) e os receptores canabinoides tipo 2 (CB2R), ambos acoplados a proteína G. Os CB1R podem ser encontrados principalmente no sistema nervoso central (SNC), especialmente no hipocampo, gânglios da base e cerebelo (e, em menor extensão, no tálamo e tronco cerebral inferior), onde está localizado nas pré-sinapses excitatórias e inibitórias sendo o principal responsável pelos efeitos psicoativos do Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) (MORANO *et al.*, 2020).

Acreditava-se que o CB2R estaria confinado ao sistema nervoso periférico e às células do sistema imunológico, porém estudos recentes com roedores e primatas sugerem que o CB2R também é expresso no cérebro e nos neurônios (JORDAN; XI, 2019). Estudos sugerem que os CB2R são induzidos em resposta a vários insultos como a hipóxia induzida por isquemia, dor crônica, doença de Alzheimer e esclerose múltipla (BASAVARAJAPPA *et al.*, 2017;

PROSPÉRO-GARCÍA *et al.*, 2019). Acredita-se que esta regulação positiva do CB2R do cérebro pode ter relação com efeitos neuroprotetores (MACHADO *et al.*, 2018).

Quando os CB2R são ativados, seja por endocanabinoides ou por ligantes exógenos, ocorre a ativação de uma cascata de sinalização mediada por $G\alpha i$, resultando na inibição da adenil ciclase, ativação de quinases intracelulares (incluindo a via PI3K-Akt) e extracelulares reguladas por sinal (ERK) com supressão da atividade neuronal. O CB2R também interage com a via da MAP quinase (IBSEN; CONNOR; GLASS, 2017).

O BCP é o primeiro ligante CB2R funcional derivado da Cannabis sativa com uma estrutura molecular diferente dos canabinoides clássicos. Assim, representa um composto promissor para o tratamento de muitas doenças neurológicas, dentre elas a epilepsia, por se tratar de um novo tipo de agonista seletivo para o CB2R (GERTSCH *et al.*, 2008).

Em estudos de modelagem computacional foi demonstrado que o anel ciclobutano presente na molécula do BCP se liga seletivamente ao sítio de ligação tetrahydrocânico no CB2R, interagindo competitivamente com o mesmo local de ligação de THC, inibindo a produção de monofosfato de adenosina cíclica (cAMP). Além disso, o BCP parece ser um potente ativador da via G_o , que leva à liberação de Ca^{2+} intracelular e também ativa as vias de sinalização mediadas por Erk1/2 e p38 (CAO; YANG; WANG, 2020; SHARMA *et al.*, 2016).

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito anticonvulsivantes da associação do BCP com a PGB em um modelo experimental de crises epiléticas agudas em ratos, bem como os possíveis mecanismos moleculares envolvidos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Verificar se a associação do BCP com PGB atenua as crises epiléticas no modelo agudo de crises epiléticas induzidas por PTZ em ratos Wistar machos;

- b) Investigar os efeitos do tratamento com BCP em associação com PGB sobre parâmetros moleculares de excitabilidade neuronal, astrocítica e estresse oxidativo no córtex cerebral de ratos Wistar machos submetidos ao modelo agudo de crises epiléticas induzidas por PTZ;

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 “ *β -caryophyllene and pregabalin association presents anticonvulsive action in an acute model of seizures induced by pentylentetrazole*”

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).

4.1 MANUSCRITO

**ANTICONVULSANT ACTIVITY OF B-CARYOPHILLENE IN ASSOCIATION
WITH PREGABALIN IN A SEIZURE MODEL IN RATS**

Karine Gabriela da Costa Sobral¹, Bruna Neuberger¹, Fernanda Kulinski Mello¹, Michele Pereira Mallman¹, Tuane Bazanella Sampaio¹, Mauro Schneider Oliveira^{1*}

¹Graduate Program in Pharmacology, 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 a common chronic neurological disease. The hallmark of epilepsy is recurrent, unprovoked seizures. Unfortunately, drug resistance is frequent in patients with epilepsy, and therefore improved therapeutic strategies are needed. In the present study, we tested the effect of pregabalin in association with beta-caryophyllene, an FDA-approved food additive and naturally occurring agonist of cannabinoid receptor subtype 2 against pentylenetetrazol (PTZ)-induced seizures in rats. In addition, selected neurochemical parameters were evaluated in the cerebral cortex. Adult male Wistar rats received beta-caryophyllene (100 mg/kg), pregabalin (40 mg/kg) or their combination before PTZ (60 mg/kg). Appropriated vehicle-treated control groups were included for each treatment. Animals were monitored by video-EEG and the latency to myoclonic seizures, latency to tonic-clonic seizures, tonic-clonic seizure duration and overall seizure score were measured. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) release, erythroid-related factor 2 (Nrf2), c-fos and 3-nitrotyrosine (3-NT) levels were evaluated in the frontal cortex. We found that beta-caryophyllene plus pregabalin increased the latency to PTZ-induced myoclonic and tonic-clonic seizures and decreased the tonic-clonic seizure duration and overall seizure score. Interestingly, lower levels of GFAP, c-Fos and 3-NT were observed in animals receiving beta-caryophyllene and pregabalin treatments. Our results suggest a possible additive effect of beta-caryophyllene plus pregabalin against PTZ induced-seizures.

Keywords: beta-caryophyllene, pregabalin, epilepsy, seizures, EEG

1.Introduction

Epilepsy is one of the most prevalent neurological diseases and affects about seventy million people worldwide (World Health Organization, 2019). The most striking characteristic of epilepsy is the occurrence of seizures. These are defined as transient occurrence of signs and/or symptoms due to abnormal excessive or synchronous neuronal activity in the brain (Fisher et al., 2017). Indeed, seizures largely impact the quality of life of patients with and their families. In fact, considering several neurological diseases, epilepsy appears among those with the highest morbidity and mortality, according to the worldwide estimates of disability-adjusted life years in patients with epilepsy (World Health Organization, 2019).

Pharmacological treatment of epilepsy is centered on seizure control with anticonvulsants. However, about 30% of patients remain refractory even with polytherapy (Löscher et al., 2020). In addition to insufficient seizure control, refractory patients present increased risk of side effects and negative drug interactions (Löscher et al., 2020). Pregabalin (PGB) is an example of anticonvulsant used as add-on in the treatment of epilepsy. PGB binds to the $\alpha 2\text{-}\delta$ subunit of voltage-gated calcium channels, decreasing calcium influx and thus neuronal excitability, eventually eliciting analgesic, anxiolytic, and anticonvulsant effects (Taylor et al., 2007).

Beta-caryophyllene (BCP) is a food additive approved for human use by the Food and Drug Administration (FDA) and has an excellent safety profile (Bastaki et al., 2020). In addition, this naturally occurring molecule is a selective full agonist at subtype 2 cannabinoid receptors (Gertsch et al., 2008). Interestingly, BCP displays several biological activities, including anti-inflammatory (Gertsch et al., 2008) antinociceptive, local anesthetic (Ghelardini et al., 2001) anxiolytic, antidepressant and anticonvulsant properties (Bahi et al., 2014). For instance, it has been showed that BCP attenuates seizures induced by kainic acid pentylentetrazol (PTZ) (Oliveira et al., 2016a) and maximal electroshock (Tchekalarova et al., 2018) in rodents.

Since monotherapy is not effective for many patients and that polytherapy often causes adverse effects (Löscher et al., 2020), discovery of therapeutic alternatives with better efficacy and improved safety profile is crucial. In the present study we evaluated the effect a combination between BCP and PGB on the seizures induced by pentylentetrazol (PTZ) in rats. We hypothesized that BCP and PGB would have additive beneficial effects on seizure activity. To test the hypothesis, electroencephalographical (EEG), behavioral and molecular parameters were analyzed.

