



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ARLINDO CÉSAR MATIAS PEREIRA FILHO

**EFEITO DO ÁLCOOL PERÍLICO SOBRE CONVULSÕES
EPILEPTIFORMES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL
EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Macapá

2021

ARLINDO CÉSAR MATIAS PEREIRA FILHO

**EFEITO DO ÁLCOOL PERÍLICO SOBRE CONVULSÕES
EPILEPTIFORMES INDUZIDAS POR PENTILENOTETRAZOL
EM ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, como parte dos requisitos para à obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, na área de concentração em Biologia Farmacêutica sob orientação do **Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho**.

Macapá

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá

Elaborada por Cristina Fernandes – CRB-2/1569

Pereira Filho, Arlindo César Matias.

Efeito do álcool perfílico sobre convulsões epileptiformes induzidas por pentilenotetrazol em zebrafish (*Danio rerio*). / Arlindo César Matias Pereira Filho; orientador, José Carlos Tavares Carvalho. – Macapá, 2021.

63 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Epilepsia. 2. Convulsão. 3. Neurofarmacologia. 4. Neurociências. 5. Bioinformática. I. Carvalho, José Carlos Tavares, orientador. II Fundação Universidade Federal do Amapá. III. Título.

615.1 P436e

CDD. 22 ed.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá

BANCA EXAMINADORA

Aluno: Arlindo César Matias Pereira Filho

Orientador: Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho

Prof. Dr. José Carlos Tavares Carvalho / Presidente

Professor Titular do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Amapá, UNIFAP.

Prof. Dr. Andres Navarrete Castro / Membro Titular

Professor da Universidad Nacional Autónoma de México.

Prof. Dr. Hady Keita / Membro Titular

Professor da Universidad de la Sierra Sur.

Data de aprovação: ____/____/____

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Sandra Suely, pela criação sempre focada nos estudos e por sempre ter acreditado no meu potencial.

Agradeço ao orientador Dr. José Carlos Tavares pela oportunidade e pelo exemplo dado como pesquisador.

Agradeço à equipe do Laboratório de Pesquisa em Fármacos, em especial àqueles envolvidos direta ou indiretamente na execução deste trabalho.

“Toda a nossa ciência comparada com a realidade, é primitiva e infantil – e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos.”

Albert Einstein

RESUMO

Introdução: A epilepsia é uma das doenças neurológicas mais comuns no mundo, acometendo em torno de 1% da população mundial. Embora uma gama de medicamentos anticonvulsivantes esteja disponível, aproximadamente um terço dos pacientes não respondem adequadamente aos medicamentos atuais. **Objetivo:** O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito do Álcool Perílico (AP) sobre convulsões epiléticas *in vivo* e *in silico*. **Materiais e Métodos:** A convulsão foi induzida por pentilenotetrazol (PTZ, 170 mg/kg, i.p.) em zebrafish adulto, e o anticonvulsivante controle usado foi Diazepam (DZP, 2 mg/kg, p.o.); o AP foi testado nas doses de 10, 50 e 100 mg/kg (p.o.). Para mensurar a convulsão, foram avaliados manualmente comportamentos tipicamente convulsivos, e então, com o auxílio de um software de rastreamento animal (Toxtrac v2.90), os parâmetros motores foram analisados. Por fim, foram executados estudos *in silico* para elucidar um possível mecanismo de ação envolvido na atividade do AP (*structure-based prediction* e *docking*). **Resultados e Discussão:** Os resultados mostram que o PTZ induziu o comportamento convulsivo em todos os animais do grupo controle negativo (n = 10), começando com episódios de hiperlocomção, convulsão propriamente dita e então perda de postura e imobilidade. O DZP inibiu a ocorrência de convulsão em todos os animais do grupo. O AP inibiu a ocorrência de convulsão de forma dose-dependente, com frequências de 90%, 70% e 40% para os grupos tratados com 10, 50 e 100 mg/kg, respectivamente. O tratamento com AP também diminuiu a frequência e o tempo de perda de postura, a frequência e o tempo de imobilidade induzida por convulsão, o tempo de convulsão, o número de nados em círculo/espiral, e atenuou o déficit motor causado pelas convulsões. A diferença do grupo tratado com a maior dose de AP foi estatisticamente diferente do grupo controle negativo para todos os parâmetros convulsivos avaliados ($p < 0,05$; Kruskal-wallis). A análise *in silico* sugere envolvimento do sistema GABAérgico na atividade anticonvulsivante do AP, com predição de inibição da enzima GABA-AT. **Conclusão:** Em suma, os resultados sugerem um potencial anticonvulsivante no AP tanto *in vivo* quanto *in silico*.

Palavras chave: Epilepsia, convulsão, neurofarmacologia, neurociências, bioinformática.

ABSTRACT

Introduction: Epilepsy is one of the most common neurological diseases, affecting around 1% of the world population. Although several anticonvulsants are available, around a third of the patients are not responsive to them. **Objective:** This research aimed to evaluate the effect of perillyl alcohol (PA) against acute seizures *in vivo* and *in silico*. **Materials and Methods:** Seizures were induced with pentylenetetrazole (PTZ, 170 mg/kg, i.p.) in adult zebrafish, and the control anticonvulsant was Diazepam (DZP, 2 mg/kg, p.o.); PA was tested at 10, 50, and 100 mg/kg (p.o.). To quantify the seizures, we manually appraised typically convulsive behaviors; then, using an animal tracking software (Toxtrac v2.90), motor parameters were assessed as well. Finally, a *in silico* study was performed to shed light on the potential action mechanisms involved in PA activity (structure-based prediction and molecular docking). **Results and Discussion:** The results show that PTZ induced convulsive-like behavior in all animals of the negative control group (n = 10), starting with episodes of hyperlocomotion, convulsion itself, then posture loss, and immobility. DZP inhibited the occurrence of seizures in all treated animals. PA decreased the occurrences in a dose-dependent manner, with frequencies of 90%, 70%, and 40% for the groups treated with doses of 10, 50, and 100 mg/kg, respectively. Treatment with PA also decreased the frequency and duration of posture loss, frequency and duration of seizure-induced immobility, convulsion duration, number of circular and spiral swimming, and decreased the seizure-induced motor deficit. The difference of the group treated with the highest dose of PA was statistically significant from the negative control for all the parameters assessed ($p < 0.05$; Kruskal-wallis). The *in silico* assessment predicted a role of the GABAergic system in PA's anticonvulsant activity, with potential inhibition of GABA-AT. **Conclusion:** Overall, the results suggest anticonvulsant potential in PA both *in vivo* and *in silico*.

Keywords: Epilepsy, seizures, neuropharmacology, neuroscience, bioinformatics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. A:** Diagrama esquemático mostrando as principais estruturas de um neurônio; caso os PEPS atinjam o limiar de excitação, terá início o disparo do potencial de ação na zona de gatilho, que se encontra no cone de implantação; quanto mais próxima a sinapse se encontra da zona de gatilho, maior a influência sobre o disparo do potencial de ação (a seta verde aponta o sentido de maior influência). SAD: sinapse axo-dendrítica; SAS: sinapse axo-somática; SAA: sinapse axo-axônica. **B:** Perfil do potencial de membrana (lado interno em relação ao externo) em função do tempo durante o disparo do potencial de ação; antes do disparo a membrana encontra-se no potencial de repouso de aproximadamente -60 mV (os valores podem variar de acordo com o tipo de neurônio); o início do potencial de ação é marcado por grande influxo de íons Na^+ , invertendo a polarização da membrana até +40 mV; após atingido o pico do potencial de ação, os canais de K^+ se abrem, causando efluxo desses íons e repolarizando a membrana. Após o potencial, há um breve período de hiperpolarização que impede o disparo de novos potenciais de ação por um período. **C:** Aproximação da membrana neuronal, o influxo de íons Na^+ marca a despolarização da membrana neuronal em B, que é reestabelecido pelo efluxo de íons K^+ . O equilíbrio desses íons é reestabelecido pela ação da bomba de Na-KATPase. Fonte primária.9
- Figura 2.** Sinapses GABAérgica (A) e Glutamatérgica (B). CCDV: Canais de cálcio dependentes de voltagem; CK: Canais de potássio; CIDV: Canais iônicos dependentes de voltagem; Glu: Glutamato; Gly: Glicina. Fonte primária.11
- Figura 3.** Classificação oficial da International League Against Epilepsy - ILAE. Imagem elaborada pelo autor.....14
- Figura 4.** Diagrama esquemático mostrando como a neuroinflamação, estresse oxidativo e excitotoxicidade mediada por glutamato estão relacionados com a epileptogênese e o ataque epiléptico. As setas contínuas simbolizam indução e as setas tracejadas simbolizam feedback positivo, gerando ciclos. Os símbolos em vermelho mostram os possíveis pontos em que o álcool perílico pode atuar baseado no que já se sabe pela literatura: 1 – Prevenção do estresse oxidativo; 2 – Inibição da transcrição do NF-kB; 3 – Bloqueio de canais de cálcio sensíveis à dihidropiridina; 4 – Inibição da hiperatividade da via mTOR; 5 – Prevenção da disfunção mitocondrial. Imagem elaborada pelo autor.26

Figura 5. A: Estrutura do Álcool Perílico; B: Ilustração do Zebrafish (Danio rerio), mostrando o que será administrado por cada via. Imagem elaborada pelo autor.....	29
Figura 6. Frequência de fenótipos relacionados à convulsão por grupo dado em porcentagem.	34
Figura 7. Quantificação dos fenótipos convulsivos por grupo. Cada ponto da dispersão representa os valores de um animal; as barras de erro representam o EPM. Os asteriscos pretos mostram as diferenças estatísticas comparado ao grupo controle negativo (Kruskal-Wallis, post-hoc de Dunn) levando em consideração todos os grupos. Os asteriscos vermelhos mostram as diferenças estatísticas comparado ao grupo controle negativo, sem os grupos onde não houve convulsão (ANOVA, post-hoc de Tukey). Nota: o ANOVA foi feito apenas para a duração das convulsões, pois apenas esse parâmetro passou no teste de normalidade após remover os grupos controle Veículo e Positivo. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0.001$	35
Figura 8. Gráficos de linhas mostrando as médias por grupo de distância percorrida em cada minuto de observação. A área hachurada representa o EPM; a linha pontilhada representa a média dos dez minutos. Todos os gráficos são mostrados na mesma escala.	38
Figura 9. Gráfico de linha mostrando as médias por grupo de aceleração em cada minuto de observação. A área hachurada representa o EPM; a linha pontilhada representa a média dos dez minutos. Todos os gráficos são mostrados na mesma escala.....	39
Figura 10. Gráfico de linha mostrando as médias por grupo de velocidade em cada minuto de observação. A área hachurada representa o EPM; a linha pontilhada representa a média dos dez minutos. Todos os gráficos são mostrados na mesma escala.....	40
Figura 11. Gráfico de linhas mostrando as médias dos parâmetros motores de todos os grupos juntos. Notar o "padrão em V" do controle negativo nos três gráficos.	41
Figura 12. Quantificação total dos parâmetros motores. Cada ponto da dispersão representa os valores de um animal; as barras de erro representam o EPM. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$; ANOVA). Notar a tendência de maior atividade locomotora com maiores doses de álcool perílico.....	43
Figura 13. Comparações feitas agrupando os dois primeiros minutos do tempo restante. Cada ponto da dispersão representa os valores de um animal; as barras de erro representam o EPM. Nota que a diferença de atividade pré e pós convulsiva dos grupos tratados com álcool perílico foi notavelmente menor que o grupo controle negativo.....	45
Figura 14. Representações em 2D e 3D do docking ligante-proteína; os tipos de interações são mostrados de acordo com a cor. A: Diazepam-GABAAR; B: Álcool Perílico-GABAAR;	

C: Vigabatrina-GABA-AT; D: Álcool Perílico-GABA-AT. C-H: ligação carbono-hidrogênio; Ha: halogênio; P-S: pi-enzofre; P-P: pi-pi; Alk: alquil; P-A: pi-alquil; CHD: ligação de hidrogênio.....46

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Alterações patofisiológicas que resultam em convulsões (Stafstrom, 1998).	16
Quadro 2. Medicamentos antiepilépticos.	18
Quadro 3. Parâmetros avaliados.	31
Quadro 4. Definições adotadas.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Divisão dos grupos e seus respectivos tratamentos.	29
Tabela 2. Detalhes das interações ligante-receptor preditas <i>in silico</i>	47

LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHDA – Oxidopamina

AMPA – Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

AP – Álcool Perílico

AVC – Acidente Vascular Cerebral

COX – Ciclooxygenase

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DZP – Diazepam

GABA – Ácido γ -Aminobutírico

GABA_AR – Receptor GABA_A

GABA-AT – GABA-Aminotransferase

GABA_BR – Receptor GABA_B

IL – Interleucina

ILAE – *International League Against Epilepsy*

mTOR – *Mammalian target of rapamycin*

NF- κ B – Fator Nuclear κ B

NMDA – N-metil-D-Aspartato

NOS – Sintase de Óxido Nítrico

PA – Potencial de Ação

PEPS – Potenciais Excitatórios Pós-Sinápticos

PIPS – Potenciais Inibitórios Pós-Sinápticos

PTZ – Pentilenonetrazol

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

SNC – Sistema Nervoso Central

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	5
2 OBJETIVOS	7
2.1 Geral:	7
2.2 Específicos:	7
3 REFERENCIAL TEÓRICO	8
3.1 Neurofisiologia	8
3.1.1 Potencial de ação e liberação de neurotransmissores	8
3.1.2 Sinapses GABAérgicas	10
3.1.3 Sinapses glutamatérgicas	12
3.1.5 Ciclo GABA/Glutamato-Glutamina	12
3.2 A Epilepsia	13
3.2.1 Classificação	14
3.2.2 Patogênese	15
3.2.3 Patofisiologia	16
3.2.3 Anticonvulsivantes e epilepsia refratária	18
3.3 O Álcool perílico (AP)	21
3.3.1 Atividade anti-(neuro)inflamatória e antioxidante	21
3.3.2 Atividade neuroprotetora	22
3.3.3 Atividade sobre canais iônicos e modulação da excitabilidade neuronal	22
3.3.4 Hipótese: Álcool perílico contra convulsões epiléticas	23
3.4 Zebrafish como organismo modelo em neurofarmacologia	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Animais e aspectos éticos	28
4.2 Reagentes, doses e via de administração	28

4.3 Delineamento experimental e tratamentos	29
4.4 Procedimento do ensaio e aparato usado	29
4.5 Parâmetros avaliados	30
4.6 Estudos <i>in silico</i>	31
4.7 Análise de dados e estatística	32
5 RESULTADOS	34
5.1 Efeito do tratamento com Álcool Perílico sobre parâmetros convulsivos.....	34
5.2 Efeito do tratamento com Álcool Perílico sobre parâmetros motores afetados por convulsão.....	37
5.3 Mecanismo anticonvulsivante do álcool perílico <i>in silico</i>	45
6 DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
7 CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS	Erro! Indicador não definido.
ANEXO 1	63
ANEXO 2	64

Estima-se que em torno de 70 milhões de pessoas no mundo tenham epilepsia, o que corresponde à 1% da população mundial. Fazendo com que seja considerada uma das doenças neurológicas mais comuns no mundo (Singh e Trevick, 2016). Embora muitas vezes sejam de causa desconhecida, as convulsões epiléticas podem estar associadas a mutações genéticas (ex.: canalopatias), alterações na migração neuronal, neurodegeneração e doenças de degradação neuronal (ex.: Síndrome de Angelman), tumores, lesões e AVC (Turrini *et al.*, 2017).

Por mais que muitos anticonvulsivantes estejam disponíveis no mercado para o tratamento das convulsões epiléticas, aproximadamente um terço dos pacientes não respondem adequadamente a esse tratamento (Turrini *et al.*, 2017). Além disso, os fármacos anticonvulsivantes atuais apresentam efeitos adversos como déficit cognitivo, neurotoxicidade e efeitos sistêmicos (Rabiei, 2017); evidenciando a necessidade de pesquisa de novos tratamentos com mecanismos de ação diferentes para – quando possível – substituir, ou ao menos diminuir as doses com os anticonvulsivantes tradicionais.

O álcool perílico (AP) é um conhecido monoterpene antineoplásico usado no tratamento de gliomas. Em geral bem tolerado em ensaios clínicos, a administração intranasal desse agente já foi testada por longos períodos de até quatro anos em pacientes (Chen, Fonseca, da e Schönthal, 2018; Gomes *et al.*, 2017). A eficácia desse fármaco e sua segurança em estudos clínicos o torna atraente para a busca de novas atividades no sistema nervoso central.

Em um modelo *in vitro* de Parkinson, o AP causou mitigação da citotoxicidade causada por oxidopamina, restaurou o potencial de membrana mitocondrial, reduziu a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a fragmentação no DNA (Anis *et al.*, 2018). Tabassum *et al.* (2015) reportaram que o tratamento com álcool perílico melhorou a integridade histológica e funcional no cérebro de ratos após dano por isquemia/reperfusão após oclusão da artéria cerebral. O tratamento diminuiu a gravidade do infarto, atenuou os déficits neurológicos dos ratos e a perda neuronal no córtex e hipocampo. Ao nível molecular, houve diminuição do estresse oxidativo e da resposta neuroinflamatória. Em um estudo de

Zhou, Fukumoto e Yokogoshi, (2009), o tratamento com AP preveniu o déficit cognitivo (memória associativa) induzido por escopolamina em ratos wistar. Os autores reportaram que o tratamento aumentou a concentração de dopamina no hipocampo e *striatum* dos ratos e, *in vitro*, inibiu a atividade da enzima acetilcolinesterase. Outras atividades biológicas do AP no SNC foram atenuar o estresse em ratos (d'Alessio, Bisson e Béné, 2013) – atribuída à sua atividade anti-neuroinflamatória –, e analgesia central (Benedito *et al.*, 2017). Digno de nota, o tratamento com AP não parece causar nenhum dano histopatológico no cérebro (hipocampo e *striatum*) em doses testadas de até 100 mg/kg (Benedito *et al.*, 2017).

Não há até o momento, nenhuma pesquisa sobre o efeito do tratamento com álcool perfílico sobre a convulsão e seus danos ao sistema nervoso. Sabe-se que a neuroinflamação e o estresse oxidativo são eventos-chave que ocorrem na epileptogênese que podem, por feedback positivo, exacerbar a resposta convulsiva e causar danos ao sistema nervoso (Ambrogini *et al.*, 2019). Além disso, a excitotoxicidade causada pelo glutamato durante o ataque epiléptico causa grande influxo de cálcio nos neurônios para a transmissão dos potenciais de ação, e sabe-se que o AP também pode agir removendo o cálcio intracelular em alguns tipos de célula (Berchtold *et al.*, 2005). Devido à sua propriedade antioxidante, anti-inflamatória e moduladora dos íons de cálcio, hipotetizou-se que o AP tivesse um efeito protetivo contra as convulsões, assim como moléculas com essas mesmas propriedades (Pauletti *et al.*, 2017; Alshareef *et al.*, 2016; Temp *et al.*, 2017; Kriz, Župan e Simonić, 2003). Portanto, para testar essa hipótese, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade anticonvulsivante do álcool perfílico, para isso, foi adotado o modelo de convulsões induzidas por pentilenotetrazol em peixes zebrafish adultos (*Danio rerio*).

2.1 Geral:

Avaliar os efeitos do tratamento com álcool perílico sobre convulsões epileptiformes.

2.2 Específicos:

- Desenvolver um modelo confiável e reprodutível para avaliar o efeito anticonvulsivante do álcool perílico usando zebrafish baseado na literatura;
- Usar este modelo para avaliar o efeito do tratamento com AP sobre o comportamento convulsivo analisado manualmente;
- Avaliar o efeito do tratamento com AP sobre o déficit motor causado pelas convulsões usando o software de rastreamento Toxtrac;
- Elucidar um possível mecanismo de ação para a atividade anticonvulsivante do álcool perílico *in silico*.

3.1 Neurofisiologia

Para entender os mecanismos por trás das alterações fisiológicas que culminam na epileptogênese e eventualmente no ataque epiléptico, é necessário conhecer o funcionamento normal dos neurônios e suas sinapses. Nesta seção serão apresentadas informações básicas sobre a neurofisiologia do sistema nervoso central (SNC).

