

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

Jéssica Grigoletto

**EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO SOBRE AS CRISES
EPILÉPTICAS E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM
DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA**

Santa Maria, RS
2016

Jéssica Grigoletto

**EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO SOBRE AS CRISES EPILÉPTICAS E
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM DIFERENTES MODELOS
EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA**

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 **Mestre em Farmacologia.**

Orientador: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira

Santa Maria, RS
2016

Jéssica Grigoletto

**EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO SOBRE AS CRISES EPILÉPTICAS E
ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM DIFERENTES MODELOS
EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA**

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 **Mestre em Farmacologia**.

Aprovada em 01 de março de 2016:

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

Sara Marchesan de Oliveira, Dra. (UFSM)

Maria Elisa Calcagnotto, Prof. Dra. (UFRGS)

Santa Maria, RS
2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, em especial á minha melhor amiga e conselheira, a minha mãe, pela sua dedicação incondicional. Dedico também ao meu noivo, Adriel, pelo incentivo e apoio em todas minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

No início desta dissertação de mestrado, não poderia deixar de agradecer a todas as pessoas que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho, de maneira especial, agradeço:

Primeiramente a Deus, por estar sempre ao meu lado.

Manifesto a minha gratidão ao Prof. Dr. Mauro, orientador desta dissertação, agradeço pela possibilidade que me deu de efetuar este trabalho, pela orientação, pela acessibilidade que demonstrou e por me possibilitar “aprendizagens únicas”. Agradeço também por sua paciência e sabedoria no desenvolvimento desta dissertação e por me fazer enxergar que existe mais que pesquisadores e resultados por trás de uma dissertação, mas vidas humanas. Agradeço-lhe carinhosamente por ser uma referência profissional e pessoal para meu crescimento.

A meus pais, José e Cleonice por todo amor verdadeiro, apoio, confiança e motivação incondicional. Especialmente minha mãe pelo seu zelo incansável e por sempre me impulsionar em direção às vitórias dos meus desafios.

Ao meu noivo Adriel, pelo apoio incondicional, compreensão, amor e incentivo, sempre.

Aos meus irmãos, Jeferson e Josequiel, e minhas sobrinhas pelo carinho, pelo estímulo e por sempre estarem torcendo pelo meu sucesso.

Aos meus queridos tios, André e Maribel, e toda minha família que sempre tentaram entender minhas dificuldades e minha ausência, agradeço-lhes pelo carinho, paciência e incentivo.

Aos colegas e amigos do LabNeuro por tornarem os meus dias mais feliz, pelo constante aprendizado, por tudo o que com eles aprendi e por partilharem a construção do meu estudo. Em especial, á minha amiga Clarissa, que se tornou uma verdadeira amiga e tornou mais leve meu trabalho, também agradeço por participar diretamente deste trabalho e me ajudar em todos os momentos, e por estar sempre ao meu lado dando força e apoio.

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.

A todos que de alguma forma contribuíram e acreditaram em mim. Muito obrigada!

O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã.

(Ralph Waldo Emerson)

RESUMO

EFEITO DO ÁCIDO ROSMARÍNICO SOBRE AS CRISES EPILÉPTICAS E ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA

AUTORA: Jéssica Grigoletto

ORIENTADOR: Mauro Schneider Oliveira

A epilepsia é uma doença neurológica crônica caracterizada por crises epiléticas recorrentes. No entanto, as atuais drogas anticonvulsivantes são ineficazes em quase um terço dos pacientes e podem causar efeitos adversos significativos. O ácido rosmarínico é uma substância natural, que exibe diversos efeitos biológicos, incluindo atividade antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora. Frente ao fato que o estresse oxidativo, a inflamação e excitotoxicidade desempenham um papel importante na fisiopatologia das crises, nós buscamos neste presente estudo testar a hipótese que o ácido rosmarínico exibe efeitos anticonvulsivantes em diferentes modelos experimentais. Nossos resultados demonstraram que o ácido rosmarínico quando administrado na dose de 30 mg/kg aumenta a latência para as crises mioclônicas e para as crises generalizadas tônico-clônicas induzidas por PTZ, assim como aumentou a latência para as crises mioclônicas induzidas pelo agente convulsivo Pilocarpina. Estes dados foram confirmados através do registro eletroencefalográfico. Além disso, a dose anticonvulsivante de ácido rosmarínico (30 mg/kg) aumentou o número de crossing e o tempo exploração centro da arena no teste campo aberto, sugerindo efeito tipo ansiolítico. No teste do nado forçado ocorreu um aumento no tempo de imobilidade dos animais. Posteriormente foi avaliado o efeito do tratamento sub-crônico do ácido rosmarínico (3 ou 30 mg/Kg) sobre as crises epiléticas e alterações comportamentais no modelo de *status epilepticus* induzido por Pilocarpina. No entanto o ácido rosmarínico não causou nenhuma diferença significativa na frequência das crises e nem nos parâmetros comportamentais avaliados. Esses resultados decorrem possivelmente da ação GABAérgica do ácido rosmarínico, através da inibição da enzima GABA-transaminase, que culmina em uma atividade anticonvulsivante e ansiolítica no modelo agudo de epilepsia. No entanto, não foi possível visualizar o efeito anticonvulsivante e/ou alterações comportamentais no modelo crônico de epilepsia. Todavia, estudos adicionais são necessários para investigar as implicações clínicas destes achados, bem como os seus mecanismos subjacentes.

Palavras-chave: Epilepsia, comportamento, atividade anticonvulsivante, ácido rosmarínico, atividade ansiolítica.

ABSTRACT

EFFECT OF ROSMARINIC ACID ON SEIZURES EPILEPTIC AND BEHAVIORAL CHANGE IN DIFFERENT MODELS EXPERIMENTAL OF EPILEPSY

AUTHOR: Jéssica Grigoletto

ADVISOR: Mauro Schneider Oliveira

Epilepsy is a chronic neurological disease characterized by recurrent seizures. Current anticonvulsant drugs are ineffective in nearly one third of patients and may cause significant adverse effects. Rosmarinic acid is a naturally-occurring substance which displays several biological effects including antioxidant, anti inflammatory and neuroprotective activity. Since oxidative stress, inflammation and excitotoxicity play a role in the pathophysiology of seizures, we aimed the present study to test the hypothesis that rosmarinic acid displays anticonvulsant effects in different experimental models. Our results demonstrate that rosmarinic acid at the dose of 30 mg/kg increased the latencies to myoclonic and generalized seizures induced by PTZ and myoclonic seizures induced by pilocarpine. These data were confirmed by encephalographic recordings. Furthermore, the anticonvulsant dose of rosmarinic acid was anxiolytic, since it increased the number of crossings and the time of exploration in the center of open field. In the forced swimming test rosmarinic acid increased the immobility time. In another set of experiments, we evaluated the effects of sub-chronic treatment of rosmarinic acid (30 mg/kg) on epileptic seizures and behavioral changes in epilepsy model induced by pilocarpine. However, the treatment with rosmarinic acid caused no significant changes in the frequency of seizures nor in the behavioral comorbidities evaluated. These results probably reflect the GABAergic action of rosmarinic acid, by inhibiting the enzyme GABA- transaminase, since it was anticonvulsant and anxiolytic activity in the acute protocols. However, anticonvulsant effect and/or disease-modifying effects were seen in the chronic model of epilepsy. Further studies are needed to investigate the clinical implications of these findings and their underlying mechanisms.

Keywords: Epilepsy, behavior, anticonvulsant activity, rosmarinic acid, anxiolytic activity.

LISTA DE GRÁFICOS

Introdução:

Figura 1- Estrutura química do ácido rosmarínico.....22

Resultados:

Manuscript

Figure 1- Effect of oral administration of increasing doses of rosmarinic acid (0, 3, 10, or 30 mg/kg; p.o.) on seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ, 60 mg/kg; i.p.).....43

Figure 2- Effect of oral administration of increasing doses of rosmarinic acid (0, 3, 10, or 30 mg/kg; p.o.) on seizures induced by pilocarpine (300 mg/kg, i.p.).....44

Figure 3-Effect of oral administration of rosmarinic acid (30 mg/kg; p.o.) on selected behavioral parameters.....45

Figure 4- Effect of oral administration of increasing doses of rosmarinic acid (0, 3, or 30 mg/kg; p.o.) on development of SRS after pilocarpine-induced SE.....46

Figure 5- Effect of oral administration of increasing doses of rosmarinic acid (0, 3, or 30 mg/kg; p.o.) on behavioral comorbidities of epilepsy.....47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

6-OHDA	6-hidroxi-dopamina
•OH	Radical hidroxila
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico
AR	Ácido rosmarínico
AVC	Acidente vascular cerebral
COX	Ciclooxigenase
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EEG	Eletroencefalografia
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
ER	Espécies reativas
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GABA-T	4-Aminobutirato transaminase
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
ILAE	Liga Internacional Contra a Epilepsia
LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malondialdeído
NMDA	N-metil D-Aspartato
O ₂	Radical superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PTZ	Pentilenotetrazol
RNA	Ácido ribonucléico
SE	Status-epilepticus
SH	Proteína sulfidril
SIM	Sistemas de Informações sobre Mortalidade
SNC	Sistema Nervoso Central

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	EPILEPSIA.....	15
2.2	PILOCARPINA.....	17
2.3	PENTILENOTETRAZOL (PTZ).....	19
2.4	CRISES EPILÉPTICAS E A INFLAMAÇÃO	20
2.5	CRISES EPILEPTICAS E ESTRESSE OXIDATIVO	20
2.6	ÁCIDO ROSMARÍNICO.....	21
3	OBJETIVO	25
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	26
4	ARTIGO CIENTÍFICO	27
4.1	MANUSCRITO	29
5	CONCLUSÃO	49
	REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS	51
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	61

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Epilepsia é uma doença neurológica crônica caracterizada por uma predisposição persistente de gerar crises epiléticas, que apresenta como consequências alterações neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais dessa condição (FISHER, 2015). Além disso, está associada com co-morbidade, incluindo depressão e ansiedade, e acarreta aumento da mortalidade (TELLEZ-ZENTENO *et al.*, 2007).

Pessoas de todas as raças, sexos, condições socioeconômicas e regiões podem ser acometidas por esta doença (SCOTT *et al.*, 2001). Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) apontam que a epilepsia atinge aproximadamente 1% da população, tornando-se uma das doenças neurológicas mais comuns no mundo todo. Sendo que, 80% das pessoas com epilepsia vivem em países de baixa e média renda (WHO: World Health Organization 2015).

A terapia com anticonvulsivantes promove o controle das crises epiléticas em aproximadamente 60-70 % dos pacientes, mas um número significativo de indivíduos, mesmo com o uso de várias drogas e diferentes tratamentos, permanecem com crises não controláveis (BEN-MENACHEM E, 2007). Portanto é importante o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o controle das crises, e o entendimento das bases moleculares envolvidas no início na manutenção das crises, bem como a investigação de novos alvos moleculares para drogas anticonvulsivantes é parte fundamental neste processo. Neste contexto, fitomedicamentos podem potencialmente desempenhar um papel importante no desenvolvimento de novas drogas antiepiléticas, já que tem sido mostrado que vários extratos de plantas e produtos podem ser úteis para o tratamento de crises epiléticas.

O ácido rosmarinico um éster do ácido cafeico e ácido 3,4-dihidroxifenil lático, encontrado com frequência em uma ampla gama de espécies vegetais (PETERSEN e SIMMONDS, 2003). Atualmente vem sendo descrito diversas atividades para este composto natural, incluindo atividade anti-inflamatória, antioxidante e neuroprotetora (KIM *et al.*, 2015). Frente ao fato que o estresse oxidativo (MARTINC *et al.*, 2014), processo inflamatório no cérebro (VEZZANI *et al.*, 2011) e a excitotoxicidade (BAZAN *et al.*, 2005), podem estar associados a mecanismos fundamentais na fisiopatologia das crises é de particular interesse determinar se compostos com atividade antioxidante, anti-inflamatória e neuroprotetora também possuem efeito anticonvulsivante. Neste contexto, o principal objetivo desta presente dissertação de mestrado é investigar a hipótese que o ácido rosmarínico exibe efeito anticonvulsivante em diferentes modelos experimentais.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIVLIOGRÁFICA

2.1 EPILEPSIA

A palavra epilepsia é de origem grega, *επι* = em cima e *λεπ* = abater, significa fulminar, abater com surpresa, ser atacado, algo que vem de cima e abate o indivíduo (WALZ, 2004). O mais velho relato da epilepsia, um manuscrito babilônico, escrito por volta de 2000 a.C, enfatiza que a epilepsia possui natureza sobrenatural, e cada tipo de ataque está associado com o nome de um espírito ou deus, normalmente do mal. Consequentemente o tratamento era um assunto espiritual (WHO, 1997). Mais tarde, 400 anos a.C, Hipócrates afirmou que a epilepsia não era nem sagrada nem divina, mas um distúrbio do cérebro, com suspeita de que sua origem fosse hereditária.

De acordo com a mais recente proposta da Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE), a epilepsia é uma doença cerebral causada por predisposição persistente do cérebro a gerar crises epiléticas e conseqüências neurobiológicas, cognitivas, psicossociais e sociais da condição. Define-se como crise epilética a ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas gerados por uma atividade neuronal sincrônica e excessiva no encéfalo. Assim, a crise é um evento e epilepsia é a doença, que envolve crises recorrentes não provocadas (FISHER, 2015). Por sua vez, crise convulsiva é a manifestação comportamental e/ou motora da crise epilética (FISHER *et al.*, 2005).

De acordo com a ILAE a epilepsia é caracterizada por qualquer uma das seguintes condições: (1) Pelo menos duas crises epiléticas espontâneas (ou reflexas) ocorrendo em um intervalo maior de 24 horas; (2) uma crise espontânea (ou reflexa) e uma probabilidade de novas crises semelhante ao risco geral de recorrência (pelo menos 60 %) após duas crises espontâneas, ocorrendo ao longo dos próximos 10 anos; (3) diagnóstico de uma síndrome da epilepsia. A epilepsia pode ser considerada resolvida em indivíduos que permaneceram livre de crises nos últimos 10 anos, e sem uso de anticonvulsivantes, pelo menos nos últimos 5 anos (FISHER *et al.*, 2014).