2. Materials and methods

2.1 Animals and reagents

Male Wistar rats (100-130 g; 30-60 day-old) obtained from animal facility of the Federal University of Santa Maria (UFSM, Brazil) were used. Animals were housed in polypropylene cages (41 × 34 × 16 cm) and maintained in a room with controlled light (12:12 h light-dark cycle), temperature (24 ± 1 °C) and humidity (55%). Animals had free access to filtered water and species appropriate food (Nuvilab®, Colombo, PR, Brazil). Rats were housed in groups of 3 - 4 animals/cage with environmental enrichment. All experimental protocols were conducted with previous approval of the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria (7405310519/2019).

PTZ (Sigma-Aldrich) was dissolved in 0.9% NaCl to 60 mg/mL. BCP (Sigma-Aldrich) was dissolved in 0.9% NaCl to 100 mg/mL containing 0.05% of Tween 80 and PGB was dissolved in 0.9 % NaCl to 40 mg/mL.

2.2 Experimental design

Animals were randomly divided into eight groups: I) Control (vehicle + vehicle + vehicle, n = 5); II) BCP (BCP + vehicle + vehicle, n =4); III) PGB (vehicle + PGB + vehicle, n =6); IV) BCP + PGB (BCP + PGB + vehicle, n =5) V) PTZ (vehicle + vehicle + PTZ, n =9); VI) BCP+PTZ (BCP + vehicle + PTZ, n =7); VII) PGB + PTZ (vehicle + PGB + PTZ, n =6); and VIII) BCP+PGB+PTZ (BCP + PGB + PTZ, n =7) (Figure 1).

At the beginning of the experiment animals were placed in an acrylic cylinder (25 cm diameter). After thirty minutes of acclimatization, the animals received an intraperitoneal (i.p.) injection of BCP (100 mg/kg or its vehicle (NaCl 0.9% containing 5% Tween 80) (Oliveira et al., 2016a). Thirty minutes later, PGB (40 mg/kg, i.p.) or its vehicle (NaCl 0.9%) was administered (Hamada et al., 2018) Subsequently, after thirty minutes, rats received PTZ (60 mg/kg, i.p.) or its vehicle (NaCl 0.9%) to induce the experimental model (Oliveira et al., 2016a) (Figure 1). Injection volumes were 1 ml/kg. Behavioral parameters were monitored for 15 min.

Then, all animals were anesthetized with thiopental (125 mg/kg) and lidocaine (10 mg/kg) and transcardiac perfusion with saline was carried out. Brains were removed and the frontal cortices were dissected for molecular analyses.

2.3 Seizure analysis

All experiments were conducted during the light phase of circadian cycle. Seizure behavior was monitored through a network camera (Axis Communications) placed near the acrylic cylinder. During 15 min after the PTZ injection, latency to myoclonic seizures, latency to generalized tonic-clonic seizures, and the duration of the first seizure were measured. An overall seizure score was calculated according to Ferraro et al. (1999).

EEG was monitored in a subset of animals ($n = 2-3$ per group) through epidural electrodes. The procedures and hardware for electrode implantation and EEG recordings are described in detail elsewhere (Mello et al., 2020).

2.4 Western blot and dot blot assays

Western blot analysis was performed according to Funck et al. (2014) with some modifications. The frontal cortices were rapidly removed and homogenized on ice in tissue protein extraction reagent T-PER (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) supplemented with EDTA and phosphatase inhibitors Cocktail (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Homogenates were then centrifuged at $10,000 \times g$ at 4°C for 10 minutes and the supernatant were kept for Western blot. Protein content was determined colorimetrically, using bovine serum albumin (BSA) as the standard, by the bicinchoninic acid method (Pierce BCA protein assay kit, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA). Forty μg of total protein and pre-stained molecular weight standard (Sigma-Aldrich) were submitted to 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to $0.45 \mu\text{m}$ nitrocellulose membranes. These were blocked with 5% (w/v) BSA and incubated overnight at 4°C with primary antibodies for c-Fos (1:1000, SAB2100833) (Sigma-Aldrich), GFAP (1:500, sc-9065) (Santa Cruz Biotechnology) or Nrf2 (1:1000, Sc-722) (Santa Cruz Biotechnology). After washing, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with peroxidase-linked secondary antibodies (1:10000, A0545 (Sigma-Aldrich) and developed for luminescence (Clarity ECL, Bio-Rad) in a ChemiDoc™ MP Image System (Bio-Rad). Protein Immunoreactivity was measured with ImageJ software. Ponceau S served as loading control (Romero-Calvo et al., 2010).

To analyze the content of 3-nitrotyrosine (3-NT), the dot blot technique was performed according to Souza et al. (2018). In brief, an aliquot (1 μg) of T-PER supernatant was applied under vacuum to a $0.45 \mu\text{m}$ nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with a 5%

(w/v) non-fat dry milk and incubated for 3 h at room temperature with primary antibodies for 3-NT (1:200, A21285) (Thermo Fisher Scientific). After washing, the membranes were incubated for 1 h at room temperature with peroxidase-linked secondary antibodies (1:10000, A0545 (Sigma-Aldrich) and developed for luminescence (Clarity ECL, Bio-Rad) in a ChemiDoc™ MP Image System (Bio-Rad). Protein Immunoreactivity was measured with ImageJ software.

2.5 Statistical analysis

Data were analyzed by two-way or three-way analysis of variance (ANOVA) followed by post hoc Duncan's multiple comparison test when appropriate. Probability values less than 0.05 ($P < 0.05$) were considered statistically significant. All data are expressed as mean + standard error of the mean (S.E.M.). Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA) and Statistica 10.0 (StatSoft Inc., La Jolla, CA, USA) software.

3. Results

3.1 Behavioral and EEG findings

To evaluate the potential additive anticonvulsant effect of BCP and PGB, we monitored the behavioral and EEG alterations during PTZ-induced seizures in rats. Importantly, two-way ANOVA revealed a significant interaction between PGB and BCP treatments on the latency to the first myoclonic seizure (Fig. 2A). Thus, animals that received both treatments (BCP + PGB) had a delayed onset of myoclonic seizures when compared to those of PTZ group or those that received only one of them (BCP or PGB), indicating the additive anticonvulsant effect of the association. In addition, post hoc analysis demonstrated that the BCP and PGB co-treatment increased the latency (Fig. 2B) and decreased the score of tonic-clonic seizure (Fig. 2D) when compared to animals that received only drug vehicles and PTZ. The score value was calculated according to Ferraro et al. (1999). Lastly, PGB displayed a main effect in all the behavioral parameters analyzed (Fig. 2A - 2D). Of note, EEG recordings (Fig. 2E – 2H) corroborated the behavioral findings.

3.2 Molecular findings

In light of the anticonvulsant effect of BCP in association with PGB, molecular analyses were carried out in the frontal cortex aiming to understand the underlying mechanisms. In relation to astrocyte reactivity, three-way ANOVA revealed a main effect of BCP treatment and a trend of BCP + PGB co-treatment ($p = 0.081$) in reducing the GFAP immunocontent. Animals treated with BCP+PGB+PTZ displayed a significant decrease in the GFAP levels when compared to those from PTZ group, as shown in Fig. 3B.

On the other hand, regarding antioxidant markers, we observed a main effect of the PTZ group in reducing the Nrf2 levels. However, neither the combined treatment (BCP+PGB) nor the only one of them were not enough to prevent this PTZ effect (Fig. 3C). Regarding the neuronal excitability assessed by c-Fos levels, three-way ANOVA revealed a significant interaction between the BCP, PGB and PTZ factors, demonstrating the potential neuroprotective of the BCP+PGB association (Fig. 3D). An important oxidative damage footprint is the nitration of tyrosine residues originating 3-NT. In this context, PTZ-induced seizures increased 3-NT levels, while BCP+PGB+PTZ group showed a significant reduction of this marker when compared to those from PTZ group (figure 3E).

4. Discussion

Our results reveal that the treatment with the combination of BCP+PGB protected against myoclonic and tonic-clonic seizures, since they presented an increase in the latency for the PTZ-induced seizures, as well as a shorter duration and low score in tonic-clonic seizure. Of note, the delay in the onset of seizures also occurred at the electrophysiological level.