3.1.1 Potencial de ação e liberação de neurotransmissores

Os neurônios em estado inicial encontram-se polarizados, com o lado intracelular da membrana negativo em relação ao lado extracelular, gerando o potencial de repouso da membrana (V_m , situado entre -60 e -70 mV¹). O potencial de ação (PA) é uma reversão transitória (<1 ms) do potencial de membrana, que surge em um neurônio quando o potencial de membrana é elevado até o limiar de excitação (-40 mV; **Figura 1.A**) (Barnett e Larkman, 2007).

O PA começa com um grande influxo de sódio através de canais de Na^+ dependentes de voltagem que são abertos quando a membrana é elevada até o limiar de excitação. O influxo do sódio alterará o potencial de membrana de -40 mV a aproximadamente +30 mV. Essa alteração da carga percorrerá todo o axônio, levando o impulso adiante. Após o influxo de Na^+ , haverá excesso de carga positiva intracelular no neurônio, e ocorrerá a abertura dos canais de K^+ dependentes de voltagem, causando o efluxo desses íons, restaurando o equilíbrio de cargas (**Figura 1.B e 1.C**) (Stafstrom, 1998).

O efluxo de íons K^+ vai diminuir o potencial de membrana abaixo do potencial de repouso por um breve instante, chamado de pós-hiperpolarização. O período de pós-hiperpolarização, que acontece logo após o PA, irá prevenir o disparo imediato de outros por um breve período de tempo (período refratário). Terminado o potencial de ação, haverá excesso de Na^+ intracelular e K^+ extracelular; a restauração da concentração inicial desses íons será feita pela bomba *Na-K ATPase*, que devolverá o Na^+ para o lado extracelular e o K^+ para

¹ Os valores dos potenciais de membranas podem variar de acordo com os tipos de neurônios (Bean, 2007).

o lado intracelular (na proporção de 3 Na^+ para cada 2 K^+). Como os íons serão transportados contra o seu gradiente de concentração, há consumo de ATP. Além da bomba iônica *Na-K ATPase*, células da glia (astrócitos) também na restauração da homeostase iônica absorvendo o excesso de íons K^+ extracelular através dos canais $\text{K}_{\text{ir}} 4.1$ (Patel *et al.*, 2019).

As mudanças do potencial de membrana, que poderão resultar no disparo do PA, são computadas através dos PIPS (potenciais inibitórios pós-sinápticos) – provenientes das sinapses GABAérgicas (seção 3.1.2) –, e PEPS (potenciais excitatórios pós-sinápticos) – provenientes das sinapses glutamatérgicas (seção 3.1.3) – que o neurônio em questão recebe.

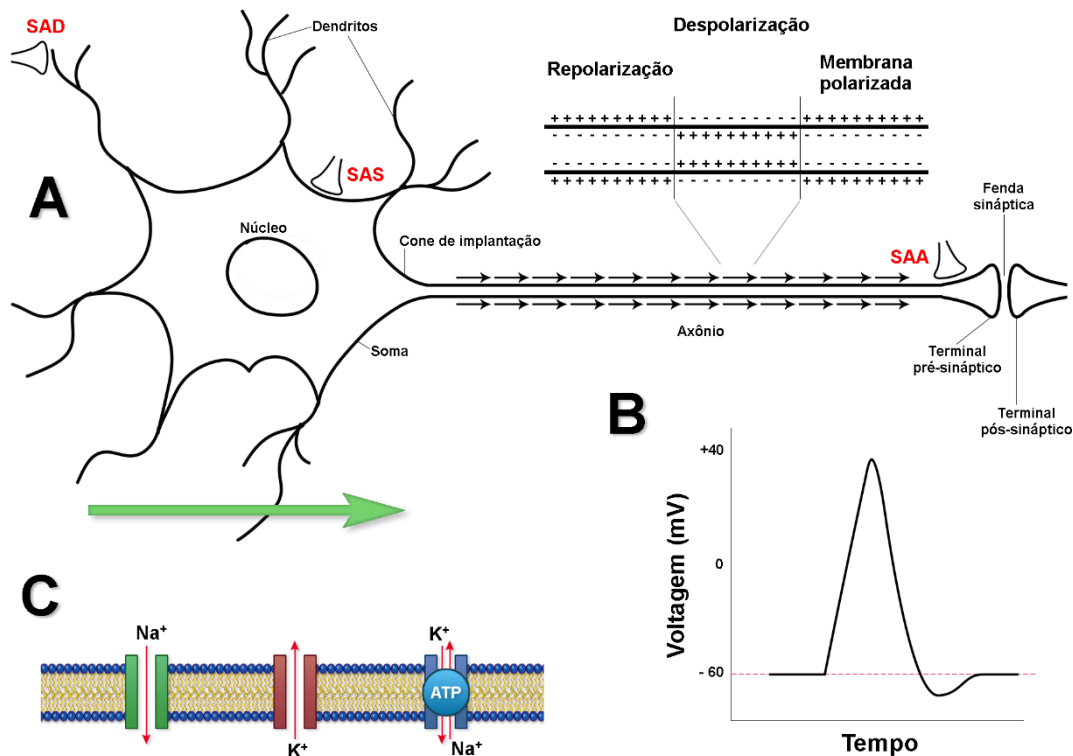


Figura 1. A: Diagrama esquemático mostrando as principais estruturas de um neurônio; caso os PEPS atinjam o limiar de excitação, terá início o disparo do potencial de ação na zona de gatilho, que se encontra no cone de implantação; quanto mais próxima a sinapse se encontra da zona de gatilho, maior a influência sobre o disparo do potencial de ação (a seta verde aponta o sentido de maior influência). SAD: sinapse axo-dendrítica; SAS: sinapse axo-somática; SAA: sinapse axo-axônica. **B:** Perfil do potencial de membrana (lado interno em relação ao externo) em função do tempo durante o disparo do potencial de ação; antes do disparo a membrana encontra-se no potencial de repouso de aproximadamente -60 mV (os valores podem variar de acordo com o tipo de neurônio); o início do potencial de ação é marcado por grande influxo de íons Na^+ , invertendo a polarização da membrana até +40 mV; após atingido o pico do potencial de ação, os canais de K^+ se abrem, causando efluxo desses íons e repolarizando a membrana. Após o potencial, há um breve período de hiperpolarização que impede o disparo de novos potenciais de ação por um período. **C:** Aproximação da membrana neuronal, o influxo de íons Na^+ marca a despolarização da membrana neuronal em B, que é reestabelecido pelo efluxo de íons K^+ . O equilíbrio desses íons é reestabelecido pela ação da bomba de *Na-KATPase*. Fonte primária.

No neurônio, o potencial de ação surge em uma região rica em canais de Na^+ dependentes de voltagem, chamada zona de gatilho, que se localiza geralmente no cone de implantação (região entre o soma e a porção proximal do axônio), e percorrerá até o terminal axonal. Diz-se que o PA é “tudo ou nada”, pois só ocorre caso o limiar seja atingido, e sempre em intensidade máxima. Outra propriedade intrínseca deste fenômeno é que é sempre unidirecional (Barnett e Larkman, 2007; Forehand, 2011; Stuart *et al.*, 1997).

A chegada do potencial de ação no terminal axonal causa o influxo de Ca^{2+} através de canais de cálcio dependentes de voltagem. No terminal pré-sináptico do axônio, a entrada do cálcio vai resultar na exocitose de vesículas contendo os neurotransmissores, liberando-os na fenda sináptica (Volk *et al.*, 2015; Kavalali, 2015). O neurotransmissor – que dependerá do tipo de sinapse – agirá nos receptores do terminal pós-sináptico, como descrito a seguir.

3.1.2 Sinapses GABAérgicas

Nas sinapses GABAérgicas (**Figura 2.A**), o neurotransmissor liberado é o ácido γ -aminobutírico (GABA) – principal neurotransmissor inibitório no SNC. O GABA é sintetizado a partir do glutamato no terminal pré-sináptico por ação da enzima *glutamato descarboxilase*, que utiliza piridoxina (Vitamina B6) como co-fator (Ciclo GABA/Glutamato-glutamina, **Seção 3.1.5**).

Ao ser liberado na fenda sináptica, o GABA pode atuar nos Receptores GABA_A (GABA_{AR} , ionotrópicos), e Receptores GABA_B (GABA_{BR} , metabotrópicos). A atividade do GABA_{AR} é mais conhecida, e esses receptores são alvos de diversos fármacos anticonvulsivantes (**Quadro 1**). Quando moléculas de GABA se ligam à Receptores GABA_A , o poro do receptor se abre e ocorre influxo de íons Cl^- . O influxo de cloreto faz com que o lado intracelular da membrana neuronal se torne ainda mais negativo (hiperpolarizado), resultando na diminuição dos disparos de potenciais de ação (Olsen e Sieghart, 2009).

O GABA_{BR} é um receptor ligado à Proteína G, sua ativação resultará à jusante na abertura de canais de K^+ (Schuler *et al.*, 2001). Como esse íon está em maior concentração no meio intracelular, haverá efluxo de K^+ , que por ter carga positiva, resultará em maior negatividade no lado interno (hiperpolarização). Devido ao seu mecanismo intrínseco, a atividade dos Receptores GABA_B é mais lenta e duradoura que a dos Receptores GABA_A . As

alterações no potencial da membrana causadas pelo GABA (hiperpolarização), por serem inibitórias, são chamadas de Potencial Inibitório Pós-Sináptico (PIPS) (Stafstrom, 1998).

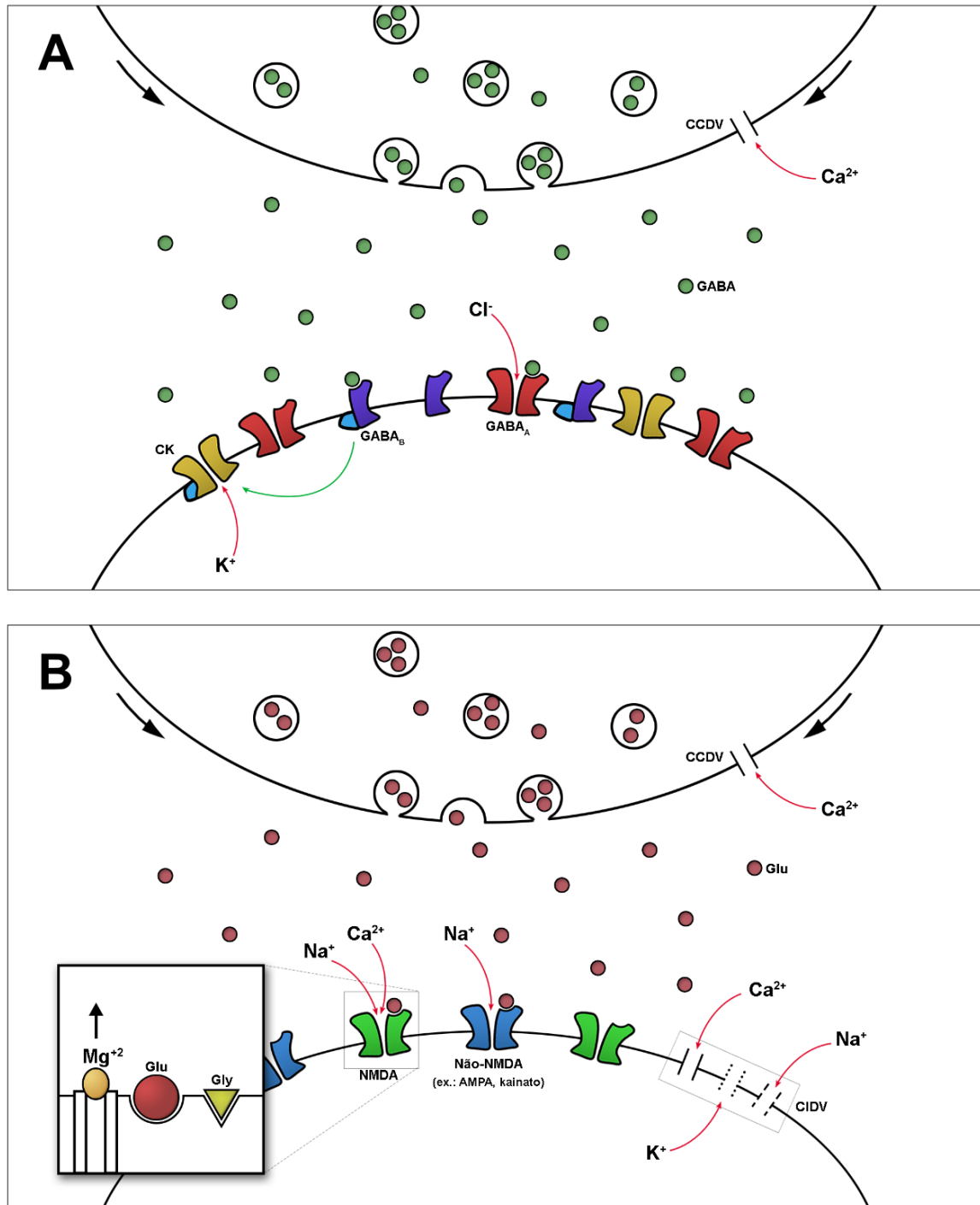


Figura 2. Sinapses GABAérgica (A) e Glutamatérgica (B). CCDV: Canais de cálcio dependentes de voltagem; CK: Canais de potássio; CIDV: Canais iônicos dependentes de voltagem; Glu: Glutamate; Gly: Glicina. Fonte primária.

3.1.3 Sinapses glutamatérgicas

Nas sinapses glutamatérgicas (**Figura 2.B**), o neurotransmissor liberado é o glutamato – principal neurotransmissor excitatório do SNC. O glutamato pode se ligar à Receptores AMPA, Receptores de Kainato e Receptores NMDA (N-metil-D-Aspartato). Os receptores não-NMDA (i.e., de Kainato e AMPA) são chamados de ação rápida, e os receptores NMDA são chamados de ação duradoura. Os receptores NMDA precisam além do glutamato, de um co-agonista essencial, a glicina (Lau e Tymianski, 2010).

Dentre estes receptores, os NMDA são considerados os principais. Entretanto, inicialmente, os poros desses receptores estão bloqueados por íons Mg^{2+} . Para que esses íons liberem o poro é necessário que haja uma mudança inicial no potencial de membrana (entre 10 e 20 mV); essa mudança é induzida pela ativação dos receptores não-NMDA. A ativação pelo glutamato dos receptores de ação rápida resultará em um influxo inicial de Na^+ , que causará a mudança de potencial necessária para que os íons Mg^{2+} saiam dos poros dos receptores NMDA, permitindo a sua ação.

Há então, três pré-requisitos para a ação dos receptores NMDA: 1) ligação do glutamato ao receptor; 2) ligação da glicina (co-agonista); 3) saída dos íons Mg^{2+} dos poros do receptor (**Figura 2.B**, canto inferior esquerdo). Uma vez que esses requisitos aconteçam, o poro do receptor abrirá causando grande influxo de Na^+ e Ca^{2+} (Stafstrom, 1998). Como estes íons são de carga positiva, tenderão a causar despolarização da membrana; o influxo do Ca^{2+} causará, ainda, ativação de vias metabólicas intracelulares (Bean, 2007). As alterações no potencial da membrana causadas pelo glutamato (despolarização), por serem excitatórias, são chamadas de Potencial Excitatório Pós-Sináptico (PEPS).

Os PEPS causados pelo glutamato nos receptores não-NMDA e NMDA vão ativar também canais iônicos dependentes de voltagem pós-sinápticos (ex.: Na^+ e Ca^{2+}), causando influxo desses íons, que também vão contribuir para a despolarização da membrana neuronal (Stafstrom, 1998).

3.1.5 Ciclo GABA/Glutamato-Glutamina

Os neurônios não são capazes de realizar síntese *de novo* dos neurotransmissores glutamato e GABA devido à ausência da enzima *piruvato carboxilase* nessas células. Isso significa que não podem sintetizar glutamato e GABA a partir de moléculas simples, como a

glicose. Por isso, há um ciclo chamado ciclo GABA/Glutamato-Glutamina, que acontece com a participação de células gliais.

O GABA ou glutamato – dependendo da sinapse – após liberado na fenda sináptica e agir nos receptores, será absorvido pelos astrócitos. Dentro dessas células, os neurotransmissores serão convertidos em glutamina e serão novamente liberados aos neurônios. A glutamina servirá como precursora para a síntese de glutamato ou GABA, reiniciando o ciclo. Por outro lado, uma parte do neurotransmissor pode ser diretamente reabsorvida pelo neurônio que o liberou, processo que é mais significativo para o GABA que para o glutamato (Bak, Schousboe and Waagepetersen, 2006; Rowley *et al.*, 2012; Petroff, 2002).

3.2 A Epilepsia

A epilepsia é conceituada como a condição médica em que o paciente sofre dois ou mais ataques epiléticos espontâneos na vida separados por um período maior que 24 horas (Fisher *et al.*, 2014). Sua prevalência total é estimada em cerca de 70 milhões de pessoas acometidas no mundo (1% da população), e a incidência é de 2,4 milhões de novos diagnósticos por ano. Cerca de 90% dessas pessoas são de países em desenvolvimento, presumivelmente devido às condições endêmicas que oferecem riscos para o seu desenvolvimento (Singh e Trevick, 2016). Trata-se de uma doença neurológica relativamente comum a segunda mais comum atrás apenas da migração, segundo alguns autores (Sung-joon *et al.*, 2017).

Embora uma convulsão grave possa levar a óbito (como no *status epilepticus*), a epilepsia em si não afeta severamente na expectativa de vida; entretanto, a qualidade de vida pode ser severamente comprometida se a doença não for devidamente controlada (Bowman, Dudek e Spitz, 2001). Para isso são usados os fármacos anticonvulsivantes; embora um grande número desses medicamentos esteja disponível no mercado, aproximadamente um terço dos pacientes não respondem adequadamente ao tratamento (Epilepsia refratária, **seção 3.2.3**), além disso, o uso dos anticonvulsivantes atuais tem como efeitos adversos o déficit cognitivo, sedação, possível neurotoxicidade dependendo do medicamento e da dose, efeitos sistêmicos e psicotomiméticos (**Quadro 1**). Isso é agravado pelo fato de o tratamento ser de longo prazo (Rabiei, 2017; Celli *et al.*, 2019).

3.2.1 Classificação

A classificação oficial da ILAE (2017) é feita em três níveis: tipos de convulsão, tipos de epilepsia e síndromes epiléticas (**Figura 3**) (Scheffer *et al.*, 2017).

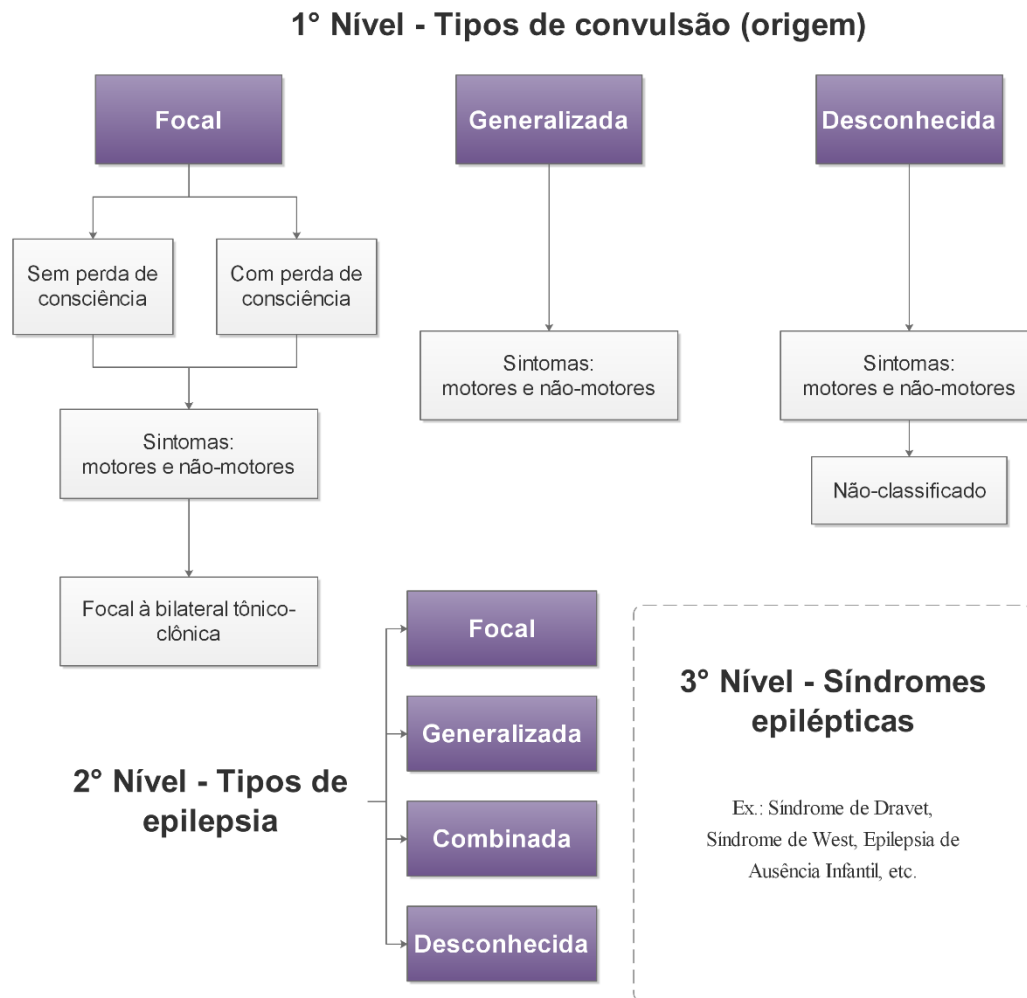


Figura 3. Classificação oficial da International League Against Epilepsy - ILAE. Imagem elaborada pelo autor.