Atualmente estima-se que a epilepsia afete cerca de 70 milhões de pessoas em todo o mundo (PREUX *et al.*, 2015), sendo que 80% desta população reside em países em desenvolvimento (DIOP *et al.*, 2003). Dentre os múltiplos fatores que desencadeiam a epilepsia, destacam-se as infecções parasitárias (neurocisticercose), infecções intracraniana ocasionada por vírus ou bactérias, toco-traumatismo, traumatismo crânio encefálico, agentes tóxicos e fatores hereditários (SENANAYAKE e ROMAN, 1993; CREMER *et al.*, 2009).

Assim, a epilepsia tem sido considerada um problema de saúde pública a nível mundial, ocupando o segundo lugar entre as doenças neurológica mais frequentes, sendo superada apenas pelo acidente vascular cerebral (AVC) (SCHMIDT, 2012).

Embora existam poucos estudos sobre a epidemiologia da epilepsia no Brasil, estima-se que haja entre 1,8 e 3,6 milhões de pessoas com epilepsia em nosso país. Segundo um estudo publicado na Revista Ciência Saúde Coletiva no ano de 2009 (FERREIRA IDE e TABOSA E SILVA, 2009), foram registradas 32.655 mortes por epilepsia no Brasil durante o período de 1980 a 2003. Esse número pode ser maior, uma vez que muitos casos podem não terem sido notificados aos Sistemas de Informações sobre Mortalidade (SIM). O mesmo artigo evidenciou que ao longo dos anos está ocorrendo um decréscimo no número de óbitos por epilepsia na maioria das regiões brasileiras. No entanto foi relatado um aumento de 80% na região nordeste. Um dos principais fatores determinantes para este aumento é que tal região possuía uma baixa cobertura do SIM, além disso, esta região possivelmente não está acompanhando as demais regiões na evolução do tratamento da epilepsia, sobretudo no que se refere á disponibilidade de medicamentos (FERREIRA IDE e TABOSA E SILVA, 2009).

Nesse contexto, é importante salientar que o Ministério da Saúde do Brasil, na Portaria 1.161, de sete de Julho de 2005 (BRASIL, 2005), reconhece a importância epidemiológica e a magnitude social das doenças neurológicas no Brasil, incluindo a epilepsia, bem como o custo elevado e crescente para o país, ressaltando e enfatizando o quadro de morbidade com alto grau de sequelas de doenças neurológicas e a elevada taxa de mortalidade.

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

As crises epilépticas podem ser classificadas em: (1) generalizadas, conceituadas como originárias em algum ponto dentro de redes neuronais distribuídas bilateralmente, envolvendo os dois hemisférios cerebrais. Essas redes neuronais bilaterais podem incluir estruturas corticais e subcorticais, mas não necessariamente o córtex inteiro; (2) focais, conceituadas como originárias dentro das redes neuronais limitadas a um hemisfério e discretamente localizadas ou mais amplamente distribuídas; (3) desconhecidas (BERG *et al.*, 2010).

Dentre os vários tipos de epilepsia, a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é a síndrome epiléptica mais frequente na idade adulta, pois cerca de 60% dos indivíduos epilépticos apresentam crises convulsivas com foco de origem no lobo temporal e regiões límbicas associadas (TELLEZ-ZENTENO e HERNANDEZ-RONQUILLO, 2012).

A epilepsia do lobo temporal apresenta grande relevância clínica, em razão de ser a forma mais comum de epilepsia focal resistente ao tratamento farmacológico em adultos (TELLEZ-ZENTENO e HERNANDEZ-RONQUILLO, 2012). Estudos neuropsicológicos afirmam que a ELT, é uma condição progressiva, onde crises recorrentes estão associadas à perda neuronal e declínio do desempenho cognitivo progressivo (FUERST *et al.*, 2001), os principais déficits observados dizem respeito, a alterações nos processos mnemônicos e de aprendizagem, e comprometimentos de funções neuropsicológicas como atenção, linguagem, praxia construtiva e funções executivas (LORING *et al.*, 1993; GUIMARAES *et al.*, 2003).

Frente ao fato que o tratamento clínico da epilepsia é feito basicamente com drogas anticonvulsivantes, estas promovem o controle das crises epilépticas em aproximadamente 60-70 % dos pacientes, mas um número significativo de indivíduos permanece refratários ao tratamento, principalmente pacientes com ELT. Além disso, é extremamente importante a concepção de terapêuticas eficazes para prevenção da epilepsia ou modificação da doença. A caracterização das várias nuances e perguntas científicas em epilepsia têm sido realizada através de modelos experimentais, dentre eles: o modelo de epilepsia induzido por Pilocarpina e por Pentilenotetrazol (PTZ) (LUCINDO JOSÉ QUINTANS-JÚNIOR, 2007).

2.2 PILOCARPINA

O modelo experimental da pilocarpina tem sido usado para a caracterização dos mecanismos de ações de drogas anticonvulsivantes no tratamento da epilepsia (PEREIRA *et al.*, 2007). Este modelo foi desenvolvido em 1983 por Turski e colaboradores (TURSKI *et al.*, 1983), e é hoje um dos mais utilizados modelos de epilepsia, especialmente nos estudos de ELT, pois induz mudanças histológicas, bioquímicas, farmacológicas, eletrofisiológicas e comportamentais em ratos muito semelhantes às observadas em humanos, como perda celular hipocampal principalmente nas regiões do hilo, CA1 e CA3, brotamento de fibras musgosas, crises espontâneas e recorrentes e dispersão celular na camada granular (TURSKI *et al.*, 1983); (MELLO *et al.*, 1993).

A pilocarpina, um agonista colinérgico muscarínico, quando administrada por via sistêmica em altas doses em roedores (~320 mg/kg), induz um quadro de alterações

comportamentais que é dividido em três fases: a) período agudo, no qual os animais apresentam crises motoras límbicas que surgem aos 15-30 minutos após injeção, e podem perdurar por horas, evoluindo para *status epilepticus*. Posteriormente inicia-se b) período silencioso, caracterizado pela ausência de sinais comportamentais e eletrográficos de atividade epilética. A última fase é denominada, período crônico, que se inicia com a primeira crise espontânea que ocorre durante toda a vida do animal (TURSKI *et al.*, 1983) (CAVALHEIRO, 1995).

As crises epiléticas induzidas por pilocarpina tem início com ativação de receptores colinérgicos muscarínicos do subtipo M1 (HAMILTON *et al.*, 1997; BYMASTER *et al.*, 2003). A ativação desse subtipo de receptor muscarínico causa influxo de cálcio, resultando em despolarização e repetidos disparos dos neurônios, acompanhado de atividade pós-sináptica (KLINK e ALONSO, 1997). A transmissão colinérgica muscarínica está envolvida no início das crises, mas não na sua manutenção, indicando a participação de outros neurotransmissores (CLIFFORD *et al.*, 1987). De fato estudos têm revelado que a pilocarpina durante a fase aguda aumenta os níveis de glutamato no hipocampo, levando ao aparecimento de crises epiléticas (COSTA *et al.*, 2004).

A fase silenciosa do modelo pilocarpina de epilepsia, período de intensa epileptogênese, é marcada por um importante desequilíbrio entre inibição e excitação. Este desequilíbrio é decorrente de mudanças nos circuitos hipocâmpais, causando alterações na liberação, remoção e expressão dos receptores de neurotransmissores (CAVALHEIRO *et al.*, 1994). Além disso, os transportadores de glutamato, aminoácido que ativa a neurotransmissão excitatória via receptores NMDA (N-metil D-Aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico) e de kainato, desempenham importante papel na manutenção dos níveis apropriados de glutamato e eventos sinápticos, prevenindo, assim, a injúria excitotóxica. Sob condições eletricamente desfavoráveis, esses transportadores podem agir no sentido inverso e tornarem-se fonte de glutamato extracelular, fato este que pode resultar em efeitos deletérios para o sistema nervoso central, assim como resultar no aparecimento de crises epiléticas (KUNZ *et al.*, 2000).

A epilepsia do lobo temporal tem sido relacionada à excitabilidade excessiva nas estruturas límbicas ou à baixa atuação do sistema inibitórios (neurônios GABAérgicos) ou, ainda, à associação entre ambos os eventos (BOUGH e RHO, 2007). Não se compreende com total certeza a origem desse desequilíbrio, mas o que tem chamado a atenção dos pesquisadores do assunto são os neurotransmissores GABA (BRIGGS e GALANOPOULOU, 2011). O GABA é produzido a partir da descarboxilação do glutamato pela enzima glutamato

descarboxilase, que está presente nas terminações nervosas em várias partes do encéfalo. O GABA é metabolizado primeiramente por transaminação a semialdeído succínico e, então, a succinato no ciclo do ácido cítrico. A GABA-Transaminase é a enzima que catalisa essa transaminação. Além disso, ocorre uma recaptação ativa de GABA via transportadores de GABA. Um transportador vesicular de GABA (VGAT) transporta o GABA e a glicina para dentro das vesículas secretoras. (KIM E. BARRETT, 2014).

Os receptores GABAérgicos apresentam um papel importante nas crises induzidas por pilocarpina, uma vez que a densidade máxima dos receptores GABAérgicos encontra-se diminuída (FREITAS *et al.*, 2004), em decorrência do aumento da concentração do cálcio intracelular induzida pelos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, que pode ser essencial para a instalação e propagação da atividade epiléptica (ISOKAWA, 1998).

2.3 PENTILENOTETRAZOL (PTZ)

O Pentilenotetrazol é um derivado tetrazol com atividade convulsivante, sendo utilizado tanto em modelos experimentais de epilepsia agudos quanto crônicos (LOSCHER, 2009). As doses de PTZ administradas nos modelos animais de crises epiléticas variam entre os autores. Quando o objetivo é induzir uma única crise epilética, doses baixas (subconvulsivas), de 20 a 40 mg/kg, de PTZ administradas intraperitonealmente resultam em crises do tipo ausência, enquanto doses maiores podem resultar em crises clônicas, tônicas e tônico-clônicas (O. C SNEAD, 1998). No entanto, quando o objetivo é induzir crises epiléticas repetidas como no modelo do *abrasamento químico* (do inglês, chemical kindling), são administradas doses repetidas, em concentrações subconvulsivantes, em diferentes intervalos de tempo como de 24 em 24 ou de 48 em 48 horas. O tratamento varia de 2 a 8 semanas (PEDLEY, 2008).

O PTZ é um antagonista não-competitivo do receptor GABA_A (ácido gama-aminobutírico), um receptor inotrópico permeável a cloreto, cuja ativação provoca hiperpolarização localizada na membrana neuronal que torna o neurônio refratário a estímulos despolarizantes (LOSCHER, 1998). Algumas das principais vantagens do modelo do PTZ são o curto período de latência para crise generalizada tônico-clônica (LOSCHER, 1998), e o alto valor preditivo de eficácia clínica. De fato, fármacos como etossuximida, trimetadiona e valproato, assim como os benzodiazepínicos e barbitúricos, foram identificados com atividade anticonvulsivante a partir de estudos com o PTZ (LOSCHER e SCHMIDT, 1988; LOSCHER, 2002).

2.4 CRISES EPILÉPTICAS E A INFLAMAÇÃO

Na última década, evidências experimentais e clínicas têm sustentado a hipótese de que a presença de processos inflamatórios no cérebro pode constituir um mecanismo comum na fisiopatologia das convulsões e da epilepsia (VEZZANI A. , 2011; DEDEURWAERDERE *et al.*, 2012). De fato, estudos epidemiológicos mostram que não há risco de epilepsia após meningite asséptica, porém as meningites bacterianas aumentam o risco em cinco vezes. As encefalites virais aumentam o risco em dez vezes (OLIVEIRA, 2006). Além do mais, pacientes com encefalite causadas por diversos agentes apresentam crises, que podem persistir mesmo após eliminação do agente infeccioso. Curiosamente, tais crises são atenuadas por anti-inflamatórios (SINGH e PRABHAKAR, 2008). Ademais, pacientes com epilepsia do lobo temporal e camundongos geneticamente suscetíveis á convulsões mostram aumento da COX-2, enzima induzida particularmente em resposta a estímulos inflamatórios, no cérebro (OKADA *et al.*, 2001; DESJARDINS *et al.*, 2003).

Estes dados indicam uma associação estreita entre inflamação no sistema nervoso central e ocorrência de crises, e que mediadores da inflamação são agentes prováveis desta excitabilidade aumentada. Considerando esses achados clínicos farmacológicos é de especial interesse determinar se agentes anti-inflamatórios, como o ácido rosmarínico, também possuem ação anticonvulsivante (BEN-MENACHEM E, 2007).

2.5 CRISES EPILEPTICAS E ESTRESSE OXIDATIVO

Os radicais livres nos quais os elétrons desemparelhados encontram-se centrados no átomo de oxigênio são identificados como espécies reativas de oxigênio (ERO), e as principais são o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($\bullet OH$) (HALLIWELL, 1999).

O estresse oxidativo é o resultado do desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante endógeno e/ou exógeno e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Embora os organismos vivos possuam um ambiente intracelular equilibrado entre as formas oxidadas e reduzidas das moléculas. No entanto, o aumento da excitabilidade neuronal e a diminuição da inibição de tal excitabilidade, característico das crises epiléticas, induzem a produção excessiva das EROs, tornando o cérebro vulnerável ao dano oxidativo e ao desenvolvimento de crises epiléticas, podendo também levar a injúria e morte celular (MELDRUM, 1984; HALLIWELL, 2006).

Todos os tecidos estão suscetíveis aos danos causados pelas EROs, porém o SNC, (FREITAS *et al.*, 2005) devido seu grande consumo de oxigênio e sua baixa propriedade antioxidante, apresenta maior vulnerabilidade em desenvolver estresse oxidativo (KHAIROVA *et al.*, 2012; OLMEZ e OZYURT, 2012).