Furthermore, the treatment showed some beneficial properties in molecular analyses. The anticonvulsant effect of association between BCP and PGB was observed both against the PTZ-induced myoclonic and tonic-clonic seizures. The increase in the latency for the onset of seizures is indicative of a potential anticonvulsant effect (Alachkar et al., 2020). In addition, the ability to make the duration of crises shorter is relevance, since the longer the duration of the seizure, the greater the neuronal damage in patients. Similarly, the score of tonic-clonic seizure assesses the severity of the seizure (Lado et al., 2002). A low score indicates that the seizure was less aggressive and, consequently, poses a lower risk of severe and irreversible neurological damage (Ferraro et al., 1999).

BCP is a volatile bicyclic lactone compound sesquiterpene found abundantly in the essential oils of many edible plants (Chicca et al., 2014). It is also one of the most important constituents (about 35%) in marijuana essential oil (*Cannabis sativa* L.) (Ghelardini et al., 2001). Due to its ability to bind to CB2R, it is increasingly studied for the treatment of neurological diseases such as pain, anxiety, depression, and epilepsy (Bahi et al., 2014; Pertwee, 2009). In previous studies by our research group, it was observed that BCP presented protection against myoclonic crises in this same model of crises, however, in mice, it did not present protection against tonic-clonic crises (Oliveira et al., 2016b), Surprisingly, when combined with PGB, it provided protection against both crises, which shows that the combination is advantageous.

PGB is an anticonvulsant used as adjuvant therapy in the treatment of focal epilepsy. Its mechanism of action is based on its affinity with the $\alpha 2$ - δ subunit, an auxiliary protein of the P, Q and N voltage-dependent calcium channel in the CNS, reducing the influx of calcium in the neuronal terminal and, consequently, reducing the release of neurotransmitters such as glutamate, norepinephrine and substance P (Taylor et al., 2007). Considering that BCP and PGB act by different mechanisms, and that experimental data provide evidence that cannabinoid agonists, such as BCP, can modify the activity of some anticonvulsant drugs in rats, we believe that such effects found in our studies may be due to some pharmacological interaction between them (Miziak et al., 2019).

Seizure activity can lead to neurodegeneration, contributing to disease progression (Ercegovac et al., 2010). Seizures can influence the appearance of severe morphological and biochemical changes in pre-existing astrocytes. In addition, migration of GFAP-positive astrocytes may occur close to the lesion or proliferation of a new population of astrocytes, being considered an important indicator of neurotoxicity and neuronal damage (Ajtai and Kálmán, 1998). Importantly, our data demonstrated that the co-treatment with BCP+PGB reduced the GFAP levels in the cerebral cortex of animals when compared to those from PTZ group, probably indicating an attenuation of the astrocyte reactivity and, consequently, of the neuronal excitability.

In a model of chronic astrogliosis, the animals developed spontaneous tonic-clonic attacks generated by neuronal hyperexcitability, suggesting an involvement between astrocytic pathways and the development of seizures (Robel et al., 2015). Therefore, we can suggest that our treatment attenuates the formation of reactive astrocytes, which is a mechanism that should be further explored as a possible anticonvulsant effect. This effect may be due to some mechanism still unknown to PGB or BCP. In a literature review, some studies show that the

PGB is able to reduce GFAP levels. However, in our study, it did not find this beneficial PGB effect on the GFAP levels, evidencing the importance of BCP+PGB association (Daneshdoust et al., 2017; Nader et al., 2018).

Thus, the increase in neuronal excitability induces the activation of immediate early genes (GPIs), such as the proto-oncogene c-Fos, commonly used to assess neuronal activity after external stimuli (Szyndler et al., 2009). We observed a significant reduction in c-Fos levels with BCP and PGB suggesting that such treatment may be beneficial in preventing epileptogenesis, since increased hyperexcitability favors excessive production of reactive oxygen species, in addition to make the brain vulnerable to oxidative damage and development of new crises (Halliwell, 2006; Nehlig, 1998).

Also, we evaluated the levels of Nrf2, a key factor in the regulation of cellular antioxidant response (Baird and Yamamoto, 2020). Herein, we found a main effect of PTZ, suggesting that as seizures decrease the antioxidant support, making the brain vulnerable to new crises, favoring disease progression. In fact, PTZ-induced seizures induced an increase in the 3-NT levels in the frontal cortex of rats. Of highlight, we observed a significant reduction in 3-NT levels after simultaneous administration of BCP with PGB, when compared to the PTZ group. 3-NT is considered a marker for protein nitration and is formed when protein tyrosine residues are attacked by ONOO⁻ (Pearson-Smith and Patel, 2017). The treatment's ability to reduce this marker may be indicative of neuroprotection, as protein nitration induces post-translational modifications acting as mediators of deleterious subcellular events that promote epileptogenesis (Fedorova et al., 2014).

5. Conclusion

Finally, our results suggest a better effect of PGB when combined with BCP in a PTZ-induced acute crisis model. We believe that the combination of an anticonvulsant drug with a natural compound such as BCP is promising and beneficial for the treatment of refractory epilepsy, although more studies are needed. Our treatment appears to prevent myoclonic and generalized seizures and protect animals' brains from major neurological damage.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the student fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES). This work was supported by grants

from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grants #304708/2015-1 and 308011/2019-8). This study was 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.

References

Ajtai, B.M., Kálmán, M., 1998. Glial fibrillary acidic protein expression but no glial demarcation follows the lesion in the molecular layer of cerebellum. *Brain Res.* 802, 285–288. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(98\)00622-2](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(98)00622-2)

Alachkar, A., Ojha, S.K., Sadeq, A., Adem, A., Frank, A., Stark, H., Sadek, B., 2020. Experimental Models for the Discovery of Novel Anticonvulsant Drugs: Focus on Pentylentetrazole-Induced Seizures and Associated Memory Deficits. *Curr. Pharm. Des.* 26, 1693–1711. <https://doi.org/10.2174/1381612826666200131105324>

Bahi, A., Al Mansouri, S., Al Memari, E., Al Ameri, M., Nurulain, S.M., Ojha, S., 2014. β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. *Physiol. Behav.* 135, 119–124. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.06.003>

Bastaki, M., Api, A.M., Aubanel, M., Bauter, M., Cachet, T., Demyttenaere, J.C.R., Diop, M.M., Harman, C.L., Hayashi, S., Krammer, G., Lu, V., Marone, P.A., Mendes, O., Renskers, K.J., Schnabel, J., Tsang, S.Y., Taylor, S. V., 2020. Dietary administration of β -caryophyllene and its epoxide to Sprague-Dawley rats for 90 days. *Food Chem. Toxicol.* 135, 110876. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110876>

Chicca, A., Caprioglio, D., Minassi, A., Petrucci, V., Appendino, G., Tagliatela-Scafati, O., Gertsch, J., 2014. Functionalization of β -Caryophyllene Generates Novel Polypharmacology in

the Endocannabinoid System. *ACS Chem. Biol.* 9, 1499–1507.
<https://doi.org/10.1021/cb500177c>

Daneshdoust, D., Khalili-Fomeshi, M., Ghasemi-Kasman, M., Ghorbanian, D., Hashemian, M., Gholami, M., Moghadamnia, A., Shojaei, A., 2017. Pregabalin enhances myelin repair and attenuates glial activation in lysolecithin-induced demyelination model of rat optic chiasm. *Neuroscience* 344, 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.12.037>

Ercegovac, M., Jovic, N., Simic, T., Beslac-Bumbasirevic, L., Sokic, D., Djukic, T., Savic-Radojevic, A., Matic, M., Mimic-Oka, J., Pljesa-Ercegovac, M., 2010. Byproducts of protein, lipid and DNA oxidative damage and antioxidant enzyme activities in seizure. *Seizure* 19, 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2010.02.002>

Fedorova, M., Bollineni, R.C., Hoffmann, R., 2014. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. *Mass Spectrom. Rev.* 33, 79–97. <https://doi.org/10.1002/mas.21381>