A classificação das convulsões da ILAE foi publicada em seu periódico oficial, “*Epilepsia*”, por Fisher *et al.* (2017). Nessa classificação, as convulsões são divididas em focal, generalizada, ou desconhecida, de acordo com o sítio de surgimento no cérebro. A convulsão focal pode ser com ou sem consciência alterada, e com sintomas motores (ex.: automatismos) ou não-motores (ex.: sensoriais); a convulsão focal pode ainda se tornar secundariamente bilateral. A convulsão generalizada é sempre com consciência alterada, e pode ser com sintomas motores (ex.: convulsão tônico-clônica) ou não-motores (ex.:

convulsão de ausência). As convulsões de origem desconhecidas também podem ser classificadas de acordo com sintomas motores e não motores (Fisher *et al.*, 2017).

O segundo nível de classificação da ILAE são os tipos de epilepsia. Essa classificação é feita basicamente a partir dos tipos de convulsões predominantes, podendo ser: epilepsia focal, generalizada, combinada (focal e generalizada) ou desconhecida. Por fim, o terceiro nível de classificação são as síndromes epiléticas, que são agrupamentos de quadros epiléticos com características em comum, como idade do paciente, variação circadiana, prognóstico, comorbidades, fatores etiológicos, entre outros. Exemplos de síndromes epiléticas são a Síndrome de West, Síndrome de Dravet e a Epilepsia de Ausência Infantil. A classificação é uma importante ferramenta de diagnóstico que tem papel fundamental na escolha do tratamento apropriado (Scheffer *et al.*, 2017).

3.2.2 Patogênese

Como visto, o ataque epilético é marcado pela ocorrência de sinais ou sintomas de atividade neuronal anormal excessiva e sincrônica no cérebro (Fisher *et al.*, 2005). O processo crônico em que o cérebro inicialmente normal cria predisposição para o surgimento espontâneo dos ataques epiléticos é denominado “epileptogênese” (Lukasiuk, 2014). As causas para a epileptogênese são diversas; a ILAE divide esses fatores etiológicos em estruturais, genéticos, infecções, metabólicos, imunológicos e de causa desconhecida (Scheffer *et al.*, 2017).

No cérebro, o processo de epileptogênese é marcado por um desequilíbrio entre os estímulos excitatórios e inibitórios dentro de um circuito neuronal, de forma que ele se torne mais propenso a funcionar de forma excessiva, hipersincrônica e oscilatória. Ao agir dessa forma de maneira contínua, o circuito anômalo acaba resultando em alterações de outros circuitos. Eventualmente, os circuitos anômalos, chamados de epileptogênicos, irão resultar na precipitação dos ataques epiléticos (Thijs *et al.*, 2019).

O desequilíbrio de estímulos que irá contribuir para a epileptogênese, e mais tarde para o desencadeamento dos ataques epiléticos espontâneos, pode ocorrer em vários níveis do sistema nervoso: desde moléculas pequenas (ex.: neurotransmissores), macromoléculas (ex.: receptores e canais iônicos), até células (ex.: estrutura dos dendritos) e circuitos neuronais inteiros. Alguns exemplos de alterações patofisiológicas que resultam em epilepsia são mostrados no **Quadro 1**.

Quadro 1. Alterações patofisiológicas que resultam em convulsões (Stafstrom, 1998).

Nível de função cerebral	Condição	Mecanismo patofisiológico
Rede neuronal	Disgenesia cerebral, cicatriz pós-traumática, esclerose mesial temporal (na epilepsia do lobo temporal)	Circuitos neuronais alterados: formação de conexões excitatórias anômalas (“sprouting”)
Estrutura neuronal	Síndrome de Down e outras síndromes com retardo mental e convulsões	Estrutura anormal dos dendritos e espinhos dendríticos: fluxo de corrente elétrica anômalo no neurônio
Síntese de neurotransmissores	Dependência de piridoxina (Vitamina B6)	Diminuição da síntese de GABA; B6 é um co-fator da glutamato descarboxilase
Receptores inibitórios	Síndrome de Angelman	Subunidade dos receptores GABA anormais
Receptores excitatórios	Hiperglicinememia não cetótica	O excesso de glicina causa hiperativação dos receptores NMDA
Desenvolvimento sináptico	Convulsão neonatal	Desenvolvimento antecipado das sinapses excitatórias ou atraso do desenvolvimento das sinapses inibitórias
Canais iônicos	Convulsão neonatal familiar benigna	Mutações nos canais de K ⁺ : processo de repolarização prejudicado

3.2.3 Patofisiologia

Como demonstrado por Ambrogini et al. (2019), há três fenômenos intrinsecamente ligados à epileptogênese, ao posterior surgimento dos ataques epiléticos (ictiogênese), e à neurodegeneração que pode ser desencadeada por estes. Esses fenômenos são a excitotoxicidade mediada pelo glutamato, estresse oxidativo e neuroinflamação.

A excitotoxicidade mediada por glutamato, característica do ataque epilético, pode contribuir para o ataque epilético e neurodegeneração por, pelo menos, três maneiras: 1: pelo excesso de estímulos excitatórios e consequente exacerbação do influxo de cálcio e disparos de potenciais de ação (Puttachary *et al.*, 2015); 2: indução do estresse oxidativo no cérebro, pois, a ativação do Receptor Ionotrópico NMDA pelo glutamato induz a montagem e

atividade da enzima NADPH Oxidase 2 (NOX2), que produz espécies reativas de oxigênio (ROS) durante o ataque epiléptico (Ambrogini et al., 2019); 3: a disrupção da homeostase de $[Ca^{+2}]$ intracelular induzida pela excitotoxicidade pode causar abertura dos poros de transição mitocondrial, modificando o potencial de membrana e gerando quadro de disfunção mitocondrial, que também tem papel importante na epilepsia e em doenças neurodegenerativas (Rivero-Segura et al., 2017).

Não só o excesso de cálcio intracelular, mas o estresse oxidativo também pode causar abertura de poros de transição de permeabilidade mitocondrial. Como se sabe, a cadeia respiratória mitocondrial é uma das maiores fontes de radicais livres no organismo; elétrons não-pareados que escapam do complexo respiratório interagem com oxigênio molecular, formando ânions superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxilas livres, altamente reativos e tóxicos. A abertura dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial faz com que essas espécies reativas vazem, contribuindo para mais estresse oxidativo. Um quadro de alteração exacerbada da permeabilidade mitocondrial pode, também, causar inchaço mitocondrial, liberação de citocromo-c e consequente ativação da caspase e apoptose, contribuindo para a neurodegeneração (Devi, Manocha e Vohora, 2008; Pearson-smith e Patel, 2017).

Se por um lado a excitotoxicidade do glutamato contribui para o estresse oxidativo, o inverso também acontece, pois, as espécies reativas inibem a atividade da *glutamina sintetase*. Essa enzima encontrada em astrócitos é importante por dois motivos: primeiro, ela é responsável pela depuração do glutamato, diminuindo seus níveis; segundo, a glutamina formada por ela é convertida em GABA, o principal neurotransmissor inibitório, com efeito oposto ao glutamato (Puttachary et al., 2015; Ambrogini et al., 2019). Como resultado, há um ciclo vicioso excitotoxicidade-estresse oxidativo-excitotoxicidade. Além de contribuir para o ataque epiléptico, o estresse oxidativo pode contribuir diretamente para a neurodegeneração, pois é particularmente nocivo ao cérebro, mais do que aos demais tecidos, por diversos fatores: elevado metabolismo oxidativo, maiores concentrações de íons livres de ferro e cobre, elevada concentração de grupos heme e ácidos graxos poli-insaturados, baixos níveis de enzimas antioxidantes (Gomes et al., 2017).

Um outro fator que contribui para o estresse oxidativo é a neuroinflamação, através da liberação de espécies reativas por células inflamatórias. Além disso, a neuroinflamação pode facilitar o ataque epiléptico, pois sabe-se que as citocinas pró-inflamatórias aumentam a excitabilidade neuronal. Assim como a neuroinflamação facilita o ataque epiléptico, o inverso

também ocorre: o ataque epiléptico gera inflamação no sistema nervoso, formando um novo ciclo vicioso (Vezzani *et al.*, 2013; Ambrogini *et al.*, 2019).

3.2.3 Anticonvulsivantes e epilepsia refratária

Os principais medicamentos antiepiléticos são mostrados no **Quadro 2**. O quadro mostra ainda a classe de substâncias à qual o composto pertence, seus mecanismos de ação e principais efeitos adversos. As informações são das bases de dados PubChem (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov), DrugBank (drugbank.ca) e DailyMed (dailymed.nlm.nih.gov).

Quadro 2. Medicamentos antiepiléticos.

Nome (classe)	Mecanismo de Ação	Efeitos Adversos
Carbamazepina (Benzazepinas)	Mecanismo não completamente elucidado, mas acredita-se que seja através da inibição de canais de sódio dependentes de voltagem, diminuindo a hiperexcitabilidade causada pela despolarização da membrana neuronal.	Náusea, vômito, tontura, vertigo, sonolência, fadiga, ataxia, alterações na coordenação, dor de cabeça, discrasias sanguíneas, constipação, hiponatremia.
Clobazam (Benzodiazepínicos)	Potencialização dos Receptores GABA _A .	Agressividade, ataxia, constipação, tontura, insônia ou sonolência, náusea, vômito, dependência.
Clonazepam (Benzodiazepínicos)	Potencialização dos Receptores GABA _A .	Anorexia, constipação, tontura, sonolência, dependência.
Diazepam (Benzodiazepínicos)	Potencialização dos Receptores GABA _A .	Sedação, sonolência, diplopia, ataxia, déficit cognitivo, dependência.
Etosuximida (Pirrolidinas)	Inibição dos canais de cálcio dependentes de voltagem tipo T, diminuindo o influxo de cálcio e consequentemente a excitabilidade neuronal.	Anorexia, dor abdominal, náuseas, vômito, tontura, distúrbios no sono, irritabilidade, hiperatividade, discrasias sanguíneas.
Gabapentina (Ácidos carboxílicos)	Mecanismo não completamente elucidado, mas acredita-se que seja pela inibição das subunidades $\alpha 2\delta$ -1 de canais de cálcio dependentes de voltagem, diminuindo a quantidade desses canais na membrana pré-sináptica, com consequente diminuição do influxo de cálcio e liberação de neurotransmissores excitatórios.	Sonolência, tontura, fadiga, ataxia.
Lamotrigina (Benzênicos)	Bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem (tipo R), estabilizando a membrana neuronal e a liberação de neurotransmissores excitatórios.	Reações cutâneas, tontura, dor de cabeça, náusea, vômito, tremor, sonolência, diplopia.

Nome (classe)	Mecanismo de Ação	Efeitos Adversos
Levetiracetam (Pirrolidinas)	Acredita-se que seja através da ligação às proteínas de vesículas sinápticas SV2A, modulando a exocitose de vesículas e liberação de neurotransmissores.	Ataxia, sonolência, sedação, dor de cabeça, náusea, depressão, diplopia, hiponatremia, erupções cutâneas, vertigo.
Oxcarbazepina (Benzazepinas)	Mecanismo não completamente elucidado, mas acredita-se que seja através da inibição de canais de sódio dependentes de voltagem, diminuindo a hiperexcitabilidade causada pela despolarização da membrana neuronal.	Erupções cutâneas, tontura, sonolência, diplopia, vertigo, náusea, vômito, ataxia, dor de cabeça, hiponatremia, sedação.
Fenobarbital (Barbitúricos)	Potencialização dos Receptores GABA _A ; inibição de canais de cálcio.	Sonolência ou insônia, ataxia, confusão mental, vômito, tontura, mudanças de humor, agitação, hipercinesia, ansiedade, alucinações.
Fenitoína (Azolidinas)	Bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem (tipos 1 e 5), diminuindo a hiperexcitabilidade causada pela despolarização da membrana neuronal.	Confusão mental, ataxia, diplopia, discrasias sanguíneas, fala alterada, erupções cutâneas.
Primidona (Diazinas)	Potencialização dos Receptores GABA _A .	Letargia, alterações no ciclo do sono, alterações comportamentais, hiperatividade, letargia, náusea, sedação, erupções cutâneas, ataxia.
Topiramato (Dioxolopiranos)	Vários mecanismos de ação conhecidos: 1) potencialização dos Receptores GABA _A ; 2) inibição de canais de sódio dependentes de voltagem; 3) redução da atividade de receptores de glutamato (AMPA e Kainato).	Confusão mental, dificuldade de concentração, problemas de fala, depressão, fadiga, nervosismo, parestesias, tremores.
Ácido Valpróico (Ácidos graxos acil-ramificado)	Mecanismo não completamente elucidado, mas acredita-se que seja através do aumento da concentração de GABA devido à inibição da enzima semialdeído-succínico-dehidrogenase.	Alopecia, tontura, sonolência, tremores, ganho de peso, síndrome do ovário policístico.
Vigabatrina (Ácido carboxílico)	Aumento da concentração de GABA no SNC por inibição irreversível da enzima responsável pelo seu catabolismo (GABA-Transaminase).	Perda de visão permanente, sonolência, fadiga, tontura.
Zonisamida (Benzisoxazóis)	Inibição de canais de sódio e canais de cálcio dependentes de voltagem (tipo T), suprimindo a despolarização neuronal.	Acidose, erupções cutâneas, nefrolitíase metabólica, oligohidrose.

Nos últimos anos, houve um grande crescimento no número de drogas usadas no tratamento da epilepsia. Apesar disso, a fração de pacientes que não respondem adequadamente ao tratamento continua sendo um terço dos casos (Golyala e Kwan, 2017). A

situação onde o paciente epiléptico não responde adequadamente ao tratamento é chamada de Epilepsia Refratária. Esse quadro está associado a maior índice de morbidade e mortalidade, sérias consequências psicossociais, problemas cognitivos e pior qualidade de vida (Tang, Hartz e Bauer, 2017).

Existem diversas hipóteses que tentam explicar a epilepsia refratária; dessas, as mais citadas são a hipótese do alvo e a hipótese dos transportadores. Segundo a hipótese do alvo, a fármaco-resistência seria causada por alterações na estrutura molecular dos receptores (como os receptores de GABA e canais iônicos dependentes de voltagem), diminuindo a ligação e eficácia do anticonvulsivante. A hipótese dos transportadores postula que a fármaco-resistência seria causada pelo excesso da expressão de transportadores de efluxo na barreira hematoencefálica (como a Glicoproteína-P), que diminuiriam a concentração do medicamento a doses sub-terapêuticas. Por fim, a hipótese das redes neurais postula que a fármaco-resistência seja causada por degeneração nos circuitos neurais do paciente, que se torna irresponsivo ao tratamento (Pohlmann-Eden e Weaver, 2013).

Tang, Hartz e Bauer (2017) argumentam que nenhuma dessas hipóteses pode explicar sozinha as bases da fármaco-resistência na epilepsia. De acordo com esses autores, outras hipóteses possíveis são a hipótese da farmacocinética, a hipótese da severidade intrínseca, a hipótese das redes neurais e a hipótese da variante genética. A hipótese da farmacocinética afirma que a resistência aos medicamentos anticonvulsivantes seria devido a alterações farmacocinéticas nos pacientes refratários, como maior quantidade de transportadores de efluxo presentes nos órgãos viscerais (não apenas na barreira hematoencefálica, como na hipótese dos transportadores), maior metabolismo pelo fígado, etc, que culminariam em menores doses do fármaco no sangue, conseqüentemente, diminuindo sua eficácia. A hipótese da severidade intrínseca diz que os pacientes naturalmente possuem um *continuum* de gravidade, do menos grave ao mais grave, e que a fármaco-resistência seria uma propriedade das condições mais graves. A hipótese das redes neurais postula que a fármaco-resistência seja causada por neurodegeneração nos circuitos neurais. Finalmente, a hipótese da variante genética afirma que a resistência aos medicamentos anticonvulsivantes seria devido a alterações de genes envolvidos no metabolismo destes, como as CYPs. Apesar de muitas hipóteses, nenhuma delas parece explicar sozinha todos os casos.

3.3 O Álcool perílico (AP)

O álcool perílico (Pubchem ID 10819) é um monoterpene cíclico anfipático usado no tratamento de cânceres, principalmente gliomas. Já foi testado em ensaios clínicos e apesar da sua eficácia, falhou devido efeitos adversos gastrintestinais (quando administrado oralmente); entretanto, novos ensaios clínicos mostraram que o composto é bem tolerado pelos pacientes quando administrado intranasalmente, e sem efeitos adversos significativos em períodos de até 4 anos (Chen, Fonseca e Schönthal, 2018; Gomes et al., 2017). O fato de ter sido bem tolerado no CNS em ensaios clínicos torna essa molécula atraente na busca de novas formas de uso, pois sabe-se que é uma molécula com outras atividades biológicas além de combater cânceres.

3.3.1 Atividade anti-(neuro)inflamatória e antioxidante

O AP é um forte antioxidante (embora possa agir como pró-oxidante no retículo endoplasmático de células cancerígenas, o que vai depender da quantidade de ROS disponíveis no meio). A atividade antioxidante do AP pode ser pelo sequestro de radicais livres ou ativação de antioxidantes endógenos (ex.: catalase e glutathione-redutase) (Gomes et al., 2017).

O AP também é um anti-inflamatório. Khan, Nafees e Sultana (2011) reportaram que o tratamento com AP protegeu o fígado de ratos contra toxicidade aguda induzida por etanol. Além de inibir o estresse oxidativo – evidenciado pela diminuição de peroxidação lipídica, restauração dos níveis de glutathione reduzida e aumento da atividade de enzimas antioxidantes –, o tratamento inibiu a ativação do NF- κ B (importante fator de transcrição inflamatório que sintetiza citocinas) e a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α). A atividade anti-inflamatória do AP também já foi reportada em neuroinflamação, Tabassum et al. (2015) testaram o composto em ratos com dano cerebral induzido por isquemia-reperfusão por oclusão da artéria cerebral. O tratamento diminuiu o estresse oxidativo no tecido e reduziu o tamanho do infarto. Ao nível molecular houve queda nas concentrações das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α , diminuição da expressão de COX-2 e NOS-2, e da transcrição do NF- κ B.

3.3.2 Atividade neuroprotetora

O estudo de Tabassum et al. (2015) já mostra outra propriedade do AP, ele também atua como neuroprotetor em diversos danos agudos no SNC. Por exemplo, nesse mesmo estudo os autores reportaram que além de diminuir a produção de mediadores pró-inflamatórios, o tratamento melhorou a integridade histológica e funcional do tecido nervoso, e atenuou os déficits neurológicos dos ratos. Em outro estudo, Zhou, Fukumoto e Yokogoshi (2009) reportaram que o tratamento com AP preveniu a perda de memória associativa induzida por escopolamina em ratos Wistar; nesse mesmo estudo, o tratamento restaurou os sistemas antioxidantes endógenos, preveniu a perda neuronal no córtex e hipocampo, aumentou a concentração de dopamina no hipocampo e *striatum* dos animais e, *in vitro*, o AP pôde inibir a atividade da acetilcolinesterase.

Corroborando sua atividade neuroprotetora, Anis et al. (2018) testaram o AP em um modelo de Parkinson *in vitro* – células SH-SY5 tratadas com oxidopamina (6-OHDA). Os autores reportaram que o AP mitigou a citotoxicidade causada pelo 6-OHDA restaurando a viabilidade celular e o potencial de membrana mitocondrial, reduziu a geração de ROS e do Citocromo C, e reduziu a fragmentação de DNA.

