

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
NEUROCIÊNCIAS**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL NEUROPROTETOR DO ÁCIDO ROSMARÍNICO
EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS DE CRISES EPILÉPTICAS
EM CAMUNDONGOS**

JORDANA GRIEBLER LUFT

Dissertação de Mestrado

**Porto Alegre
2019**

JORDANA GRIEBLER LUFT

**AVALIAÇÃO DO PERFIL NEUROPROTETOR DO ÁCIDO ROSMARÍNICO
EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS DE CRISES EPILÉPTICAS
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, para obtenção do título de Mestre em Neurociências.

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Pereira

Coorientadora: Dinara Jaqueline Moura

Porto Alegre

2019

“Quem quer colher rosas deve suportar os espinhos.”

Provérbio Chinês

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e meu irmão, por me possibilitarem a oportunidade de crescimento pessoal e profissional, por todo o apoio, incentivo, amor e compreensão.

A todos que auxiliaram a minha vinda a Porto Alegre para a realização deste sonho, em especial as minhas tias-avós Nelcy e Elma e a minha querida amiga, e para sempre Mestre, Kelly.

Ao meu grande amor, Mateus Assmann, por todo o apoio, compreensão, companheirismo, carinho e suporte durante essa jornada, sem você esse sonho não teria se realizado.

Ao meu *Shifu* e amigo Lauro Telles por todos os ensinamentos e por me possibilitar fazer parte de sua família Shaolin de Kung Fu, agradeço imensamente pelo auxílio no crescimento pessoal e desenvolvimento da estabilidade emocional.

Aos meus amigos Thamyrys, Daniela e Mateus Ritter pela amizade e por me auxiliarem a permanecer forte nessa jornada.

À Débora, Fernanda, Pricila, Gabriela, Letícia e Chris, companheiras de laboratório e amigas que levarei para a vida, agradeço por todo o auxílio, apoio e por tornarem os dias de trabalho mais divertidos.

À minha orientadora Patrícia por me permitir fazer parte de seu grupo de pesquisa e por todos os ensinamentos.

À minha coorientadora Dinara e à Maria Elisa, relatora desta dissertação, agradeço por todas as sugestões realizadas para a melhoria deste trabalho.

A todos os envolvidos no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de PPG Neurociências pela oportunidade do Mestrado, a todos os professores pelo conhecimento disponibilizado e a todas as amigas que esta jornada me proporcionou.

A CAPES pelo auxílio financeiro, sem o qual nada disso seria possível.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação das Epilepsias, segundo ILAE 2017. Adaptado de Falco-Walter <i>et al.</i> , (2018).	2
Figura 2: Produção e enzimas associadas na catálise de espécies reativas de oxigênio (EROs) na mitocôndria. Adaptado de Li <i>et al.</i> , (2013)	6
Figura 3: Estrutura química do Ácido Rosmarínico.....	11

LISTA DE ABREVIATURAS

4-AP	4-aminopiridina
AR	Ácido Rosmarínico
ATP	Adenosina Trifosfato
CAT	Catalase
Cav3.1/Cav3.2/Cav3.3	Subtipos de canais de Ca^{2+} do tipo T
CCTT	Canais de Ca^{2+} do tipo T
Cl^-	Cloreto
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAE	Fármacos antiepilépticos
Fe/Fe^{2+}	Ferro
GABA	Ácido Gama-Aminobutírico
GABA T	GABA Transaminase
GABA_A	Receptor GABA do tipo A
GABAérgico	Relacionado ao sistema GABA
$\text{GAD}_{65}/\text{GAD}_{67}$	Isoformas da enzima Glutamato Descarboxilase
GPx	Glutationa Peroxidase
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
I_A/I_D	Correntes do tipo A e do tipo D dos canais de Potássio
ILAE	Liga Internacional Contra a Epilepsia
K^+	Potássio
MDA	Malondialdeído
Na^+/K^+ ATPase	Bomba de Sódio/Potássio
O^{2-}	Superóxido
PTX	Picrotoxina
S	Enxofre
SOD	Superóxido Dismutase
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