A nível celular, as membranas são importante alvo do estresse oxidativo em decorrência da lipoperoxidação (LPO), que se trata de um processo no qual ocorre a oxidação das cadeias de ácidos graxos polinsaturadas, incluindo aqueles que compõem a membrana das células ou organelas, devido à ação dos radicais livres. Como consequência, ocorrem transtornos nas funções exercidas pela membrana plasmática tais como seletividade e transporte ou até mesmo liberação do conteúdo de organelas, como por exemplo, as enzimas hidrolíticas dos lisossomas e a formação de produtos tóxicos (como o malondialdeído) gerando uma cascata de eventos deletérios à célula. Frente a esses dados, a lipoperoxidação vem sendo associada com os processos de neurodegeneração, e apontada como responsável pelo desenvolvimento da injúria neuronal, que acontece nos quadros de epilepsia (BEAL, 1996; FREITAS *et al.*, 2005). Nesse contexto, terapias que visam minimizar o estresse oxidativo e, conseqüentemente, o dano neuronal, têm sido muito utilizadas para diminuir os prejuízos causados pela epilepsia (SANTOS *et al.*, 2008).

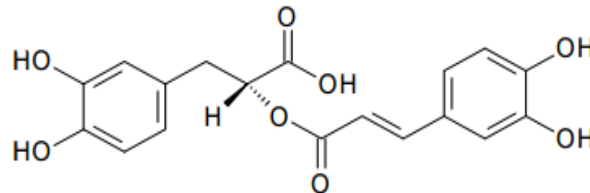
2.6 ÁCIDO ROSMARÍNICO

Considerando a perspectiva histórica é possível observar que os produtos naturais assumem papel relevante para a descoberta de novas drogas, o que tem mobilizado o interesse de pesquisadores de diversas áreas no sentido de identificar moléculas bioativas a partir de produtos naturais (NEWMAN *et al.*, 2003). O Brasil é possuidor de uma flora rica, composta de uma infinidade de espécies com aplicações terapêuticas e constitui-se o mais rico do mundo em espécies vegetais, e que muito pode contribuir para o avanço da medicina mundial (ALBAGLI, 2001).

O ácido rosmarínico foi isolado pela primeira vez a partir do *Rosmarinus officinalis* (alecrim), de onde recebeu seu nome, pelos químicos italianos Scarpati e Oriente (SCARPATI M.L., 1958). É um constituinte de diversas espécies vegetais, incluindo *Lavandula angustifolia* (alfazema), *Melissa officinalis* (erva cidreira), *Mentha pulegium* (poejo), *Mentha spicata* (hortelã-peluda), *Origanum vulgare* (orégano), *Salvia officinalis* (sálvia), *Satureja hortensis* (segurelha), *Satureja macrantha*, dentre outras (SHEKARCHI *et al.*, 2012). Sua estrutura molecular foi elucidada como um éster do ácido cafeico e ácido 3,4-dihidroxifenil

lático, como mostra a figura abaixo (Figura 1), sua fórmula estrutural é $C_{18}H_{16}O_8$, com PM = 360, 315.

Figura 1- Estrutura química do ácido rosmarínico



Fonte: Adaptação da Wikipédia

Disponível em:

<https://es.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_rosmar%C3%ADnico#/media/File:Rosmarinic_acid.png>.

O ácido rosmarínico quando aplicado topicamente na pele é absorvido e distribuído pelo sangue, ossos e músculos. Já quando administrado por via intravenosa, distribui-se por vários tecidos, como rins, coração, fígado e baço (RITSCHER, 1989) (BABA *et al.*, 2004). É absorvido e metabolizado nas formas conjugadas ou metiladas dos ácidos caféico, ferúlico e coumárico, antes de ser excretado na urina (BABA *et al.*, 2004; JIROVSKY *et al.*, 2007). Esta metabolização provavelmente ocorra antes do ácido rosmarínico chegar ao fígado, devido ao fato que este não é capaz de alterar as enzimas de metabolização de xenobióticos em fígado de camundongos (DEBERSAC *et al.*, 2001).

Diversas atividades biológicas vêm sendo descritas para o ácido rosmarínico, como por exemplo, atividade neuroprotetora, ansiolítica, antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, antibacteriana, antiviral, anti-HIV, dentre outras (SIMMONDS, 2003; VALENTOVA, 2007; DUBOIS, 2008).

A atividade antimutagênica do ácido rosmarínico foi relatada por sua capacidade estender o tempo de vida do nemátodo *Caenorhabditis elegans*, através do bloqueio da quinase oncogênica denominada PAK-1 (PIETSCH *et al.*, 2011), uma enzima que é responsável não somente na transformação maligna, mas também por várias outras doenças, incluindo doenças inflamatórias (asma e artrite), doenças infecciosas (malária, AIDS, gripe) e doenças neurológicas (neurofibromatose, esclerose tuberosa, doença de Alzheimer, doença de Huntington, epilepsia e depressão) (YANASE *et al.*, 2013).

A nível de sistema nervoso central o ácido rosmarínico exerce atividade neuroprotetora. Estudos de Iuvone e colaboradores (IUVONE *et al.*, 2006) demonstram que o ácido rosmarínico é capaz de proteger células PC12 da neurotoxicidade promovida pelo peptídeo β -amilóide, assim como inibir a oligomerização e a formação da proteína β amilóide (YAMADA *et al.*, 2015). Além disso, o ácido rosmarínico é capaz de exercer importante efeito protetor em neurônios dopaminérgicos contra a neurotoxicidade induzida por 6-OHDA (6-hidroxidopamina) através da sua propriedade antioxidante e antiapoptótica indicando seu potencial no tratamento da Doença de Parkinson (REN *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2012).

Uma importante característica do ácido rosmarínico é sua considerável atividade antioxidante, a qual é em grande parte responsável pela ação neuroprotetora, por meio da atividade neutralizadora de espécies reativas de oxigênio como o peroxinitrito e peróxido de hidrogênio (CHOI *et al.*, 2002; QIAO *et al.*, 2005; LIHUA GUA, 2008). Estudos de Yinrong Lu (YINRONG LU 1999) mostram que os derivados do ácido rosmarínico, provenientes do extrato de sálvia, apresentam elevado potencial antioxidante, de 15 a 20 vezes maior que o trolox, um antioxidante clássico utilizado com padrão (YINRONG LU 1999). Além disso, Gao e colaboradores mostraram que o ácido rosmarínico também é capaz de atenuar a injúria celular induzida pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e possui atividades antiapoptóticas, especialmente por aumentar o potencial de membrana mitocondrial e inibir a atividade da caspase-3 (GAO *et al.*, 2005).

O ácido rosmarínico além de possuir atividade antioxidante, possui uma elevada atividade anti-inflamatória. As primeiras propriedades anti-inflamatórias do ácido rosmarínico foram demonstradas por meio da sua capacidade de bloquear a fixação do complemento e inibir as lipooxigenases e ciclooxigenases (OKUDA, 1987). Estudos mais recentes mostram que o AR é capaz de inibir a atividade de enzimas chave da resposta inflamatória, como a ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2) (KELM *et al.*, 2000). É importante mencionar que a eficácia e potência de inibição são semelhantes a inibidores clássicos destas enzimas, como a aspirina e o naproxeno. Ademais, o ácido rosmarínico é capaz de reduzir o conteúdo de neutrófilos e eosinófilos no lavado nasal de pacientes com rinoconjuntivite alérgica sazonal e ocasiona o aumento na expressão de mediadores inflamatórios em um modelo animal desta condição (OSAKABE *et al.*, 2004).

De modo importante, é relatado que o ácido rosmarínico é responsável por uma inibição significativa e dose dependente na resposta nociceptiva causada pela injeção intraplantar de glutamato, um dos mais importantes neurotransmissores excitatórios em mamíferos (GUGINSKI *et al.*, 2009). Na luz dos efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes

descritos para o ácido rosmarínico, e considerando que a) inibidores da ciclooxigenase-2 possuem atividade anticonvulsivante, (M. S. OLIVEIRA; A. F. FURIAN, 2008) b) que o estresse oxidativo desempenha um papel importante no desenvolvimento das crises epilépticas (SHIN *et al.*, 2011) e c) que substâncias que antagonizam os efeitos do glutamato em geral possuem atividade anticonvulsivante (OLIVEIRA M. S.; FURIAN, 2008), é de extrema importância avaliar a possível atividade anticonvulsivante do ácido rosmarínico.

Em um recente estudo, Khamse e colaboradores (KHAMSE *et al.*, 2015) relataram que o AR possui efeito neuroprotetor no modelo de epilepsia do lobo temporal induzido por kainato. O ácido rosmarínico foi administrado oralmente na dose 10 mg/kg durante uma semana e uma hora após a última injeção, uma dose única de Kainato foi injetado unilateralmente no hipocampo direito de ratos Wistar. Os resultados deste estudo mostram que os animais pré-tratados com ácido rosmarínico exibem apenas leve a moderados sinais comportamentais (baixo escore comportamental das crises) quando comparado com o grupo tratado com veículo e kainato. Além disso, o AR diminuiu a produção de malondialdeído (MDA) e nitrito, e aumentou a atividade da enzima catalase (KHAMSE *et al.*, 2015). Em outro estudo recente, Coelho *et al.* (COELHO *et al.*, 2015) investigou o efeito do ácido rosmarínico no modelo de abrasamento químico induzido por PTZ. Os animais receberam injeções intraperitoneal de ácido rosmarínico (1, 2 ou 4 mg/kg), 30 minutos antes da dose sub-efetiva de PTZ (50 mg/kg, s.c.). O comportamento foi observado e gravado por 30 min. Os dados encontrados mostram que o ácido rosmarínico não previne o desenvolvimento do abrasamento e não possui efeito sobre a latência das crises.

Dentre os diversos mecanismos de ação das drogas anticonvulsivantes, destaca-se o aumento da neurotransmissão inibitória mediada pelo GABA (TREIMAN, 2001). Nesse contexto, estudos em frações do extrato metanólico de *Melissa officinalis L.* demonstraram que o ácido rosmarínico é um potente inibidor *in vitro* enzima GABA transaminase (GABA-T) (AWAD *et al.*, 2009), responsável pela degradação de GABA, e enzima alvo na terapia de ansiedade, epilepsia e distúrbios neurológicos relacionados.

Diante desses dados, e frente ao fato que a oxidação e a inflamação estão associadas a fisiopatologia das crises epilépticas, a presente dissertação foi realizada com o intuito de verificar se o ácido rosmarínico, um composto anti-inflamatório e antioxidante, possui atividade anticonvulsivante.

3 OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral desta dissertação é avaliar o potencial anticonvulsivante do ácido rosmarínico no modelo experimental de crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol e pilocarpina, assim como o efeito do seu tratamento subcrônico sobre vários parâmetros comportamentais após o *status epilepticus*.

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- a) Determinar se a administração de diferentes doses de ácido rosmarínico é capaz de atenuar as crises epiléticas no modelo agudo de crises epiléticas induzido por pentilenotetrazol e pilocarpina.
- b) Avaliar o efeito da administração aguda do ácido rosmarínico sobre parâmetros comportamentais diversos.
- c) Determinar se a administração subcrônica do ácido rosmarínico é capaz de alterar a latência ou reduzir a frequência das crises epiléticas após o *status epilepticus* induzido por pilocarpina.
- d) Avaliar o efeito do tratamento subcrônico do ácido rosmarínico sobre os parâmetros comportamentais após o *status epilepticus* induzido por pilocarpina

4 ARTIGO CIENTÍFICO

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, este está intitulado como “*Rosmarinic acid is anticonvulsant against seizures induced by pentylentetrazol and pilocarpine in mice*”, foi submetido para revista *Epilepsy & Behavior*.

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).

Rosmarinic acid is anticonvulsant against seizures induced by pentylenetetrazol and pilocarpine in mice

Jéssica Grigoletto^a, Clarissa Vasconcelos de Oliveira^a, Ana Claudia Beck Grauncke^a, Thaíze Lopes de Souza^a, Naieli Schiefelbein Souto^b, Mayara Lütchemeyer de Freitas^a, Ana Flávia Furian^{a,b}, Adair Roberto Soares Santos^{a,c}, Mauro Schneider Oliveira^{a,*}

^a Graduate Program in Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^b Graduate Program in Food and Science Technology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^cLaboratory of Neurobiology of Pain and Inflammation, Department of Physiological Sciences, Center of Biological Sciences, Federal University of Santa Catarina, Trindade, Florianopolis 88040-900, SC, Brazil.

*Corresponding author: Dr. Mauro Schneider Oliveira, 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

Aims: Epilepsy is a chronic neurological disease characterized by spontaneous recurrent seizures (SRS). However, current anticonvulsant drugs are ineffective in nearly one third of patients and may cause significant adverse effects. Rosmarinic acid is a naturally-occurring substance which displays several biological effects including antioxidant and neuroprotective activity. Since oxidative stress and excitotoxicity play a role in the pathophysiology of seizures, we aimed the present study to test the hypothesis that rosmarinic acid displays anticonvulsant and antiepileptogenic effects.

Main methods: Female C57BL/6 mice were administered with rosmarinic acid (0, 3, 10 or 30 mg/kg; p.o.) 60 min before the injection of pentylenetetrazol (PTZ, 60 mg/kg; i.p.) or pilocarpine (300 mg/kg; i.p.). Myoclonic and generalized seizure latencies and generalized seizure duration were analyzed by behavioral and electroencephalographic (EEG) methods. The effect of acute administration of rosmarinic acid on mice behavior in the open-field, object recognition, rotarod, and forced swim tests were also evaluated. In an independent set of experiments, we evaluated the effect of rosmarinic acid (3 or 30 mg/kg; p.o. for 14 days) on development of SRS and behavioral comorbidities in the pilocarpine post status epilepticus (SE) model of epilepsy.

Key findings: Rosmarinic acid dose-dependently (peak effect at 30 mg/kg) increased the latency to myoclonic jerks (by 281 %) and generalized seizures (by 449 %) in PTZ model, and increased the latency to myoclonic jerks (by 345 %) induced by pilocarpine. Rosmarinic acid (30 mg/kg) increased in the number of crossings the time in the center of open-field and the immobility time in the forced swim test. In the chronic epilepsy model treatment with rosmarinic acid did not prevent the appearing of SRS or behavioral comorbidities in post SE mice.

Significance: Rosmarinic acid displays anticonvulsant activity against acute seizures induced by PTZ or pilocarpine in mice. No antiepileptogenic effects were found in the pilocarpine post SE model of epilepsy. These results may contribute to future development of new anticonvulsant drugs.