3.3.3 Atividade sobre canais iônicos e modulação da excitabilidade neuronal

Embora isso não tenha sido diretamente demonstrado, já foi sugerido que o álcool perílico possa bloquear os canais de sódio dependentes de voltagem. Tomaz-Morais *et al.* (2017), demonstrou que o AP exerceu atividade analgésica orofacial central contra diferentes agentes indutores de dor (formalina, capsaicina, glutamato). Os autores atribuíram essa ação ao possível bloqueio dos canais de sódio dependentes de voltagem. De fato, existem moléculas estruturalmente relacionadas (monoterpenos) que também são analgésicas e já demonstradas de exercerem esse mecanismo, como mentol e eugenol (Oz *et al.*, 2015).

Outros autores já atribuíram mecanismos diferente; por exemplo, Benedito *et al.* (2019) atribuíram à ação analgésica do álcool perílico a interação com receptores opióides, pois sua atividade analgésica no teste da contorção induzida por formalina foi parcialmente inibida pela naloxona, um antagonista dos receptores opióides. Como a atividade foi apenas parcialmente inibida, é possível que ambos os mecanismos (inibição dos canais de sódio e receptores opióides) estejam envolvidos. É importante notar, que nos dois estudos, a atividade analgésica do AP foi central, e não apenas periférica.

Outro canal iônico em que o AP pode atuar são os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. Berchtold et al. (2005) mostrou que o AP diminuiu a concentração de Ca^{2+} intracelular em células WEHI-231 de forma significativa e por período prolongado, diferentemente de outros monoterpenos testados (limoneno e mentol). Os resultados desse estudo sugerem que os canais afetados eram canais de Ca^{2+} tipo L (Cav1.3, canais sensíveis à dihidropiridina).

A capacidade de interagir com os canais iônicos e, possivelmente, com receptores opióides, pode conferir ao AP o potencial para a regulação da excitabilidade neuronal. Uma outra forma possível de ação seria através da inibição da via mTOR, uma via envolvida na hiperexcitabilidade neuronal que já foi reportada de ser inibida pelo AP (Sundin, Peffley e Hentosh, 2013).

3.3.4 Hipótese: Álcool perfílico contra convulsões epiléticas

Não há estudo na literatura do efeito do AP sobre ataques epiléticos ou convulsões, no entanto, com base no que se sabe sobre a molécula é razoável supor que o tratamento possa atenuar a convulsão e seus danos ao sistema nervoso. Como visto na **seção 3.2.3**, o ataque epilético tem como bases moleculares a neuroinflamação, estresse oxidativo e excitotoxicidade mediada por glutamato. As propriedades anti-inflamatória (inibição do NF- κ B) e antioxidante (sequestro de ROS, produção de antioxidantes endógenos) do AP podem antagonizar a neuroinflamação e o estresse oxidativo no sistema nervoso, respectivamente.

Corroborando essas hipóteses, há estudos que reportam que tratamento com antioxidantes (ex.: N-acetilcisteína e sulforafano) podem atenuar a atividade convulsiva (Pauletti et al., 2017), assim como alguns agentes anti-inflamatórios (ex.: celecoxib, dexametasona, nimesulida), e de forma inversa, alguns anticonvulsivantes tradicionais também têm atividade anti-inflamatória e antioxidante no SNC (ex.: valproato) (Alshareef et al., 2016; Temp et al., 2017).

Não há estudos mostrando que iniba diretamente a excitotoxicidade causada pelo glutamato, mas poderia antagonizá-la por prevenir o excesso de cálcio intracelular causado por ela e a hiperexcitabilidade neuronal. Como visto na **Seção 3.1.3**, o glutamato lançado na fenda sináptica age nos receptores NMDA promovendo o influxo de Ca^{2+} que desencadeará a despolarização do neurônio e disparo do potencial de ação. Durante o ataque epilético esse processo ocorre de forma anormal. Considerando que o AP pode bloquear certos canais de

Ca^{2+} diminuindo sua contração intracelular (mais especificamente os canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L, segundo Berchtold et al., 2005), ele poderia agir: (1) no terminal pré-sináptico, diminuindo a quantidade de neurotransmissores liberados na fenda sináptica (incluindo o glutamato); ou (2) no terminal pós-sináptico, diminuindo a quantidade de Ca^{2+} intracelular e consequentemente a despolarização de membrana, disparo de potenciais de ação e a sinalização intracelular. O papel dos canais de Ca^{2+} tipo L nesses processos neuronais é descrito por Helton, Xu e Lipscombe (2005).

O bloqueio de canais de cálcio dependentes de voltagem está envolvido na atividade de alguns anticonvulsivantes conhecidos (**Quadro 1**). Esses anticonvulsivantes não agem necessariamente nos mesmos canais de cálcio que o AP; a Zonisamida e a Etosuximida, por exemplo, atuam sobre canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo T. Entretanto, já foi reportado que fármacos capazes de bloquear os canais do tipo L, como a nifedipina, e nimodipina exerceram atividade anticonvulsivante *in vitro* e *in vivo* (Kim et al., 2008; Simeone et al., 2011; Kriz, Župan e Simonić, 2003). Além disso, acredita-se que o efeito anticonvulsivante dos canabinóides também seja mediado pelos canais do tipo L (Naderi et al., 2012). Por fim, alguns autores chegam a sugerir o uso do verapamil no controle da epilepsia refratária, um dos mais conhecidos bloqueadores desses canais (Nicita et al., 2016).

De acordo com Anis et al. (2018), o AP tem capacidade neuroprotetora por prevenir alterações da permeabilidade mitocondrial. Isso é relevante para o estudo, pois tanto o estresse oxidativo quanto o excesso de cálcio intracelular causado pela excitotoxicidade podem causar alteração da permeabilidade da mitocôndria, liberando mais espécies reativas e potencialmente podendo induzir a apoptose, contribuindo para a neurodegeneração (Rivero-Segura et al., 2017; Devi, Manocha e Vohora, 2008).

Outro mecanismo de ação possível em que o AP poderia combater a epilepsia (e até mesmo a epileptogênese) seria através da inibição da via mTOR. A hiperatividade dessa via causa hiperexcitabilidade neuronal e até alterações estruturais no sistema nervoso. De fato, sabe-se que a hiperativação da via mTOR ocorre tanto em epilepsia congênita quanto na adquirida, e em ataques epilépticos induzidos experimentalmente (Lasarge e Danzer, 2014). O principal fármaco inibidor dessa via é a rapamicina, e sabe-se que essa molécula já foi reportada de exercer atividade anticonvulsivante (Guo, Zou e Wong, 2017). Interessantemente, o AP já foi reportado de inibir a atividade da mTOR, assim como a rapamicina (Sundin, Peffley e Hentosh, 2013).

A atividade analgésica central do AP evidencia outro mecanismo possível de modulação no sistema nervoso. O fato de ser central é relevante pois indica que o composto age também no SNC. Como visto, a analgesia foi atribuída à dois possíveis mecanismos: 1) a supressão parcial da analgesia pela naloxona reportada por Benedito *et al.* (2019) indica o envolvimento de receptores opioides; 2) como a supressão é parcial, é provável que outro mecanismo esteja envolvido, Tomaz-Morais *et al.* (2017) sugeriu que o mecanismo seja a inibição de canais de sódio dependentes de voltagem, citando como evidência moléculas estruturalmente relacionadas que já foram reportadas de exercer essa atividade.

Não é possível dizer se a atividade sobre receptores opióides do AP pode contribuir para um possível efeito anticonvulsivante. Atualmente, são conhecidos pelo menos três tipos de receptores opióides, os receptores kappa, delta e mu. Agonistas dos receptores kappa já foram reportados de inibirem a convulsão em camundongos induzida por pilocarpina (Przewłocka, Machelska e Lasoń, 1994) e kainato (Zangrandi e Schwarzer, 2011). Entretanto, isso não acontece necessariamente com os outros receptores opióides (Burtscher e Schwarzer, 2017). Como a naloxona é um agonista inespecífico (age em todos os receptores opioides), não há como saber especificamente em qual deles o AP atua.

O segundo mecanismo analgésico central do AP seria pela inibição dos canais de sódio dependentes de voltagem. Embora moléculas estruturalmente relacionadas já foram reportadas de exercer esse efeito (ex.: citrionelol, mentol, eugenol), o AP foi apenas sugerido e não demonstrado. Caso realmente tenha essa atividade, isso seria altamente relevante, pois os canais de sódio dependentes de voltagem são peças chaves para a despolarização da membrana e disparo de potencial de ação (Stafstrom, 1998). Vários anticonvulsivantes comerciais agem justamente pela inibição desses canais, como Carbamazepina, Lamotrigina, Oxcarbamazepina, Fenitoína e Topiramato (**Quadro 1**).

Há então diversos mecanismos de ação na qual o álcool perílico possa antagonizar o ataque epilético e a neurodegeneração (Os principais são mostrados na **Figura 4**). Para testar isso, foi usado o organismo modelo zebrafish (*Danio rerio*).

A popularização do zebrafish também ocorreu no desenvolvimento de fármacos. No ano 2.000 foi realizada a primeira triagem química em zebrafish, e desde então, o número de triagens cresceu. Em 2015 ao menos 66 triagens foram documentadas em periódicos diversos, desde os mais abrangentes (ex.: *Nature*), aos mais especializados (ex.: *Zebrafish*) (Rennekamp e Peterson, 2015). A busca de novos fármacos usando zebrafish também é feita para candidatos a anticonvulsivantes. Para isso, usa-se um fármaco indutor de convulsões, frequentemente o pentilenotetrazol – um modulador alostérico positivo dos receptores GABA_A (Braidá et al., 2012; Duy et al., 2017; Emoto et al., 2015; Jin et al., 2018; Pineda, Beattie e Hall, 2013; Reeta, Prabhakar e Gupta, 2016; Xie et al., 2012). Os parâmetros avaliados são diversos: eletroencefalografia (Afrikanova et al., 2013), expressão de *c-fos* (Baraban et al., 2005), comportamento (Mussulini et al., 2013), mapeamento óptico de atividade neuronal (Turrini *et al.*, 2017), entre outros.

Não apenas em triagem fármacos para o tratamento, mas no estudo da epilepsia em geral e neurociência translacional o zebrafish têm ganhado espaço como meio de estudo (Hortopan, Dinday e Baraban, 2010; Stewart et al., 2012; Wong et al., 2010). Além das vantagens gerais já citadas do zebrafish, alguns fatores que tornam o animal atraente especificamente em neurociências é seu comportamento que já é catalogado hoje para pesquisas (Kalueff et al., 2013), diversos testes comportamentais desenvolvidos e softwares para análises de comportamento (Blaser e Gerlai, 2006), técnicas de imagem cerebral e fenômica comportamental, sistema neuroendócrino bem desenvolvido e diversas bases de dados dedicadas, como o zfin.org, ensemble.org (genoma), zebrafish.org, zebrafishbrainatlas.org (atlas cerebral completo), entre outros (Stewart et al., 2014).

4.1 Animais e aspectos éticos

Os peixes zebrafish (*Danio rerio*, tipo *wild, short-fin*), foram adquiridos de criadouro autorizado (Acqua New Aquarium and Fish Ltda., ME, Itagassu – PE, Brasil) e mantidos na Plataforma Zebrafish do Laboratório de Pesquisa em Fármacos (Universidade Federal do Amapá – UNIFAP). Após aproximadamente um mês em quarentena, os animais foram mantidos em sistema especializado com água em circulação constante, pH (6 - 8), temperatura (25 – 29 C°) e dureza (140 – 145 mg/L de CaCO₃) controlados. Foram utilizados animais adultos (4-5 meses) pesando entre 0,400 e 0,800 g, alimentados quatro vezes por dia com ração floculada (Alcon Colours), e mantidos em ciclo claro/escuro de 12/12 horas.

Considerando que o sexo dos animais não afeta significativamente sua sensibilidade ao pentilenotetrazol (Menezes e Silva, Da, 2017), a divisão dos peixes entre os grupos foi feita aleatoriamente (proporção entre machos e fêmeas de ~1:1). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Amapá sob nº 013/2019 (Anexo 1).

4.2 Reagentes, doses e via de administração

A convulsão foi induzida por pentilenotetrazol (PTZ) (Sigma-Aldrich) aplicado intraperitonealmente (i.p.) à 170 mg/kg (Kundap *et al.*, 2017), e o anticonvulsivante controle usado foi o Diazepam (DZP) (Compaz, Cristália) aplicado oralmente (p.o.) na dose de 2 mg/kg baseado em testes piloto. O Diazepam foi escolhido por ser um anticonvulsivante tradicional frequentemente usado como controle em ensaios de epilepsia. Tanto o PTZ quanto o DZP foram diluídos em solução salina (0,9%).

O álcool perílico (AP) foi adquirido da empresa Almeida Prado Ltda., Brasil, com 98% de pureza em mistura racêmica (**Figura 5.A**). O fármaco foi diluído em solução salina (0,9%) com 5% de Tween-80 devido à sua lipofilicidade. As doses de AP foram 10, 50 e 100 mg/kg (p.o.), baseado em testes piloto em que não afetaram a sobrevivência dos peixes.

4.3 Delineamento experimental e tratamentos

Tanto para o procedimento de injeção intraperitoneal quanto para a gavagem, os animais foram cuidadosamente imobilizados com uma esponja úmida. A injeção intraperitoneal foi feita usando uma microseringa de precisão Hamilton® (10 µL), aplicada na linha medial do peixe entre as nadadeiras pélvicas, logo acima da abertura anal. A gavagem foi feita usando micropipeta com volume entre 0,5 e 2 µL. A distribuição dos grupos (n = 10/grupo) e seus tratamentos estão detalhados na **Tabela 1** e **Figura 5.B**.

Tabela 1. Divisão dos grupos e seus respectivos tratamentos.

Grupo	Tratamento do animal	
	Oral	Intraperitoneal
Controle Veículo	Salina + Tween 80	Salina
Controle Positivo	DZP 2 mg/kg	PTZ 170 mg/kg
Controle Negativo	Salina + Tween 80	PTZ 170 mg/kg
AP10	AP 10 mg/kg	PTZ 170 mg/kg
AP50	AP 50 mg/kg	PTZ 170 mg/kg
AP100	AP 100 mg/kg	PTZ 170 mg/kg

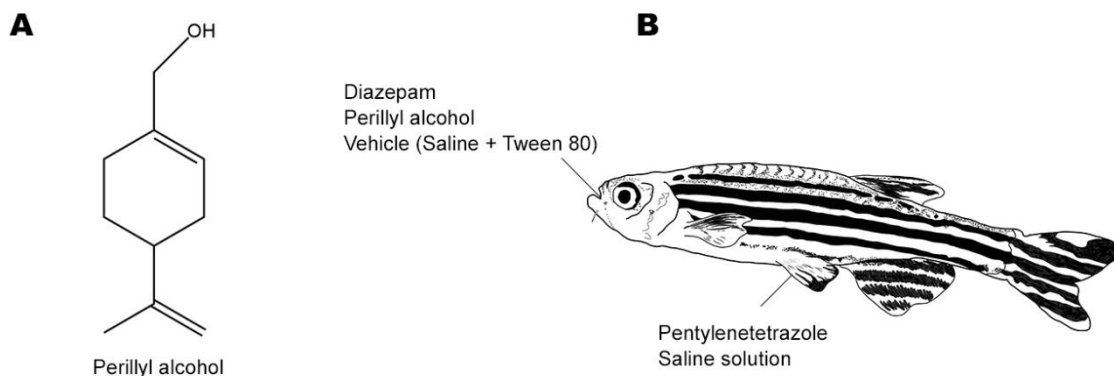


Figura 5. A: Estrutura do Álcool Perílico; B: Ilustração do Zebrafish (*Danio rerio*), mostrando o que será administrado por cada via. Imagem elaborada pelo autor.

4.4 Procedimento do ensaio e aparato usado

No dia do teste, os animais foram primeiramente aclimatados à sala de experimento em béquer individualmente por duas horas. Então, os animais receberam o seu respectivo pré-tratamento oral (**Tabela 1**). Passado uma hora, os animais receberam o PTZ intraperitoneal

(com exceção do grupo controle veículo que recebeu apenas solução salina intraperitoneal) e seus comportamentos foram filmados no tanque-teste por 10 minutos. Todos os experimentos foram realizados no mesmo período do dia (entre 10 e 16 horas) para evitar discrepâncias causadas pelo ciclo circadiano no metabolismo dos animais.

O tanque-teste usado no procedimento foi feito de vidro, medindo 27×20×10 cm (comprimento × altura × largura), com 5,4 L de volume. O tanque foi coberto com material opaco branco nas laterais e na superfície inferior para diminuir o contato visual do peixe com o exterior, diminuir seu reflexo, e aumentar o contraste na filmagem. A câmera foi posicionada frontalmente a ~30 cm de distância do tanque e fixada por tripé. A fonte de luz foi posicionada a ~40 cm de distância da superfície posterior do tanque; uma folha de poliuretano branca foi usada como difusor de luz na parede posterior do tanque, fazendo com que a luz chegue ao tanque e a câmera de maneira uniforme, maximizando o contraste. Este aparato mostrou-se eficiente de forma que o software (Toxtrac v2.90) distinguiu o peixe do fundo em todos os vídeos à uma taxa sempre superior a 95% dos frames (em geral entre 99 – 100%).

Uma hora após a convulsão os animais foram observados para verificar a mortalidade e então, sacrificados por resfriamento rápido.

4.5 Parâmetros avaliados

A convulsão foi avaliada de acordo com parâmetros convulsivos e motores baseados em Desmond *et al.* (2012) e Stewart, Desmond, *et al.* (2012), descritos no **Quadro 3**. As definições adotadas são descritas no **Quadro 4** adaptadas de Kalueff *et al.* (2013). Os parâmetros convulsivos foram analisados manualmente, enquanto que os parâmetros motores foram analisados usando um software de rastreamento animal – ToxTrac v2.90 (Rodriguez *et al.*, 2018). Os vídeos foram analisados em triplicata e de modo cego ao tratamento dos animais.

Quadro 3. Parâmetros avaliados.

Parâmetros convulsivos	Hiperlocomoção	Ocorrência (%)
	Convulsão	Ocorrência (%) Duração (s) Número de nados em círculo/espiral (n)
	Perda de postura	Ocorrência (%) Duração (s)
	Paralisia	Ocorrência (%) Duração (s)
Parâmetros motores	Velocidade média (cm/s)	Total Por minuto
	Aceleração média (cm/s ²)	Total Por minuto
	Distância percorrida (m)	Total Por minuto

Quadro 4. Definições adotadas.

Comportamento	Definição
<i>Congelamento</i>	Imobilidade do animal no fundo do tanque por mais de três segundos. Pode ocorrer antes da convulsão, mas também pode ser causada por outros fatores (ex.: ansiedade, medo).
<i>Movimentos erráticos</i>	Mudanças bruscas e estocásticas de direção ou velocidade do animal.
<i>Hiperlocomoção</i>	Aumento da atividade do animal anterior à convulsão, caracterizado por: - Aumento acentuado da atividade natatória e da frequência opercular; - Nados explosivos; - Surto de hiperatividade (movimentos erráticos por mais de 3 s).
<i>Convulsão</i>	Caracterizado por: - Movimentos circulares repetitivos; - Movimentos em espiral; - Contrações musculares espasmódicas.
<i>Perda de postura</i>	Perda de equilíbrio dorso-ventral do animal, acompanhada ou não de imobilidade, tanto no fundo do tanque quanto na coluna d'água.
<i>Imobilidade</i>	Imobilidade do animal após a convulsão por mais de três segundos, tanto no fundo do tanque quanto na coluna d'água.

4.6 Estudos *in silico*

Primeiramente foi feita uma predição de atividade biológica baseada em semelhança de estrutura usando o servidor PASS – *Prediction of Activity Spectra for Substances* (Filimonov *et al.*, 2014), disponível em <http://www.way2drug.com/PASSOnline/> – com o intuito de obter um mecanismo de ação do AP no sistema GABAérgico, mesmo sistema afetado pelo fármaco controle, diazepam.

Após a triagem inicial, foi feito um *docking* molecular dos receptores com maior potencial predito, os receptores GABA_A (GABA_{AR}, PDB ID 6HUP, 3.58 Å) e GABA-Aminotransferase (GABA-AT, PDB ID 1OHW, 2.3 Å), usando o software GOLD 2020.1. Este software usa um algoritmo genético para explorar toda a gama de possibilidades conformacionais dos ligantes, com flexibilidade parcial da proteína (Jones et al., 1997).