RESUMO

A epilepsia é uma doença que causa uma alta predisposição a crises epiléticas. Atualmente, existem mais de 30 medicamentos antiepiléticos disponíveis, porém 20 a 30% dos pacientes não respondem à medicação. Com isso, a busca por novos medicamentos, mais eficazes e seguros, torna-se importante. As crises epiléticas prolongadas geram disfunções mitocondriais e estresse oxidativo, além de piorar as lesões encefálicas relacionadas às crises. O uso de antioxidantes possui o benefício de proteger o encéfalo dos danos neuronais resultantes das múltiplas e/ou prolongadas crises epiléticas, reduzindo assim o uso e a dose de fármacos antiepiléticos. O Ácido Rosmarínico (AR) é um éster de ácido cafeico e ácido 3,4-dihidroxiifenilático, que tem a capacidade de prevenir danos celulares causados por radicais livres, atuando como antioxidante, além de poder atuar como anti-inflamatório, antimutagênico e antiapoptótico. Neste trabalho, foram utilizados dois modelos de crises epiléticas agudas induzidas por 4-Aminopiridina (4-AP) e Picrotoxina (PTX) em camundongos, para investigar o efeito antiepilético, antioxidante e neuroprotetor do AR. Diazepam (DZP) e Ácido Valpróico (VPA), fármacos antiepiléticos já utilizados no tratamento da epilepsia, foram utilizados como controles positivos nesse estudo. Embora o AR não tenha sido capaz de prevenir as crises epiléticas, nem aumentar o tempo de latência para a primeira crise nas doses testadas, ele demonstrou um efeito antioxidante e neuroprotetor. Portanto, sugerimos que o AR poderia ser usado como adjuvante no tratamento com outros fármacos antiepiléticos convencionais. Nosso trabalho abre a necessidade de testar doses mais altas de AR e seu efeito quando administrado com outros fármacos antiepiléticos, bem como seus parâmetros anti-inflamatórios nos diferentes modelos de crises epiléticas.

ABSTRACT

Epilepsy is a disease that causes a high predisposition to seizures. There are more than 20 antiepileptic drugs available for the treatment of this disease, but 20-30 % of patients do not respond to medication, making it necessary to search for new drugs which can be effective in the treatment of refractory patients. Prolonged epileptic seizures generate mitochondrial dysfunctions and oxidative stress, as well as influence seizure-related brain lesions. The use of antioxidants has the benefit of protecting the brain from neuronal damage that results from prolonged or multiple seizures, and so could be able to reduce the use and dose of antiepileptic drugs. Rosmarinic Acid (RA) is an ester of caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenylactic acid, who has the ability to prevent cell damage caused by free radicals, acting as an antioxidant, being able to act as well as an anti-inflammatory, antimutagenic and antiapoptotic. In this work, we use two models of acute seizure in mice, 4-Aminopyridine (4-AP) and Picrotoxin (PTX), to investigate the antiepileptic, antioxidant and neuroprotective effect of RA. Diazepam (DZP) and Valproic Acid (VPA), antiepileptic drugs already used in the treatment of epilepsy, were used as positive controls in this study. Although RA could not prevent seizures, neither enhance the latency time to first seizure in the tested doses, it exhibited an antioxidant and neuroprotective effect. So, we suggest that RA could be used as an adjuvant in the therapy with other conventional antiepileptic drugs. Our research opens the need to test higher doses of RA and its effect when administered with other antiepileptic drugs, as well as its anti-inflammatory parameters in the seizure models.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Modelos animais	4
1.2.	Estresse oxidativo	5
1.3.	Antioxidantes	9
1.4.	Ácido Rosmarínico	11
2.	OBJETIVOS	14
2.1.	Objetivo geral	14
2.2.	Objetivos específicos	14
3.	RESULTADOS.....	15
3.1.	Artigo – Rosmarinic acid improves oxidative stress parameters and mitochondrial activity following 4-aminopyridine and picrotoxin-induced seizure in mice. <i>Jordana Griebler Luft¹, Luiza Steffens², Ana Moira Morás², Mateus Strucker da Rosa³, Guilhian Leipnitz^{3,4}, Gabriela Gregory Regner¹, Pricila Fernandes Pflüger¹, Débora Gonçalves¹, Dinara Jaqueline Moura², Patrícia Pereira^{1*}</i>	15
4.	DISCUSSÃO GERAL.....	28
5.	CONCLUSÕES	31
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO

De acordo com um estudo recente, aproximadamente 70 milhões de pessoas no mundo possuem epilepsia (NGUGI *et al.*, 2010). Segundo a Liga Internacional Contra a Epilepsia (ILAE), a epilepsia é considerada uma doença encefálica que faz com que o indivíduo afetado possua uma tendência a ter crises epiléticas espontâneas e recorrentes (FISHER *et al.*, 2014), sendo estas crises caracterizadas por transitórios sinais ou sintomas decorrentes de descargas neuronais excessivas ou síncronas no encéfalo (FISHER *et al.*, 2005).

