

diferentes modelos de convulsão em animais são bastante utilizados para estudar a fisiopatologia do processo convulsivo, uma vez que reproduz alterações comportamentais, eletroencefalográficas e neuroquímicas que são semelhantes à epilepsia do lobo temporal em humanos (FREITAS, 2011).

Por outro lado, aproximadamente 70% dos pacientes com epilepsia são bem controlados por monoterapia com drogas antiepilépticas disponíveis no momento. Outras 5-10% dos pacientes são estabilizados pela adição de outra droga antiepiléptica, mas permanece mais de 20% dos pacientes cuja crise epiléptica não é controlada. Portanto, fitomedicamentos podem potencialmente desempenhar um papel importante no desenvolvimento de novas drogas antiepilépticas aos pacientes farmacoresistentes (QUINTANS-JUNIOR et al., 2008). Desta forma estudos anteriores utilizando alguns monoterpenos como citrionelol (DE SOUSA et al., 2006),  $\alpha,\beta$ -epóxi-carvona (DE SOUSA et al., 2007a),  $\alpha$ -terpineol (DE SOUSA; QUINTANS; ALMEIDA et al., 2007b), e isopulegol (SILVA et al., 2009), presente em alguns óleos essenciais, possuem atividade anticonvulsivante em estudos realizados em animais. O p-cimeno definido como 1-isopropil-4-metilbenzeno é um monoterpeno aromático biosintético de fórmula molecular C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>, precursor do cravacol e largamente presente entre os óleos essenciais, sendo o constituinte majoritário em várias espécies vegetais como 83,75% em *Origanum saccatum*, 53,07% em *Origanum solymicum* e 44,13% em *Thymus vulgaris* (POULOSE; CROTEAU, 1978; ADAMS, 2007). Além disso, o p-cimeno vem sendo alvo de estudos em outros trabalhos como atividade antinociceptiva (SANTANA et al., 2011), antibacteriana (BAGAMBOULA; UYTENDAELE; DEBEVERE et al., 2004), antifúngica, herbicida (KODALI et al., 2008), antileishmania (DE MEDEIROS et al, 2011) e ação na anticolinesterase (ÖZTÜRK, 2012).

Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anticonvulsivante do p-cimeno em modelo de convulsão em camundongos induzido por pilocarpina.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos, adultos com 2 meses de idade, com peso variando de 25-30 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em condições controladas de iluminação (ciclo de 12h claro/escuro) e temperatura ( $25 \pm 2$  °C), recebendo ração padrão do tipo Purina e água ad libitum. Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados e uso de animais de laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (EUA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da UFPI (nº 038/2009).

### Drogas Administradas

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

### Método

Os animais com peso variando entre 25–30g foram divididos em cinco grupos (n=12 por grupo). O primeiro grupo foi usado como controle e recebeu o veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em uma solução salina de 0,9%), o segundo grupo foi tratado com cloridrato de pilocarpina 400 mg/kg (P400) via intraperitoneal, os demais foram tratados com p-cimeno (CIM) nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg, trinta minutos após administração das drogas os camundongos foram tratados com pilocarpina 400 mg/kg (i.p) e observados quanto comportamento como os movimentos estereotipados, movimentos tônico e clônico, crise epiléptica tônico-clônica, o período de latência para primeira crise convulsiva, latência para desenvolvimento de mal epiléptico e a taxa de sobrevivência dos animais (FREITAS, 2009).

Em outro momento, 30 minutos após a administração do veículo, p-cimeno 150 mg/kg e atropina 25 mg/kg, os animais receberam dose de pilocarpina 400 mg/kg (i.p.) e foi observado durante 1 hora para detectar a latência de instalação da crise epiléptica (LCP), latência de estado de mal epiléptico (LEP), ocorrência de crise epiléptica e o número de animais sobreviventes após a administração de pilocarpina. Atropina 25 mg/kg, p-cimeno 150 mg/kg e atropina 25 mg/kg + p-cimeno 150 mg/kg foram usados como drogas de referência.

Em outro grupo com 12 camundongos foram tratados com atropina e após 15 minutos administrado com p-cimeno 150 mg/kg e depois de 30 minutos a pilocarpina foi administrada em cada animal. Os animais foram observados novamente em relação aos parâmetros de LCP, LEP e o número de animais que apresentaram crises epilépticas e os sobreviventes.

### Análises Estatísticas

Os dados foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste t-Student-Neuman-Keuls como post hoc teste ( $p < 0,05$ ). O número de animais que apresentaram crises convulsivas e o número de sobreviventes foi calculado como porcentagens (porcentagem de crises epilépticas, porcentagem de estado de mal epiléptico e a taxa porcentagem de sobrevivência, respectivamente) e comparados com um teste não paramétrico ( $\chi^2$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As crises epilépticas decorrente do tratamento com pilocarpina, em doses convulsivas, parecem depender da ativação dos receptores muscarínicos, podendo envolver o metabolismo dos fosfoinositídeos e é capaz de produzir lesões cerebrais e alterações comportamentais. A pilocarpina também altera os níveis do neurotransmissor colinérgico e pode produzir alterações em outros sistemas de neurotransmissores [noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (5-HT), glutamato e ácido  $\gamma$ -amino-butírico (GABA)], embora pouco se saiba sobre essas alterações (FREITAS, 2011). A injeção subcutânea de pilocarpina (400 mg/kg) produz uma sequência de alterações comportamentais incluindo sinais colinérgicos periféricos, tremores, staring spell, automatismo facial, crises epilépticas límbicas, que se desenvolvem progressivamente dentro de 1-2h em estado de epilepsia (TURKI et al., 1983; FREITAS et al., 2003).

No presente trabalho, os efeitos anticonvulsivantes do p-cimeno foram estudados. O pré-tratamento com p-cimeno, em doses de 50, 100 ou 150 mg/kg não foi capaz de reverter os sinais colinérgicos periféricos, tremores e movimentos estereotipados. Entretanto o composto provocou um aumento dose-dependente na taxa de sobrevivência.

Drogas que atuam sobre o sistema nervoso central podem demonstrar a capacidade de modular as crises epilépticas atenuando e/ou potencializando o estado epiléptico induzido pela pilocarpina. (Freitas, 2011). Estes resultados dos efeitos anticonvulsivantes do p-cimeno demonstraram um indicativo de efeito neuroprotetor ao ser verificado um aumento progressivo no tempo de latência das crises epilépticas e para o desenvolvimento do estado de mal epiléptico induzidas por pilocarpina nos animais. E em relação à taxa de sobrevivência com as drogas atropina e diazepam utilizadas como droga de referência.

No presente trabalho foi verificado que a pilocarpina induziu a primeira crise epiléptica em  $7,83 \pm 0,23$  min. Durante os primeiros 3 a 5 minutos após administração de pilocarpina foi observado alterações de comportamento, como sinais periféricos colinérgicos (miose, piloereção, cromodacriorréia, diarreia e movimentos orofaríngeos), movimentos estereotipados (sniffing, grooming e rearing) seguidos de crises epilépticas tônico-clônico e desenvolvimento progressivo dentro de minutos em um estado de mal epiléptico em 100% dos animais estudados ( $p < 0,001$ ) (Tabela 1). Com os animais pré-tratados com p-cimeno em doses de 50, 100 e 150 mg/kg resultaram em alterações comportamentais como sinais colinérgicos periféricos, tremores, cromodacriorréia, automatismo faciais, wet dog shakes e rearing em 100% dos camundongos.