1. Introduction

Epilepsy is a chronic neurological disease defined by the presence of a pathologic and enduring tendency to have recurrent seizures [1]. Importantly, epilepsy is linked to numerous physical, neurological, mental health and cognitive comorbidities, including heart disease, autism spectrum disorders, Alzheimer's disease, depression, anxiety, and learning and memory deficits [2]. In this context, epilepsy has been considered a major worldwide public health problem [3]. Accordingly, the World Health Organization estimates that epilepsy affects around 70 million people worldwide; 80 per cent of them are in developing countries. In these countries, although most cases can be treated, around 75% of people with epilepsy are not receiving appropriate treatment [4].

Despite the availability of a wide range of antiepileptic drugs (AEDs), about one-third of individuals with epilepsy still experience seizures that do not respond to medication [5]. Development of new therapeutic strategies for seizure activity is therefore important, and understanding the molecular basis of seizure onset and maintenance, as well as probing for new targets for antiepileptic drugs is a fundamental part of this process. In this context, phytomedicines can potentially play an important role in the development of new antiepileptic drugs, since it has been shown that several plant extracts and products may be useful for the treatment of convulsions or seizures [6].

Rosmarinic acid is an ester of caffeic acids and 3,4-dihydroxyphenyl lactic acid commonly found in a broad range of plant species [7]. A number of interesting biological activities have been described for rosmarinic acid, including antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective activity [8]. Since oxidative stress [9], inflammatory processes in the brain [10] and excitotoxicity [11] can be shared and fundamental mechanisms in the pathophysiology of seizures, is of particular interest to determine if antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective agents are also anticonvulsant. In this context, a few studies have investigated the effect of rosmarinic acid on seizure activity. For instance, a seven-day pretreatment with rosmarinic acid reduced the severity kainate-induced seizures in rats [12]. Conversely, in another study administration of rosmarinic acid did not prevent kindling development induced by pentylenetetrazol (PTZ) in mice [13]. In light of these apparently conflicting results, and in order to further evaluate the anticonvulsant potential of rosmarinic acid, we aimed the present study to investigate the effect of this natural product on seizure activity in experimental models of epilepsy in which it has not been evaluated. In this context, we tested the effect of rosmarinic acid against the seizures induced by acute injection of PTZ or pilocarpine, two convulsants that have been widely used in the preclinical screening

of new AEDs [14]. Furthermore, we evaluated the effect of rosmarinic acid on spontaneous recurrent seizures (SRS) and behavioral comorbidities in the pilocarpine-induced status epilepticus (SE) model of epilepsy.

2. Materials and methods

2.1. Animals and reagents

Female C57BL/6 mice (20-30g; 30-60 day-old) were used. Animals were maintained under controlled light and environment (12:12 h light-dark cycle, 24 ± 1 °C, 55% relative humidity) with free access to water and food (SupraTM, Santa Maria, RS, Brazil). All experimental protocols aimed to keep the number of animals used to a minimum, as well as their suffering. These were conducted in accordance with national and international legislation (guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation – CONCEA – and of U.S. Public Health Service’s Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals – PHS Policy), and with the approval of the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Santa Maria.

Pentylentetrazol (PTZ) and Pilocarpine were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri) and was dissolved in 0.9 % NaCl to 6mg/mL e 30mg/mL, respectively. Rosmarinic acid was purchased from Sigma, and dissolved in 0.9 % NaCl containing 5% of Tween 80.

2.2. Acute seizure models

Animals were individually placed in glass boxes and administered by gavage with increasing doses of rosmarinic acid (0, 3, 10 or 30 mg/kg) or vehicle (0.9% NaCl containing 0.05 % Tween 80). Sixty minutes thereafter, PTZ (60 mg/kg) or pilocarpine (300 mg/kg) were injected intraperitoneally. All solutions were administered at 10 ml solution per kg of body weight. After the injection of convulsant the animals were observed for 15 min (PTZ) or 60 min (pilocarpine), and during this time the latency to myoclonic jerks, latency generalized seizure and the duration of the first generalized seizure were recorded. Doses and schedules for drug injections were selected based on pilot experiments.

2.3. Electroencephalography (EEG)

Seizure activity and the effect of rosmarinic acid in acute seizure models induced by PTZ or pilocarpine were evaluated in a subset of animals (n= 3-4) by electroencephalographic (EEG) recordings. The procedures for recording electrode implantation and EEG recordings

are described in detail elsewhere [15]. Briefly, a 30 min baseline recording was obtained to establish an adequate control period. After the baseline recording mice were injected with rosmarinic acid (30 mg/kg, p.o.) or vehicle (10 ml/kg, p.o.), 60 min before the injection of PTZ (60 mg/kg, i.p.) or pilocarpine (300 mg/kg, i.p.). Following convulsant injection the behavior was followed up and EEG was recorded for 15 min (PTZ) or 60 min (pilocarpine). EEG signals were stored in a PC for off-line analysis.

2.4. Pilocarpine-induced SE and chronic model of epilepsy

SE was induced in C57BL/6 mice following standard procedures [16]. Briefly, thirty minutes before the injections of pilocarpine, methylscopolamine (a muscarinic antagonist) was administered intraperitoneally (1 mg/kg) to reduce adverse, peripheral effects. Next, mice were intraperitoneally injected with repeated low-dose pilocarpine hydrochloride (100 mg/kg) every 20 min until onset of status epilepticus (SE) characterized by continuous limbic seizure activity. SE was terminated after 60 min with diazepam (10 mg/kg, i.p.). Controls animals received methylscopolamine and diazepam, but received NaCl 0.9 % instead of pilocarpine. All mice were hand-fed with moistened chow and fresh fruits (apples and bananas) and injected with 5% dextrose in lactated Ringer's solution for three days following the SE or control procedure for welfare purposes.

In order to evaluate the effect of rosmarinic acid on SRS and behavioral comorbidities control and post SE mice received daily doses of vehicle or rosmarinic acid (3 or 30 mg/kg, p.o.) during 14 consecutive days. Treatment with rosmarinic acid started 3 h after diazepam, and all solutions were prepared fresh daily. Starting 24 hours after the SE, all animals were daily monitored for the appearing of SRS. Monitoring was performed during the light phase of circadian cycle (8-10 hours per day) and was carried out until the end of the experimental period (14 days after SE), totalizing approximately 100-120 hours per animal. In addition, all SRS that occurred during handling (weighing, gavage, tagging, etc) were noted.

2.5 Behavioral tests

The effect of rosmarinic acid on mice behavior or behavioral comorbidities of epilepsy was evaluated using two different protocols:

Protocol #1: in this set of experiments an anticonvulsant dose of rosmarinic acid (30 mg/kg) was administrated 60 min before of the beginning each test (open-field, object recognition, rotarod, and forced swim). Independent group of naïve mice were used in each test, and each animal was used only once.

Protocol #2: starting one week after the induction of SE, control and SE mice were subjected to a behavioral test battery. All mice underwent all behavioral tests in the following sequence: open-field, object recognition, rotarod, sucrose preference and forced swim. The sequence of behavioral tests was organized from the least to the most aversive [16].

The procedures for open field, object recognition and forced swim tests are described in detail elsewhere [15]. The rotarod rod test for naïve animals was carried out as reported in [15], but the paradigm was different for post SE animals (cut-off latency was 300 s and the procedure included an additional training session). For the sucrose preference test mice were placed in individual cages which gave access to two bottles, one with water (100 mL) and other with a 4 % aqueous sucrose solution (100 mL). Water and sucrose consumption over 48 hours were measured and sucrose preference was calculated as percentage of total fluid consumed.

2.7 Statistical analyses

Kolmogorov-Smirnov test was used to verify data normality and Bartlett's test was used to verify homogeneity of variances. Nonparametric data (seizure latencies) were analyzed by the Kruskal-Wallis test followed by *post hoc* analyses with the Dunn's multiple comparisons test. Dose-response relationships were tested with the Spearman's rank correlation test. Acute seizure duration, latency to the first SRS and number of SRS were analyzed by one-way ANOVA. Data from behavioral testing were analyzed by two-tailed unpaired Student's t test (protocol #1) or two-way ANOVA (protocol #2). Parametric *post hoc* analyses were carried out by the Student-Newman-Keuls multiple comparison test. A probability of $P < 0.05$ was considered significant.

3. Results

Figure 1 shows the effect of increasing doses of rosmarinic acid on the seizures induced by PTZ. Statistical analysis revealed that the dose of 30 mg/kg increased the latency for the first myoclonic jerk (281 % average increase versus vehicle-treated mice) [$H(3) = 9.102$; $P < 0.05$ - Fig. 1A] and the first generalized tonic-clonic seizure (449 % average increase versus vehicle-treated mice) [$H(3) = 10.55$; $P < 0.05$ - Fig. 1B]. Spearman analysis revealed a significant positive correlation between the doses of rosmarinic acid and the latency to PTZ-induced myoclonic ($r_s = 0.5285$; $P < 0.05$) and generalized ($r_s = 0.5548$; $P < 0.05$) seizures. The duration of generalized convulsions induced by PTZ was not altered by any of the doses of rosmarinic acid [$F(3,30) = 0.451$; $P > 0.05$ - Fig. 1C]. In order to confirm

and extend the data related to the effect of the rosmarinic acid on the seizures induced by PTZ, we also evaluated in a subset of animals by electroencephalographic (EEG) recordings. Electroencephalographic experiments depicted in Figure 1D-E confirmed that rosmarinic acid (30mg/kg) delayed the appearance on the EEG of PTZ-induced myoclonic jerks and generalized seizures.

We also evaluated the effect of rosmarinic acid on the seizures induced by pilocarpine. Statistical analysis revealed that the dose of 30 mg/kg increased the latency for the first myoclonic jerk (345 % average increase versus vehicle-treated mice) [$H(3) = 12.72$; $P < 0.05$ - Fig. 2A]. On the other hand, onset latency [$H(3) = 1.123$; $P > 0.05$ - Fig. 2B] and duration [$F(3,35) = 0.2024$; $P > 0.05$ - Fig. 2C] of the first pilocarpine-induced generalized tonic-clonic seizure did not change. Spearman analysis revealed a significant positive correlation between the doses of rosmarinic acid and the latency to myoclonic seizures induced by pilocarpine ($r_s = 0.5753$; $P < 0.05$). Electroencephalographic experiments depicted in Figure 2D-E confirmed that rosmarinic acid (30mg/kg) treatment delayed the appearance of pilocarpine-induced myoclonic jerks.

In order to investigate whether effects on behavior and motor skills accompanied the anticonvulsant effect of rosmarinic acid, we tested independent group of mice in the open-field, object recognition, rotarod and forced swim and tests (Figure 3). Statistical analysis revealed that rosmarinic acid increased the number of crossings [$t(10) = 3.790$; $P < 0.05$ - Fig. 3A] and spent more time exploring the center [$t(10) = 2.327$; $P < 0.05$ - Fig. 3B] in the open-field test. The number of rearing responses [$t(10) = 1.503$; $P > 0.05$ - Fig. 3C] or the latency to start the exploration [$t(10) = 0.088$; $P > 0.05$ - Fig. 3D] were not altered. In addition, no significant differences were found in the object recognition test regarding the time spent in object exploration during the habituation trial [$t(8) = 0.6226$; $P > 0.05$ - Fig. 3E] or in the recognition index 24 h after habituation [$t(8) = 0.0815$; $P > 0.05$ - Fig. 3F]. The latency to fall in the rotarod test was not altered by rosmarinic acid [$t(22) = 0.0623$; $P > 0.05$ - Fig. 3G]. On the other hand, rosmarinic acid increased the immobility time in the forced swim test [$t(8) = 2.639$; $P < 0.05$ - Fig. 3H].

Regarding the post SE model of epilepsy, we found no effect of rosmarinic acid on the latency to the first SRS [$F(2,22) = 0.6065$; $P > 0.05$ - Fig. 4A] or on the total number of SRS during the 2-week monitoring period [$F(2, 22) = 0.5628$; $P > 0.05$ - Fig. 4B]. In addition, no effect of rosmarinic acid was detected on the behavioral comorbidities of epilepsy. In the open field test, the number of crossings was not altered by SE or rosmarinic acid [$F(2,38) = 0.1561$; $P > 0.05$ - Fig. 5A], but post SE mice spent less time exploring the center [$F(1,38) = 20.14$;

$P < 0.05$ - Fig. 5B)], exhibited fewer rearing responses [$F(1,38) = 23.99$; $P < 0.05$ - Fig. 5C)] and increased latency to start exploration [$F(1,38) = 5.499$; $P < 0.05$ - Fig. 5D)] than their control counterparts. In the object recognition test post SE mice spent less time exploring the objects in the habituation session [$F(1,38) = 57.35$; $P < 0.05$ - Fig. 5E)]. The total exploration time was reduced to an extent that made the analysis of recognition index at 4 or 24 h unfeasible (data not shown). Considering the sucrose preference test, post SE mice displayed reduced consumption of sucrose in comparison with their control counterparts [$F(1,38) = 15.64$; $P < 0.05$ - Fig. 5F)]. In the rotarod test, the latency to fall was not altered by SE or rosmarinic acid [$F(2,38) = 0.3215$; $P > 0.05$ - Fig. 5G)]. In the forced swim test post SE mice showed reduced immobility time when compared to controls [$F(1,38) = 11.99$; $P < 0.05$ - Fig. 5H)]. None of the behavioral changes displayed by post SE mice was modified by rosmarinic acid.

