



Um possível mecanismo de ação para o efeito anticonvulsivante do *p*-cimeno

Talita Mendes de Oliveira¹; Rusbene Bruno Fonseca de Carvalho^{1,2}; Rivelilson Mendes de Freitas^{1,*}; Sidney Gonçalo de Lima^{1,2}

¹Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

² Departamento de Química do Centro de Ciências da Natureza da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo investigar o efeito anticonvulsivante do *p*-cimeno (CIM), bem como verificar a concentração das monoaminas (dopamina (DA), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), e seus metabólitos (ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA) e ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA)) no hipocampo de camundongos tratados com cloridrato de pilocarpina 400 mg/kg (P400; i.p.) e nos grupos tratados com a associação de CIM (50, 100 ou 150 mg/kg) e P400. Nesse estudo foi avaliada a latência para a primeira crise epilética e a taxa de mortalidade. Os resultados revelaram que o CIM produziu um aumento na latência para primeira crise epilética, bem como promoveu uma proteção significativa contra a mortalidade induzida pelo processo convulsivo. O monoterpeno nas doses testadas também foi capaz de produzir um aumento da latência para instalação do estado de mal epilético induzido por pilocarpina. Além disso, durante os estudos para identificar o mecanismo de ação nenhum dos efeitos do *p*-cimeno nesse modelo foram bloqueados pelo pré-tratamento com atropina. Complementando os estudos para identificar o provável mecanismo de ação do *p*-cimeno, foi verificado que os efeitos desse monoterpeno foram revertidos pelo flumazenil, um antagonista do sistema GABAérgico, sugerindo que esse monoterpeno pode atuar por meio desse sistema. Também, em nossos resultados também foi visto uma diminuição dos níveis de DA e um aumento do conteúdo de seus metabólitos (DOPAC e HVA) durante as crises epiléticas. Por outro lado foi detectado um aumento na concentração de NA e 5-HT, e uma diminuição no metabólito da 5-HT (5-HIAA) durante as crises epiléticas. Dessa forma, o CIM na presença do estímulo convulsivo, reverte os efeitos produzidos nos níveis das monoaminas e seus

metabólitos observados durante as crises epiléticas, sugerindo que este monoterpeno produz efeito anticonvulsivante por meio da modulação direta do sistema GABAérgico e indiretamente por meio de modificações contrárias no conteúdo das monoaminas as observadas durante processo convulsivo (DA, NA e 5-HT) na região hipocampal. No entanto, mais estudos são necessários para esclarecer completamente o mecanismo de ação anticonvulsivante do *p*-cimeno.

Palavras-Chave: Anticonvulsivante. Camundongos. *p*-Cimeno. Monoterpenos.

INTRODUÇÃO

Aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo sofrem de epilepsia. Essa patologia é uma das doenças neurológicas mais frequentes e pode ser verificada em pessoas de todas as faixas etárias, etnias e classes sociais (Saengsuwan et al., 2012). A prevalência da epilepsia é aproximadamente 0,5% e 1,5 a 2% na população dos países desenvolvidos e em desenvolvimento, respectivamente (Maranhão et al., 2011).

As epilepsias são complexos distúrbios neurológicos e comportamentais resultantes de um aumento da excitabilidade de neurônios colinérgicos em várias áreas cerebrais que podem ser difundidas para outras regiões. É sabido que o sítio inicial de instalação das crises epiléticas é o hipocampo, dessa forma o presente estudo pretende investigar o mecanismo de ação de um produto natural dando ênfase principalmente as alterações produzidas nos níveis de neurotransmissores implicados com a instalação, progressão e/ou manutenção das crises epiléticas induzidas por pilocarpina nessa região (Rauca et al., 2004; Berg et al., 2010, Gomes et al., 2011).

Nesse contexto, a literatura enfatiza que o estado de mal epilético (EME) é uma situação de emergência com morbidade e mortalidade substancial que requer tratamento imediato e eficaz. Tradicionalmente, o estado de mal epilético é definido como uma crise epilética única que dura mais de 30 minutos ou crises epiléticas repetidas ao longo de um período de mais de 30 minutos sem intervir na recuperação da consciência (Knake et al., 2009). Sabendo que essas crises podem ser refratárias aos tratamentos atualmente disponíveis, faz-se necessário à investigação de novos produtos anticonvulsivantes mais seguros e eficazes

Autor correspondente: Rivelilson Mendes de Freitas. Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Piauí - UFPI, Campus Universitário Ministro Petrônio Portella, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Bairro Ininga, Teresina, Piauí. CEP: 64.049-550. E-mail: rivmendes@hotmail.com

com o objetivo de melhorar a qualidade de vida dos portadores de transtornos psicossociais, particularmente a epilepsia.

O modelo experimental largamente utilizado para estudar a fisiopatologia das crises epiléticas e a identificação dos potenciais agentes terapêuticos para o tratamento da epilepsia é feito por meio da administração aguda de uma dose elevada de pilocarpina em roedores. Os sistemas de neurotransmissores envolvidos nesse modelo experimental de epilepsia induzido pela pilocarpina, ainda não estão completamente definidos (Marques et al., 2011; Costa et al., 2012a).

Diferentes modelos de crises epiléticas em animais são bastante utilizados para estudar a fisiopatologia do processo convulsivo, uma vez que reproduzem alterações comportamentais, eletroencefalográficas e neuroquímicas que são semelhantes à epilepsia do lobo temporal em humanos (Freitas, 2011a).