Ferraro, T.N., Golden, G.T., Smith, G.G., Jean, P.S., Schork, N.J., Mulholland, N., Ballas, C., Schill, J., Buono, R.J., Berrettini, W.H., 1999. Mapping loci for pentylentetrazol-induced seizure susceptibility in mice. *J. Neurosci.* 19, 6733–6739. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.19-16-06733.1999>

Fisher, R.S., Cross, J.H., French, J.A., Higurashi, N., Hirsch, E., Jansen, F.E., Lagae, L., Moshé, S.L., Peltola, J., Roulet Perez, E., Scheffer, I.E., Zuberi, S.M., 2017. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. *Epilepsia* 58, 522–530. <https://doi.org/10.1111/epi.13670>

Funck, V.R., Ribeiro, L.R., Pereira, L.M., Oliveira, C.V. de, Grigoletto, J., Figuera, M.R., Royes, L.F.F., Furian, A.F., Oliveira, M.S., 2014. Long-term decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity after pilocarpine-induced status epilepticus is associated with nitration of its alpha subunit. *Epilepsy Res.* 108, 1705–1710. <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2014.09.025>

Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S., Racz, I., Chen, J.Z., Xie, X.Q., Altmann, K.H., Karsak, M., Zimmer, A., 2008. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 9099–9104. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803601105>

Ghelardini, C., Galeotti, N., Di Cesare Mannelli, L., Mazzanti, G., Bartolini, A., 2001. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. *Farmaco* 56, 387–389. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01092-8](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01092-8)

Halliwell, B., 2006. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J. Neurochem.* 97, 1634–1658. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x>

Hamada, N.M., Ashour, R.H., Shalaby, A.A., El-Beltagi, H.M., 2018. Calcitonin potentiates the anticonvulsant and antinociceptive effects of valproic acid and pregabalin in pentylenetetrazole-kindled mice. *Eur. J. Pharmacol.* 818, 351–355. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.11.003>

Lado, F.A., Laureta, E.C., Moshé, S.L., 2002. Seizure-induced hippocampal damage in the mature and immature brain. *Epileptic Disord.* 4, 83–97.

Löscher, W., Potschka, H., Sisodiya, S.M., Vezzani, A., 2020. Drug Resistance in Epilepsy: Clinical Impact, Potential Mechanisms, and New Innovative Treatment Options. *Pharmacol. Rev.* 72, 606–638. <https://doi.org/10.1124/pr.120.019539>

Mello, F.K., Freitas, M.L., Souto, N.S., Zorzi, V.N., Moreira, M.P., Neuberger, B., Costa, K.G., Figuera, M.R., Royes, L.F., Furian, A.F., Oliveira, M.S., 2020. Neuroprotective effects of thromboxane receptor antagonist SQ 29,548 after pilocarpine-induced status epilepticus in mice. *Epilepsy Res.* 160, 106277. <https://doi.org/10.1016/j.epilepsyres.2020.106277>

Miziak, B., Walczak, A., Szponar, J., Pluta, R., Czuczwar, S.J., 2019. Drug-drug interactions between antiepileptics and cannabinoids. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 15, 407–415. <https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1605355>

Nader, M.A., Ateyya, H., El-Shafey, M., El-Sherbeeney, N.A., 2018. Sitagliptin enhances the neuroprotective effect of pregabalin against pentylenetetrazole-induced acute epileptogenesis

in mice: Implication of oxidative, inflammatory, apoptotic and autophagy pathways. *Neurochem. Int.* 115, 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.10.006>

Nehlig, A., 1998. Mapping of neuronal networks underlying generalized seizures induced by increasing doses of pentylenetetrazol in the immature and adult rat: A c-Fos immunohistochemical study. *Eur. J. Neurosci.* 10, 2094–2106. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00223.x>

Oliveira, C.C. de, Oliveira, C.V. de, Grigoletto, J., Ribeiro, L.R., Funck, V.R., Grauncke, A.C.B., Souza, T.L. de, Souto, N.S., Furian, A.F., Menezes, I.R.A., Oliveira, M.S., 2016a. Anticonvulsant activity of β -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsy Behav.* 56, 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.12.040>

Oliveira, C.C. de, Oliveira, C.V. de, Grigoletto, J., Ribeiro, L.R., Funck, V.R., Grauncke, A.C.B., Souza, T.L. de, Souto, N.S., Furian, A.F., Menezes, I.R.A., Oliveira, M.S., 2016b. Anticonvulsant activity of β -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsy Behav.* 56, 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.12.040>

Pearson-Smith, J., Patel, M., 2017. Metabolic Dysfunction and Oxidative Stress in Epilepsy. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 2365. <https://doi.org/10.3390/ijms18112365>

Pertwee, R.G., 2009. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. *Br. J. Pharmacol.* 156, 397–411. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00048.x>

Robel, S., Buckingham, S.C., Boni, J.L., Campbell, S.L., Danbolt, N.C., Riedemann, T., Sutor, B., Sontheimer, H., 2015. Reactive Astroglia Causes the Development of Spontaneous Seizures. *J. Neurosci.* 35, 3330–3345. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1574-14.2015>

Romero-Calvo, I., Ocón, B., Martínez-Moya, P., Suárez, M.D., Zarzuelo, A., Martínez-Augustín, O., de Medina, F.S., 2010. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal. Biochem.* 401, 318–320. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.02.036>

Souza, T.L. de, Grauncke, A.C.B., Ribeiro, L.R., Mello, F.K., Oliveira, S.M., Brant, F., Machado, F.S., Oliveira, M.S., 2018. Cerebral Malaria Causes Enduring Behavioral and Molecular Changes in Mice Brain Without Causing Gross Histopathological Damage. *Neuroscience* 369, 66–75. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.10.043>

Szyndler, J., Maciejak, P., Turzyńska, D., Sobolewska, A., Taracha, E., Skórzewska, A., Lehner, M., Bidziński, A., Hamed, A., Wisłowska-Stanek, A., Krząścik, P., Płaźnik, A., 2009. Mapping of c-Fos expression in the rat brain during the evolution of pentylenetetrazol-kindled seizures. *Epilepsy Behav.* 16, 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.07.030>

Taylor, C.P., Angelotti, T., Fauman, E., 2007. Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: The calcium channel $\alpha 2-\delta$ (alpha2–delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery. *Epilepsy Res.* 73, 137–150. <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2006.09.008>

Tchekalarova, J., da Conceição Machado, K., Gomes Júnior, A.L., de Carvalho Melo Cavalcante, A.A., Momchilova, A., Tzoneva, R., 2018. Pharmacological characterization of the cannabinoid receptor 2 agonist, β -caryophyllene on seizure models in mice. *Seizure* 57, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.03.009>

World Health Organization, 2019. WHO | Epilepsy: a public health imperative, Who.

Figure legends

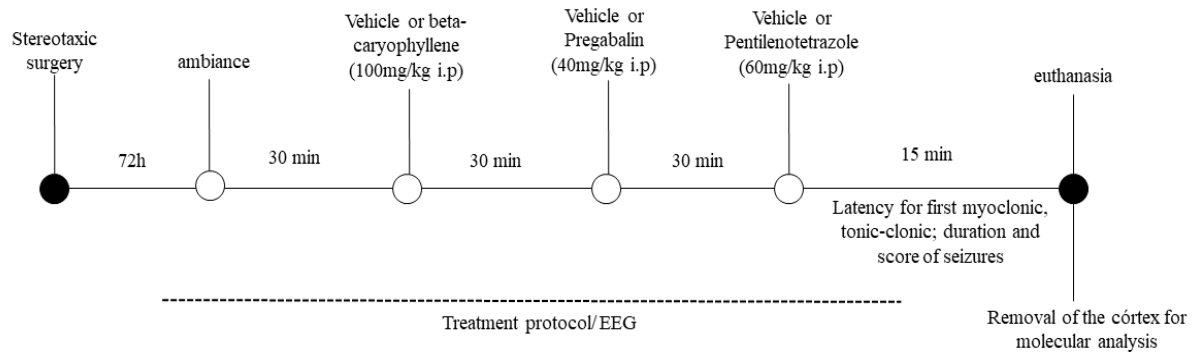


Figure 1. Experimental design. Animals were subjected to stereotaxic surgery for electrodes implantation. Approximately 72 h after, EEG recordings begun. After thirty minutes of acclimatization, the animals received an intraperitoneal injection of BCP (100 mg / kg; i.p.) or its vehicle (NaCl 0.9%). Thirty minutes later, PGB (40 mg / kg, i.p.), and thirty minutes later PTZ (60 mg / kg, i.p.) or its vehicle (NaCl 0.9%). All animals were observed for 15 min and immediately carried out for transcardial perfusion and frontal cortex dissection.