Os resultados foram então validados por *redocking* usando raiz quadrada do erro médio (*root-mean-square deviation*, RMSD) entre a posição cristalográfica do inibidor e do *docking*. Foram usadas as seguintes coordenadas para o centro da esfera: PDB ID 6HUP: x = 147.95, y = 130.96 e z = 151.71, 9 Å raio; PDB ID 1OHW: x = 11.08, y = -0.93 e z = 18.21, 6.2 Å raio. Ligantes co-cristalizados, íons e moléculas de água foram removidos da estrutura cristalográfica antes das simulações; átomos de hidrogênio foram adicionados ao AP e suas cargas atômicas foram calculadas usando o método RM1 para maior precisão com o software Hyperchem 6.02 (Froimowitz, 1993).

4.7 Análise de dados e estatística

Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett's, para análise de normalidade e homocedasticidade, respectivamente. Os parâmetros convulsivos foram avaliados primeiro usando o teste de Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Dunn devido a ocorrência de grupos com desvios-padrão estatisticamente diferentes, ou com desvio padrão = 0. No caso da ocorrência de desvio padrão = 0 (grupos sem convulsão: controle veículo e controle positivo), foi realizado nova análise para comparar os grupos testes apenas com o grupo controle negativo usando *one-way* ANOVA (fator: grupo) com teste post-hoc de Tukey (apenas quando os grupos que sobraram foram em maioria paramétricos).

Os parâmetros motores passaram no teste de normalidade e homocedasticidade, por isso foram comparados usando *one-way* ANOVA (fator: grupo) com teste post-hoc de Tukey. Para a comparação dos parâmetros motores dentro do mesmo grupo (antes vs. depois), foi adotado o teste t de Student pareado.

Os testes post-hoc foram executados apenas no caso de diferença estatística. Os resultados foram representados como Média ± Erro Padrão da Média e Mediana ± Intervalo Interquartil, pois foram usados tanto testes paramétricos como não-paramétricos. A significância adotada foi: $p < 0,05$ = estatisticamente significativo (*); $p < 0,01$ = altamente

significativo (**); $p < 0,001$ = extremamente significativo (***). A análise estatística foi feita usando o software GraphPad Prism 8.

5.1 Efeito do tratamento com Álcool Perílico sobre parâmetros convulsivos

O tratamento com AP não parece ter afetado a frequência parâmetros pré-convulsivos como congelamento ou hiperlocomção (**Figura 6**). No entanto, houve diminuição da frequência de convulsão por grupo de forma dose-dependente. As frequências foram: 100% no controle negativo (que recebeu apenas PTZ), 90% em AP10, 70% em AP50 e 40% em AP100. Os grupos controle positivo e controle veículo tiveram ambos 0% de convulsão.

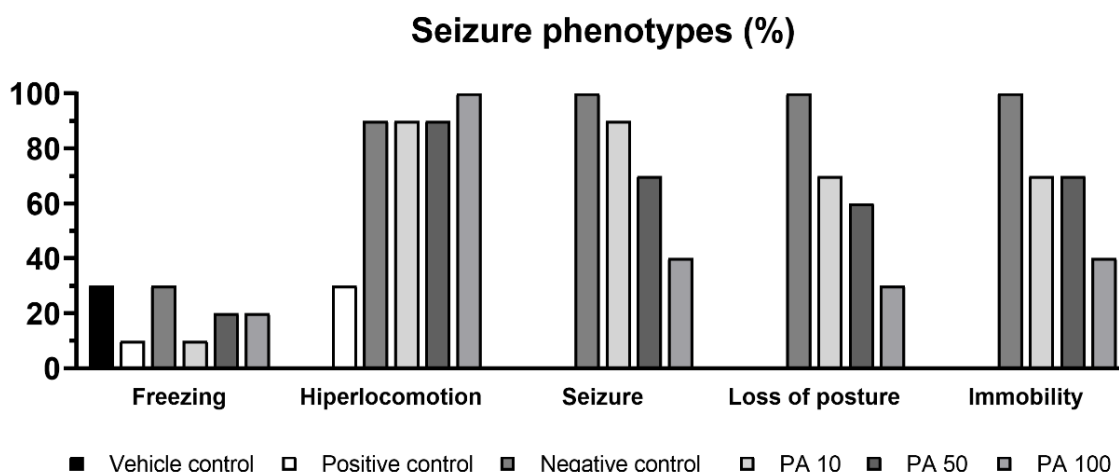


Figura 6. Frequência de fenótipos relacionados à convulsão por grupo dado em porcentagem.

Além da frequência de convulsão, a frequência da ocorrência de perda de postura e paralisia induzida por convulsão foram avaliadas. A perda de postura foi diminuída de forma dose-dependente pelo tratamento com AP, enquanto no controle negativo a frequência de perda de postura foi 100%, no grupo AP10 a frequência foi 70%, em AP50 foi 60% e no grupo AP100 foi 30%. Quanto a paralisia, as frequências foram 100% no controle negativo, 70% nos grupos AP10 e AP50, e 40% no grupo AP100 (**Figura 6**).

Após avaliar a frequência de ocorrência desses comportamentos por grupo, os parâmetros foram quantificados por animal para o cálculo das médias por grupo. A convulsão

foi quantificada pelo tempo (s) e pela quantidade de nados em círculo/espiral (n); a perda de postura e paralisia foram quantificados pelo tempo (s) (**Figura 7**).

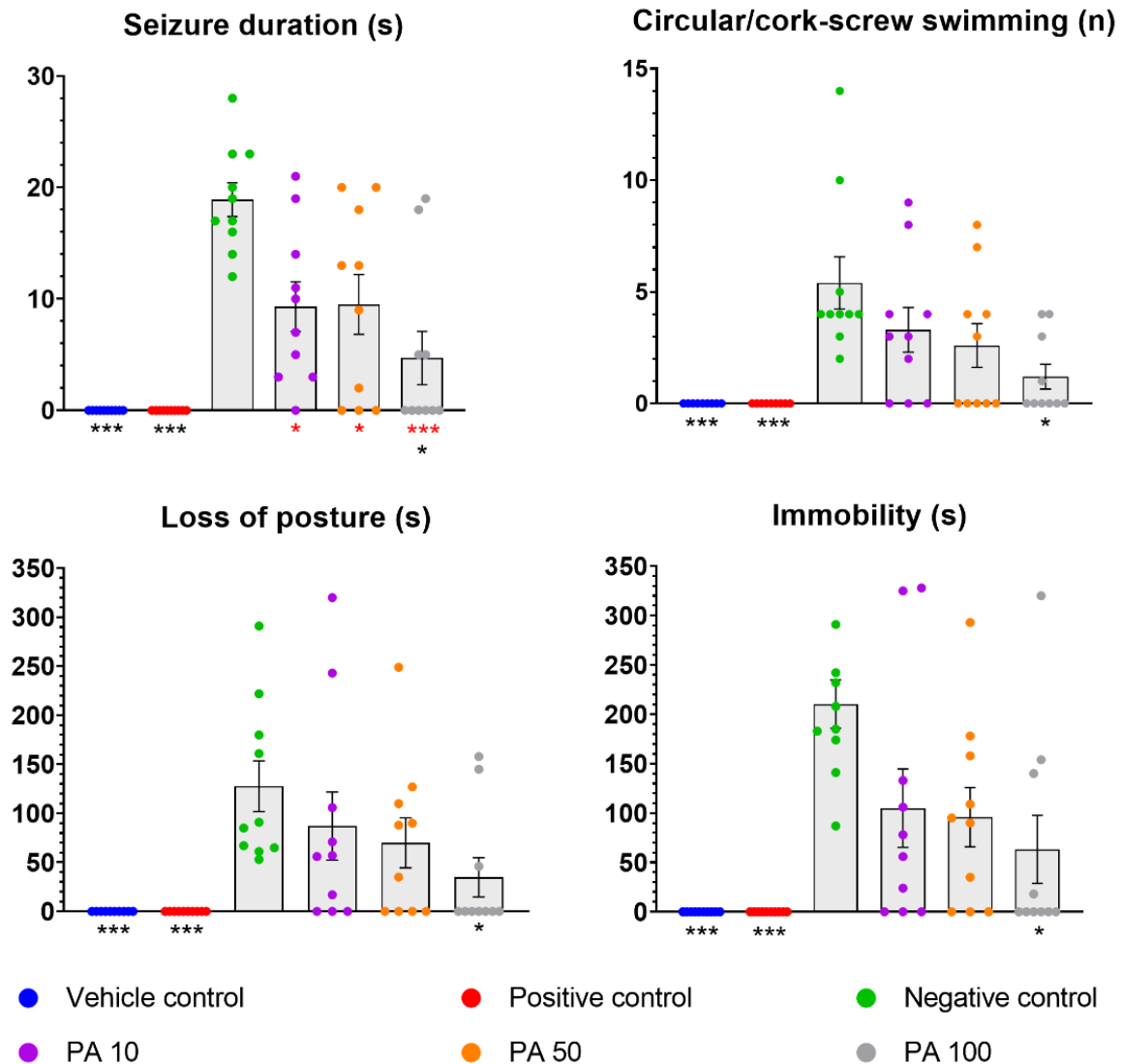


Figura 7. Quantificação dos fenótipos convulsivos por grupo. Cada ponto da dispersão representa os valores de um animal; as barras de erro representam o EPM. Os asteriscos pretos mostram as diferenças estatísticas comparado ao grupo controle negativo (Kruskal-Wallis, post-hoc de Dunn) levando em consideração todos os grupos. Os asteriscos vermelhos mostram as diferenças estatísticas comparado ao grupo controle negativo, sem os grupos onde não houve convulsão (ANOVA, post-hoc de Tukey). Nota: o ANOVA foi feito apenas para a duração das convulsões, pois apenas esse parâmetro passou no teste de normalidade após remover os grupos controle Veículo e Positivo. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

A média $\pm$ erro padrão (seguido da mediana $\pm$ intervalo interquartil entre parênteses) dos tempos de convulsão foram: 0 ± 0 s (0 ± 0 s) nos grupos controle veículo e positivo; $18,9 \pm 1,5$ s ($18 \pm 7,5$ s) no controle negativo; $9,3 \pm 2,2$ s ($8,5 \pm 12,25$) em AP10; $9,5 \pm 2,6$ s ($11 \pm 18,5$) em AP50; e $4,7 \pm 2,3$ s ($0 \pm 8,25$) em AP100. A análise estatística apontou diferença

extremamente significativa ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis) entre os grupos. De forma notável, a média do grupo tratado com a maior dose de AP (100 mg/kg) foi estatisticamente menor ($p < 0,05$; teste post-hoc de Dunn) que a média do controle negativo. Usando ANOVA para comparar os tratamentos de AP apenas com o grupo controle negativo (isto é, removendo os grupos com desvio-padrão igual a 0 para adotar um teste paramétrico), a diferença estatística é ainda maior ($F_{(3, 36)} = 7,069$; $P = 0,0007$), com diferença extremamente significativa entre AP100 e controle negativo ($p < 0,001$), e diferença estatisticamente significativa entre AP50 e controle negativo, bem como entre AP10 e controle negativo ($p < 0,5$) (**Figura 7**).

Houve uma diminuição dose-dependente no número de nados em círculo/espiral nos grupos tratados com AP, os valores foram: média = 0 ± 0 (mediana = 0 ± 0) nos grupos controle veículo e positivo; $5,4 \pm 1,1$ ($4 \pm 2,5$) no controle negativo; $3,3 \pm 1,0$ (3 ± 5) em AP10; $2,6 \pm 0,9$ ($1,5 \pm 4,75$) em AP50; e $1,2 \pm 0,5$ ($0 \pm 3,25$) em AP100. A análise estatística apontou diferença extremamente significativa ($p < 0,001$; Kruskal-Wallis) entre os grupos. O grupo tratado com AP à 100 mg/kg (AP100) teve significativamente menos ($p < 0,05$; teste post-hoc de Dunn) nados em círculo/espiral que o controle negativo (**Figura 7**). O ANOVA não foi realizado para esse parâmetro, pois, mesmo removendo os grupos com desvio-padrão = 0, a maioria permanece em distribuição não-normal.

Houve diminuição dose-dependente no tempo (s) de perda de postura e imobilidade induzida por convulsão também. As médias de perda de postura foram: 0 ± 0 s (0 ± 0 s) nos grupos controle veículo e positivo; $127,6 \pm 25,8$ s ($88 \pm 126,5$ s) no controle negativo; $87 \pm 34,7$ s ($56,5 \pm 140,3$ s) em AP10; $69,9 \pm 25,4$ s ($61,5 \pm 114,3$ s) em AP50; e $34,9 \pm 19,9$ s ($0 \pm 70,5$ s) em AP 100. As médias de tempo de imobilidade foram: 0 ± 0 s (0 ± 0 s) nos grupos controle veículo e positivo; $210 \pm 24,4$ s ($196,5 \pm 88,5$ s) no controle negativo; $105 \pm 39,6$ s (67 ± 181 s) no grupo AP10; $95,8 \pm 29,9$ s ($92,5 \pm 163$ s) em AP50; e $63,2 \pm 34,3$ s ($0 \pm 143,5$ s) em AP100. A diferenças tanto no tempo de perda de postura quanto no tempo de imobilidade entre o grupo AP100 e o controle negativo foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$; teste post-hoc de Dunn; **Figura 7**). O ANOVA não foi realizado para esses parâmetros, pois, mesmo removendo os grupos com desvio-padrão = 0, metade dos grupos restantes permaneceram com distribuição não-normal.

O tratamento não parece ter influenciado no tempo de latência para a convulsão pois não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis). A média geral foi $93 \pm 8,6$ s (mediana = $83 \pm 64,8$ s); por grupo os valores médios foram (apenas em grupos

onde houve convulsão): $78,7 \pm 14$ s ($66 \pm 72,75$ s) no controle negativo; $112,2 \pm 17,62$ s (95 ± 101 s) em AP10; $91,7 \pm 17,42$ s ($76,5 \pm 83,3$ s) em AP50; e $88,25 \pm 23,55$ s ($83 \pm 64,8$ s) em AP100. Outro parâmetro que não foi afetado foi o tempo de congelamento ($p > 0,05$; Kruskal-Wallis). As médias por grupo foram: $3,2 \pm 2,1$ s (mediana = $0 \pm 6,5$ s) no grupo controle veículo; 0 ± 0 s (0 ± 0 s) no controle positivo; $5,4 \pm 3,6$ s ($0 \pm 11,5$ s) no controle negativo; 0 ± 0 s (0 ± 0 s) em AP10; $0,8 \pm 0,8$ s (0 ± 0 s) em AP50; e 1 ± 1 s (0 ± 0 s) em AP100. Esses dois parâmetros não estavam distribuídos normalmente e não foram avaliados com ANOVA. Não houve mortes até uma hora de observação após as convulsões.

5.2 Efeito do tratamento com Álcool Perílico sobre parâmetros motores afetados por convulsão

No geral, deslocamento, aceleração e velocidade se mostraram similares, como pode ser observado em suas figuras (respectivamente, **Figuras 8, 9 e 10**). As medidas foram feitas primeiramente por minuto, para avaliar a variação da atividade motora dos animais em função do tempo após a convulsão. Depois, as médias de atividade total (durante os 10 minutos) foram comparadas entre grupos. Por último, a atividade foi agrupada em pré e pós convulsiva para a comparação entre si e entre os grupos.

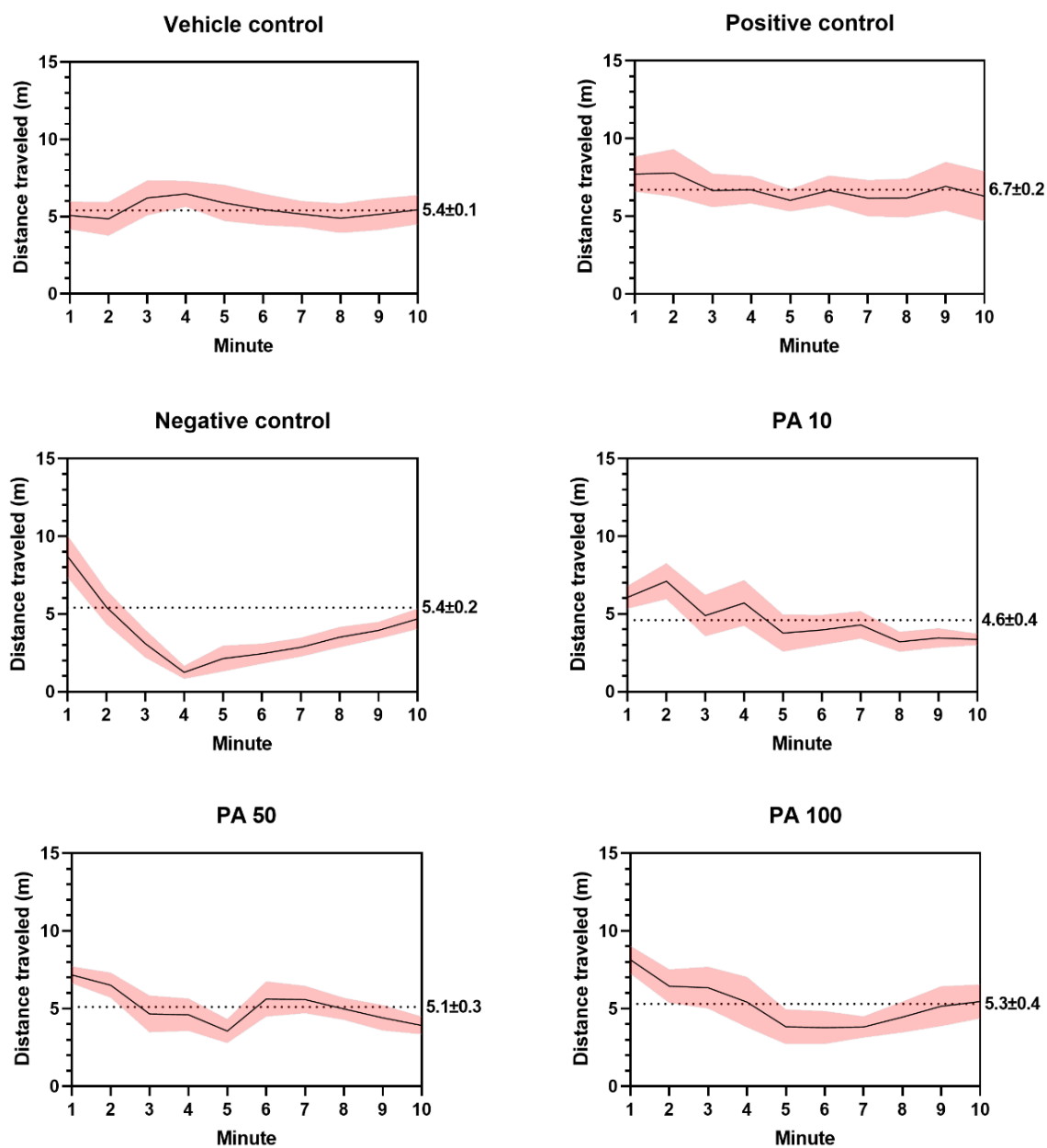


Figura 8. Gráficos de linhas mostrando as médias por grupo de distância percorrida em cada minuto de observação. A área hachurada representa o EPM; a linha pontilhada representa a média dos dez minutos. Todos os gráficos são mostrados na mesma escala.