4. Discussion

Several biological actions have been described for rosmarinic acid [8], but only a few studies have investigated the effect of this natural product on seizure activity. For instance, in the study by Khamse et al. [12] rosmarinic acid was orally administered at the dose of 10 mg/kg/day for seven days and one hour after the last injection a single dose of kainate was injected unilaterally into the right hippocampus of Wistar rats. Animals pretreated with rosmarinic acid exhibited only mild to moderate behavioral signs (lower seizure scores) when compared with the vehicle-kainate group [12]. In the study by Coelho et al. [17], authors investigated the effect of rosmarinic acid on PTZ-elicited kindling development, an experimental model of epileptogenesis in which repeated administrations of low doses of a convulsant drug led to a progressive decrease in the seizure threshold. Animals received intraperitoneal injections of rosmarinic acid (1, 2 or 4 mg/kg) 30 min before the subeffective dose of PTZ (50 mg/kg, s.c.) and seizure behavior was recorded for 30 min. Rosmarinic acid did not prevent the kindling development and had no effect on seizure latency, suggesting no antiepileptogenic effects [17]. Considering our present results, acute oral administration of rosmarinic acid (30 mg/kg) produced a significant increase in the latency to myoclonic jerks induced by PTZ or pilocarpine and increased the latency to PTZ-induced generalized seizures. EEG experiments confirmed the results from behavioral seizure analysis, demonstrating that the rosmarinic acid-induced delay of seizure onset also occurs at the electrophysiological level. Conversely, we found no effect of rosmarinic acid on the development of SRS or behavioral comorbidities in the chronic epilepsy model elicited by

pilocarpine-induced SE. Altogether, data gathered in the present study confirm and extend literature data suggesting that rosmarinic acid displays anticonvulsant, but not antiepileptogenic, properties.

PTZ and pilocarpine have been widely used in the screening of new compounds with anticonvulsant activity [14], but to the best of our knowledge have not been previously employed to assess potential acute effects of rosmarinic acid. These convulsants cause an imbalance between central excitatory and inhibitory transmission ultimately leading to generation of ictal activity. The convulsant ability of PTZ depends most part on antagonism of the GABA_A receptor complex, likely through an allosteric interaction with the Cl⁻ channel which decreases the GABA-mediated inhibitory currents [18]. On the other hand, pilocarpine induces seizures by activation of the M₁ muscarinic receptor subtype, since M₁ receptor knockout mice do not develop seizures in response to pilocarpine [19]. Nevertheless, it has been suggested that following initiation by M₁ receptors, pilocarpine seizures are maintained by NMDA receptor activation [20]. Although the mechanisms underlying the initiation seizures induced by PTZ and pilocarpine are somewhat different, but is interesting to observe that seizures induced by PTZ and pilocarpine are sensitive to classical anticonvulsants, and the suitability of these animal models for screening of new anticonvulsants [14].

The mechanisms underlying the anticonvulsant effect of rosmarinic acid may include activation of the GABAergic system. For instance, rosmarinic acid is an *in vitro* inhibitor of the GABA-degrading enzyme GABA transaminase (E_{max} = 40% inhibition at 100 µg/mL), as identified in a bioassay-guided fractionation of *Melissa officinalis* L. methanolic extract [21]. Regarding this point, it is important to note that the clinically available anticonvulsant vigabatrin was rationally designed to inhibit GABA transaminase, which results in a widespread increase of GABA concentrations in the brain [22].

The anticonvulsant effect of rosmarinic acid may also involve modulation of glutamatergic excitatory neurotransmission. For instance, rosmarinic acid produces a significant and dose-dependent (0.3-3mg/Kg) inhibition of the nociceptive response caused by intraplantar injection of glutamate [23]. This nociceptive response caused by glutamate seems to involve peripheral, spinal and supra-spinal sites and it is mediated by NMDA and non NMDA receptors [24]. Therefore, suppression of glutamate-induced nociception can be associated with its interaction with the glutamatergic system [25].

In addition to modulation of GABA and glutamate-mediated transmission, antioxidant and anti-inflammatory actions may play a role in the anticonvulsant effect of rosmarinic acid. Accordingly, treatment with rosmarinic acid significantly restored altered locomotor activity

and cognitive performance and blunted oxidative stress and inflammatory response in a rat model of Alzheimer's disease [26]. Moreover, anti-inflammatories like celecoxib, aspirin, naproxen, nimesulide and rofecoxib or antioxidant substances including ascorbic acid, α -tocopherol, N-acetylcysteine, resveratrol and curcumin display anticonvulsant activity [9, 27, 28].

In the present study we also found that the anticonvulsant dose of rosmarinic acid increased the immobility time in the forced swim test. Initially, this data appears conflicting with previous studies showing antidepressant-like effects of rosmarinic acid. For instance, acute treatment with a low dose of rosmarinic acid (2 mg/kg), 30 min prior to the start of the test session of forced swimming test, reduced the duration of immobility, suggesting an antidepressant-like effect [29]. Of course, one important difference between the present study and that by Takeda et al. [29] is the rosmarinic acid dosing, since the dose used here was 15 times larger (30 versus 2 mg/kg). Notwithstanding, the above discussed potential improvement of GABAergic transmission may also explain the increase in the immobility time after administration of rosmarinic acid. In fact, it has been showed that small doses of GABA or muscimol (a GABA_A receptor agonist) decrease forced swimming-induced immobility period, while higher doses enhance the immobility period [30]. In addition, it is worth mentioning that prolonged forced swim test immobility was also observed with aminooxyacetic acid, a GABA-transaminase inhibitor [31].

Despite the increased immobility time in the forced swim test, it is important to note that the presently reported anticonvulsant effect of rosmarinic acid accompanied the well-known anxiolytic-like activity of this compound (as suggested by increased number of crossings and time in the center of open-field arena) and did not bring together adverse effects on motor coordination performance (rotarod). These results are in agreement with the recognized low toxicity of rosmarinic acid in mice, as shown by an LD₅₀ of 561 mg/kg after intravenous administration [7].

Considering the lack of effect of rosmarinic acid on SRS and behavioral comorbidities of epilepsy, one possible explanation might be the well-known impairment of the GABAergic system that occurs during SE and in the course of epileptogenesis. For instance, studies shown that during SE there is a reduced response in the GABA-mediated inhibition of hippocampal principal neurons and a reduced response of these neurons to benzodiazepines [32]. This reduced response in the GABA-mediated inhibitions is caused by decreased surface expression of GABA receptor subunits, triggered by an increased in the rate of internalization during SE [33]. In addition, GABA_A receptor subunit composition is altered in epilepsy

models, and these changes are associated with pharmacoresistance to GABA_A receptor agonists [34]. Of course, further in-depth studies are needed to determine whether changes in the efficiency of GABAergic system occurring during SE and epileptogenesis underlie the lack of effect of rosmarinic acid on SRS and behavioral comorbidities development. Regarding this point, it is also important to consider that most previous preclinical attempts to develop antiepileptogenic strategies based on monotherapies were unsuccessful [35]. Furthermore, combinatorial approaches (*i.e.* polytherapy) targeting multiple mechanisms relevant for antiepileptogenesis have been considered more promising options for future development of epilepsy-modifying drugs [36]. In this context, given its acute anticonvulsant effects, rosmarinic acid associated with other drugs may be an interesting alternative to be tested in future studies.

5. Conclusion

Rosmarinic acid displays anticonvulsant activity against acute seizures induced by PTZ and pilocarpine in mice. No effects of rosmarinic acid on development of SRS and behavioral comorbidities in the chronic pilocarpine model of epilepsy were found. Additional studies are needed to investigate the clinical implications of these findings as well as its underlying mechanisms.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the student fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) (to J.G., C.V.O., N.S.S. and M.L.F.), CNPq/Pibic (to A.C.B.G.) and Fapergs/Probic (to T.L.S.). A.F.F., A.R.S.S and M.S.O. are grantees of CNPq research productivity fellowships. The authors thank Dr. Luiz Fernando Freire Royes and Michele Rechia Figuera for kindly providing EEG laboratory facilities.

Conflict of Interest statement

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 2014;55: 475-82.
- [2] England MJL, C. T.Schultz, A. M.Strawbridge, L. M. Epilepsy Across the Spectrum: Promoting Health and Understanding. Washington (DC): National Academies Press (US); 2012.
- [3] Schmidt D, Sillanpaa M. Evidence-based review on the natural history of the epilepsies. *Curr Opin Neurol* 2012;25: 159-63.
- [4] WHO. World Health Organization. In: Neurological disorders: Public health challenges. Geneva, Switzerland.; 2006.
- [5] Perucca E, French J, Bialer M. Development of new antiepileptic drugs: challenges, incentives, and recent advances. *Lancet Neurol* 2007;6: 793-804.
- [6] Sucher NJ, Carles MC. A pharmacological basis of herbal medicines for epilepsy. *Epilepsy Behav* 2015.
- [7] Petersen M, Simmonds MS. Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 2003;62: 121-5.
- [8] Kim GD, Park YS, Jin YH, Park CS. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015;99: 2083-92.
- [9] Martinc B, Grabnar I, Vovk T. Antioxidants as a preventive treatment for epileptic process: a review of the current status. *Curr Neuropharmacol* 2014;12: 527-50.
- [10] Vezzani A, French J, Bartfai T, Baram TZ. The role of inflammation in epilepsy. *Nat Rev Neurol* 2011;7: 31-40.
- [11] Bazan NG, Marcheselli VL, Cole-Edwards K. Brain response to injury and neurodegeneration: endogenous neuroprotective signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1053: 137-47.
- [12] Khamse S, Sadr SS, Roghani M, Hasanzadeh G, Mohammadian M. Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect in the kainate rat model of temporal lobe epilepsy: Underlying mechanisms. *Pharm Biol* 2015;53: 1818-25.
- [13] Coelho VR, Vieira CG, de Souza LP, Moysés F, Basso C, Papke DK, Pires TR, Siqueira IR, Picada JN, Pereira P. Antiepileptogenic, antioxidant and genotoxic evaluation of rosmarinic acid and its metabolite caffeic acid in mice. *Life Sci* 2015;122: 65-71.
- [14] Pitkänen A, Schwartzkroin PA, Moshé SL. Models of seizures and epilepsy. Amsterdam ; Boston: Elsevier Academic Press; 2006.

- [15] Oliveira CC, Oliveira CV, Grigoletto J, Ribeiro LR, Funck VR, Grauncke AC, Souza TL, Souto NS, Furian AF, Menezes IR, Oliveira MS. Anticonvulsant activity of beta-caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsy Behav* 2016;56: 26-31.
- [16] Groticke I, Hoffmann K, Loscher W. Behavioral alterations in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in mice. *Exp Neurol* 2007;207: 329-49.
- [17] Coelho VR, Vieira CG, de Souza LP, Moyses F, Basso C, Papke DK, Pires TR, Siqueira IR, Picada JN, Pereira P. Antiepileptogenic, antioxidant and genotoxic evaluation of rosmarinic acid and its metabolite caffeic acid in mice. *Life Sci* 2015;122: 65-71.
- [18] Huang RQ, Bell-Horner CL, Dibas MI, Covey DF, Drewe JA, Dillon GH. Pentylenetetrazole-induced inhibition of recombinant gamma-aminobutyric acid type A (GABA(A)) receptors: mechanism and site of action. *J Pharmacol Exp Ther* 2001;298: 986-95.
- [19] Hamilton SE, Loose MD, Qi M, Levey AI, Hille B, McKnight GS, Idzerda RL, Nathanson NM. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94: 13311-6.
- [20] Smolders I, Khan GM, Manil J, Ebinger G, Michotte Y. NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. *Br J Pharmacol* 1997;121: 1171-9.
- [21] Awad R, Muhammad A, Durst T, Trudeau VL, Arnason JT. Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. *Phytother Res* 2009;23: 1075-81.
- [22] Ben-Menachem E. Mechanism of action of vigabatrin: correcting misperceptions. *Acta Neurol Scand Suppl* 2011: 5-15.
- [23] Guginski G, Luiz AP, Silva MD, Massaro M, Martins DF, Chaves J, Mattos RW, Silveira D, Ferreira VM, Calixto JB, Santos AR. Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2009;93: 10-6.
- [24] Beirith A, Santos AR, Calixto JB. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res* 2002;924: 219-28.
- [25] Ferreira J, Santos AR, Calixto JB. Antinociception produced by systemic, spinal and supraspinal administration of amiloride in mice. *Life Sci* 1999;65: 1059-66.
- [26] Kantar Gok D, Ozturk N, Er H, Aslan M, Demir N, Derin N, Agar A, Yargicoglu P. Effects of rosmarinic acid on cognitive and biochemical alterations in ovariectomized rats treated with D-galactose. *Folia Histochem Cytobiol* 2015;53: 283-93.

- [27] Dhir A, Naidu PS, Kulkarni SK. Effect of cyclooxygenase inhibitors on pentylenetetrazol (PTZ)-induced convulsions: Possible mechanism of action. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2006;30: 1478-85.
- [28] Mello CF, Oliveira MS. Commentary on Kaushik et al.: Prostaglandin D2 is crucial for seizure suppression and postictal sleep. Novel evidence supporting a role for prostanoid receptors in seizure control. *Exp Neurol* 2014;257: 157-61.
- [29] Takeda H, Tsuji M, Inazu M, Egashira T, Matsumiya T. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *Eur J Pharmacol* 2002;449: 261-7.
- [30] Aley KO, Kulkarni SK. GABA-mediated modification of despair behavior in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1989;339: 306-11.
- [31] Tadashi Nagatani TSaRK. The effect of Diazepam and of agents which change Gabaergic functions in immobility in mice *European Journal of Pharmacology* 1984;97: 271-275.
- [32] Kapur J, Coulter DA. Experimental status epilepticus alters gamma-aminobutyric acid type A receptor function in CA1 pyramidal neurons. *Ann Neurol* 1995;38: 893-900.
- [33] Goodkin HP, Yeh JL, Kapur J. Status epilepticus increases the intracellular accumulation of GABAA receptors. *J Neurosci* 2005;25: 5511-20.
- [34] Brooks-Kayal AR, Shumate MD, Jin H, Rikhter TY, Coulter DA. Selective changes in single cell GABA(A) receptor subunit expression and function in temporal lobe epilepsy. *Nat Med* 1998;4: 1166-72.
- [35] Klee R, Tollner K, Rankovic V, Romermann K, Schidlitzki A, Bankstahl M, Loscher W. Network pharmacology for antiepileptogenesis: Tolerability of multitargeted drug combinations in nonepileptic vs. post-status epilepticus mice. *Epilepsy Res* 2015;118: 34-48.
- [36] Loscher W, Klitgaard H, Twyman RE, Schmidt D. New avenues for anti-epileptic drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12: 757-76.