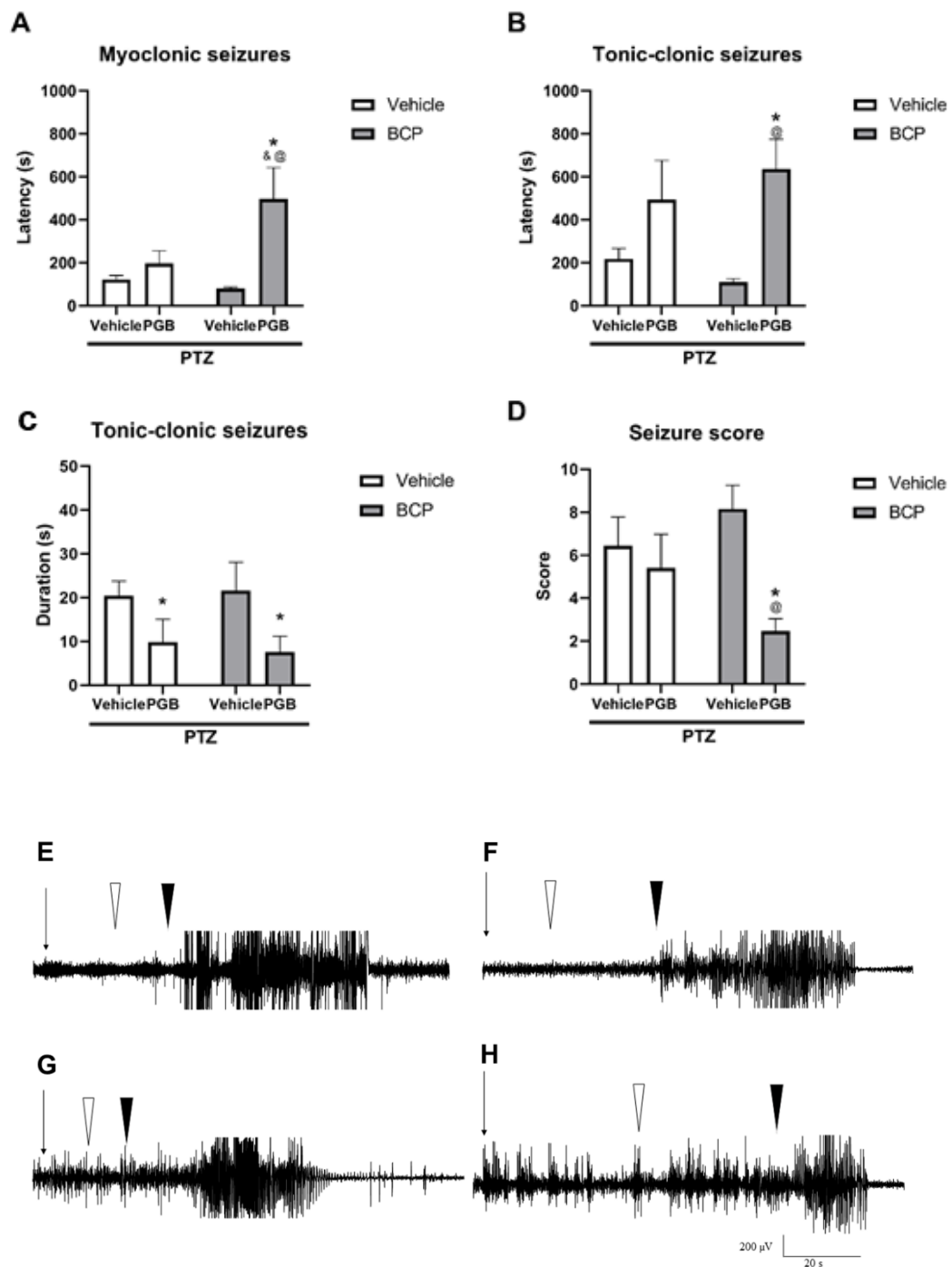


Figure 2. Effect of BCP (100 mg / kg; i.p.) plus and PGB (40 mg / kg; i.p.) on the behavioral (A-D) and EEG (E-H) parameters induced by PTZ -induced seizures (PTZ, 60 mg / kg; i.p.) in rats. (A) Latencies for (A) myoclonic spasms seizure, or (B) latency for generalized tonic-clonic seizures, (C) Durations of tonic-clonic seizure, and (D) score of tonic-clonic seizure. Representative EEG recordings for (E) vehicle + vehicle plus + PTZ, (F) vehicle + PGB plus + PTZ, (G) BCP + vehicle plus + PTZ, and (H) BCP and + PGB plus + PTZ. The black arrows indicates the administration of PTZ, the white arrows indicate the begin of myoclonic seizures,

and the gray arrows indicate the begin of tonic-clonic seizure. Data are shown as mean + S.E.M. of 6 – 7 animals per group. The asterisk indicates a statistically significant difference from the vehicle treated group (* $P < 0.05$ vs vehicle + vehicle + PTZ group; @ $P < 0.05$ vs BCP + vehicle + PTZ group; and & $P < 0.05$ vs vehicle + PGB + PTZ group). Statistical analyzes were performed using two-way ANOVA followed by post hoc analyzes using the dDuncan's multiple comparison test.

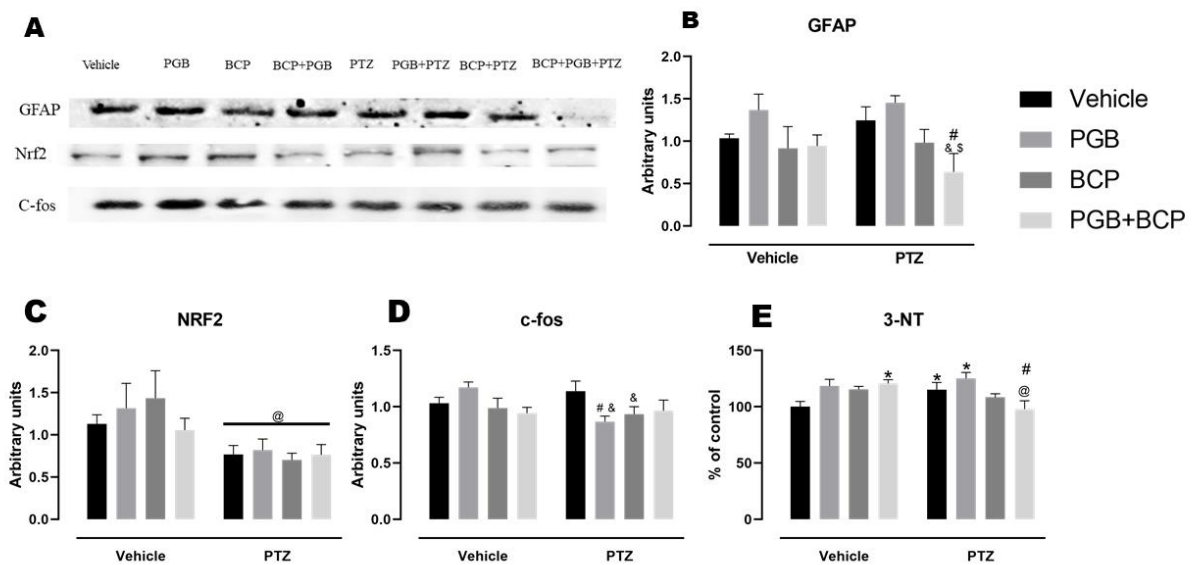


Figure 3. Effects of BCP (100 mg / kg, i.p.) plus PGB (40 mg / kg, i.p.) treatment and/or PTZ administration on the levels of GFAP, Nrf2, and c-Fos in the frontal cortex. (A) Representative Western blot bands, protein expression of (B) GFAP, (C) Nrf2, (D) c-Fos and (E) 3-NT. Data are shown as mean + S.E.M. of 4 - 6 animals per group. * $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs PTZ group; & $P < 0.05$ vs PGB group; @ $P < 0.05$ vs BCP group; \$ $P < 0.05$ vs PGB+PTZ group. Statistical analyzes were performed using three-way ANOVA followed by Duncan's multiple comparison test.