Aproximadamente em 70% dos pacientes com epilepsia a remissão das crises pode ser controlada por meio do uso de drogas antiepiléticas. Entre 5 a 10% dos pacientes são estabilizados pela adição de outra droga antiepilética, entretanto, em mais de 20% dos pacientes a crise epilética não é controlada (Hitiris et al., 2007; Souza-Oliveira et al., 2010). Portanto, compostos extraídos de plantas medicinais podem potencialmente desempenhar um papel importante no desenvolvimento de novas drogas antiepiléticas aos pacientes fármaco-resistentes (Quintans-Júnior et al., 2008; Costa et al., 2012a).

Nesse sentido, estudos anteriores utilizando alguns monoterpenos, como: citronelol (De Sousa et al., 2006), α , β -epóxi-carvona (De Sousa et al., 2007a), α -terpineol (De Sousa et al., 2007b), fitol (Costa et al., 2012a), cianocarvona (Costa et al., 2012b) e isopulegol (Silva et al., 2009) presentes em alguns óleos essenciais de plantas medicinais, demonstraram atividade anticonvulsivante em estudos realizados em animais.

O *p*-cimeno definido quimicamente como 1-isopropil-4-metilbenzeno é um monoterpene aromático biossintético de fórmula molecular $C_{10}H_{14}$, precursor do carvacrol e largamente presente entre os óleos essenciais, sendo o constituinte majoritário em várias espécies vegetais apresentando 83,75% em *Origanum saccatum*, 53,07% em *Origanum solymicum* e 44,13% em *Thymus vulgaris* (Poulose & Croteau, 1978; Adams, 2007). Além disso, o *p*-cimeno vem sendo alvo de estudos em outros trabalhos os quais demonstram atividade antinociceptiva (Santana et al., 2011), antibacteriana (Bagamboula et al., 2004), antifúngica, herbicida (Kordali et al., 2008), antileishmania (De Medeiros et al., 2011) e anticolinesterásico (Öztürk, 2012).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anticonvulsivante do *p*-cimeno, bem como caracterizar seu mecanismo de ação e identificar seus efeitos sobre os níveis das monoaminas (dopamina (DA), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT), e seus metabólitos (ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA) e ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA)), no hipocampo de camundongos no modelo de epilepsia induzida por pilocarpina.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, adultos com dois meses de idade, com peso variando de 25-30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo de 12h claro/escuro) e temperatura (22 ± 1 °C) recebendo ração padrão do tipo Purina e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados e uso de animais de laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (EUA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (n° 038/2009).

Drogas Administradas

As drogas utilizadas nesse trabalho, cloridrato de pilocarpina, *p*-cimeno, atropina, flumazenil e o monooleato de polioxietileno-sorbitan (Tween 80) foram adquiridos da Sigma Chemical Co. St. Louis (USA) e o Diazepam da Cristália (Brasil). Todos foram administrados por via intraperitoneal (i.p.) solubilizados em Tween 80 (0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (v/v)), em um volume final de 0,1 mL para cada 10 g de peso do animal.

Método

Protocolo experimental I

Camundongos *Swiss* machos adultos com peso variando entre 25-30 g foram utilizados nos experimentos (n=12/grupo). Os animais foram divididos em gaiolas contendo no máximo seis animais e colocados em ambiente reservado, livre de ruídos e em condições controladas de umidade e temperatura, sendo feita a observação direta e por meio de registros das gravações realizadas durante os experimentos.

As drogas foram todas administradas por via intraperitoneal (i.p.). Todos os grupos experimentais foram observados após a administração das drogas conforme os protocolos experimentais descritos abaixo, perfazendo um total de 24 h de observação; Os seguintes parâmetros foram observados: presença de sinais colinérgicos periféricos, tremores, movimentos estereotipados, latência de instalação da primeira crise epilética (LPCE), a taxa de crise epilética motora que progrediram para o estado de mal epilético, a latência de instalação do estado de mal epilético (LEME) e o número de animais que sobreviveram em cada grupo experimental (Turski et al., 1983).

Protocolo experimental II

O primeiro grupo foi usado como controle e recebeu o veículo Tween 80 0,05% dissolvido em solução salina 0,9% (v/v; 0,1 mL/10 g), o segundo grupo foi tratado

com cloridrato de pilocarpina 400 mg/kg (P400) por via intraperitoneal, os demais grupos foram tratados com *p*-cimeno (CIM) nas doses de 50, 100 ou 150 mg/kg. Trinta minutos após o pré-tratamento com veículo ou *p*-cimeno (CIM) os camundongos foram tratados com pilocarpina 400 mg/kg (i.p.) e observados quanto aos comportamentos: movimentos estereotipados, movimentos tônico e clônicos, crises epiléticas tônico-clônicas, LPCE, LEME e a taxa de sobrevivência dos animais durante o período de 24 h de observação (Freitas, 2009).

Após esse período os animais que sobreviveram foram eutanasiados pela administração de pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.) para remoção do encéfalo e dissecação do hipocampo de ambos os lados para determinar os níveis de monoaminas e seus metabólitos.

Protocolo experimental III

Para tentar esclarecer o mecanismo de ação, outros três grupos de camundongos (n=12/grupo), foram pré-tratados com veículo, *p*-cimeno 150 mg/kg ou atropina 25 mg/kg, após 30 minutos desse pré-tratamento os animais foram tratados com cloridrato de pilocarpina (400 mg/kg; i.p.). Após o tratamento com o agente indutor de crises epiléticas os animais foram observados para detectar a LPCE, a LEME, a taxa de ocorrência de crises epiléticas e o número de animais sobreviventes durante o período de 24 h de observação.