Figure legends

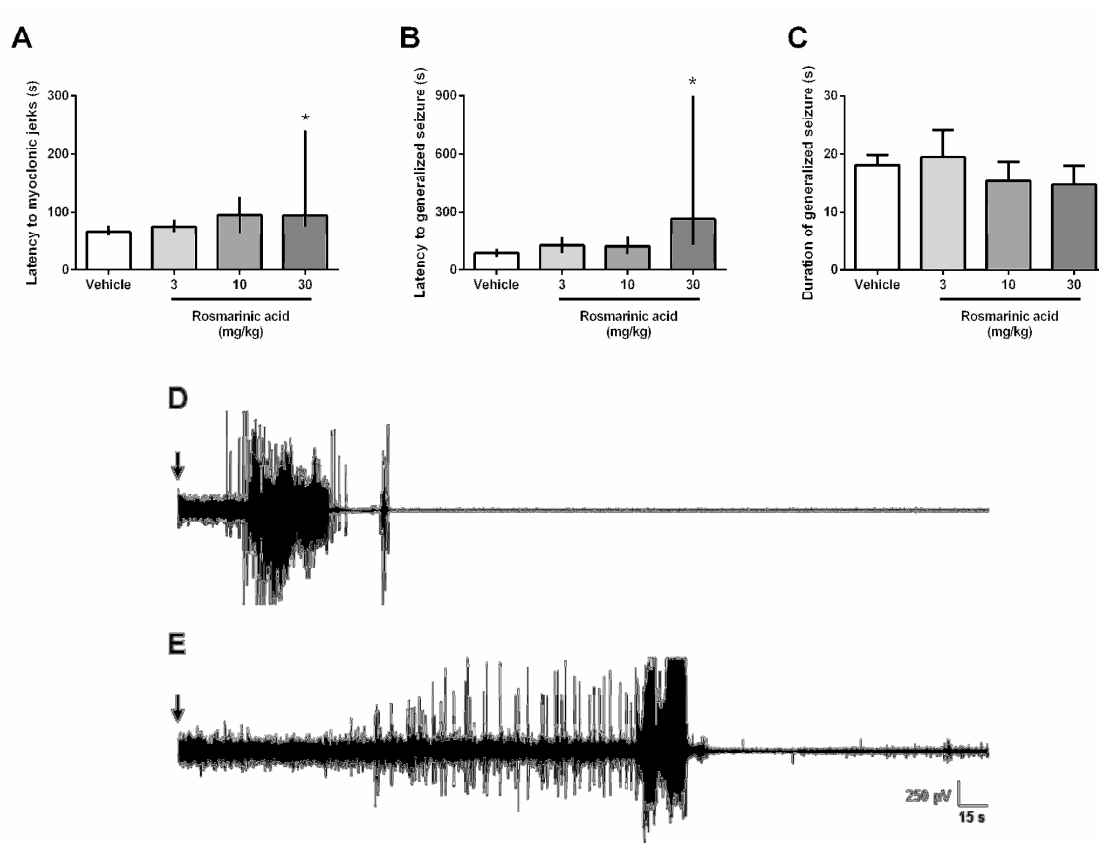


Figure 1: Effect of oral administration of increasing doses of rosmarinic acid (0, 3, 10, or 30 mg/kg; p.o.) on seizures induced by pentylenetetrazol (PTZ, 60 mg/kg; i.p.). Latencies to (A) myoclonic jerks or (B) generalized seizure and the (C) duration of the first generalized seizure were measured. Rosmarinic acid or vehicle was administered 60 min before the injection of PTZ. Data are presented as median and interquartile range for $n = 7-10$ per group. The asterisk indicates a statistically significant difference from the vehicle-treated group ($P < 0.05$). Statistical analyses were performed with the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by *post hoc* analyses with the Dunn's multiple comparisons test. Also shown are representative electroencephalograms observed in cerebral cortex after administration of PTZ in animals treated with (D) vehicle (10 ml/kg, p.o.) or (E) rosmarinic acid (30 mg/kg, p.o.). The arrow indicates the administration of PTZ.

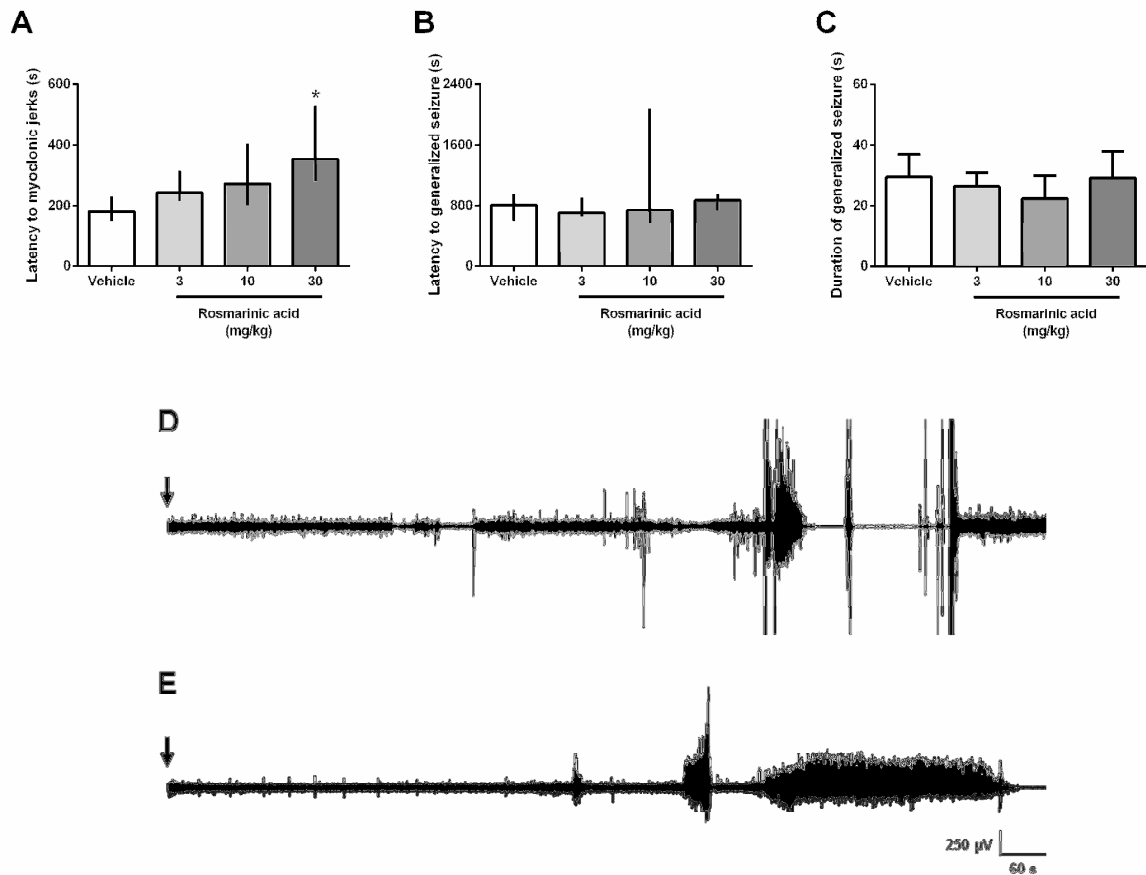


Figure 2: Effect of oral administration of increasing doses of rosmarinic acid (0, 3, 10, or 30 mg/kg; p.o.) on seizures induced by pilocarpine (300 mg/kg, i.p.). Latencies to (A) myoclonic jerks or (B) generalized seizure and the (C) duration of the first generalized seizure were measured. All solutions were administered 60 min before the injection of pilocarpine. Data are presented as median and interquartile range for $n = 8-11$ per group. The asterisk indicates a statistically significant difference from the vehicle-treated group ($P < 0.05$). Statistical analyses were performed with the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by post hoc analyses with the Dunn's multiple comparisons test. Also shown are representative electroencephalograms observed in cerebral cortex after administration of pilocarpine in animals treated with (D) vehicle (10 ml/kg, p.o.) or (E) rosmarinic acid (30 mg/kg, p.o.). The arrow indicates the administration of pilocarpine.

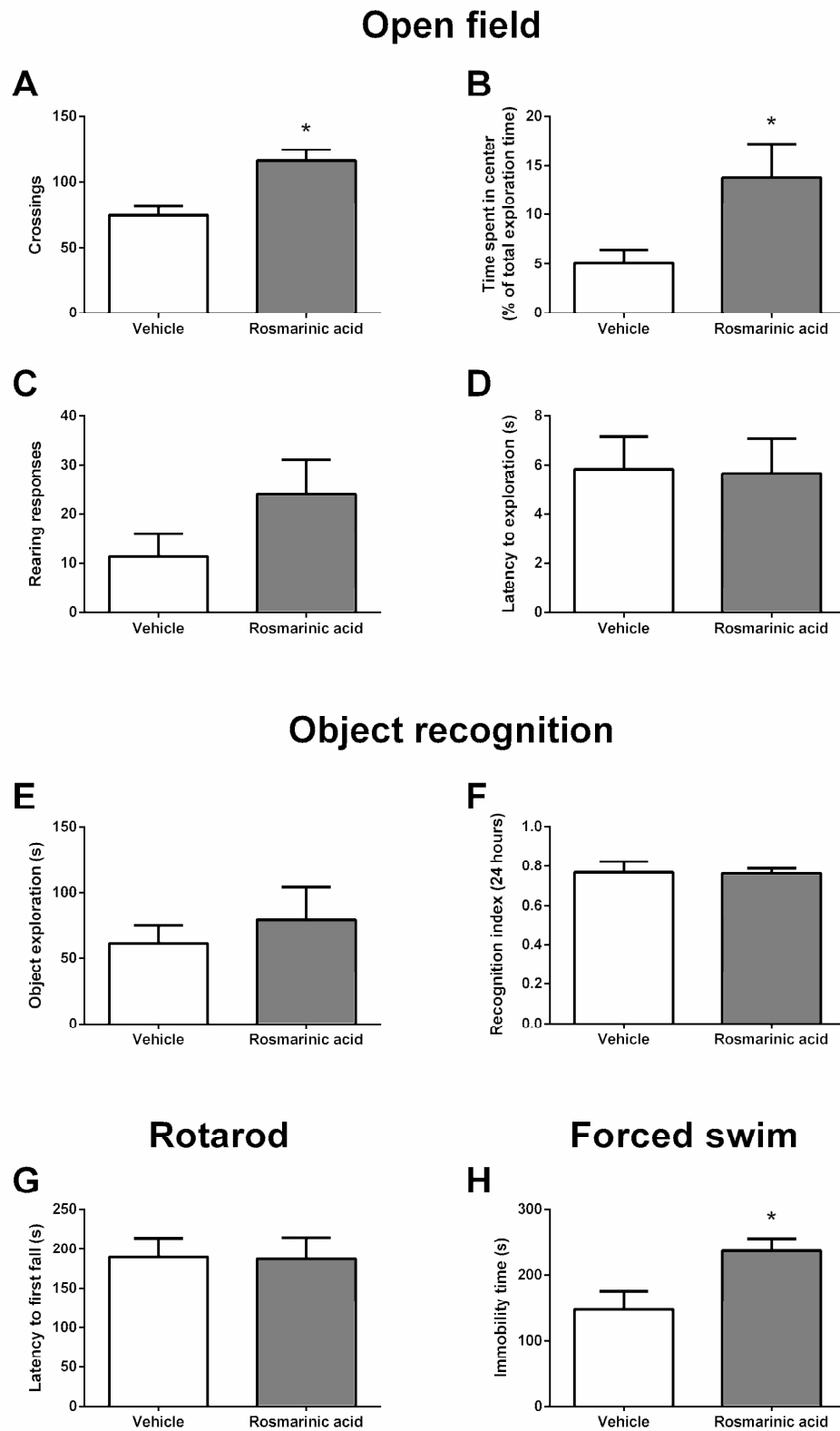


Figure 3: Effect of oral administration of rosmarinic acid (30 mg/kg; p.o.) on selected behavioral parameters. (A) Number of crossings, (B) time spent exploring the center, (C) number of rearing responses and (D) latency to start exploration in the open field test; (E)

Time spent in object exploration in the habituation session and (F) recognition index in the object recognition test; (G) latency to fall of the rod in the rotarod test and (H) immobility time in the forced swim test. Independent group of mice were used in each test. Data are presented as mean +standard error of the mean. The number of animals was 6 per group in the open-field test, 5 per group in the object recognition test, 12 per group in the rotarod test and 5 per group in the forced swim test. The asterisk indicates a statistically significant difference from the vehicle-treated group ($P < 0.05$). Statistical analyses were performed with the two-tailed unpaired Student's t test.

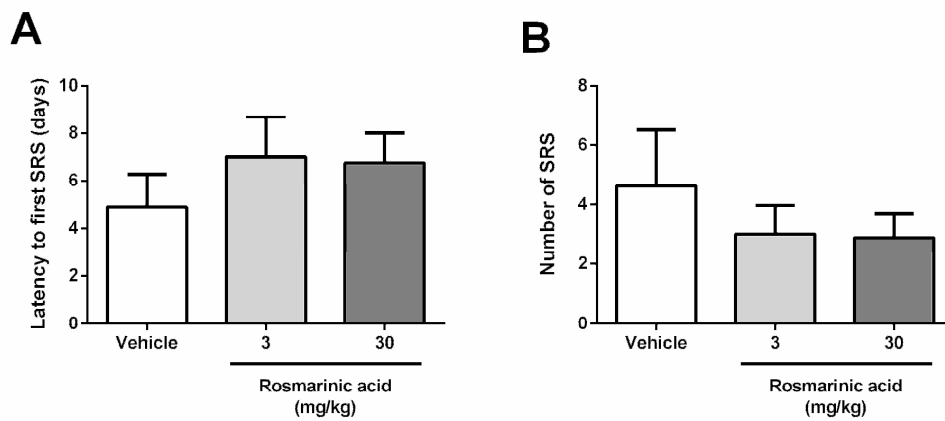


Figure 4: Effect of oral administration of increasing doses of rosmarinic acid (3 or 30 mg/kg; p.o.) on development of SRS after pilocarpine-induced SE. (A) Latency to the first SRS and (B) number of SRS). Data are presented as mean + standard error of the mean $n = 8-9$ per group. Statistical analyses were carried out by one-way ANOVA.