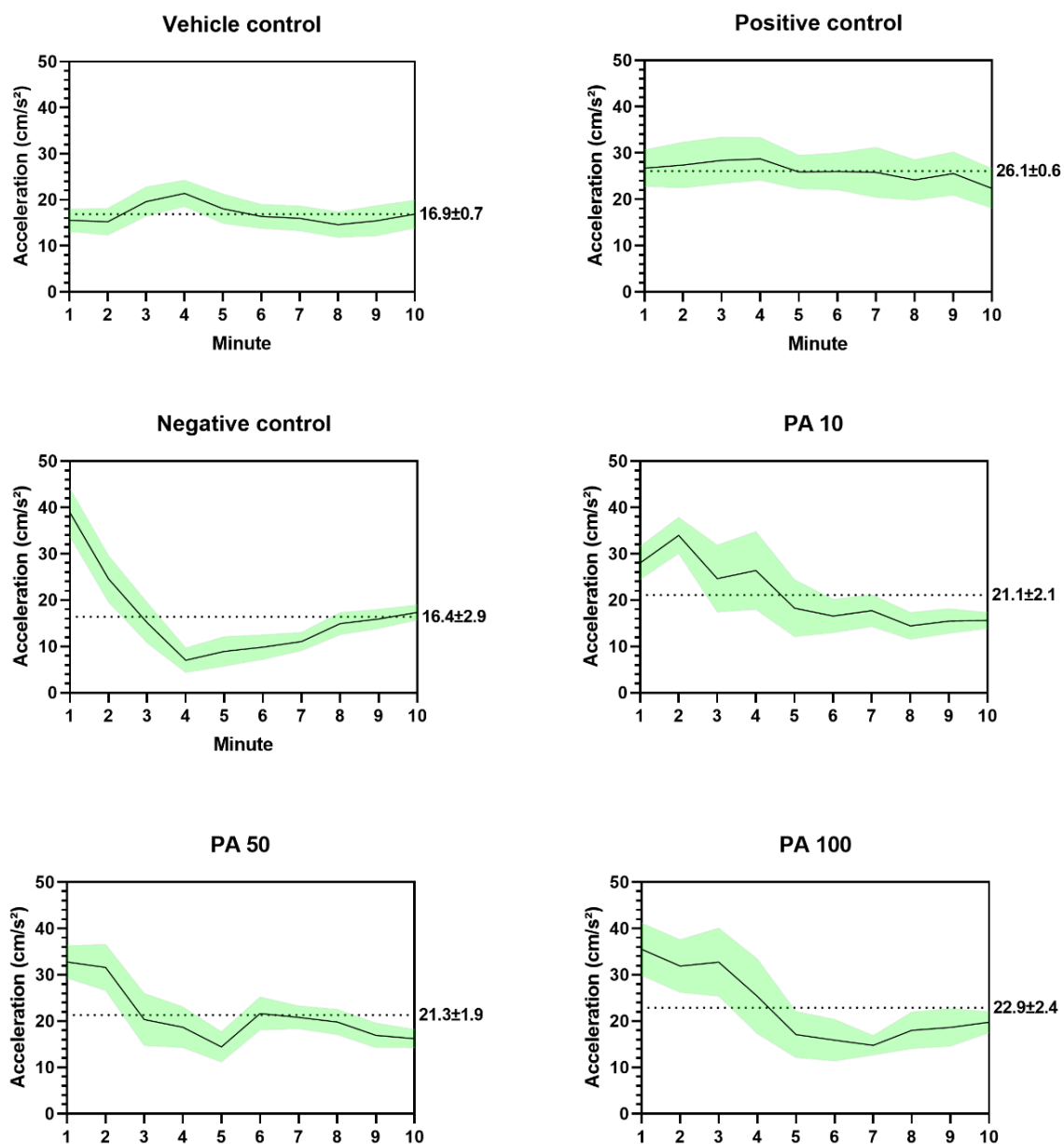


Figura 9. Gráfico de linha mostrando as médias por grupo de aceleração em cada minuto de observação. A área hachurada representa o EPM; a linha pontilhada representa a média dos dez minutos. Todos os gráficos são mostrados na mesma escala.

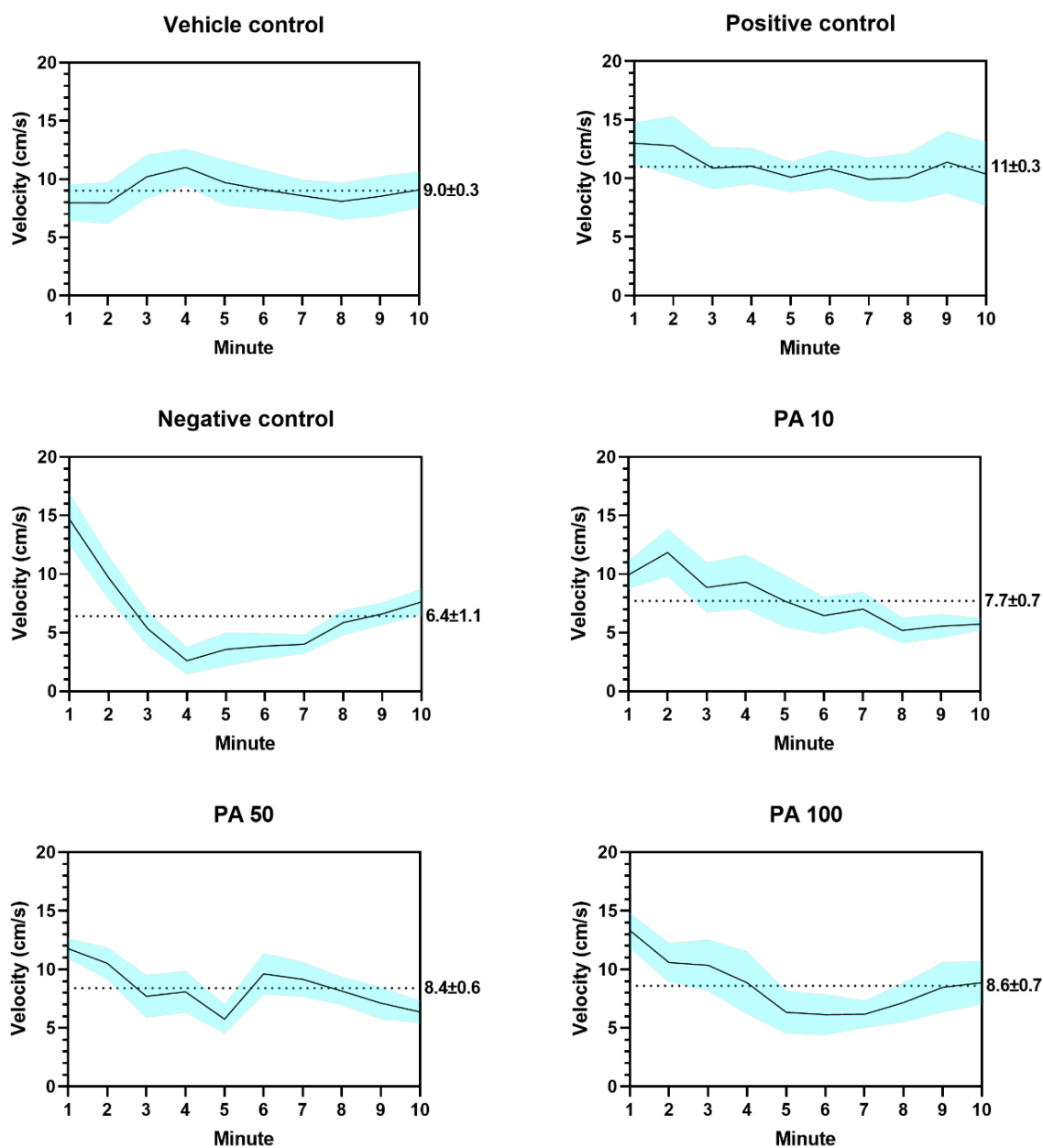


Figura 10. Gráfico de linha mostrando as médias por grupo de velocidade em cada minuto de observação. A área hachurada representa o EPM; a linha pontilhada representa a média dos dez minutos. Todos os gráficos são mostrados na mesma escala.

O grupo controle veículo começou com uma menor atividade no início da observação em relação à sua própria média, o que possivelmente ocorre pela exposição dos animais a um novo ambiente. A partir do segundo minuto, a atividade motora dos animais aumentou em relação a sua própria média (**Figuras 8, 9 e 10**). Curiosamente, esse padrão de atividade

motora oscilante já é conhecido na literatura, como foi observado no *open-field test* (Stewart, Gaikwad, *et al.*, 2012).

A atividade do grupo controle positivo, que recebeu um anticonvulsivante controle (Diazepam 2 mg/kg), foi a maior de todos os grupos. Esse aparente paradoxo pode ser facilmente entendido lembrando que o grupo recebeu injeção de pentilenotetrazol (diferente do controle veículo), o que aumentou a atividade locomotora dos animais, e, ao mesmo tempo, não houve convulsão no grupo (diferente dos demais grupos), fazendo com que os animais permanecessem com atividade elevada até o fim do período de observação.

A atividade inicial do controle negativo foi superior à de todos os outros grupos durante o primeiro minuto, e foi alta também durante o segundo devido aos episódios de hiperlocomção, então, decresce bruscamente devido ao término da convulsão de alguns animais e os consequentes episódios de perda de postura e paralisia. Na **Figura 11** é possível ver as médias por minuto de todos os grupos juntos, os erros estão omitidos para melhor clareza. Nesta figura é possível notar que o controle negativo tem um padrão de atividade em “V” (traço verde, **Figura 11**), onde começa com hiperlocomção e desce bruscamente até o quarto minuto em média. Os animais então se recuperam lentamente até o final da observação.

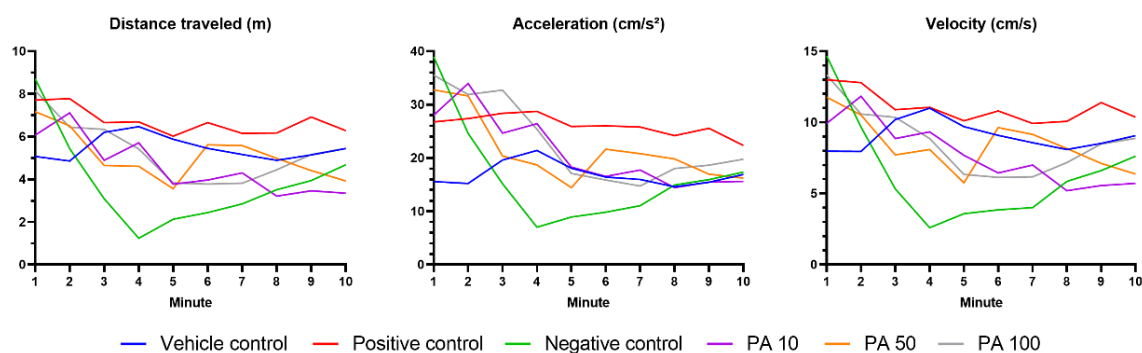


Figura 11. Gráfico de linhas mostrando as médias dos parâmetros motores de todos os grupos juntos. Notar o "padrão em V" do controle negativo nos três gráficos.

Quanto aos grupos tratados com álcool perílico, não foi observado nenhuma tendência clara entre as doses, porém, todas elas apresentaram um padrão diferente do padrão em “V”

do controle negativo, evidenciando uma atenuação do déficit motor induzido pelas convulsões.

Para fazer a comparação estatística da atividade total (durante todos os 10 minutos de observação), foram calculadas a média total de distância percorrida por grupo, a aceleração média total por grupo, e a velocidade média total por grupo. Quanto ao deslocamento total, as médias foram: $54,76 \pm 7,99$ m ($47,85 \pm 44,3$ m) para o grupo controle veículo; $67,46 \pm 7,88$ m ($68,5 \pm 37,58$ m) para o grupo controle positivo; $38,27 \pm 4,68$ m ($33,75 \pm 14,05$ m) para o controle negativo; $46,31 \pm 7,43$ m ($41,8 \pm 38,78$ m) para AP10; $51,64 \pm 4$ m ($51,25 \pm 21,1$ m) para AP50; e $53,14 \pm 6,2$ ($51 \pm 33,25$ m) para AP100.

Para a aceleração média total os resultados foram: $16,91 \pm 2,22$ cm/s² ($15,5 \pm 10,65$ cm/s²) para o grupo controle veículo; $26,09 \pm 3,35$ cm/s² ($24,7 \pm 13,77$ cm/s²) para o grupo controle positivo; $16,41 \pm 1,61$ cm/s² ($15,5 \pm 7,25$ cm/s²) para o grupo controle negativo; $21,43 \pm 3,25$ cm/s² ($20,95 \pm 15,53$ cm/s²) para AP10; $21,58 \pm 1,56$ cm/s² ($21,95 \pm 8,2$ cm/s²) para AP50; e $22,98 \pm 2,61$ cm/s² ($22,65 \pm 9,37$ cm/s²) para AP100.

Para a velocidade média total os resultados foram: $9,07 \pm 1,3$ cm/s ($7,9 \pm 7,08$ cm/s) para o grupo controle veículo; $11,07 \pm 1,31$ cm/s ($11,1 \pm 6,12$ cm/s) para o grupo controle positivo; $6,7 \pm 0,7$ cm/s ($6,1 \pm 1,57$ cm/s) para o grupo controle negativo; $7,55 \pm 1,17$ cm/s ($6,7 \pm 6,35$ cm/s) para AP10; $8,6 \pm 0,58$ cm/s ($8,6 \pm 3,15$ cm/s) para AP50; e $8,72 \pm 1$ cm/s ($8,25 \pm 5,65$ cm/s) para AP100.

Os resultados totais são mostrados na **Figura 12**. A análise estatística não apontou diferença estatística (ANOVA) entre os grupos tanto para distância ($F_{(5,54)} = 2,185$; $P = 0,0693$), quanto para a aceleração ($F_{(5,54)} = 2,112$; $P = 0,0780$) ou velocidade ($F_{(5,54)} = 1,982$; $P = 0,0960$). Observando a **Figura 12**, é possível perceber uma tendência de maior aumento da atividade dos grupos tratados com AP de forma proporcional à dose. Isso é relevante, pois indica que a ausência de convulsão de alguns dos animais tratados não foi devido à sedação ou déficit motor. Além disso, a maior atividade motora para maiores doses indica ainda, uma tendência de melhora no déficit motor induzido pelas convulsões.

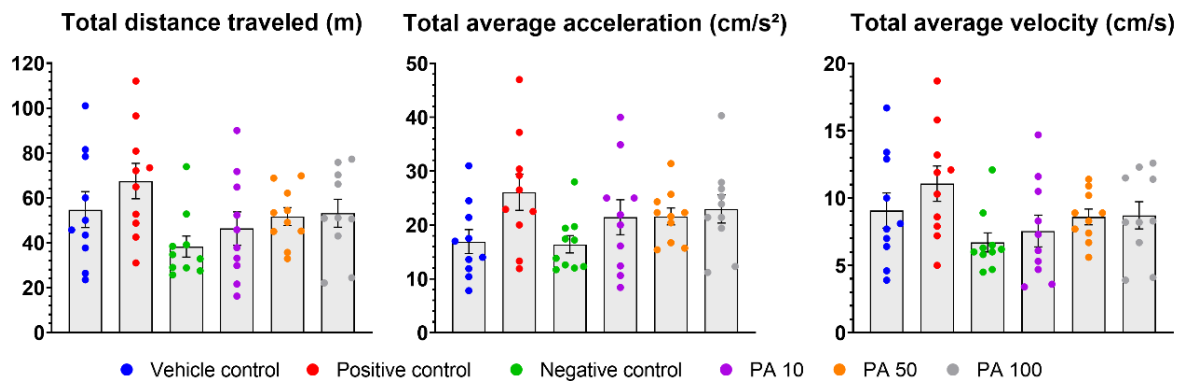


Figura 12. Quantificação total dos parâmetros motores. Cada ponto da dispersão representa os valores de um animal; as barras de erro representam o EPM. Não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$; ANOVA). Notar a tendência de maior atividade locomotora com maiores doses de álcool perílico.

É importante lembrar que os elevados valores de atividade do controle negativo dos dois primeiros minutos (hiperlocomomoção) tendem a aumentar as suas médias, compensando o déficit motor causado pelas convulsões (ver **Figura 11**). Por isso, foi feita uma nova análise. Nessa análise, foi computada a média das atividades de todos os animais durante os dois primeiros minutos (onde houve maior atividade de hiperlocomomoção), e comparada com a média dos minutos restantes. Esse agrupamento se mostrou muito útil, pois como mencionado, a hiperatividade dos minutos iniciais tende a compensar a perda da atividade locomotora pós-convulsiva, rendendo falsos resultados negativos.

Analisando a alteração temporal nos grupos (antes e depois), é possível observar que os resultados foram semelhantes tanto para a distância percorrida, quanto para a velocidade e aceleração (**Figura 13**). No geral, os grupos controle veículo e controle positivo não apresentaram diferença estatística na atividade entre os dois primeiros minutos e os minutos subsequentes. Por outro lado, a diferença no controle negativo foi extremamente significativa para os três parâmetros ($p < 0,001$), evidenciando a discrepância da atividade hiperlocomotora pré-convulsiva do déficit de atividade pós-convulsiva causada por episódios de perda de postura e paralisia. Nos grupos tratados com AP, também houve diferença significativa, mas a discrepância foi notavelmente menor que no controle negativo ($p < 0,05$; **Figura 13**).

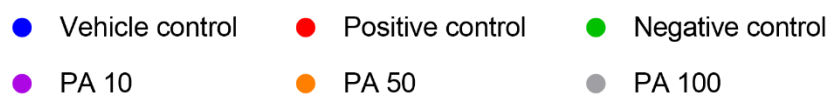
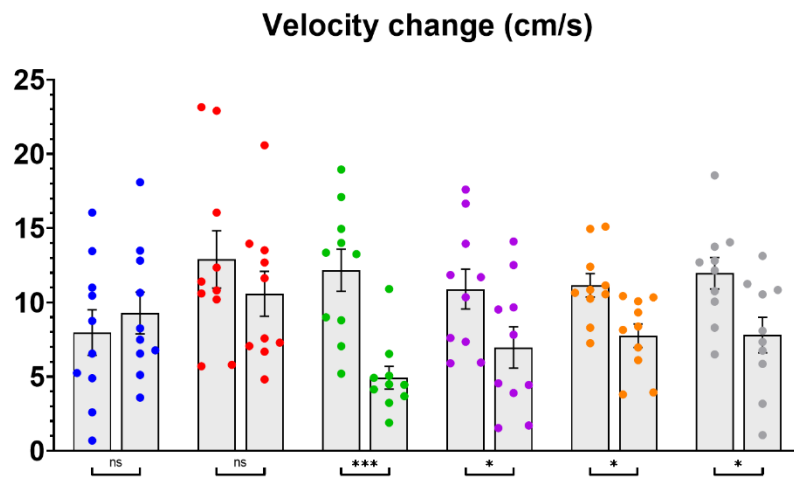
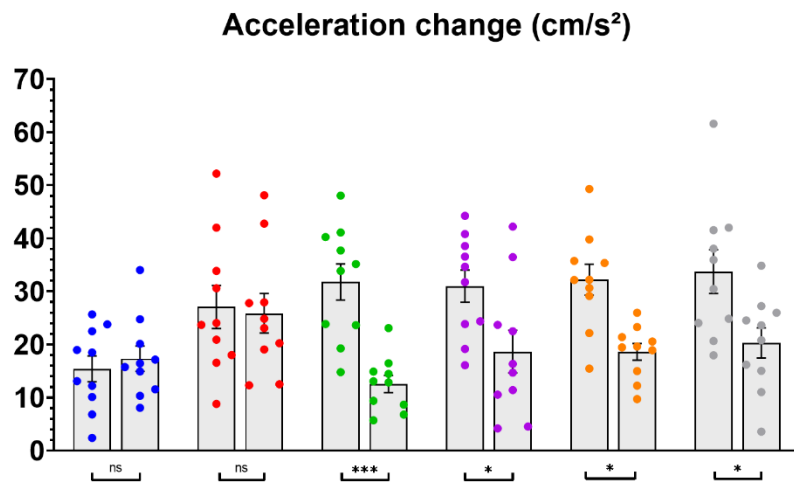
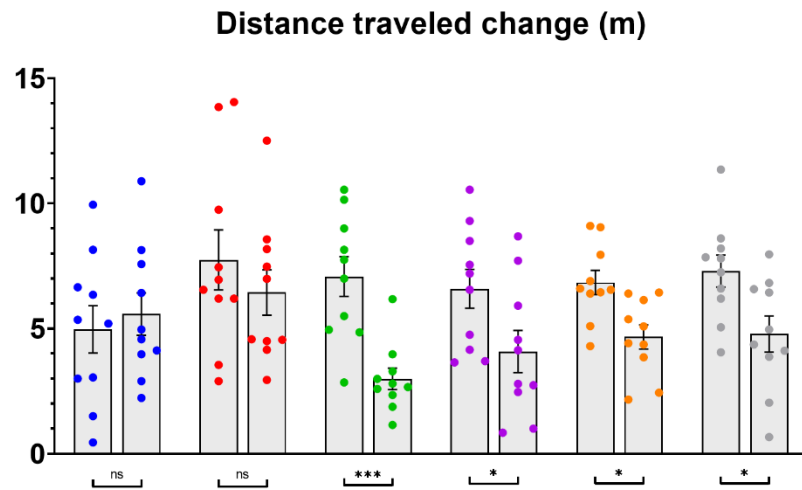


Figura 13. Comparações feitas agrupando os dois primeiros minutos do tempo restante. Cada ponto da dispersão representa os valores de um animal; as barras de erro representam o EPM. Nota que a diferença de atividade pré e pós convulsiva dos grupos tratados com álcool perílico foi notavelmente menor que o grupo controle negativo.