5. CONCLUSÃO

Por fim, nossos resultados sugerem que o tratamento combinado de BCP com PGB apresenta maior capacidade de efeito anticonvulsivantes do que quando administrados isoladamente, devido ao aumento da latência, bem como à redução da duração das crises e ao baixo escore. Em relação à análise molecular, nosso tratamento reduziu significativamente importantes marcadores de dano neuronal.

Acreditamos que a combinação de um anticonvulsivante com um composto natural como o BCP seja promissora e benéfica para o tratamento da epilepsia refratária, embora mais estudos sejam necessários.

REFERÊNCIAS

- BAHI, Amine *et al.* β -Caryophyllene, a CB2 receptor agonist produces multiple behavioral changes relevant to anxiety and depression in mice. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 135, p. 119–124, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.06.003>
- BARKER-HALISKI, Melissa; STEVE WHITE, H. Validated animal models for antiseizure drug (ASD) discovery: Advantages and potential pitfalls in ASD screening. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 167, p. 107750, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2019.107750>
- BASAVARAJAPPA, Balapal S. *et al.* Endocannabinoid system in neurodegenerative disorders. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 142, n. 5, p. 624–648, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jnc.14098>
- BEGHI, Ettore. The Epidemiology of Epilepsy. **Neuroepidemiology**, [s. l.], v. 54, n. Suppl. 2, p. 185–191, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000503831>
- BERG, Anne T.; SCHEFFER, Ingrid E. New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21st century. **Epilepsia**, [s. l.], v. 52, n. 6, p. 1058–1062, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2011.03101.x>
- BINDER, Devin K.; STEINHÄUSER, Christian. Astrocytes and Epilepsy. **Neurochemical Research**, [s. l.], 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03236-x>
- BOISON, Detlev; STEINHÄUSER, Christian. Epilepsy and astrocyte energy metabolism. **Glia**, [s. l.], v. 66, n. 6, p. 1235–1243, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/glia.23247>
- CAO, Qingjun; YANG, Fenghua; WANG, Hua. CB2R induces a protective response against epileptic seizures through ERK and p38 signaling pathways. **International Journal of Neuroscience**, [s. l.], p. 1–10, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00207454.2020.1796661>
- CARDOZO, David. An intuitive approach to understanding the resting membrane potential. **Advances in Physiology Education**, [s. l.], v. 40, n. 4, p. 543–547, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/advan.00049.2016>
- CHICCA, Andrea *et al.* Functionalization of β -Caryophyllene Generates Novel Polypharmacology in the Endocannabinoid System. **ACS Chemical Biology**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 1499–1507, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cb500177c>
- DELAHOY, Philippa; THOMPSON, Sally; MARSCHNER, Ian C. Pregabalin versus gabapentin in partial epilepsy: a meta-analysis of dose-response relationships. **BMC Neurology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 104, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2377-10-104>
- ESCARTIN, Carole; GUILLEMAUD, Océane; CARRILLO-DE SAUVAGE, Maria-Angeles. Questions and (some) answers on reactive astrocytes. **Glia**, [s. l.], v. 67, n. 12, p. 2221–2247, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/glia.23687>
- FARRELL, Jordan S.; WOLFF, Marshal D.; TESKEY, G. Campbell. Neurodegeneration and

- pathology in epilepsy: Clinical and basic perspectives. **Advances in Neurobiology**, [s. l.], v. 15, p. 317–334, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-57193-5_12
- FEDOROVA, Maria; BOLLINENI, Ravi Chand; HOFFMANN, Ralf. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. **Mass Spectrometry Reviews**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 79–97, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/mas.21381>
- FIDYT, Klaudyna *et al.* β -caryophyllene and β -caryophyllene oxide-natural compounds of anticancer and analgesic properties. **Cancer Medicine**, [s. l.], v. 5, n. 10, p. 3007–3017, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cam4.816>
- FISHER, Robert S. *et al.* Epileptic Seizures and Epilepsy: Definitions Proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 470–472, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x>
- FISHER, Robert S. *et al.* ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 475–482, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
- FISHER, Robert 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. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/epi.13670>
- FISHER, Robert S. Redefining epilepsy. **Current Opinion in Neurology**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 130–135, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000174>
- FREEMAN, M. R. Specification and Morphogenesis of Astrocytes. **Science**, [s. l.], v. 330, n. 6005, p. 774–778, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1190928>
- GERTSCH, Jürg *et al.* Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 105, n. 26, p. 9099–9104, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0803601105>
- GHELARDINI, C. *et al.* Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. **Farmaco**, [s. l.], v. 56, n. 5–7, p. 387–389, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01092-8](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01092-8)
- GOLYALA, Ambica; KWAN, Patrick. Drug development for refractory epilepsy: The past 25 years and beyond. **Seizure**, [s. l.], v. 44, p. 147–156, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2016.11.022>
- HALLIWELL, Barry. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 97, n. 6, p. 1634–1658, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03907.x>
- HUBBARD, Jacqueline A. *et al.* Regulation of astrocyte glutamate transporter-1 (GLT1) and aquaporin-4 (AQP4) expression in a model of epilepsy. **Experimental Neurology**, [s. l.], v. 283, p. 85–96, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.05.003>
- IBGE. **Projeção da população do Brasil e das Unidades da Federação**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/index.html>.

IBSEN, Mikkel Søres; CONNOR, Mark; GLASS, Michelle. Cannabinoid CB 1 and CB 2 Receptor Signaling and Bias. **Cannabis and Cannabinoid Research**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 48–60, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/can.2016.0037>

JAFARPOUR, Saba *et al.* Seizure cluster: Definition, prevalence, consequences, and management. **Seizure**, [s. l.], v. 68, p. 9–15, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2018.05.013>

JORDAN, Chloe J.; XI, Zheng-Xiong. Progress in brain cannabinoid CB2 receptor research: From genes to behavior. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], v. 98, p. 208–220, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.12.026>

KALILANI, Linda *et al.* The epidemiology of drug-resistant epilepsy: A systematic review and meta-analysis. **Epilepsia**, [s. l.], v. 59, n. 12, p. 2179–2193, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/epi.14596>

LÖSCHER, Wolfgang *et al.* Drug Resistance in Epilepsy: Clinical Impact, Potential Mechanisms, and New Innovative Treatment Options. **Pharmacological Reviews**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 606–638, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1124/pr.120.019539>

LÖSCHER, Wolfgang. Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 610, n. 1–3, p. 1–11, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.03.025>

MACHADO, Keylla da Conceição *et al.* A systematic review on the neuroprotective perspectives of beta-caryophyllene. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 32, n. 12, p. 2376–2388, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ptr.6199>

MIZIAK, Barbara *et al.* Drug-drug interactions between antiepileptics and cannabinoids. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 407–415, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1605355>

MORANO, Alessandra *et al.* Cannabinoids in the Treatment of Epilepsy: Current Status and Future Prospects. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, [s. l.], v. Volume 16, p. 381–396, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/NDT.S203782>

NEHLIG, Astrid. Mapping of neuronal networks underlying generalized seizures induced by increasing doses of pentylenetetrazol in the immature and adult rat: A c-Fos immunohistochemical study. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 2094–2106, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1998.00223.x>

NETO, José Gallucci; MARCHETTI, Renato Luiz. Epidemiologic aspects and relevance of mental disorders associated with epilepsy. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 323–328, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1516-44462005000400013>