Após esse período os animais que sobreviveram foram eutanasiados pela administração de pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.) para remoção do encéfalo e dissecação do hipocampo de ambos os lados para determinar os níveis de monoaminas e seus metabólitos.

Protocolo experimental IV

Complementando os estudos para esclarecer o mecanismo de ação do monoterpene estudado, outros quatro grupos de camundongos (n=12/grupo) foram pré-tratados com veículo, *p*-cimeno 150 mg/kg, diazepam 5 mg/kg (DZP), ou flumazenil 25 mg/kg (FLU) por via intraperitoneal. Após 30 minutos do pré-tratamento, os camundongos (n=12/grupo) foram tratados com cloridrato de pilocarpina (i.p.) na dose de 400 mg/kg. Após os protocolos de tratamento todos os grupos foram observados para detectar a LCPE, LEME, a ocorrência de crises epiléticas, o número de animais que apresentaram convulsões e o número de animais que sobreviveram durante o período de 24 horas de observação.

Ainda nesse protocolo, outros dois grupos de camundongos (n=12/grupo) foram pré-tratados com flumazenil (25 mg/kg, i.p.) ou com *p*-cimeno (150 mg/kg, i.p.). Após 30 minutos os animais foram tratados com diazepam (5 mg/kg, i.p.). Em seguida, após mais 30 minutos, os dois grupos foram tratados com cloridrato de pilocarpina na dose de 400 mg/kg por via intraperitoneal. Posteriormente aos tratamentos os animais foram observados durante 24 h para detectar os mesmos parâmetros anteriormente descritos para esclarecer o mecanismo de ação.

Após esse período os animais que sobreviveram foram eutanasiados pela administração de pentobarbital sódico (40 mg/kg, i.p.) para remoção do encéfalo e dissecação do hipocampo de ambos os lados para determinar os níveis de monoaminas e seus metabólitos.

Protocolo Experimental V

Após os protocolos experimentais os animais que apresentaram crise epilética, estado de mal epilético e sobreviveram ao tratamento durante o período de 24h, foram eutanasiados conforme descrito anteriormente. Imediatamente o hipocampo foi dissecado sobre gelo para preparação dos homogenatos utilizados na realização dos estudos neuroquímicos.

Os níveis monoaminas foram estudados em homogenatos hipocampais a 10% preparados em tampão fosfato de sódio (150 mM; pH 7,4).

Para a determinação dos neurotransmissores noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (5-HT) e seus metabólitos: ácido *dihidroxifenilacético* (DOPAC), ácido 4-hidroxi-3-metoxi-fenilacético (HVA), ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA), foi utilizado um equipamento de HPLC da Shimadzu, modelo LCD-6A, com detecção amperométrica. Para a separação das monoaminas, foi usada uma coluna de fase reversa (Shim-Pack CLC-ODS, 25cm). A fase móvel foi preparada com ácido cítrico monohidratado 150 mM, octil sulfato de sódio 67 mM, tetrahydrofurano 2%, acetonitrila 45, utilizando água deionizada. O pH da fase móvel foi ajustado para 3,0 com NaOH 10 mM. A quantificação dos picos obtidos foi feita com o auxílio de uma curva padrão. Valores absolutos foram corrigidos quanto à recuperação das cânulas e expressões de variação em relação aos valores basais (Freitas et al., 2003).

Análises Estatísticas

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Os dados foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste ($p < 0,05$). O número de animais que apresentaram crises convulsivas e o número de sobreviventes foi calculado como porcentagens (porcentagem de crises epiléticas, porcentagem de estado de mal epilético e a taxa porcentagem de sobrevivência, respectivamente) e comparados com um teste não paramétrico (χ^2).

RESULTADOS

No presente trabalho foi verificado que a pilocarpina induziu a primeira crise epilética em $7,83 \pm 0,23$ minuto. Durante os primeiros, de 3 a 5 minutos após administração de pilocarpina foram observadas alterações de comportamento, como sinais periféricos colinérgicos (miose, piloereção, cromodaciorreia, diarreia e movimentos orofaríngeos), movimentos estereotipados (*sniffing*, *grooming* e *rearing*) seguidos de crises epiléticas tônico-clônico e desenvolvimento progressivo dentro de minutos em um estado de mal epilético em 100% dos animais estudados ($p < 0,05$) (**Tabela 1**). Com os animais pré-tratados com *p*-cimeno nas doses de 50, 100 ou 150 mg/kg foram observadas alterações comportamentais como sinais colinérgicos periféricos, tremores, cromodaciorreia, automatismo faciais, *wet dog shakes* e *rearing* em 100% dos camundongos.

Os efeitos anticonvulsivantes do *p*-cimeno demonstraram um indicativo de efeito neuroprotetor ao ser verificado um aumento progressivo no tempo de latência das crises epiléticas induzidas por pilocarpina nas doses de 50 (17,83 ± 0,27), 100 (25,80 ± 0,83) e 150 mg/kg (31,33 ± 1,89) em comparação com o grupo P400 (7,83 ± 0,27; $p < 0,05$). Além disso, com o pré-tratamento se observou o aumento em relação à latência para primeira crise para o desenvolvimento do estado de mal epilético nos animais após as doses de 50 (25,50 ± 0,42), 100 (31,33 ± 1,24) e 150 (35,92 ± 1,81) em comparação com o P400 (15,00 ± 0,42; $p < 0,05$). O efeito de neuroproteção também foi observado em relação à taxa de sobrevivência com as drogas atropina (25 mg/kg) e diazepam (5 mg/kg) utilizadas como droga de referência ($p < 0,05$; Tabelas 1 e 2).