Open field

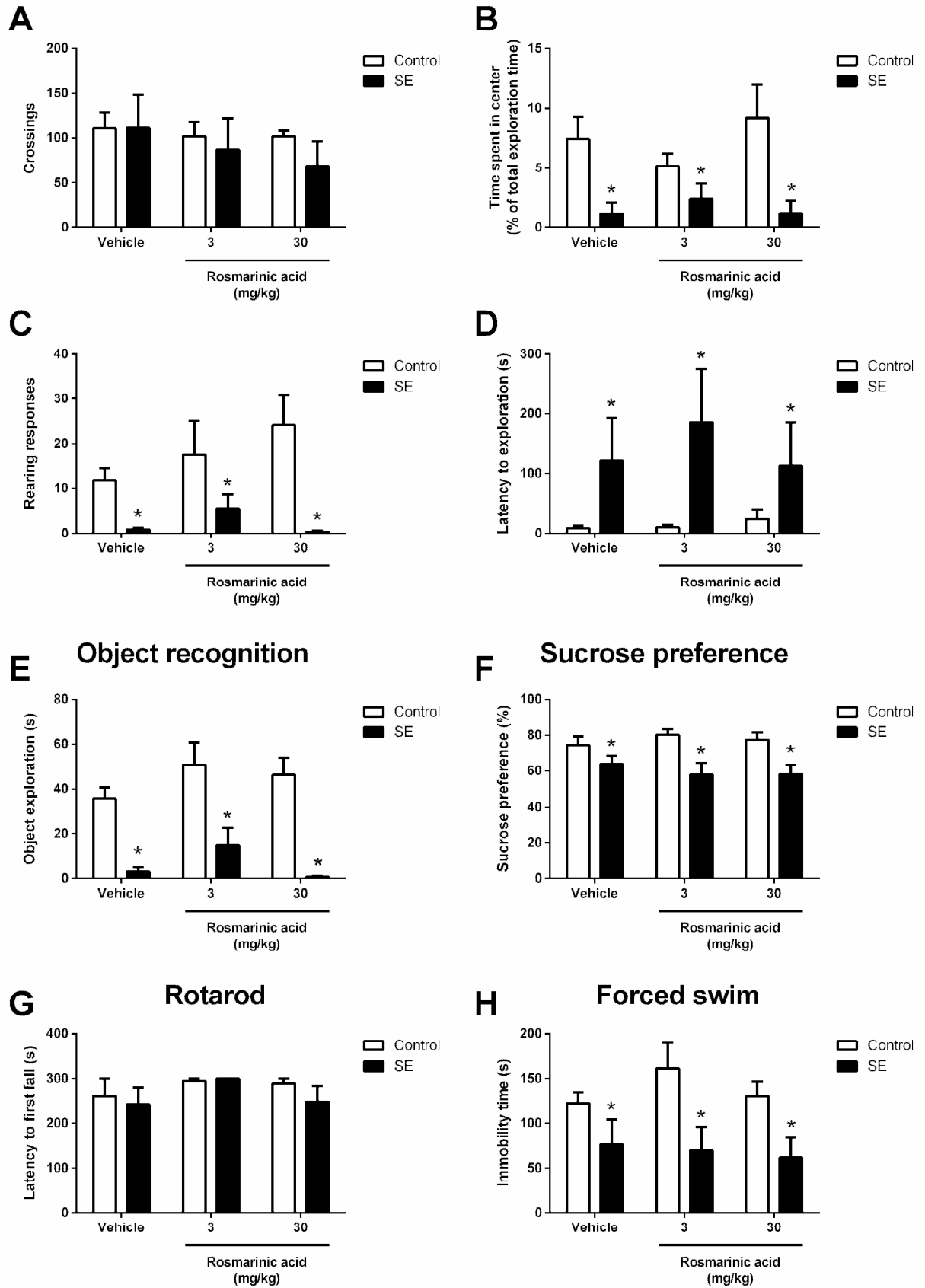


Figure 5: Effect of oral administration of increasing doses of rosmarinic acid (3 or 30 mg/kg; p.o.) on behavioral comorbidities of epilepsy. (A) Number of crossings, (B) time spent exploring the center, (C) number of rearing responses and (D) latency to start exploration in the open field test; (E) Time spent in object exploration in the habituation session of the object recognition test; (F) sucrose preference; (G) latency to fall of the rod in the rotarod test and (H) immobility time in the forced swim test. Independent group of mice were used in each test. Data are presented as mean + standard error of the mean for n = 6-9 per group. The asterisk indicates a statistically significant difference from each respective control group ($P < 0.05$). Statistical analyses were carried out by two-way ANOVA followed by post hoc analyses with the Student-Newman-Keuls multiple comparisons test.

5 CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

O ácido rosmarínico mostrou atividade anticonvulsivante em modelos de crises epilépticas agudas induzidas por PTZ e Pilocarpina. No entanto no modelo crônico *de status epilepticus* o ácido rosmarínico não foi capaz de alterar as crises epilépticas nem causar alterações comportamentais.

Frente ao fato que o ácido rosmarínico possui efeito anticonvulsivante em modelos de crises agudas, em estudos futuros pretendemos testar o efeito deste composto natural associado com outras drogas anticonvulsivantes. Além disso, estudos adicionais são necessários para investigar as implicações clínicas destes achados assim como os mecanismos subjacentes.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALBAGLI, S. **Amazônia: fronteira geopolítica da biodiversidade**. 2001.

AWAD, R. et al. Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an in vitro measure of GABA transaminase activity. **Phytother Res**, v. 23, n. 8, p. 1075-81, Aug 2009. ISSN 1099-1573 (Electronic) 0951-418X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19165747> >.

BABA, S. et al. Orally administered rosmarinic acid is present as the conjugated and/or methylated forms in plasma, and is degraded and metabolized to conjugated forms of caffeic acid, ferulic acid and m-coumaric acid. **Life Sci**, v. 75, n. 2, p. 165-78, May 28 2004. ISSN 0024-3205 (Print) 0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15120569> >.

BAZAN, N. G.; MARCHESELLI, V. L.; COLE-EDWARDS, K. Brain response to injury and neurodegeneration: endogenous neuroprotective signaling. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1053, p. 137-47, Aug 2005. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16179516> >.

BEAL, M. F. Mitochondria, free radicals, and neurodegeneration. **Curr Opin Neurobiol**, v. 6, n. 5, p. 661-6, Oct 1996. ISSN 0959-4388 (Print) 0959-4388 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8937831> >.

BEN-MENACHEM E, C. D., MOSHÉ SL, PELLOCK JM, PERUCCA E, PEDLEY TA Ed. **General Treatment Considerations**. Epilepsy: A Comprehensive Textbook: Editora Lippincott Williams & Wilkins, v.2ª Edição, Epilepsy: A Comprehensive Textbooked. 2007.

BERG, A. T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v. 51, n. 4, p. 676-85, Apr 2010. ISSN 1528-1167 (Electronic) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20196795> >.

BERG, A. T.; SCHEFFER, I. E. New concepts in classification of the epilepsies: entering the 21st century. **Epilepsia**, v. 52, n. 6, p. 1058-62, Jun 2011. ISSN 1528-1167 (Electronic) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21635233> >.

BOUGH, K. J.; RHO, J. M. Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet. **Epilepsia**, v. 48, n. 1, p. 43-58, Jan 2007. ISSN 0013-9580 (Print) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17241207> >.

BRASIL. Portaria 1.161, de Sete de Julho de 2005. 2005. Disponível em: < http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2005/prt1161_07_07_2005.html >. Acesso em: 09/12/2015.

BRIGGS, S. W.; GALANOPOULOU, A. S. Altered GABA signaling in early life epilepsies. **Neural Plast**, v. 2011, p. 527605, 2011. ISSN 1687-5443 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21826277> >.

BYMASTER, F. P. et al. Role of specific muscarinic receptor subtypes in cholinergic parasympathomimetic responses, in vivo phosphoinositide hydrolysis, and pilocarpine-induced seizure activity. **Eur J Neurosci**, v. 17, n. 7, p. 1403-10, Apr 2003. ISSN 0953-816X (Print)

0953-816X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12713643> >.

CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy. **Ital J Neurol Sci**, v. 16, n. 1-2, p. 33-7, Feb-Mar 1995. ISSN 0392-0461 (Print)

0392-0461 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7642349> >.

CAVALHEIRO, E. A. et al. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. **Epilepsia**, v. 35, n. 1, p. 1-11, Jan-Feb 1994. ISSN 0013-9580 (Print)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8112229> >.

CHOI, H. R. et al. Peroxynitrite scavenging activity of herb extracts. **Phytother Res**, v. 16, n. 4, p. 364-7, Jun 2002. ISSN 0951-418X (Print)

0951-418X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12112294> >.

CLIFFORD, D. B. et al. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. **Neuroscience**, v. 23, n. 3, p. 953-68, Dec 1987. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3437996> >.

COELHO, V. R. et al. Antiepileptogenic, antioxidant and genotoxic evaluation of rosmarinic acid and its metabolite caffeic acid in mice. **Life Sci**, v. 122, p. 65-71, Feb 1 2015. ISSN 1879-0631 (Electronic)

0024-3205 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25498895> >.

COSTA, M. S. et al. Pilocarpine-induced status epilepticus increases glutamate release in rat hippocampal synaptosomes. **Neurosci Lett**, v. 356, n. 1, p. 41-4, Feb 6 2004. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14746897> >.

CREMER, C. M. et al. Pentylentetrazole-induced seizures affect binding site densities for GABA, glutamate and adenosine receptors in the rat brain. **Neuroscience**, v. 163, n. 1, p. 490-9, Sep 29 2009. ISSN 1873-7544 (Electronic)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19345722> >.

DEBERSAC, P. et al. Effects of a water-soluble extract of rosemary and its purified component rosmarinic acid on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver. **Food Chem Toxicol**, v. 39, n. 2, p. 109-17, Feb 2001. ISSN 0278-6915 (Print)

0278-6915 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11267703> >.

DEDEURWAERDERE, S. et al. Finding a better drug for epilepsy: antiinflammatory targets. **Epilepsia**, v. 53, n. 7, p. 1113-8, Jul 2012. ISSN 1528-1167 (Electronic)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22691043> >.

DESJARDINS, P. et al. Induction of astrocytic cyclooxygenase-2 in epileptic patients with hippocampal sclerosis. **Neurochem Int**, v. 42, n. 4, p. 299-303, Mar 2003. ISSN 0197-0186 (Print)

0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12470703> >.

DIOP, A. G. et al. The global campaign against epilepsy in Africa. **Acta Trop**, v. 87, n. 1, p. 149-59, Jun 2003. ISSN 0001-706X (Print)

0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12781390> >.

DUBOIS, M. B., F.; MBEMBA, G.; MOUSCADET, J.F.; DEBYSER, Z.; WITVROUW, M.;COTELLE, P. Reaction of rosmarinic acid with nitrite ions in acidic conditions: Discovery of nitro- and dinitrorosmarinic acids as new anti-HIV-1 agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 8, p. 2575-2579, 2008.

FERREIRA IDE, L.; TABOSA E SILVA, T. P. [Mortality from epilepsy in Brazil, 1980-2003]. **Cien Saude Colet**, v. 14, n. 1, p. 89-94, Jan-Feb 2009. ISSN 1678-4561 (Electronic) 1413-8123 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19142312> >.

FISHER, R. S. Redefining epilepsy. **Curr Opin Neurol**, v. 28, n. 2, p. 130-5, Apr 2015. ISSN 1473-6551 (Electronic)

1350-7540 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25734953> >.

FISHER, R. S. et al. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475-82, Apr 2014. ISSN 1528-1167 (Electronic)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24730690> >.

FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470-2, Apr 2005. ISSN 0013-9580 (Print)

0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15816939> >.

FREITAS, R. M. et al. Pilocarpine-induced status epilepticus in rats: lipid peroxidation level, nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the hippocampus, striatum and frontal cortex. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 78, n. 2, p. 327-32, Jun 2004. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15219774> >.

FREITAS, R. M. et al. Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats. **FEBS J**, v. 272, n. 6, p. 1307-12, Mar 2005. ISSN 1742-464X (Print)

1742-464X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15752349> >.

FUERST, D. et al. Volumetric MRI, pathological, and neuropsychological progression in hippocampal sclerosis. **Neurology**, v. 57, n. 2, p. 184-8, Jul 24 2001. ISSN 0028-3878 (Print) 0028-3878 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11468300> >.

GAO, L. P. et al. Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes. **Pharmazie**, v. 60, n. 1, p. 62-5, Jan 2005. ISSN 0031-7144 (Print)

0031-7144 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15700781> >.

GUGINSKI, G. et al. Mechanisms involved in the antinociception caused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 93, n. 1, p. 10-6, Jul 2009. ISSN 1873-5177 (Electronic) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19358864> >.

GUIMARAES, C. A. et al. [Epilepsy surgery in childhood: neuropsychological and quality of life assessments]. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 61, n. 3B, p. 786-92, Sep 2003. ISSN 0004-282X (Print) 0004-282X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14595484> >.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem**, v. 97, n. 6, p. 1634-58, Jun 2006. ISSN 0022-3042 (Print) 0022-3042 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16805774> >.

HALLIWELL, B. G., J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press, New York**, , p. 617-783, 1999.

HAMILTON, S. E. et al. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 24, p. 13311-6, Nov 25 1997. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9371842> >.

ISOKAWA, M. Modulation of GABAA receptor-mediated inhibition by postsynaptic calcium in epileptic hippocampal neurons. **Brain Res**, v. 810, n. 1-2, p. 241-50, Nov 9 1998. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9813348> >.

IUVONE, T. et al. The spice sage and its active ingredient rosmarinic acid protect PC12 cells from amyloid-beta peptide-induced neurotoxicity. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 317, n. 3, p. 1143-9, Jun 2006. ISSN 0022-3565 (Print) 0022-3565 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16495207> >.

JIROVSKY, D. et al. HPLC analysis of rosmarinic acid in feed enriched with aerial parts of *Prunella vulgaris* and its metabolites in pig plasma using dual-channel coulometric detection. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 19, p. 7631-7, Sep 19 2007. ISSN 0021-8561 (Print) 0021-8561 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17708641> >.