No ano de 2014 a ILAE definiu a epilepsia, que antes era considerada uma desordem, como sendo uma doença, para melhor enfatizar aos pacientes e a sociedade da importância e do impacto desta doença (FALCO-WALTER *et al.*, 2018; FISHER *et al.*, 2014). Pessoas com epilepsia sofrem com muitos problemas cognitivos, emocionais e psicológicos em seu cotidiano como, por exemplo, sintomas depressivos, problemas de memória, ansiedade e uma baixa qualidade de vida. Assim, o tratamento farmacológico é considerado o fator que mais frequentemente é capaz de diminuir muitos desses problemas (QUINTAS *et al.*, 2012).

Os fármacos antiepiléticos (FAE) proporcionam um alívio dos sintomas relacionados a epilepsia, pois são responsáveis por prevenirem a ocorrência de crises (KAMINSKI *et al.*, 2014). Aproximadamente 34 FAE já foram prescritos para o tratamento de crises epiléticas no último século (JACOB; NAIR, 2016). Porém, apesar das várias opções de FAE disponíveis no mercado, 30 % dos pacientes epiléticos continuam sendo refratários a todos os tratamentos (WAHAB *et al.*, 2010).

Uma das possíveis explicações para a susceptibilidade e refratariedade de muitos pacientes, são as variações regionais na circuitaria encefálica e as propriedades celulares que diferem entre cada indivíduo (WAHAB *et al.*, 2010). Além disso, existem muitos fatores de risco para o desenvolvimento da epilepsia, que podem variar desde lesões encefálicas, síndromes genéticas, tumores encefálicos, infecções, entre outros (SINGH; TREVICK, 2016).

A classificação da epilepsia leva em consideração que a doença possui diversos tipos de crises (por exemplo: motoras ou não-motoras), comorbidades (por exemplo: depressão ou perda de memória), o fato de algumas serem associadas a síndromes epiléticas (por exemplo: a síndrome de Lennox-Gastaut), além de levar em conta a etiologia da doença, ou seja, o que desencadeou a epilepsia (FALCO-WALTER *et al.*,

2018; FISHER *et al.*, 2017), como pode ser observado na Figura 1, adaptada da última classificação da ILAE.

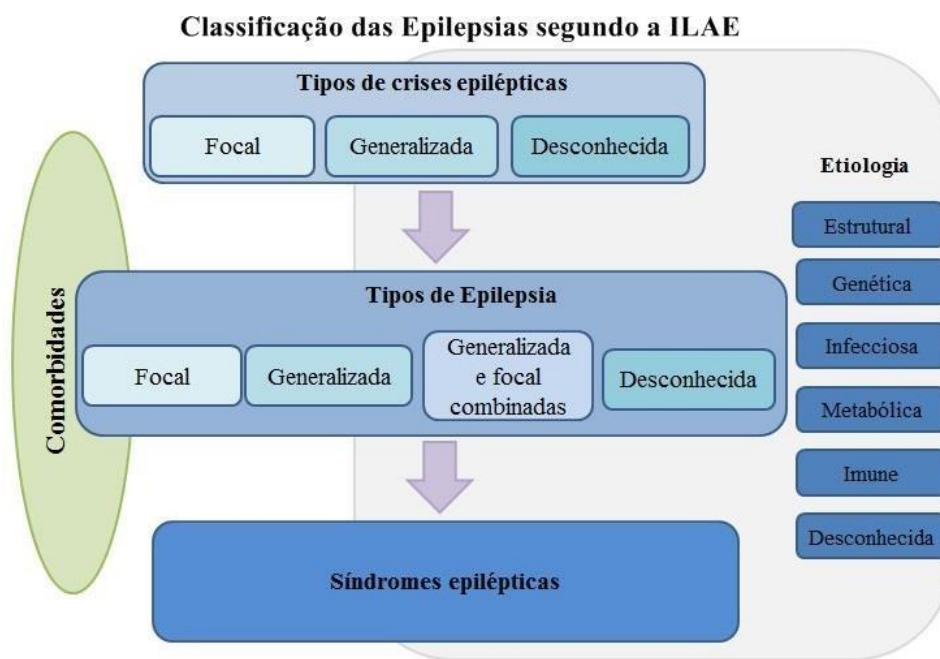


Figura 1: Classificação das Epilepsias, segundo ILAE 2017. Adaptado de Falco-Walter *et al.*, (2018).