O pré-tratamento com atropina nos animais com crise epilética induzida por pilocarpina não produziu nenhuma

alteração no comportamento, bem como não houve nenhuma alteração quando administrado em associação ao *p*-cimeno ($p > 0,05$). Entretanto, o composto provocou um aumento dose-dependente na taxa de sobrevivência dos animais tratados com as doses de 50 (66,67%), 100 (50%) ou 150 mg/kg em associação com P400 (33,33%; $p < 0,05$) (Tabela 1).

Complementando o nosso estudo, selecionamos a dose de 150 mg/kg de *p*-cimeno para tentar esclarecer o seu mecanismo de ação, uma vez que esse monoterpene na referida dose produziu o maior aumento na latência para instalação da primeira crise epilética e estado de mal epilético, bem como produziu o maior aumento no valor da taxa de sobrevivência em relação as outras doses do monoterpene avaliado e quando comparado ao grupo tratado somente com pilocarpina ($p < 0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Alterações comportamentais em camundongos adultos pré-tratados com *p*-cimeno, atropina e/ou associados durante as crises epiléticas induzidas por pilocarpina.

Grupos	SCP (%)	ME (%)	T (%)	CE (%)	LCE (min)	EME (%)	LEP (min)	TS (%)
P400	100	100	100	100	7,82 ± 2,69	100	15,03 ± 1,42	0
CIM 50	0	0	0	0	0	0	0	100
CIM 100	0	0	0	0	0	0	0	100
CIM 150	0	0	0	0	0	0	0	100
CIM 50 + P400	100	100	100	100	17,83 ± 2,27 ^a	100	25,50 ± 2,42 ^a	33,33d
CIM 100 + P400	100	100	100	100	25,80 ± 3,83 ^{a,b}	100	31,33 ± 1,24 ^a	50d
CIM 150 + P400	100	100	100	100	31,33 ± 1,89 ^{a,b,c}	100	35,92 ± 1,81 ^{a,b}	66,67 ^{d,e}
ATR 25	0	0	0	0	0	0	0	100
ATR 25 + P400	0	0	0	0	0	0	0	100
ATR 25 + CIM150	0	0	0	0	0	0	0	100
ATR 25 + CIM150 + P400	0	0	0	0	0	0	0	100

Os camundongos foram tratados com as drogas (i.p. n=12) mostrados na tabela acima. Após o tratamento foram observados por 24 h para determinação dos sinais colinérgicos periféricos (SCP), movimentos estereotipados (ME), tremores (T), crise epilética (CE), estado de mal epilético (EMEP), latência de instalação da primeira crise epilética (LPCE), latência de desenvolvimento do estado de mal epilético (LEME) e taxa de sobrevivência (TS). Os resultados de LPCE e EME foram expressos em minutos (min) e os demais como porcentagem. Drogas utilizadas: Pilocarpina (400 mg/kg) = P400; *p*-cimeno (50 mg/kg) = CIM 50; *p*-cimeno (100 mg/kg) = CIM 100; *p*-cimeno (150 mg/kg) = CIM 150; Atropina (25 mg/kg) = ATR 25. ^a $p < 0,05$ vs P400; ^b $p < 0,05$ vs CIM 50 + P400; ^c $p < 0,05$ vs CIM 100 + P400. ANOVA seguida de Student Newman Keuls como *post hoc* teste. ^d $p < 0,05$ vs P400; ^e $p < 0,05$ vs CIM 50 + P400. Teste do Qui-quadrado.

Tabela 2. Alterações comportamentais em camundongos adultos pré-tratados com *p*-cimeno, diazepam, flumazenil e/ou associações durante crises epiléticas induzidas por pilocarpina

Grupos	SCP (%)	ME (%)	T (%)	CE (%)	LPCE (min)	EME (%)	LEME (min)	TS (%)
P400	100	100	100	100	7,82 ± 2,69	100	15,03 ± 1,42	0
CIM 150 + P400	100	100	100	100	31,33 ± 1,89 ^a	100	35,92 ± 1,81 ^a	66,67 ^c
DZP 5	0	0	0	0	0	0	0	100
DZP 5 + P400	100	100	100	100	10,01 ± 3,54 ^b	100	18,83 ± 3,81 ^b	25 ^d
FLU 25	0	0	0	0	0	0	0	100
FLU 25 + DZP 5 + P400	100	100	100	100	8,25 ± 1,27 ^b	100	16,42 ± 2,67 ^b	0 ^d
FLU 25 + CIM 150 + P400	100	100	100	100	7,75 ± 2,30 ^b	100	16,08 ± 1,74 ^b	16,67 ^d

Os camundongos foram tratados com as drogas (i.p. n=12) mostrados na tabela acima. Após o tratamento os animais foram observados por 24 h para determinação dos sinais colinérgicos periféricos (SCP), movimentos estereotipados (ME), tremores (T), crise epilética (CE), estado de mal epilético (EME), latência de instalação da primeira crise epilética (LPCE), latência de desenvolvimento do estado de mal epilético (LEME) e taxa de sobrevivência (TS). Os resultados de LCEP e LEME estão expressos em minutos (min) e os demais como porcentagem. Drogas utilizadas: Pilocarpina (400 mg/kg) = P400; *p*-cimeno (150 mg/kg) = CIM 150; Diazepam (5 mg/kg) = DZP 5; Flumazenil (25 mg/kg) = FLU 25; ^a $p < 0,05$ vs P400; ^b $p < 0,05$ vs CIM 150 + P400. ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste; ^c $p < 0,05$ vs P400; ^d $p < 0,05$ vs CIM 150 + P400. Teste do Qui-quadrado.