OLIVEIRA, Cleide Correia de *et al.* Anticonvulsant activity of β -caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsy and Behavior**, [s. l.], v. 56, p. 26–31, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2015.12.040>

PANEBIANCO, Mariangela *et al.* Pregabalin add-on for drug-resistant focal epilepsy. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005612.pub4>

PEARSON-SMITH, Jennifer; PATEL, Manisha. Metabolic Dysfunction and Oxidative Stress

in Epilepsy. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 18, n. 11, p. 2365, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18112365>

PERTWEE, Roger G. Emerging strategies for exploiting cannabinoid receptor agonists as medicines. **British Journal of Pharmacology**, [s. l.], v. 156, n. 3, p. 397–411, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2008.00048.x>

PROSPÉRO-GARCÍA, Oscar *et al.* Endocannabinoids as Therapeutic Targets. **Archives of Medical Research**, [s. l.], v. 50, n. 8, p. 518–526, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2019.09.005>

ROGAWSKI, Michael A.; LÖSCHER, Wolfgang; RHO, Jong M. Mechanisms of Action of Antiseizure Drugs and the Ketogenic Diet. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. a022780, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a022780>

RYVLIN, Philippe. Pregabalin for the management of partial epilepsy. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, [s. l.], p. 1211, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/NDT.S4716>

RYVLIN, Philippe; RHEIMS, Sylvain; LHATOO, Samden D. Risks and predictive biomarkers of sudden unexpected death in epilepsy patient. **Current Opinion in Neurology**, [s. l.], v. 32, n. 2, p. 205–212, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000668>

SANTOS, Pauline 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. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1381612824666180912151412>

SANZ, Pascual; GARCIA-GIMENO, Maria Adelaida. Reactive Glia Inflammatory Signaling Pathways and Epilepsy. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 21, n. 11, p. 4096, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21114096>

SCHMIDT, Dieter; LÖSCHER, Wolfgang. New Developments in Antiepileptic Drug Resistance: An Integrative View. **Epilepsy Currents**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 47–52, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1535-7511.2008.01289.x>

SCHMIDT, J. Changes in seizure susceptibility in rats following chronic administration of pentylenetetrazol. **Biomedica biochimica acta**, [s. l.], v. 46, n. 4, p. 267–270, 1987. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3632650>

SHARMA, Charu *et al.* Polypharmacological Properties and Therapeutic Potential of β -Caryophyllene: A Dietary Phytocannabinoid of Pharmaceutical Promise. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 22, n. 21, p. 3237–3264, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1381612822666160311115226>

SHIMADA, Tadayuki; YAMAGATA, Kanato. Pentylenetetrazole-Induced Kindling Mouse Model. **Journal of Visualized Experiments**, [s. l.], n. 136, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3791/56573>

SILLS, Graeme J.; ROGAWSKI, Michael A. Mechanisms of action of currently used antiseizure drugs. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 168, p. 107966, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.107966>

SZYNDLER, Janusz *et al.* Mapping of c-Fos expression in the rat brain during the evolution of pentylenetetrazol-kindled seizures. **Epilepsy & Behavior**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 216–224, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2009.07.030>

TAYLOR, Charles P.; ANGELOTTI, Timothy; FAUMAN, Eric. Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: The calcium channel $\alpha 2-\delta$ (alpha2–delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery. **Epilepsy Research**, [s. l.], v. 73, n. 2, p. 137–150, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eplepsyres.2006.09.008>

WANG, Wei *et al.* Activation of Nrf2-ARE signal pathway protects the brain from damage induced by epileptic seizure. **Brain Research**, [s. l.], v. 1544, p. 54–61, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.004>

WIKIMEDIA COMMONS CONTRIBUTORS. **Struktur von beta-Caryophyllen**. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=File:Beta-Caryophyllen.svg&oldid=419186906>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO | Epilepsy: a public health imperative**. [S. l.: s. n.], 2019. *E-book*.

ZHENG, Guo-Qiang; KENNEY, Patrick M.; LAM, Luke K. T. Sesquiterpenes from Clove (*Eugenia caryophyllata*) as Potential Anticarcinogenic Agents. **Journal of Natural Products**, [s. l.], v. 55, n. 7, p. 999–1003, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/np50085a029>

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Comissão de Ética no Uso de Animais

da Universidade Federal de Santa Maria

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da atividade anticonvulsivante do beta-cariofileno em associação com Fenobarbital e Pregabalina em um modelo de epilepsia em ratos", protocolada sob o CEUA nº 7405310519 (ID 002599), sob a responsabilidade de **Mauro Schneider Oliveira** e equipe; *Karine Gabriela da Costa; Fernanda Kulinski Mello; Michele Pereira Moreira* - 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 16/07/2019.

We certify that the proposal "Evaluation of the anticonvulsant activity of beta-caryophyllene in combination with Phenobarbital and Pregabalin in a model of epilepsy in rats", utilizing 132 Heterogenics rats (132 males), protocol number CEUA 7405310519 (ID 002599), under the responsibility of **Mauro Schneider Oliveira** and team; *Karine Gabriela da Costa; Fernanda Kulinski Mello; Michele Pereira Moreira* - 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 07/16/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de 07/2019 a 07/2021 Área: [Farmacologia](#)

Origem: [Biotério Central UFSM](#)

Espécie: [Ratos heterogênicos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [30 a 60 dias](#)


N: [132](#)


Linhagem: [Wistar](#)

Peso: [100 a 130 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 50 m², dispõe de um espectrofotômetro UV-Visível, vibrátomo, 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 15 m², subdividida em três salas menores onde são realizados os testes comportamentais. Possui computador com sistema de vídeo-monitoramento. 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, centrífugas, 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, 05 de julho 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

ANEXO B- PERMISSÃO PARA REUSO E TRADUÇÃO DA FIGURA 1

24/08/2021

RightsLink Printable License

JOHN WILEY AND SONS LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Aug 24, 2021

This Agreement between Mauro S Oliveira ("You") and John Wiley and Sons ("John Wiley and Sons") consists of your license details and the terms and conditions provided by John Wiley and Sons and Copyright Clearance Center.

License
Number 5135660605615

License date Aug 24, 2021

Licensed
Content John Wiley and Sons
Publisher

Licensed
Content Epilepsia
Publication

Licensed
Content Title Operational classification of seizure types by the International League Against
Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and
Terminology

Licensed
Content Sameer M. Zuberi, Ingrid E. Scheffer, Eliane Roulet Perez, et al
Author

Licensed
Content Date Mar 8, 2017

Licensed
Content 58
Volume

Licensed
Content Issue 4

Licensed
Content 9

24/08/2021

RightsLink Printable License

Pages

Type of use Dissertation/Thesis

Requestor type University/Academic

Format Print and electronic

Portion Figure/table

Number of figures/tables 1

Will you be translating? Yes, without English rights

Number of languages 1

Title Associação entre β -cariofileno e pregabalina apresenta ação anticonvulsivante aguda em modelo de crises epilépticas induzidas por pentilenotetrazol em ratos

Institution name Universidade Federal de Santa Maria

Expected presentation date Aug 2021

Order reference number Karine-Fig2

Portions Figure 2

Specific Languages Portuguese

Requestor Location Mauro S Oliveira
Av. Roraima, 1000

24/08/2021

RightsLink Printable License

Santa Maria, RS 97105-900
 Brazil
 Attn: Mauro S Oliveira

Publisher Tax ID EU826007151

Total 0.00 USD

Terms and Conditions

TERMS AND CONDITIONS

This copyrighted material is owned by or exclusively licensed to John Wiley & Sons, Inc. or one of its group companies (each a "Wiley Company") or handled on behalf of a society with which a Wiley Company has exclusive publishing rights in relation to a particular work (collectively "WILEY"). By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the billing and payment terms and conditions established by the Copyright Clearance Center Inc., ("CCC's Billing and Payment terms and conditions"), at the time that you opened your RightsLink account (these are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