Após o evento que desencadeia a primeira crise epiléptica, a circuitaria neuronal encefálica passa por mudanças que poderão, eventualmente, levar a uma condição de crises recorrentes e espontâneas, ou seja, a epilepsia (ROWLES; OLSEN, 2012). De fato, um indivíduo só é diagnosticado com epilepsia se ele apresentar: 1) pelo menos duas crises reflexas ou não provocadas dentro de um período de 24 horas; 2) uma crise reflexa ou não provocada, com a probabilidade de ocorrência de outra crise dentro dos próximos 10 anos; ou 3) uma síndrome epiléptica (FISHER *et al.*, 2014).

O processo de expansão e desenvolvimento de um tecido capaz de gerar crises epilépticas espontâneas e recorrentes é denominado epileptogênese (PITKANEN, 2010). O termo epileptogênese não se refere somente ao período entre o evento epileptogênico e o diagnóstico da epilepsia, mas também inclui os mecanismos de progressão que continuam ocorrendo mesmo após o diagnóstico da doença (PITKANEN *et al.*, 2015). Dentre os muitos mecanismos observados como potenciais responsáveis na progressão da epileptogênese, excluindo fatores genéticos, podem ser destacados o estresse oxidativo, processos inflamatórios, a morte neuronal e a

diminuição da atividade inibitória do sistema GABAérgico (sistema que libera o neurotransmissor Ácido Gama-Aminobutírico - GABA) (MAIO, 2014).

Um desequilíbrio nos sistemas excitatórios e inibitórios pode ser determinante na patogenia relacionada a epilepsia, pois gera perturbações nos mecanismos homeostáticos auto-regulatórios, como o sistema bioenergético mitocondrial (BOISON *et al.*, 2013; MAIO, 2014). Portanto, perdas ou disfunções na neurotransmissão GABAérgica liberam os neurônios excitatórios da inibição GABAérgica e facilitam a geração de crises epiléticas (CALCAGNOTTO *et al.*, 2010). De fato já foi demonstrado que o sistema GABAérgico está alterado em modelos experimentais e pacientes com epilepsia (ARELLANO *et al.*, 2004; CALCAGNOTTO *et al.*, 2005; KOBAYASHI; BUCKMASTER, 2003).

Um das formas de epilepsia adquirida que mais se destaca é a epilepsia do lobo temporal (ELT), pois é a forma mais comum de epilepsia refratária. A ELT ocorre geralmente após alguma forma de lesão encefálica como, por exemplo, uma crise epilética decorrente de uma febre alta durante a infância, hipóxia, infecção ou trauma (PEARSON-SMITH; PATEL, 2017; ROWLEY; PATEL, 2013). As manifestações sintomáticas da ELT somente aparecem após um dano irreversível, decorrente da perda neuronal, já ter se espalhado para áreas como o hipocampo e o córtex entorrinal, fazendo com que os pacientes geralmente sejam refratários aos tratamentos disponíveis (MAIO, 2014; ROWLEY; PATEL, 2013).

O estresse oxidativo e a morte neuronal tem ganhado uma grande atenção como sendo os fatores que ligam uma lesão encefálica inicial com a condição epilética, dentre as epilepsias adquiridas (PATEL, 2004; PAULETTI *et al.*, 2017). Tem sido sugerido que, em epilepsias pós-traumáticas, a ocorrência de uma hemorragia intracraniana faz com que reações mediadas por íons Ferro, presentes no sangue, levem a uma produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que levarão a uma excitabilidade neuronal elevada, causando a morte neuronal (MARTINC *et al.*, 2012). Por isso, a morte neuronal pode ser considerada tanto a causa, como a consequência de algumas crises epiléticas (PATEL, 2004). Mais detalhes sobre o papel do estresse oxidativo no desenvolvimento de lesões associadas a epilepsia serão discutidos mais adiante.

Para que os complexos mecanismos da epileptogênese e a geração de crises epiléticas na ELT, e outras formas de epilepsia, possam ser entendidas por completo a utilização de modelos animais é essencial (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2014). Além

disso, uma maior variedade de modelos animais pode permitir que novos FAE, que sejam eficazes em alguns pacientes refratários, possam ser descobertas no futuro (LÖSCHER, 2017).