Os efeitos anticonvulsivantes do *p*-cimeno demonstraram serem superiores ao do diazepam ($p < 0,05$; Tabela 2). Além disso, a fim de determinar se os efeitos

anticonvulsivantes do *p*-cimeno são exercidos por meio do sistema GABAérgico, os camundongos tratados com *p*-cimeno foram submetidos ao pré-tratamento com

flumazenil, e os resultados apresentaram um comportamento semelhante entre os camundongos tratados com diazepam e *p*-cimeno ($p > 0,05$; Tabela 2).

A Figura 1 demonstra que a dose convulsiva de pilocarpina diminui de forma significativa os níveis de dopamina (DA) em 27,5% em comparação ao grupo controle. Quanto ao conteúdo de dopamina nos grupos tratados com a associação de CIM 100 + P400 e CIM 150 + P400 um aumento significativo de 69 e 86,3%, respectivamente, também foi encontrado quando comparado ao grupo P400. A associação de CIM 150 + P400 quando comparada ao grupo controle também aumentou de maneira significativa em 17,3% os valores da concentração de DA ($p < 0,05$).

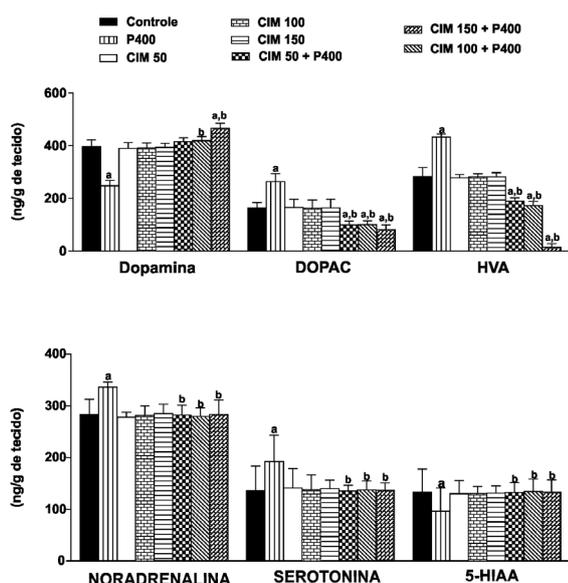


Figura 1. Efeitos do *p*-cimeno em dopamina (DA), norepinefrina (NA), serotonina (5-HT) e os seus metabolitos (ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA)) no hipocampo de camundongos.

* $p < 0,05$ quando comparado com o controle (ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls)

† $p < 0,05$ comparado com P400 (ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls)

Com relação aos níveis do ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), o tratamento com P400 aumentou significativamente em 60,28% quando comparada ao controle. Os níveis de DOPAC no hipocampo de camundongos diminuíram significativamente em 39,87, 39,20 e 50,45% ($p < 0,05$), respectivamente, em comparação ao controle e em 62,49, 68,06 e 69,08% respectivamente, quando comparados ao grupo tratado com P400, após a administração da associação CIM 50 + P400, CIM 100 + P400 e CIM 150 + P400 ($p < 0,05$).

Por sua vez, no hipocampo dos animais tratados com o estímulo convulsivo foi observado um aumento de 52,21% na concentração do ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético (HVA) quando comparada ao controle ($p < 0,05$). E as associações de CIM 50 + P400, CIM 100 + P400 e CIM 150 + P400 diminuíram significativamente em 33,36, 39,27 e 57,26% ($p < 0,05$), respectivamente, em comparação ao controle e em 56,22, 60,10 e 71,92% quando comparadas ao grupo tratado com P400 ($p < 0,05$).

Não foram observadas variações significativas nos níveis de DA, DOPAC e HVA no hipocampo dos camundongos tratados com CIM nas doses de 50, 100 ou

150 mg/kg, i.p, quando comparado com o controle e ao grupo P400 ($p > 0,05$; Fig. 1).

Na Figura 1 também pode ser observado um aumento significativo na concentração de NA de 18,11% no grupo P400 em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Os tratamentos com as associações de CIM 50 + P400, CIM 100 + P400 e CIM 150 + P400 diminuíram significativamente em 16,03, 16,98 e 15,73%, respectivamente, em comparação ao mesmo grupo ($p < 0,05$). Além disso, houve um aumento na concentração de serotonina (5-HT) em 41,07% no grupo de animais que apresentaram as crises epilépticas ($p < 0,05$). Já as associações com CIM 50 + P400, CIM 100 + P400 e CIM 150 + P400 diminuíram de maneira significativa em 29,37, 28,15 e 28,67%, respectivamente, em comparação ao P400 ($p < 0,05$).

Os valores do metabólito da 5-HT, o ácido 5-hidroxiindol-acético (5-HIAA), reduziram significativamente em 27,62% no hipocampo dos animais que apresentaram crises epilépticas ($p < 0,05$). Já os tratamentos com as associações de CIM 50 + P400, CIM 100 + P400 e CIM 150 + P400 aumentaram de maneira significativa em 37,36, 39,43 e 38,28%, respectivamente, quando comparados ao grupo P400 ($p < 0,05$).

Por sua vez, não foram observadas variações significativas na concentração de NA, 5-HT e 5-HIAA no hipocampo dos camundongos após a administração de CIM nas doses 50, 100 e 150 mg/kg (i.p), quando comparado com os grupos controle e P400 ($p < 0,05$; Fig. 1).