5.3 Mecanismo anticonvulsivante do álcool perílico *in silico*

O servidor PASS foi usado para avaliar duas atividades no sistema GABAérgico (o mesmo sistema neurotransmissor afetado pelo diazepam e outros fármacos anticonvulsivantes): agonismo do GABA_AR e inibição da GABA-AT. Os seguintes resultados a seguir foram retornados pelo servidor; para agonismo do GABA_AR: Possibilidade de atividade (P_a) = 0,200 e Possibilidade de inatividade (P_i) = 0,076; para inibição da GABA-AT: P_a = 0,465 e P_i = 0,028. Como se pode observar, $P_a > P_i$ para ambos os mecanismos avaliados, então, um novo estudo foi feito para avalia-los (docking). No *docking*, o diazepam foi usado como fármaco controle para o GABA_AR enquanto vigabatrina foi usada para a GABA-AT. Na **Figura 14** são mostradas as interações ligante-receptor preditas, os detalhes das ligações são dados na **Tabela 2**.

O agonista controle do GABA_AR – diazepam – teve nove interações com o receptor, com um *fitting* score de 69,33, o AP, por sua vez, teve oito interações e um score de 53,8. Quanto à GABA-AT, a molécula inibidora padrão – vigabatrina – teve seis interações, com um score de 40,97; o AP teve quatro interações, mas seu score foi de 45,15, maior que o da vigabatrina.

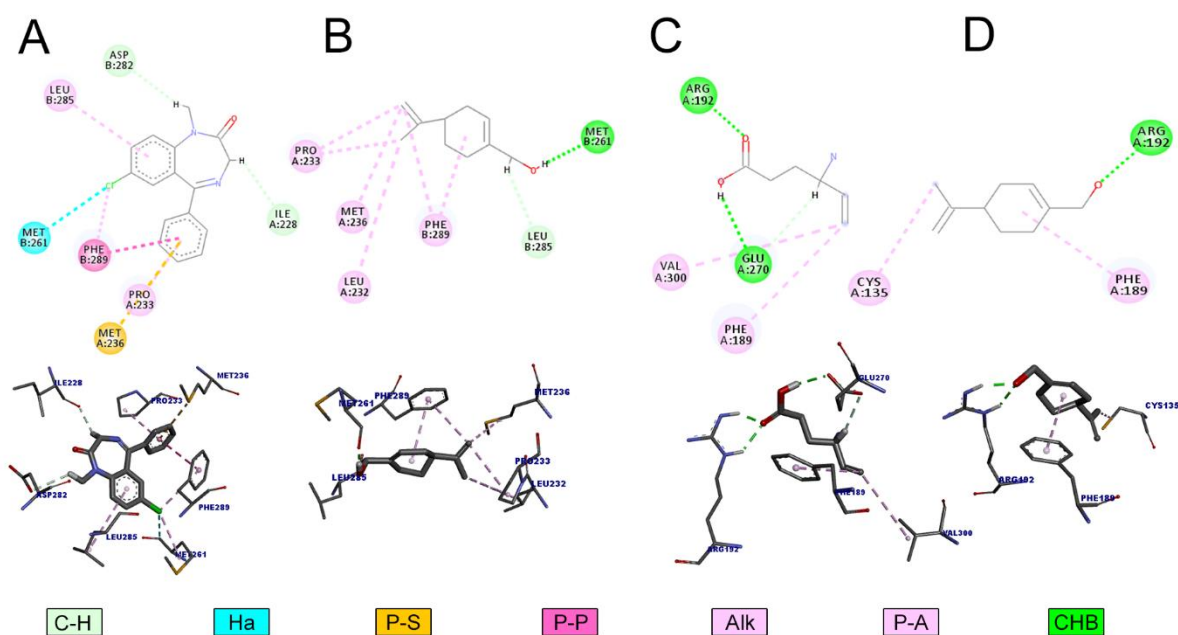


Figura 14. Representações em 2D e 3D do docking ligante-proteína; os tipos de interações são mostrados de acordo com a cor. A: Diazepam-GABAAR; B: Álcool Perílico-GABAAR; C: Vigabatrina-GABA-AT; D: Álcool Perílico-GABA-AT. C-H: ligação carbono-hidrogênio; Ha: halogênio; P-S: pi-enxofre; P-P: pi-pi; Alk: alquil; P-A: pi-alquil; CHD: ligação de hidrogênio.

Tabela 2. Detalhes das interações ligante-receptor preditas *in silico*.

Alvo	Ligante	Aminoácido	Átomo ligante	Categoria da interação	Tipo de interação	Distancia (Å)	Score
GABA _A R	Diazepam	A:ILE228	H22	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	2.5	69.33
		A:PRO233	Ligand	Hydrophobic	Pi-Alkyl	4.02	
		A:MET236	Ligand	Other	Pi-Sulfur	4.46	
		B:MET261	Cl	Hydrophobic	Alkyl	3.56	
		B:MET261	Cl	Halogen	Halogen (Cl)	3.32	
		B:ASP282	H25	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	2.89	
		B:LEU285	Ligand	Hydrophobic	Pi-Alkyl	5.21	
		B:PHE289	Ligand	Hydrophobic	Pi-Pi Stacked	4.19	
		B:PHE289	Cl	Hydrophobic	Pi-Alkyl	4.1	
	Perillyl alcohol	A:LEU232	C10	Hydrophobic	Alkyl	5.4	53.8
		A:PRO233	C10	Hydrophobic	Alkyl	3.71	
		A:PRO233	C11	Hydrophobic	Alkyl	4.14	
		A:MET236	C11	Hydrophobic	Alkyl	4.58	
		B:MET261	H27	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	1.84	
		B:LEU285	H21	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	2.53	
		B:PHE289	Ligand	Hydrophobic	Pi-Alkyl	4.26	
		B:PHE289	C11	Hydrophobic	Pi-Alkyl	4.08	
GABA-AT	Vigabatrin	A:PHE189	C9	Hydrophobic	Pi-Alkyl	4.77	40.97
		A:ARG192	O2	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	1.74	
		A:ARG192	O2	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	2.1	
		A:GLU270	H20	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	2.07	
		A:GLU270	H12	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	2.59	
		A:VAL300	C9	Hydrophobic	Alkyl	5.09	
		A:CYS135	C10	Hydrophobic	Alkyl	4.24	
		A:PHE189	Ligand	Hydrophobic	Pi-Alkyl	4.57	
	Perillyl alcohol	A:ARG192	O1	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	1.97	45.15
		A:ARG192	O1	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	2.1	

O álcool perílico (AP) é uma molécula atualmente usada para o tratamento de gliomas (Gomes *et al.*, 2017). Já foi testado por longos períodos (até quatro anos) em testes clínicos por via intranasal (Chen, Fonseca, da e Schönthal, 2018), e sua relativa segurança tem chamado a atenção dos pesquisadores, que vêm descobrindo outros usos para essa molécula no SNC, como visto anteriormente. Até o presente momento, não há um estudo do efeito do álcool perílico sobre a epilepsia.

Sabe-se que a neuroinflamação, o estresse oxidativo e a excitotoxicidade mediada por glutamato possuem papel fundamental na origem das convulsões epiléticas e a consequente neurodegeneração causada pelas convulsões (Ambrogini *et al.*, 2019). Como visto, parte das atividades do AP no SNC foram devido à sua proteção contra o estresse oxidativo, neuroinflamação e prevenção da neurodegeneração. Por isso, levantou-se a hipótese de que esta molécula pudesse ter um efeito benéfico contra convulsões epiléticas. Outra atividade biológica reportada no AP que poderia antagonizar o mecanismo de surgimento do ataque epilético seriam a inibição da via mTOR (Sundin, Peffley e Hentosh, 2013), pois sabe-se que esta via está associada à hiperexcitabilidade neuronal, de fato, o mais conhecido inibidor dessa via – a rapamicina – já foi reportada de ter efeitos benéficos contra as convulsões (Chi *et al.*, 2017; Lasarge e Danzer, 2014; Ostendorf e Wong, 2015). Por fim, o AP já foi reportado de remover o excesso de cálcio intracelular em algumas células (Berchtold *et al.*, 2005; Wei *et al.*, 2000), e embora isso ainda não tenha sido demonstrado em células nervosas, é provável que aconteça, pois segundo Berchtold *et al.* (2005), o AP atua em canais de cálcio do tipo L, e estes, estão presentes no SNC também (Ortner e Striessnig, 2016). A remoção do excesso de cálcio intracelular nos neurônios pelo AP poderia antagonizar a excitotoxicidade mediada pelo glutamato, pois sabe-se que o excesso de cálcio intracelular é uma consequência da excitotoxicidade e está envolvido nos seus efeitos deletérios, como a disfunção mitocondrial, ativação da via caspase e consequente apoptose neuronal (Jia *et al.*, 2015).

Para testar a hipótese de um possível efeito anticonvulsivante no álcool perílico foi usado o organismo modelo zebrafish (*Danio rerio*). O zebrafish (*Danio rerio*) tem surgido como um modelo de destaque na triagem de novos fármacos (MacRae e Peterson, 2015), no

estudo da epilepsia (Stewart, Desmond, *et al.*, 2012), e em neurociências em geral (Stewart *et al.*, 2014). Por ser um animal inteiro, tem vantagem em relação a estudos *in vitro*, e por ser um vertebrado, está mais próximo filogeneticamente dos humanos que outros organismos modelos como *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*; o fato de possuir uma barreira hematoencefálica também o põe em vantagem em relação a esses organismos, considerando que esta barreira possui papel fundamental na epilepsia (Han *et al.*, 2017). O zebrafish está mais longe filogeneticamente dos humanos comparado aos roedores *Rattus norvegicus* e *Mus musculus*, no entanto, possui nítidas vantagens em relação a esses para estudos preliminares. Por exemplo, o zebrafish possui notável melhor custo-benefício, possibilitando o uso de um número maior de animais e consequentemente, estatísticas mais robustas; além disso, o rápido desenvolvimento deste animal (com 3 meses já é considerado adulto) permite a execução de testes em um menor intervalo de tempo.

É comum que sejam utilizadas larvas do animal, que são mais numerosas, permitindo uma triagem em maior escala. No entanto, para o propósito deste estudo foi optado pelo uso de animais adultos, pois: 1 – trata-se de um estudo comportamental, e o animal adulto possui notável maior repertório de comportamentos em relação à larva; 2 – o SNC do adulto é completamente desenvolvido, assim como a barreira hematoencefálica, diferente do das larvas (Mussulini *et al.*, 2013). Para a indução da convulsão foi utilizado o pentilenotetrazol, um antagonista dos receptores GABA_A frequentemente usado para este propósito (ex: Banote *et al.*, 2013; Baraban *et al.*, 2005; Barbalho *et al.*, 2016; Duy *et al.*, 2017; Jin *et al.*, 2018; Menezes and Silva, Da, 2017; Pineda, Beattie and Hall, 2011). A dose do PTZ de 170 mg/kg foi adotada de Kundap *et al.* (2017).

Para avaliar o efeito anticonvulsivante do álcool perílico foram adotados parâmetros convulsivos e motores. Dentro dos parâmetros convulsivos, a primeira avaliação foi a frequência de ocorrência de fenótipos associados à convulsão por grupo (%), entre eles: congelamento, hiperlocomoção, convulsão propriamente dita, perda de postura e imobilidade (**Figura 6**). Os resultados mostram que o tratamento com AP não influenciou alguns parâmetros pré-convulsivos como a ocorrência de congelamento e hiperlocomoção, a latência para a convulsão também não parece ter sido afetada. Já as frequências de convulsão e de perda de postura diminuíram de forma dose-dependente, e todas as doses diminuíram a ocorrência de imobilidade induzida por convulsão, com maior efeito obtido pela maior dose.

Após verificar a frequência desses comportamentos por grupo, os parâmetros epilépticos foram quantificados individualmente para o cálculo da média do grupo. A convulsão foi quantificada a partir do tempo de convulsão (s) e número de nados em círculo/espiral (n); tanto a perda de postura quanto a imobilidade induzida por convulsão foram quantificadas pelos seus respectivos tempos. Os resultados mostram que o tratamento diminuiu de forma dose-dependente o número de nados em círculo/espiral, o tempo de perda de postura e o tempo de imobilidade induzida por convulsão (**Figura 7**); além disso, todas as doses diminuíram o tempo de convulsão, com maior efeito obtido pela maior dose. Digno de nota, a diferença do grupo tratado com a maior dose de AP (100 mg/kg) foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para todos esses parâmetros em relação ao grupo controle negativo, que não recebeu tratamento algum (**Figura 7**).

Após avaliar manualmente os parâmetros convulsivos, os parâmetros motores afetados pela convulsão foram avaliados, entre estes o deslocamento (**Figura 8**), a aceleração (**Figura 9**) e a velocidade (**Figura 10**). Esses parâmetros não podem ser quantificados manualmente, por isso, foram obtidos usando um software especializado de rastreamento animal – Toxtrac v2.90 (Rodriguez *et al.*, 2018). A importância de medir a atividade locomotora dos animais está principalmente em dois motivos, primeiro: o movimento é diretamente afetado pela convulsão, medi-la então, é um indicador confiável e reproduzível da gravidade da mesma; segundo: em ensaios comportamentais, é possível que uma atividade biológica seja confundida com outra, rendendo falsos-positivo (Por exemplo, um tratamento pode ser considerado anticonvulsivante por diminuir a convulsão, quando na verdade o animal estava sedado).

Os resultados dos parâmetros motores mostram que todas as doses de AP obtiveram um padrão diferente do controle negativo, não apresentando a queda brusca observada nesse grupo (padrão em “V”, **Figura 11**). É possível observar que há uma tendência de aumento de atividade locomotora total com o aumento da dose de AP, indicando uma relação causal entre a dose e a melhora do déficit motor induzido pelas convulsões (**Figura 12**). Outro indicador positivo do tratamento foi a diminuição da discrepância da atividade pré-convulsiva (com episódios de hiperlocomoção) da pós-convulsiva (afetada por episódios de perda de postura e paralisia) como pode ser visto na **Figura 13**.

Além de apontar melhora do déficit motor causado pelas convulsões, os resultados mostram que o tratamento não prejudicou a atividade locomotora, o que é altamente relevante,

pois uma debilidade motora causada pelo tratamento com AP indicaria uma possível toxicidade ou sedação, comprometendo a interpretação da diminuição do comportamento convulsivo nos animais.

Após os resultados *in vivo* indicarem evidência de atividade anticonvulsivante, os estudos *in silico* foram feitos para dar trazer luz sobre um possível mecanismo de ação envolvido. O servidor PASS indicou possível inibição da GABA-AT, então foi feito um *docking* molecular para corroborar esses resultados. Considerando que o servidor também previu ligeira probabilidade de agonismo do GABA_AR, também foi feito o *docking* com este receptor. O método computacional do *docking* é amplamente usado no desenvolvimento de fármacos e é capaz de identificar interações e afinidade de ligação entre ligantes e receptores (Du *et al.*, 2016). No geral, o *docking* corroborou o efeito do AP na GABA-AT ao ligar-se em seu sítio ativo com um score maior que a vigabatrina. O score do AP em relação ao GABA_AR foi maior que quando comparado ao GABA-AT, mas menor comparado ao fármaco controle, diazepam. É importante lembrar ainda que o cofator PLP é necessário para a inibição da GABA-AT; portanto, é possível ainda que a ligação do AP à GABA-AT pode ser ainda mais forte em sua presença. No *docking* molecular, é geralmente aceito entre os pesquisadores que RMSDs < 2 Å são considerados relevantes (Cole *et al.*, 2005); neste estudo, foram obtidos valores RMSDs de 0,729 e 1,843 para o GABA_AR E GABA-AT, respectivamente.

Considerando que este é o primeiro estudo do potencial anticonvulsivante do AP, não há publicações na literatura para comparar, e novos estudos deverão ser feitos para a validação dessa atividade, principalmente em mamíferos. Digno de nota, apesar dos resultados do estudo ser baseado principalmente no sistema GABAérgico – principalmente por inibição da GABA-AT – não pode ser descartada a possibilidade de envolvimento de outros mecanismos de ação. Por exemplo, as atividades do AP anti-neuroinflamatória, antioxidante no SNC, bloqueio de canais de Ca⁺² dependentes de voltagem, e inibição da via mTOR, descritas na literatura podem estar envolvidas também (de fato, foram essas atividades que levou o autor a hipotetizar a atividade benéfica do AP contra convulsões). Estes mecanismos são diferentes daqueles dos anticonvulsivantes tradicionais que agem principalmente no sistema GABAérgico, como fenobarbital, benzodiazepínicos (incluindo Diazepam), felbamato, topiramato, vigabatrina e tiagabina (Sankaraneni e Lachhwani, 2015). Como há mecanismos adicionais, seria uma nova abordagem para o tratamento da epilepsia refratária. Além disso, como o AP pode antagonizar diversos fatores envolvidos na epileptogênese, é plausível hipotetizar que a molécula poderia ser usada não apenas no

tratamento sintomático prevenindo as convulsões, mas também para a prevenção do próprio surgimento da doença (epileptogênese); porém, isso ainda é suposição e não é sugerido necessariamente pelos resultados.

Um outro fato relevante que torna o uso do AP atrativo é a relativa segurança do uso do álcool perílico descrita na literatura (principalmente quando administrado intranasalmente), pois sabe-se que os anticonvulsivantes tradicionais geralmente podem causar diversos efeitos adversos como sonolência ou insônia, letargia, cansaço, fadiga, tontura, ataxia, diplopia, tremores, déficit cognitivo, irritabilidade, depressão, efeitos sistêmicos, entre outros (Sankaraneni e Lachhwani, 2015).

Os resultados do estudo foram publicados na revista oficial da Sociedade Alemã de Farmacologia e Toxicologia Clínica e Experimental – *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* – editora Springer (Matias Pereira *et al.*, 2021). Anexo 2.

Neste estudo foi avaliado a atividade anticonvulsivante do álcool perílico em zebrafish. Os resultados mostram que o tratamento teve efeitos positivos tanto em parâmetros convulsivos quanto nos parâmetros motores afetados pelas convulsões. Foram testadas doses de 10, 50 e 100 mg/kg, e os melhores resultados foram obtidos pela maior dose, que foi estatisticamente diferente do controle negativo (sem tratamento) em todos os parâmetros convulsivos.

A melhora foi dose-dependente para vários fatores como frequência de convulsão (%), frequência de perda de postura (%), número de nados em círculo/espiral (n), tempo de perda de postura (s), tempo de imobilidade. Outros parâmetros melhoraram de forma não dose-dependente como frequência de imobilidade (%) e o tempo de convulsão (s), com melhores resultados obtidos pela maior dose. Nos parâmetros motores, o tratamento parece ter atenuado o déficit motor causado pelas convulsões. O estudo *in silico* indicou um possível envolvimento do sistema GABAérgico na atividade anticonvulsivante do álcool perílico, principalmente por inibição da GABA-AT; porém, outros mecanismos já relatados na literatura podem estar envolvidos.

- AFRIKANOVA, T. *et al.* Validation of the Zebrafish Pentylenetetrazol Seizure Model: Locomotor versus Electrographic Responses to Antiepileptic Drugs. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2013.
- AMBROGINI, P. *et al.* Excitotoxicity, neuroinflammation and oxidant stress as molecular bases of epileptogenesis and epilepsy-derived neurodegeneration: The role of vitamin E. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1865, n. 6, p. 1098–1112, 2019.
- ANIS, E. *et al.* Evaluation of phytomedicinal potential of perillyl alcohol in an in vitro Parkinson's Disease model. **Drug Development Research**, v. 79, n. 5, p. 218–224, 2018.
- BAK, L. K.; SCHOUSBOE, A.; WAAGEPETERSEN, H. S. The glutamate/GABA-glutamine cycle: Aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. **Journal of Neurochemistry**, v. 98, n. 3, p. 641–653, 2006.
- BANOTE, R. K. *et al.* Oral gabapentin suppresses pentylenetetrazole-induced seizure-like behavior and cephalic field potential in adult zebrafish. **Epilepsy & behavior : E&B**, v. 27, n. 1, p. 212–219, 2013.
- BARABAN, S. C. *et al.* Pentylenetetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. **Neuroscience**, v. 131, n. 3, p. 759–768, 2005.
- BARBALHO, P. G. *et al.* Cyclooxygenase-1 as a potential therapeutic target for seizure suppression: Evidences from zebrafish pentylenetetrazole-seizure model. **Frontiers in Neurology**, v. 7, n. NOV, 2016.
- BARNETT, M. W.; LARKMAN, P. M. The Action Potential. **Practical Neurology**, v. 7, p. 192–197, 2007.
- BASU, S.; SACHIDANANDAN, C. Zebrafish: A multifaceted tool for chemical biologists. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 10, p. 7952–7980, 2013.
- BEAN, B. P. The action potential in mammalian central neurons. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 8, n. 6, p. 451–465, 2007.