Terms and Conditions

- The materials you have requested permission to reproduce or reuse (the "Wiley Materials") are protected by copyright.
- You are hereby granted a personal, non-exclusive, non-sub licensable (on a stand-alone basis), non-transferable, worldwide, limited license to reproduce the Wiley Materials for the purpose specified in the licensing process. This license, **and any CONTENT (PDF or image file) purchased as part of your order**, is for a one-time use only and limited to any maximum distribution number specified in the license. The first instance of republication or reuse granted by this license must be completed within two years of the date of the grant of this license (although copies prepared before the end date may be distributed thereafter). The Wiley Materials shall not be used in any other manner or for any other purpose, beyond what is granted in the license. Permission is granted subject to an appropriate acknowledgement given to the author, title of the material/book/journal and the publisher. You shall also duplicate the copyright notice that appears in the Wiley publication in your use of the Wiley Material. Permission is also granted on the understanding that nowhere in the text is a previously published source acknowledged for all or part of this Wiley Material. Any third party content is expressly excluded from this permission.
- With respect to the Wiley Materials, all rights are reserved. Except as expressly granted by the terms of the license, no part of the Wiley Materials may be copied, modified, adapted (except for minor reformatting required by the new Publication), translated, reproduced, transferred or distributed, in any form or by any means, and no derivative works may be made based on the Wiley Materials without the prior permission of the respective copyright owner. **For STM Signatory Publishers clearing permission under the terms of the [STM Permissions Guidelines](#) only, the terms of the license are extended to include subsequent editions and for editions in other languages, provided such editions are for the work as a whole in situ and**

24/08/2021

RightsLink Printable License

does not involve the separate exploitation of the permitted figures or extracts,

You may not alter, remove or suppress in any manner any copyright, trademark or other notices displayed by the Wiley Materials. You may not license, rent, sell, loan, lease, pledge, offer as security, transfer or assign the Wiley Materials on a stand-alone basis, or any of the rights granted to you hereunder to any other person.

- The Wiley Materials and all of the intellectual property rights therein shall at all times remain the exclusive property of John Wiley & Sons Inc, the Wiley Companies, or their respective licensors, and your interest therein is only that of having possession of and the right to reproduce the Wiley Materials pursuant to Section 2 herein during the continuance of this Agreement. You agree that you own no right, title or interest in or to the Wiley Materials or any of the intellectual property rights therein. You shall have no rights hereunder other than the license as provided for above in Section 2. No right, license or interest to any trademark, trade name, service mark or other branding ("Marks") of WILEY or its licensors is granted hereunder, and you agree that you shall not assert any such right, license or interest with respect thereto
- NEITHER WILEY NOR ITS LICENSORS MAKES ANY WARRANTY OR REPRESENTATION OF ANY KIND TO YOU OR ANY THIRD PARTY, EXPRESS, IMPLIED OR STATUTORY, WITH RESPECT TO THE MATERIALS OR THE ACCURACY OF ANY INFORMATION CONTAINED IN THE MATERIALS, INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, ANY IMPLIED WARRANTY OF MERCHANTABILITY, ACCURACY, SATISFACTORY QUALITY, FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, USABILITY, INTEGRATION OR NON-INFRINGEMENT AND ALL SUCH WARRANTIES ARE HEREBY EXCLUDED BY WILEY AND ITS LICENSORS AND WAIVED BY YOU.
- WILEY shall have the right to terminate this Agreement immediately upon breach of this Agreement by you.
- You shall indemnify, defend and hold harmless WILEY, its Licensors and their respective directors, officers, agents and employees, from and against any actual or threatened claims, demands, causes of action or proceedings arising from any breach of this Agreement by you.
- IN NO EVENT SHALL WILEY OR ITS LICENSORS BE LIABLE TO YOU OR ANY OTHER PARTY OR ANY OTHER PERSON OR ENTITY FOR ANY SPECIAL, CONSEQUENTIAL, INCIDENTAL, INDIRECT, EXEMPLARY OR PUNITIVE DAMAGES, HOWEVER CAUSED, ARISING OUT OF OR IN CONNECTION WITH THE DOWNLOADING, PROVISIONING, VIEWING OR USE OF THE MATERIALS REGARDLESS OF THE FORM OF ACTION, WHETHER FOR BREACH OF CONTRACT, BREACH OF WARRANTY, TORT, NEGLIGENCE, INFRINGEMENT OR OTHERWISE (INCLUDING, WITHOUT LIMITATION, DAMAGES BASED ON LOSS OF PROFITS, DATA, FILES, USE, BUSINESS OPPORTUNITY OR CLAIMS OF THIRD PARTIES), AND WHETHER OR NOT THE PARTY HAS BEEN ADVISED OF THE POSSIBILITY OF SUCH DAMAGES. THIS LIMITATION SHALL APPLY NOTWITHSTANDING ANY FAILURE OF ESSENTIAL PURPOSE OF ANY LIMITED REMEDY PROVIDED HEREIN.
- Should any provision of this Agreement be held by a court of competent jurisdiction to be illegal, invalid, or unenforceable, that provision shall be deemed amended to achieve as nearly as possible the same economic effect as the original provision, and the legality, validity and enforceability of the remaining provisions of this Agreement shall not be affected or impaired thereby.

24/08/2021

RightsLink Printable License

- The failure of either party to enforce any term or condition of this Agreement shall not constitute a waiver of either party's right to enforce each and every term and condition of this Agreement. No breach under this agreement shall be deemed waived or excused by either party unless such waiver or consent is in writing signed by the party granting such waiver or consent. The waiver by or consent of a party to a breach of any provision of this Agreement shall not operate or be construed as a waiver of or consent to any other or subsequent breach by such other party.
- This Agreement may not be assigned (including by operation of law or otherwise) by you without WILEY's prior written consent.
- Any fee required for this permission shall be non-refundable after thirty (30) days from receipt by the CCC.
- These terms and conditions together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein) form the entire agreement between you and WILEY concerning this licensing transaction and (in the absence of fraud) supersedes all prior agreements and representations of the parties, oral or written. This Agreement may not be amended except in writing signed by both parties. This Agreement shall be binding upon and inure to the benefit of the parties' successors, legal representatives, and authorized assigns.
- In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall prevail.
- WILEY expressly reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
- This Agreement will be void if the Type of Use, Format, Circulation, or Requestor Type was misrepresented during the licensing process.
- This Agreement shall be governed by and construed in accordance with the laws of the State of New York, USA, without regards to such state's conflict of law rules. Any legal action, suit or proceeding arising out of or relating to these Terms and Conditions or the breach thereof shall be instituted in a court of competent jurisdiction in New York County in the State of New York in the United States of America and each party hereby consents and submits to the personal jurisdiction of such court, waives any objection to venue in such court and consents to service of process by registered or certified mail, return receipt requested, at the last known address of such party.

WILEY OPEN ACCESS TERMS AND CONDITIONS

Wiley Publishes Open Access Articles in fully Open Access Journals and in Subscription journals offering Online Open. Although most of the fully Open Access journals publish open access articles under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) License only, the subscription journals and a few of the Open Access Journals offer a choice of Creative Commons Licenses. The license type is clearly identified on the article.

The Creative Commons Attribution License

The [Creative Commons Attribution License \(CC-BY\)](#) allows users to copy, distribute and transmit an article, adapt the article and make commercial use of the article. The CC-BY license permits commercial and non-

24/08/2021

RightsLink Printable License

Creative Commons Attribution Non-Commercial License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial \(CC-BY-NC\) License](#) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.(see below)

Creative Commons Attribution-Non-Commercial-NoDerivs License

The [Creative Commons Attribution Non-Commercial-NoDerivs License](#) (CC-BY-NC-ND) permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, is not used for commercial purposes and no modifications or adaptations are made. (see below)

Use by commercial "for-profit" organizations

Use of Wiley Open Access articles for commercial, promotional, or marketing purposes requires further explicit permission from Wiley and will be subject to a fee.

Further details can be found on Wiley Online Library
<http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-410895.html>

Other Terms and Conditions:

v1.10 Last updated September 2015

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.