DISCUSSÃO

As crises epilépticas decorrentes do tratamento com pilocarpina em doses convulsivas parecem depender da ativação dos receptores muscarínicos, do metabolismo dos fosfoinositídeos, e são capazes de produzir lesões cerebrais e alterações comportamentais (Oliveira et al., 2007). A pilocarpina também altera os níveis do neurotransmissor colinérgico e pode produzir alterações em outros sistemas de neurotransmissores [noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (5-HT), glutamato e ácido γ -aminobutírico (GABA)], embora pouco se saiba sobre essas alterações (Freitas, 2011a). A administração sistêmica de pilocarpina (400 mg/kg) produz uma sequência de alterações comportamentais incluindo sinais colinérgicos periféricos, tremores, *staring spell*, automatismos faciais, crises epilépticas límbicas, que se desenvolvem progressivamente dentro de 1-2 h para o estado de mal epiléptico (Turski et al., 1983; Freitas et al., 2003; Costa Júnior et al., 2012).

Nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com *p*-cimeno nas doses de 50, 100 ou 150 mg/kg não foram capazes de reverter os sinais colinérgicos periféricos, tremores e movimentos estereotipados. Entretanto, o monoterpene avaliado provocou um aumento dose-dependente na taxa de sobrevivência.

As drogas que atuam sobre o sistema nervoso central podem demonstrar a capacidade de modular as crises epilépticas atenuando e/ou potencializando o estado de mal epiléptico induzido por pilocarpina (Freitas, 2011a). Os resultados dos efeitos anticonvulsivantes do *p*-cimeno demonstraram

um indicativo de efeito neuroprotetor ao ser verificado um aumento progressivo na latência para instalação das crises epiléticas e para o desenvolvimento do estado de mal epilético induzido por pilocarpina nos animais. Além disso, quando comparada a taxa de sobrevivência entre os grupos tratados com as drogas atropina e diazepam foi visto um aumento significativo nesses parâmetros nos grupos tratados com associação do *p*-cimeno e pilocarpina.

As crises epiléticas induzidas por pilocarpina podem ser bloqueadas pelo pré-tratamento com atropina, um antagonista colinérgico, demonstrando o envolvimento desse sistema no estabelecimento das crises epiléticas e do estado de mal epilético (Bem-Barak & Dudai, 1979). A ausência de alteração do comportamento na crise epilética mesmo em associação ao *p*-cimeno pode ser um indicativo da ausência do efeito anticonvulsivante do monoterpeno no sistema colinérgico muscarínico.

O processo convulsivo induzido em ratos pela administração de pilocarpina, parece interagir com o sistema GABAérgico, uma vez que a ativação do receptor GABAérgico do tipo GABA_A pode estar diminuída 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 epilética nesse modelo (Militão et al., 2009; Marques et al., 2011).

A pilocarpina também altera os níveis do neurotransmissor do sistema GABAérgico. Associado às crises epiléticas induzidas por pilocarpina, ocorre um aumento na concentração do GABA após o estado de mal epilético e uma diminuição, após 24 h da fase aguda, das crises epiléticas (Freitas, 2011a).

Os benzodiazepínicos, como diazepam e o clonazepam, não interferem na incidência de nenhum dos parâmetros comportamentais observados em camundongos, sugerindo que o sistema GABAérgico não interage nos efeitos periféricos mediados pela pilocarpina. Por sua vez, o diazepam demonstrou eficácia na redução do número de animais que convulsionam e que evoluem para o estado de mal epilético, bem como diminui a taxa de mortalidade e aumenta a LCPE e a LEME (Freitas, 2011a). Essa característica também é encontrada entre os animais tratados com *p*-cimeno, reforçando a hipótese sobre o possível mecanismo de ação do *p*-cimeno, a qual pode estar relacionada diretamente com o sistema GABAérgico.

Além disso, já é sabido que durante a fase aguda das crises epiléticas pode ocorrer uma relação quase que imediata entre a acetilcolina com outros sistemas de neurotransmissão (adrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico), uma vez que foram observados efeitos rápidos nas concentrações de noradrenalina, dopamina e serotonina (El-Etri et al., 1993; Freitas et al., 2006).

Nesse estudo os resultados revelaram que durante as crises epiléticas ocorre uma diminuição dos níveis de DA e um aumento dos conteúdos de DOPAC e HVA no hipocampo de camundongos adultos. Da mesma forma, quando analisado o conteúdo de NA e 5-HT foi verificado um aumento, enquanto que na concentração de 5-HIAA foi vista uma redução durante as crises epiléticas, sugerindo

que durante as crises pode ser observado um aumento da taxa de metabolização das monoaminas. Esses resultados corroboram com os resultados já disponíveis sobre o conteúdo de monoaminas hipocampal durante o processo convulsivo induzido por pilocarpina em roedores (Santos et al., 2010; Freitas et al., 2011b).

Por sua vez, quando avaliado o potencial anticonvulsivante do *p*-cimeno nesse modelo de epilepsia induzida por pilocarpina, o monoterpeno na presença do estímulo convulsivo reverteu os efeitos observados nessas monoaminas e seus metabólitos durante as crises epiléticas, sugerindo que este monoterpeno produz efeito anticonvulsivante por meio da modulação direta do sistema GABAérgico e indiretamente por modificar a síntese, liberação e/ou taxa de metabolização das monoaminas (DA, NA e 5-HT) no hipocampo de camundongos. Esses dados estão sendo apresentados na literatura pela primeira vez e não há ainda resultados disponíveis sobre a modulação de sistemas de neurotransmissores por monoterpenos no modelo de epilepsia induzida por pilocarpina, o que dificulta a interpretação dos nossos resultados, mas por outro lado amplia as perspectivas para o delineamento de novos ensaios pré-clínicos com esses compostos naturais.