BENARD, E. L. *et al.* Infection of Zebrafish Embryos with Intracellular Bacterial Pathogens. **Journal of Visualized Experiments**, n. 61, p. 1–8, 2012.

BENEDITO, R. B. *et al.* Perillyl alcohol: Antinociceptive effects and histopathological analysis in rodent brains. **Natural Product Communications**, v. 12, n. 9, p. 1385–1389, 2017.

BERCHTOLD, C. M. *et al.* Perillyl alcohol inhibits a calcium-dependent constitutive nuclear factor- κ B pathway. **Cancer Research**, v. 65, n. 18, p. 8558–8566, 2005.

BIRD, N. C.; MABEE, P. M. Developmental Morphology of the Axial Skeleton of the Zebrafish, *Danio rerio* (Ostariophysi: Cyprinidae). **Developmental Dynamics**, v. 228, n. 3, p. 337–357, 2003.

BLASER, R.; GERLAI, R. Behavioral phenotyping in zebrafish: Comparison of three behavioral quantification methods. **Behavior Research Methods**, v. 38, n. 3, p. 456–469, 2006.

BORHAM, L. E. *et al.* The effect of some immunomodulatory and anti-inflammatory drugs on Li-pilocarpine-induced epileptic disorders in Wistar rats. **Brain Research**, v. 1648, p. 418–424, 2016.

BOWMAN, J.; DUDEK, E.; SPITZ, M. Epilepsy. **Encyclopedia of Life Sciences**, 2001.

BRAIDA, D. *et al.* Neurohypophyseal hormones protect against pentylene-tetrazole-induced seizures in zebrafish: Role of oxytocin-like and V1a-like receptor. **Peptides**, v. 37, n. 2, p. 327–333, 2012.

BURTSCHER, J.; SCHWARZER, C. The opioid system in temporal lobe epilepsy: Functional role and therapeutic potential. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, n. August, p. 1–13, 2017.

CELLI, R. *et al.* Targeting metabotropic glutamate receptors in the treatment of epilepsy: rationale and current status. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 0, n. 0, p. 1, 2019.

CHEN, T. C.; FONSECA, C. O. DA; SCHÖNTHAL, A. H. Intranasal perillyl alcohol for glioma therapy: Molecular mechanisms and clinical development. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, p. 1–21, 2018.

CHI, X. *et al.* Inhibition of mTOR Pathway by Rapamycin Decreases P-glycoprotein

Expression and Spontaneous Seizures in Pharmacoresistant Epilepsy. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 61, n. 4, p. 553–562, 2017.

COLE, J. C. *et al.* Comparing protein-ligand docking programs is difficult. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 60, n. 3, p. 325–332, 2005.

D’ALESSIO, P. A.; BISSON, J.-F.; BÉNÉ, M. C. Anti-Stress Effects of d -Limonene and Its Metabolite Perillyl Alcohol . **Rejuvenation Research**, v. 17, n. 2, p. 145–149, 2013.

DESMOND, D. *et al.* Assessing Epilepsy-Related Behavioral Phenotypes in Adult Zebrafish. *In: Chemosphere*. [s.l.: s.n.]. v. 66p. 313–322.

DEVI, P. U.; MANOCHA, A.; VOHORA, D. Seizures, antiepileptics, antioxidants and oxidative stress: An insight for researchers. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 9, n. 18, p. 3169–3177, 2008.

DU, X. *et al.* Insights into protein–ligand interactions: Mechanisms, models, and methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 2, p. 1–34, 2016.

DUY, P. Q. *et al.* Cellular responses to recurrent pentylenetetrazole-induced seizures in the adult zebrafish brain. **Neuroscience**, v. 349, p. 118–127, 2017.

EMOTO, M. C. *et al.* Brain redox imaging in the pentylenetetrazole (PTZ)-induced kindling model of epilepsy by using in vivo electron paramagnetic resonance and a nitroxide imaging probe. **Neuroscience Letters**, v. 608, p. 40–44, 2015.

FILIMONOV, D. A. *et al.* Prediction of the biological activity spectra of organic compounds using the pass online web resource. **Chemistry of Heterocyclic Compounds**, v. 50, n. 3, p. 444–457, 2014.

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. 470–472, 2005.

____. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475–482, 2014.

____. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 522–530, 2017.

- FOREHAND, C. J. The action potential, synaptic transmission, and maintenance of nerve function. **Medical Physiology: Principles for Clinical Medicine**, p. 37–61, 2011.
- FROIMOWITZ, M. HyperChem: A Software Package for Computational Chemistry and Molecular Modeling. **BioTechniques**, 1993.
- GOLYALA, A.; KWAN, P. Drug development for refractory epilepsy: The past 25 years and beyond. **Seizure**, v. 44, p. 147–156, 2017.
- GOMES, A. C. *et al.* Perillyl alcohol, a pleiotropic natural compound suitable for brain tumor therapy, targets free radicals. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 65, n. 4, p. 285–297, 2017.
- GUO, D.; ZOU, J.; WONG, M. Rapamycin attenuates acute seizure-induced astrocyte injury in mice in vivo. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2017.
- HAN, H. *et al.* Breaking Bad: the Structure and Function of the Blood-Brain Barrier in Epilepsy. **The AAPS Journal**, v. 19, n. 4, p. 973–988, 2017.
- HELTON, T. D.; XU, W.; LIPSCOMBE, D. Neuronal L-type calcium channels open quickly and are inhibited slowly. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 44, p. 10247–10251, 2005.
- HORTOPAN, G. A.; DINDAY, M. T.; BARABAN, S. C. Zebrafish as a model for studying genetic aspects of epilepsy. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 3, n. 3–4, p. 144–148, 2010.
- ISLAM, F. F. *et al.* Perillyl alcohol improves functional and histological outcomes against ischemia-reperfusion injury by attenuation of oxidative stress and repression of COX-2, NOS-2 and NF- κ B in middle cerebral artery occlusion rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 747, n. January, p. 190–199, 2015.
- JIA, M. *et al.* Taming glutamate excitotoxicity: Strategic pathway modulation for neuroprotection. **CNS Drugs**, v. 29, n. 2, p. 153–162, 2015.
- JIN, M. *et al.* Gastrodin Suppresses Pentylentetrazole-Induced Seizures Progression by Modulating Oxidative Stress in Zebrafish. **Neurochemical Research**, v. 43, n. 4, p. 904–917, 2018.
- JONES, G. *et al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, 1997.

KALUEFF, A. V. *et al.* Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond. **Zebrafish**, v. 10, n. 1, p. 70–86, 2013.

KAVALALI, E. T. The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 1, p. 5–16, 2015.

KHAN, A. Q.; NAFEEES, S.; SULTANA, S. Perillyl alcohol protects against ethanol induced acute liver injury in Wistar rats by inhibiting oxidative stress, NFκ-B activation and proinflammatory cytokine production. **Toxicology**, v. 279, n. 1–3, p. 108–114, 2011.

KIM, D. Y. *et al.* GABAA receptor-mediated activation of L-type calcium channels induces neuronal excitation in surgically resected human hypothalamic hamartomas. **Epilepsia**, v. 49, n. 5, p. 861–871, 2008.

KRIZ, J.; ŽUPAN, G.; SIMONIĆ, A. Differential effects of dihydropyridine calcium channel blockers in kainic acid-induced experimental seizures in rats. **Epilepsy Research**, v. 52, n. 3, p. 215–225, 2003.

KUNDAP, U. P. *et al.* Zebrafish as a model for epilepsy-induced cognitive dysfunction: A pharmacological, biochemical and behavioral approach. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. AUG, p. 1–13, 2017.

LASARGE, C. L.; DANZER, S. C. Mechanisms regulating neuronal excitability and seizure development following mTOR pathway hyperactivation. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 7, n. MAR, p. 1–15, 2014.

LAU, A.; TYMIANSKI, M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 460, n. 2, p. 525–542, 2010.

LUKASIUK, K. Epileptogenesis. **Encyclopedia of the Neurological Sciences**, p. 196–199, 2014.

MACRAE, C. A.; PETERSON, R. T. Zebrafish as tools for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 10, p. 721–731, 2015.

MATIAS PEREIRA, A. C. *et al.* Perillyl alcohol decreases the frequency and severity of convulsive-like behavior in the adult zebrafish model of acute seizures. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 2021.

MENEZES, F. P.; SILVA, R. S. DA. The influence of temperature on adult zebrafish

- sensitivity to pentylenetetrazole. **Epilepsy Research**, v. 135, n. April, p. 14–18, 2017.
- MUSSULINI, B. H. M. *et al.* Seizures Induced by Pentylenetetrazole in the Adult Zebrafish: A Detailed Behavioral Characterization. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–9, 2013.
- NADERI, N. *et al.* L-type calcium channel mediates anticonvulsant effect of cannabinoids in acute and chronic murine models of seizure. **Neurochemical Research**, v. 37, n. 2, p. 279–287, 2012.
- NICITA, F. *et al.* The possible use of the L-type calcium channel antagonist verapamil in drug-resistant epilepsy. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 16, n. 1, p. 9–15, 2016.
- OLSEN, R. W.; SIEGHART, W. GABAA receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology. **Neuropharmacology**, v. 56, n. 1, p. 141–148, 2009.
- ORTNER, N. J.; STRIESSNIG, J. L-type calcium channels as drug targets in CNS disorders. **Channels**, v. 10, n. 1, p. 7–13, 2016.
- OSTENDORF, A. P.; WONG, M. MTOR inhibition in epilepsy: Rationale and clinical perspectives. **CNS Drugs**, v. 29, n. 2, p. 91–99, 2015.
- OZ, M. *et al.* Effects of monoterpenes on ion channels of excitable cells. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 152, p. 83–97, 2015.
- PATEL, D. C. *et al.* Neuron–glia interactions in the pathophysiology of epilepsy. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 20, n. 5, p. 282–297, 2019.
- PAULETTI, A. *et al.* Targeting oxidative stress improves disease outcomes in a rat model of acquired epilepsy. **Brain**, v. 140, n. 7, p. 1885–1899, 2017.
- PEARSON-SMITH, J. N.; PATEL, M. Metabolic dysfunction and oxidative stress in epilepsy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 11, p. 1–13, 2017.
- PETROFF, O. A. C. GABA and glutamate in the human brain. **Neuroscientist**, v. 8, n. 6, p. 562–573, 2002.
- PINEDA, R.; BEATTIE, C. E.; HALL, C. W. Recording the adult zebrafish cerebral field potential during pentylenetetrazole seizures. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 200, n. 1, p. 20–28, 2011.
- PINEDA, R.; BEATTIE, C. E.; HALL, C. W. Closed-loop neural stimulation for

pentylentetrazole-induced seizures in zebrafish. **Disease Models & Mechanisms**, v. 6, n. 1, p. 64–71, 2013.

POHLMANN-EDEN, B.; WEAVER, D. F. The puzzle(s) of pharmacoresistant epilepsy. **Epilepsia**, v. 54 Suppl 2, p. 1–4, 2013.

PRZEWŁOCKA, B.; MACHELSKA, H.; LASOŃ, W. Kappa opioid receptor agonists inhibit the pilocarpine-induced seizures and toxicity in the mouse. **European Neuropsychopharmacology**, v. 4, n. 4, p. 527–533, 1994.

PUTTACHARY, S. *et al.* Seizure-induced oxidative stress in temporal lobe epilepsy. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

RABIEI, Z. Anticonvulsant effects of medicinal plants with emphasis on mechanisms of action. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 2, p. 166–172, 2017.

REETA, K. H.; PRABHAKAR, P.; GUPTA, Y. K. Anticonvulsant activity of the antidepressant drug, tianeptine, against pentylentetrazole-induced seizures mitigates cognitive impairment in rats. **Behavioural Pharmacology**, v. 27, n. 7, p. 623–632, 2016.

RENNEKAMP, A. J.; PETERSON, R. T. 15 Years of Zebrafish Chemical Screening. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 24, p. 58–70, 2015.

RIVERO-SEGURA, N. A. *et al.* Prolactin-induced neuroprotection against glutamate excitotoxicity is mediated by the reduction of [Ca²⁺]_i overload and NF-κB activation. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–16, 2017.

RODRIGUEZ, A. *et al.* ToxTrac: A fast and robust software for tracking organisms. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 9, n. 3, p. 460–464, 2018.

ROWLEY, N. M. *et al.* Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. **Neurochemistry International**, v. 61, n. 4, p. 546–558, 2012.

SANKARANENI, R.; LACHHWANI, D. Antiepileptic drugs-a review. **Pediatric Annals**, v. 44, n. 2, p. e36–e42, 2015.

SCHEFFER, I. E. *et al.* ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 512–521, 2017.

SCHULER, V. *et al.* Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABAB responses in mice lacking GABAB(1). **Neuron**, v. 31, n. 1, p. 47–58,

2001.

SIMEONE, K. A. *et al.* L-type calcium channel blockade reduces network activity in human epileptic hypothalamic hamartoma tissue. **Epilepsia**, v. 52, n. 3, p. 531–540, 2011.

SINGH, A.; TREVICK, S. The Epidemiology of Global Epilepsy. **Neurologic Clinics**, v. 34, n. 4, p. 837–847, 2016.

STAFSTROM, C. E. The pathophysiology of epileptic seizures: a primer for pediatricians. **Pediatrics in review / American Academy of Pediatrics**, v. 19, n. 10, p. 342–351, 1998.

STEWART, A. M.; DESMOND, D.; *et al.* Perspectives of zebrafish models of epilepsy: What, how and where next? **Brain Research Bulletin**, v. 87, n. 2–3, p. 135–143, 2012.

STEWART, A. M.; GAIKWAD, S.; *et al.* Understanding spatio-temporal strategies of adult zebrafish exploration in the open field test. **Brain Research**, v. 1451, p. 44–52, 2012.

STEWART, A. M. *et al.* Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 5, p. 264–278, 2014.

STUART, G. *et al.* Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. **Trends in Neurosciences**, v. 20, n. 3, p. 125–131, 1997.

SUNDIN, T.; PEFFLEY, D. M.; HENTOSH, P. Disruption of an hTERT-mTOR-RAPTOR protein complex by a phytochemical perillyl alcohol and rapamycin. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 375, n. 1–2, p. 97–104, 2013.

SUNG-JOON, C. *et al.* Zebrafish as an animal model in epilepsy studies with multichannel EEG recordings. **Scientific Reports**, n. December 2016, p. 1–10, 2017.

TANG, F.; HARTZ, A. M. S.; BAUER, B. Drug-resistant epilepsy: Multiple hypotheses, few answers. **Frontiers in Neurology**, v. 8, n. JUL, p. 1–19, 2017.

TEMP, F. R. *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibitors differentially attenuate pentylenetetrazol-induced seizures and increase of pro- and anti-inflammatory cytokine levels in the cerebral cortex and hippocampus of mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 810, n. June, p. 15–25, 2017.

THIJS, R. D. *et al.* Epilepsy in adults. **The Lancet**, v. 393, n. 10172, p. 689–701, 2019.

TOMAZ-MORAIS, J. F. *et al.* Orofacial antinociceptive activity of (S)-(-)-perillyl alcohol in

mice: a randomized, controlled and triple-blind study. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 46, n. 5, p. 662–667, 2017.

TURRINI, L. *et al.* Optical mapping of neuronal activity during seizures in zebrafish. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2017.

VEZZANI, A. *et al.* Epilepsy and brain inflammation. **Experimental Neurology**, v. 244, p. 11–21, 2013.

VOLK, L. *et al.* Glutamate Synapses in Human Cognitive Disorders. **Annual Review of Neuroscience**, v. 38, n. March, p. 127–149, 2015.

WEI, X. *et al.* Perillyl alcohol inhibits TCR-mediated $[Ca^{2+}]_i$ signaling, alters cell shape and motility, and induces apoptosis in T lymphocytes. **Cellular Immunology**, v. 201, n. 1, p. 6–13, 2000.

WONG, K. *et al.* Modeling seizure-related behavioral and endocrine phenotypes in adult zebrafish. **Brain Research**, v. 1348, p. 209–215, 2010.

XIE, T. *et al.* Effects of epigallocatechin-3-gallate on pentylentetrazole-induced kindling, cognitive impairment and oxidative stress in rats. **Neuroscience Letters**, v. 516, n. 2, p. 237–241, 2012.

ZANGRANDI, L.; SCHWARZER, C. Activation of kappa opioid receptors reduces EEG seizure activity in a mouse model of temporal lobe epilepsy. **BMC Pharmacology**, v. 11, n. S2, p. A10, 2011.

ZHOU, W.; FUKUMOTO, S.; YOKOGOSHI, H. Components of lemon essential oil attenuate dementia induced by scopolamine. **Nutritional Neuroscience**, v. 12, n. 2, p. 57–64, 2009.

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA – UNIFAP

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá **APROVOU**, na data de 25 de junho de 2019, o parecer referente ao protocolo no. **013/2019** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Estudo do efeito do álcool perílico sobre convulsões epilépticas induzidas por pentilenotetrazol em zebrafish (*Danio rerio*)**" coordenado por **Arlindo César Matias Pereira Filho**, está de acordo com os princípios de ética e bem estar animal.

CERTIFICATE

The Ethics Committee on Animal Use of the Amapá Federal University **APPROVED** at the meeting of June 25, 2019, the final decision about the Protocol **013/2019** and certify that the research project entitled "**Estudo do efeito do álcool perílico sobre convulsões epilépticas induzidas por pentilenotetrazol em zebrafish (*Danio rerio*)**" coordinated by **Arlindo César Matias Pereira Filho**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 25 de junho de 2019

Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho
Presidente CEUA-UNIFAP
Port. No. 1733/2014

Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA – UNIFAP
Rod. Juscelino Juscelino Kubitschek, km 02 – Campus Marco Zero,
Macapá - AP, 68903-419 email: farmacos@unifap.br
Fone (96)4009-2907

ANEXO 2 – Artigo Publicado

Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology
<https://doi.org/10.1007/s00210-021-02050-0>

ORIGINAL ARTICLE



Perillyl alcohol decreases the frequency and severity of convulsive-like behavior in the adult zebrafish model of acute seizures

Arlindo César Matias Pereira^{1,2} · Brenda Lorena Sánchez-Ortiz^{2,3} · Ester Lopes de Melo² · Lorane Izabel da Silva Hage-Melim^{1,4} · Raphaelle Sousa Borges^{1,2} · Xuebo Hu⁵ · José Carlos Tavares Carvalho^{1,2}

Received: 11 November 2020 / Accepted: 10 January 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH, DE part of Springer Nature 2021

Abstract

This research aimed to assess the effect of perillyl alcohol (PA) on convulsive behavior in vivo using adult zebrafish (*Danio rerio*, both sexes). The seizures were induced with pentylenetetrazole (PTZ) intraperitoneally at 170 mg/kg, and diazepam (DZP) was used as the control anticonvulsant (2 mg/kg, oral); PA was tested at 10, 50, and 100 mg/kg orally. The groups had ten animals per group (total $n = 60$), observed for 10 minutes after seizure induction. We manually appraised typical seizure phenotypes for quantification and used an animal tracking software (Toxtrac) to assess the motor parameters. Next, we sought to find a mechanism of action for PA anticonvulsant activity in silico using a structure-based activity prediction server and molecular docking. The results show that PTZ induced seizure-like behavior in all untreated animals with hyperlocomotion episodes, seizure itself, posture loss, and immobility. DZP inhibited the seizures in all animals of the positive control group. PA, in turn, inhibited the occurrence of seizures in a dose-dependent manner, with frequencies of 90%, 70%, and 40% (for 10, 50, and 100 mg/kg, respectively). The PA treatments also decreased several seizure endpoints in a dose-dependent manner. Also, the difference of the group treated with highest dose of PA was statistically significant compared with the negative control group for all the endpoints assessed ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis). The in silico analyses suggested that PA can affect the GABAergic system, which might be involved in its anticonvulsant activity, but other mechanisms cannot be ruled out. Overall, our results suggest an anticonvulsant potential in perillyl alcohol.

Keywords *Danio rerio* · neuroscience · bioinformatics · anticonvulsant · monoterpenes