KELM, M. A. et al. Antioxidant and cyclooxygenase inhibitory phenolic compounds from *Ocimum sanctum* Linn. **Phytomedicine**, v. 7, n. 1, p. 7-13, Mar 2000. ISSN 0944-7113 (Print) 0944-7113 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10782484> >.

KHAIROVA, R. et al. Effects of lithium on oxidative stress parameters in healthy subjects. **Mol Med Rep**, v. 5, n. 3, p. 680-2, Mar 2012. ISSN 1791-3004 (Electronic) 1791-2997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22200861> >.

KHAMSE, S. et al. Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect in the kainate rat model of temporal lobe epilepsy: Underlying mechanisms. **Pharm Biol**, v. 53, n. 12, p. 1818-25, Dec 2015. ISSN 1744-5116. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25874386> >.

KIM E. BARRETT, S. M. B., SCOTT BOITANO, HEDDWEN L. BROOKS. **Fisiologia Médica de Ganong**. 2014.

KIM, G. D. et al. Production and applications of rosmarinic acid and structurally related compounds. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 99, n. 5, p. 2083-92, Mar 2015. ISSN 1432-0614 (Electronic) 0175-7598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25620368> >.

KLINK, R.; ALONSO, A. Ionic mechanisms of muscarinic depolarization in entorhinal cortex layer II neurons. **J Neurophysiol**, v. 77, n. 4, p. 1829-43, Apr 1997. ISSN 0022-3077 (Print) 0022-3077 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9114239> >.

KUNZ, W. S. et al. Mitochondrial complex I deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy. **Ann Neurol**, v. 48, n. 5, p. 766-73, Nov 2000. ISSN 0364-5134 (Print) 0364-5134 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11079540> >.

LIHUA GUA, T. W., ZHENGTAO WANGA TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from fruit of *Perilla frutescens* var. *acuta*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 1, p. 131-136, 2008.

LORING, D. W. et al. Wada memory testing and hippocampal volume measurements in the evaluation for temporal lobectomy. **Neurology**, v. 43, n. 9, p. 1789-93, Sep 1993. ISSN 0028-3878 (Print) 0028-3878 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8414033> >.

LOSCHER, W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. **Eur J Pharmacol**, v. 342, n. 1, p. 1-13, Jan 19 1998. ISSN 0014-2999 (Print) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9544786> >.

LOSCHER, W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and post-status epilepticus models of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res**, v. 50, n. 1-2, p. 105-23, Jun 2002. ISSN 0920-1211 (Print) 0920-1211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12151122> >.

LOSCHER, W. Preclinical assessment of proconvulsant drug activity and its relevance for predicting adverse events in humans. **Eur J Pharmacol**, v. 610, n. 1-3, p. 1-11, May 21 2009. ISSN 1879-0712 (Electronic) 0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19292981> >.

LOSCHER, W.; SCHMIDT, D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Res**, v. 2, n. 3, p. 145-81, May-Jun 1988. ISSN 0920-1211 (Print) 0920-1211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3058469> >.

LUCINDO JOSÉ QUINTANS-JÚNIOR, J. T. D. L., JACKSON ROBERTO GUEDES DA SILVA ALMEIDA, CHEILA NATALY GALINDO BEDOR, RENÉ GERALDO

CORDEIRO SILVA JÚNIOR. Animal models evaluation employed anticonvulsant drugs: a review. **Revista Bras. Farmacologia**, v. 88, n. 4, p. 163-166, 2007.

M. S. OLIVEIRA; A. F. FURIAN, L. F. R., M. R. FIGHERA, N. G. FIORENZA, M. CASTELLI, P. MACHADO, D. BOHRER, M. VEIGA, J. FERREIRA, E. A CAVALHEIRO, C. F. MELLO. Cyclooxygenase-2/PGE2 pathway facilitates pentylentetrazol-induced seizures. **Epilepsy Reserach** v. 79, n. 1, p. 14-21, Mar 2008. ISSN 0920-1211 (Print) 0920-1211 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18255268> >.

MARTINC, B.; GRABNAR, I.; VOVK, T. Antioxidants as a preventive treatment for epileptic process: a review of the current status. **Curr Neuropharmacol**, v. 12, n. 6, p. 527-50, Dec 2014. ISSN 1570-159X (Print) 1570-159X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25977679> >.

MELDRUM, B. Amino acid neurotransmitters and new approaches to anticonvulsant drug action. **Epilepsia**, v. 25 Suppl 2, p. S140-9, 1984. ISSN 0013-9580 (Print) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6146519> >.

MELLO, L. E. et al. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy: cell loss and mossy fiber sprouting. **Epilepsia**, v. 34, n. 6, p. 985-95, Nov-Dec 1993. ISSN 0013-9580 (Print) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7694849> >.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J Nat Prod**, v. 66, n. 7, p. 1022-37, Jul 2003. ISSN 0163-3864 (Print) 0163-3864 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12880330> >.

O. C SNEAD, M. C. **[gamma]-aminobutyric acid-A receptor antagonist-induced absence seizures in rats: A dose-specific response**. *Annals of Neurology*, 1998. 545.

OKADA, K. et al. Cyclooxygenase-2 expression in the hippocampus of genetically epilepsy susceptible El mice was increased after seizure. **Brain Res**, v. 894, n. 2, p. 332-5, Mar 16 2001. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11251211> >.

OKUDA, Y. K. H. O. T. **Studies on the activities of tannins and related compounds, X: effects of caffeetannins and related compounds on arachidonate metabolism in human polymorphonuclear leukocytes**. *Journal of Natural Products*: 1987.

OLIVEIRA, G. R. D. **Importância da análise da frequência cardíaca na diferenciação de eventos epilépticos e não epilépticos**. DISSERTAÇÃO. Fortaleza-Ceará 2006.

OLIVEIRA M. S.; FURIAN, A. F. F., M. R.; FIORENZA, N. G.; FERREIRA, J.; RUBIN, M. A.; MELLO, C. F.; ROYES, L. F. The involvement of the polyamines binding sites at the NMDA receptor in creatine-induced spatial learning enhancement. **Behav Brain Res**, v. 187, n. 1, p. 200-4, Feb 11 2008. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17950476> >.

OLMEZ, I.; OZYURT, H. Reactive oxygen species and ischemic cerebrovascular disease. **Neurochem Int**, v. 60, n. 2, p. 208-12, Jan 2012. ISSN 1872-9754 (Electronic) 0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22122807> >.

OSAKABE, N. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic effect of rosmarinic acid (RA); inhibition of seasonal allergic rhinoconjunctivitis (SAR) and its mechanism. **Biofactors**, v. 21, n. 1-4, p. 127-31, 2004. ISSN 0951-6433 (Print) 0951-6433 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15630183> >.

PEDLEY, J. E. T. A. **Epilepsy: A Comprehensive Textbook**. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

PEREIRA, M. B. et al. Study pharmacologic of the GABAergic and glutamatergic drugs on seizures and status epilepticus induced by pilocarpine in adult Wistar rats. **Neurosci Lett**, v. 419, n. 3, p. 253-7, Jun 4 2007. ISSN 0304-3940 (Print) 0304-3940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17499921> >.

PETERSEN, M.; SIMMONDS, M. S. Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 121-5, Jan 2003. ISSN 0031-9422 (Print) 0031-9422 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12482446> >.

PIETSCH, K. et al. Hormetins, antioxidants and prooxidants: defining quercetin-, caffeic acid- and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*. **Biogerontology**, v. 12, n. 4, p. 329-47, Aug 2011. ISSN 1573-6768 (Electronic) 1389-5729 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21503726> >.

PREUX, P. M.; RATSIMBAZAFY, V.; JOST, J. Epidemiology of febrile seizures and epilepsy: a call for action. **J Pediatr (Rio J)**, v. 91, n. 6, p. 512-4, Nov-Dec 2015. ISSN 1678-4782 (Electronic) 0021-7557 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26354867> >.

QIAO, S. et al. Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264.7 macrophages. **Free Radic Res**, v. 39, n. 9, p. 995-1003, Sep 2005. ISSN 1071-5762 (Print) 1029-2470 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16087481> >.

REN, P. et al. Rosmarinic acid inhibits 6-OHDA-induced neurotoxicity by anti-oxidation in MES23.5 cells. **J Mol Neurosci**, v. 39, n. 1-2, p. 220-5, Sep 2009. ISSN 1559-1166 (Electronic) 0895-8696 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19219567> >.

RITSCHHEL, W. A., ET AL. Percutaneous absorption of rosmarinic acid in the rat. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**, v. 11, p. 345-352, 1989.

SANTOS, L. F. et al. Neuroprotective actions of vitamin C related to decreased lipid peroxidation and increased catalase activity in adult rats after pilocarpine-induced seizures. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 89, n. 1, p. 1-5, Mar 2008. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18096215> >.

SCARPATI M.L., O. G. **Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.)**. 1958.

SCHMIDT, D. S., M. Evidence-based review on the natural history of the epilepsies. **Curr Opin Neurol**, v. 25, n. 2, p. 159-63, Apr 2012. ISSN 1473-6551 (Electronic) 1350-7540 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22274775> >.

SCOTT, R. A.; LHATOO, S. D.; SANDER, J. W. The treatment of epilepsy in developing countries: where do we go from here? **Bull World Health Organ**, v. 79, n. 4, p. 344-51, 2001. ISSN 0042-9686 (Print) 0042-9686 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11357214> >.

SENANAYAKE, N.; ROMAN, G. C. Epidemiology of epilepsy in developing countries. **Bull World Health Organ**, v. 71, n. 2, p. 247-58, 1993. ISSN 0042-9686 (Print) 0042-9686 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8490989> >.

SHEKARCHI, M. et al. Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. **Pharmacogn Mag**, v. 8, n. 29, p. 37-41, Jan 2012. ISSN 0976-4062 (Electronic) 0973-1296 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22438661> >.

SHIN, E. J. et al. Role of oxidative stress in epileptic seizures. **Neurochem Int**, v. 59, n. 2, p. 122-37, Aug 2011. ISSN 1872-9754 (Electronic) 0197-0186 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21672578> >.

SIMMONDS, M. P. A. M. S. J. Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 121-125, 2003. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942202005137> >.

SINGH, G.; PRABHAKAR, S. The effects of antimicrobial and antiepileptic treatment on the outcome of epilepsy associated with central nervous system (CNS) infections. **Epilepsia**, v. 49 Suppl 6, p. 42-6, Aug 2008. ISSN 1528-1167 (Electronic) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18754960> >.

TELLEZ-ZENTENO, J. F.; HERNANDEZ-RONQUILLO, L. A review of the epidemiology of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Res Treat**, v. 2012, p. 630853, 2012. ISSN 2090-1356 (Electronic) 2090-1348 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22957234> >.

TELLEZ-ZENTENO, J. F. et al. Psychiatric comorbidity in epilepsy: a population-based analysis. **Epilepsia**, v. 48, n. 12, p. 2336-44, Dec 2007. ISSN 0013-9580 (Print) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17662062> >.

TREIMAN, D. M. GABAergic mechanisms in epilepsy. **Epilepsia**, v. 42 Suppl 3, p. 8-12, 2001. ISSN 0013-9580 (Print) 0013-9580 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520315> >.

TURSKI, W. A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav Brain Res**, v. 9, n. 3, p. 315-35, Sep 1983. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6639740> >.

VALENTOVA, K. T., N.; MONCION, Z.; WAZIERS, I.; ULRICHOVA J. Induction of glucokinase mRNA by dietary phenolic compounds in rat liver cells in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 7726-7731, 2007.

VEZZANI, A. et al. The role of inflammation in epilepsy. **Nat Rev Neurol**, v. 7, n. 1, p. 31-40, Jan 2011. ISSN 1759-4766 (Electronic)
1759-4758 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21135885> >.

VEZZANI A. , F. Brain inflammation as a biomarker in epilepsy. **Biomark Med**, v. 5, n. 5, p. 607-14, Oct 2011. ISSN 1752-0371 (Electronic)
1752-0363 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22003909> >.

WALZ, R. B., M. M.; LINHARES, M. N.; LEITE, J. P.; SAKAMOTO, A.C. KAPCZINSKI F, QUEVEDO J E IZQUIERDO I. Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos. **Epilepsias**, p. Epilepsias
2004.

WANG, J. et al. Neurorescue effect of rosmarinic acid on 6-hydroxydopamine-lesioned nigral dopamine neurons in rat model of Parkinson's disease. **J Mol Neurosci**, v. 47, n. 1, p. 113-9, May 2012. ISSN 1559-1166 (Electronic)
0895-8696 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22205146> >.

WHO. World Health Organization. **Mental health and primary health care**, 1997.

WHO: World Health Organization 2015. Disponível em: < http://www.who.int/mental_health/neurology/epilepsy/en/ >. Acesso em: 09/01/2016.

YAMADA, M. et al. Natural Phenolic Compounds as Therapeutic and Preventive Agents for Cerebral Amyloidosis. **Adv Exp Med Biol**, v. 863, p. 79-94, 2015. ISSN 0065-2598 (Print)
0065-2598 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26092627> >.

YANASE, S.; LUO, Y.; MARUTA, H. PAK1-deficiency/down-regulation reduces brood size, activates HSP16.2 gene and extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. **Drug Discov Ther**, v. 7, n. 1, p. 29-35, Feb 2013. ISSN 1881-7831 (Print)
1881-7831 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23524941> >.

YINRONG LU , L. Y. F. Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 1, p. 91-94, 1999. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942298007304> >.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Avaliação do potencial anticonvulsivante do Ácido rosmarínico."

Número do Parecer: 077/2014

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira

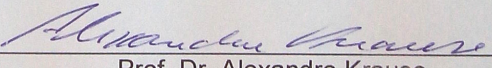
Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. *Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.*

OBS: Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DE APROVAÇÃO: 21/08/2014.

Santa Maria, 22 de Agosto de 2014.


Prof. Dr. Alexandre Krause
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM

Comissão de Ética no Uso de Animais - UFSM - Av. Roraima, 1000 – Prédio da Reitoria - 2º andar -
Campus Universitário 97105-900 – Santa Maria – RS - - Tel: 0 xx 55 3220 9362