Os resultados do presente estudo demonstram que o *p*-cimeno aumenta a latência para instalação da primeira crise epilética e do estado de mal epilético, bem como aumenta a taxa de sobrevivência dos animais tratados com o estímulo convulsivo, reforçando a hipótese sobre seu efeito antiepilético durante as crises epiléticas induzidas por pilocarpina, provavelmente pela modulação direta do sistema GABAérgico e/ou indiretamente de outros sistemas de neurotransmissão como adrenérgico, dopaminérgico e serotoninérgico. Dessa forma, esses resultados fornecem subsídios para continuarmos a avaliação das propriedades sobre o sistema nervoso central desse composto com o intuito de subsidiar o desenvolvimento de novos agentes antiepiléticos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos de financiamento FAPEPI e CNPq.

ABSTRACT

A plausible mechanism of action for the anticonvulsant effect of p-cymene

The aim of this study was to investigate the anticonvulsant effect of *p*-cymene (CYM) and to determine the concentrations of monoamines (dopamine (DA), noradrenaline (NA) and serotonin (5-HT)), and their metabolites (dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA) and 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)) in the hippocampus of mice treated with pilocarpine hydrochloride 400 mg/kg (P400; i.p.) and in groups treated with a combination of CYM (50, 100 or 150 mg/kg) and P400. We assessed the latency to the first epileptic seizure and the mortality rate. Results showed that CYM produced an increase in latency to the first seizure, as well as providing significant protection against mortality induced by seizures.

Higher doses of the monoterpene were also able to prolong the latency to the onset of status epilepticus induced by pilocarpine. Moreover, in an experiment to throw light on the mechanism of action of *p*-cymene, none of its effects was blocked by pretreatment with atropine. In further studies to identify the probable mechanism of CYM, it was observed that the effects of this monoterpene were reversed by flumazenil, an antagonist of the GABAergic system, suggesting that it may act through this cerebral system. Furthermore, our results also showed a fall in DA levels and an increase in the contents of its metabolites (DOPAC and HVA) during seizures. On the other hand, increases in NA and 5-HT concentrations and a decrease in that of the 5-HT metabolite (5-HIAA) were detected during seizures. Thus, CYM, in the presence of a convulsant stimulus, reverses the effects on levels of monoamines and their metabolites observed during seizure activity, suggesting that this monoterpene produces its anticonvulsant effect by modulating the GABAergic system directly and/or indirectly, through changes in monoamine (DA, NA and 5-HT) contents opposite to those observed during the convulsive process in the hippocampal region. However, further studies are necessary to clarify the mechanism of the anticonvulsant effects of *p*-cymene.

Keywords: Anticonvulsant. *P*-Cymene. Mice. Monoterpenes.

REFERÊNCIAS

- Adams RP. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing; 2007. p. 141-5.
- Bagamboula CF, Uyttendaele M, Debevere J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiol.* 2004;21:33-42.
- Ben-Barak J, Dudai Y. Cholinergic binding sites in rat hippocampal formations: properties and ontogenesis. *Brain Res.* 1979;166:245-57.
- Berg AT, Berkovic SF, Brodie MJ, Buchhalter J, Cross JH, Boas WVE, Engel J, French J, Glauser TA, Mathern GW, Moshé SL, Nordli D, Plouin P, Scheffer IE. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology. *Epilepsia.* 2010;51:676-85.
- Costa JP, Ferreira PB, De Sousa DP, Jordán, J, Freitas RM. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. *Neurosci Lett.* 2012a;523:115-8.
- Costa DA, Oliveira GAL, Lima TC, Santos PS, De Sousa DP, Freitas RM. Anticonvulsant and antioxidant effects of cyano-carvone and its action on acetylcholinesterase activity in mice hippocampus. *Cell Mol Neurobiol.* 2012b;32:633-40.
- Costa Júnior JS, Almeida AAC, Costa JP, Cito AMGL, Saffi J, Freitas RM. Superoxide dismutase and catalase activities in rat hippocampus pretreated with garcinielliptone FC from *P. insignis*. *Pharma Biol.* 2012;50:453-7.
- De Medeiros MGF, Da Silva AC, Cito AMGL, Borges AR, De Lima SG, Lopes JAD, Figueiredo RCBQ. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides Cham.* *Parasitology.* 2011;60:237-41.
- De Sousa DP, Gonçalves JCR, Quintans-Júnior L, Cruz JS, Araújo DAM, Almeida RN. Study of Anticonvulsant Effect of Citronellol, a Monoterpene Alcohol, in Rodents. *Neurosci Lett.* 2006;401:231-5.
- De Sousa DP, Nobrega FFF, Claudino FS, De Almeida RN, Leite JR, Mattei R. Pharmacological effects of the monoterpene α,β -epoxy-carvone in mice. *Rev Bras Farmacogn.* 2007a;17:170-5.
- De Sousa DP, Quintans JL, Almeida RN. Evaluation of the Anticonvulsant Activity of α -terpineol. *Pharm Biol.* 2007b;45:69-70.
- El-Etri MM, Eniis M, Jiang M, Shipley MT. Pilocarpine-induced convulsions in rats: evidence for muscarinic receptor-mediated activation of locus coeruleus and norepinephrine release in cholinolytic seizure development. *Exper Neurol.* 1993;121:24-39.
- Freitas RM, Sousa FCF, Vasconcelos SMM, Viana GSB, Fonteles MMF. Alterações agudas dos níveis de neurotransmissores em corpo estriado de ratos jovens após estado epletico induzido por pilorcapina. *Arq Neuropsiquiatr.* 2003;61:430-3.
- Freitas RM, Sousa FCF, Vasconcelos SMM, Viana GSB, Fonteles MMF. Acetylcholinesterase activities in hippocampus, frontal cortex and striatum of Wistar rats after pilocarpine-induced status epilepticus. *Neurosci Lett.* 2006;399:76-8.
- Freitas RM. The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. *Neurosci Lett.* 2009;455:140-4.
- Freitas RM. Sistemas de Neurotransmissão Envolvidos no Modelo de Epilepsia: Uma revisão de Literatura. *Rev Neurocienc.* 2011a;19:128-38.
- Freitas RM, Silva FO, Saldanha GB, Jordán J. Lipoic acid alters amino acid neurotransmitters content in rat hippocampus after pilocarpine-induced seizures. *Fund Clin Pharmacol.* 2011b;25:485-92.
- Gomes TKC, Oliveira SL, Ataíde TR, Trindade Filho EM. The role of the ketogenic diet on oxidative stress present in experimental epilepsy. *J Epilepsy Clin Neurophysiol.* 2011; 17(2):54-64.
- Hitiris N, Mohanraj R, Norrie J, Sills GJ, Brodie MJ. Predictors of pharmaco-resistant epilepsy. *Epilepsy Res.* 2007;75:192-6.
- Knake S, Hamer HM, Rosenow F. Status epilepticus: A critical review. *Epilepsy Behav.* 2009;15:10-4.
- Kordali S, Cakir A, Ozer H, Cakmakci R, Kesdek M, Mete E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens*

- and its three components, carvacrol, thymol and *p*-cymene. *Bioresour Technol.* 2008;99:8788–95.
- Maranhão MVM, Gomes EA, Carvalho PE. *Epilepsia e Anestesia. Rev Bras Anesthesiol.* 2011;61:232-254.
- Marques THC, Cardoso KMF, Almeida AAC, Tomé AR, Freitas, RM. Behavioral studies and histopathological changes in mice pretreated with *Bellis perennis* in pilocarpine-induced seizures. *Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromát.* 2011;10:338-44.
- Militão GCG, Ferreira PMP, FREITAS RM. Lipoic acid effects on lipid peroxidation level, superoxide dismutase activity and monoamines concentration in rat hippocampus. *Neurosci Lett.* 2009;464:131-4.
- Oliveira AA, Sousa FCF, Vasconcelos SMM, Viana GSB, Fonteles MM, Freitas RM. Pathophysiology of status epilepticus induced by pilocarpine. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem.* 2007;7:11-5.
- Oztürk, M. Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. *Food Chem.* 2012;134:48–54.
- Poulouse AJ, Croteau R. Biosynthesis of Aromatic Monoterpenes Conversion of γ -Terpinene to *p*-Cymene and Thymol in *Thymus vulgaris* L. *Arch Biochem Biophys.* 1978; 187;307-14.
- Quintans-Junior LJ, Almeida JRGS, Lima JT, Nunes XP, Siqueira JS, Oliveira LEG, Almeida RN, Athayde-Filho PF, Barbosa-Filho JM. Plants with anticonvulsant properties – a review. *Rev Bras de Farmacogn.* 2008;18:798-819.
- Rauca C, Wiswedel I, Zerbe R, Keilhoff G, Krug M. The role of superoxide dismutase and alpha-tocopherol in the development of seizures and kindling induced by pentylentetrazol - influence of the radical scavenger alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron. *Brain Res.* 2004; 1009:203–12.
- Saengsuwan J, Boonyaleepan S, Srijakkot J, Sawanyawisuth K, Tiamkao S. Factors associated with knowledge and attitudes in persons with epilepsy. *Epilepsy Behav.* 2012; 24:23-9.
- Santana MF, Quintans-Júnior LJ, Cavalcanti SCH, Oliveira MGB, Guimarães AG, Cunha ES, Melo MS, Santos MRV, Araújo AAS, Bonjardim LR. *p*-cymene redices orofacial nociceptive response in mice. *Rev Bras Farmacogn.* 2011;8:1138-43.
- Santos IMS, Freitas RLM, Saldanha GBS, Tomé AR, Jordán J, Freitas RM. Alterations on monoamines concentration in rat hippocampus produced by lipoic acid. *Arq Neuro-Psiqu.* 2010;68:362-6.
- Silva MI, Silva MA, Aquino Neto MR, Moura BA, Sousa HL, Lavor EP, Vasconcelos PF, Macêdo DS, Sousa DP, Vasconcelos SMM, Sousa FCF. Effects of isopulegol on pentylentetrazol-induced convulsions in mice: Possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. *Fitoterapia.* 2009;80:506-13.
- Souza-Oliveira C, Escosi-Rosset, S, Funayama SS, Terra VC, Machado HR, Sakamoto AC. Funcionamento intelectual em pacientes pediátricos com epilepsia: comparação de crianças controladas com medicação, não controladas com medicação e controladas com cirurgia. *J Pediatr.* 2010;86:377-83.
- Turski WA, Cavalheiro EA, Schwarz M, Czuczwar SJ, Kleinronk Z, Turski L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res.* 1983;9:315–36.

Recebido em 22 de outubro de 2012

Aceito para publicação em 31 de julho de 2013