1.1. Modelos animais

Como discutido anteriormente, a epilepsia pode ser classificada em diversos tipos, dependendo das manifestações comportamentais decorrentes das crises, das comorbidades dos pacientes, da etiologia da doença e também da presença de síndromes epiléticas. Levando em consideração a grande heterogeneidade dessa doença, não é possível encontrar um modelo animal que seja capaz de representar completamente todas as formas da epilepsia (GRONE; BARABAN, 2015).

Atualmente existem diversos modelos animais conhecidos para o estudo da epilepsia e de crises epiléticas. Esses modelos podem ser divididos em diversas categorias como, por exemplo, modelos de crises de ocorrência espontânea ou induzida, modelos de crises agudas (somente uma crise epilética) ou crônicas (crises recorrentes), modelos com crises epiléticas motoras ou não-motoras, dentre outros (LÖSCHER, 2011). Por muito tempo o termo “convulsão” foi utilizado como sinônimo de crises epiléticas motoras generalizadas, porém, segundo Fisher *et al.*, (2017), esse termo não está mais sendo utilizado na classificação de crises da ILAE por ser um termo ambíguo, popular e não oficial.

Diferentes compostos que induzem crises epiléticas podem ser utilizados na busca por novos FAE, pois irão levar a diferentes formas de crises (KANDRATAVICIUS *et al.*, 2014). A 4-aminopiridina (4-AP) é um fármaco utilizado para induzir crises epiléticas agudas, através do bloqueio de correntes do tipo A (I_A) e do tipo D (I_D) dos canais de Potássio (K^+) (FUETA; AVOLI, 1992; WAHAB *et al.*, 2010). As I_A dos canais de K^+ são de grande importância para a regulação da excitabilidade neuronal e alguns estudos demonstraram que em pacientes que sofrem de ELT refratária, devido a uma mutação genética, a expressão de algumas subunidades dos canais de K^+ está diminuída, levando a um hiperexcitabilidade neuronal, causada pela diminuição das I_A (MYERS *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2006). Portanto, a indução de crises epiléticas através do modelo de 4-AP torna-se importante para mimetizarmos disfunções nos canais de K^+ .

Já a Picrotoxina (PTX) é um composto derivado de plantas capaz de gerar crises epiléticas através de sua ação nos receptores GABA_A, o principal sistema de neurotransmissão inibitória do sistema nervoso (OLSEN, 2006). A PTX é capaz de modular um sítio alostérico do receptor GABAérgico, induzindo mudanças conformacionais no canal que impedem a condutância de íons Cloreto (Cl⁻), portanto inibindo a ação do neurotransmissor GABA (KORSHOEJ *et al.*, 2010). Algumas formas de epilepsia genética têm sido ligadas a mutações nos receptores GABA_A. Essas mutações são responsáveis por diminuir a expressão desses receptores na superfície da membrana neuronal, portanto diminuindo a resposta inibitória do neurotransmissor GABA (CHEN *et al.*, 2017) e, como já discutido anteriormente, uma diminuição ou perda na inibição neuronal facilita a ocorrência de crises epiléticas.

É através da utilização desses e outros modelos animais que se tornou possível a ação de simular as diversas disfunções nos sistema de excitação e inibição neuronal, sendo elas causas ou consequências das crises epiléticas. Além disso, os modelos animais também permitem a avaliação de substâncias com potencial para diminuir ou inibir efeitos danosos causados pela atividade neuronal excessiva, como por exemplo, a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, que levarão a um estresse oxidativo e, possivelmente, a morte neuronal.

1.2. Estresse oxidativo

O encéfalo acometido pela epilepsia é caracterizado por possuir grandes alterações homeostáticas, tais alterações podem ser as causas e/ou consequências do estado epilético (BOISON; STEINHÄUSER, 2018). Tem sido observado que durante o período ictal, ou seja, durante uma crise epilética, ocorre um aumento no metabolismo energético, assim como um aumento do fluxo sanguíneo para a área ipsilateral ao foco epilético (BOISON; STEINHÄUSER, 2018; CORNFORD *et al.*, 2002; DURING *et al.*, 1994). Enquanto que, após as crises epiléticas, uma diminuição no metabolismo energético e no aporte sanguíneo para a área do foco epilético é observado (MCDONALD; BORGES, 2017; SHELLY *et al.*, 2017).

A redução do metabolismo observada no foco epilético após as crises pode sugerir que a capacidade bioenergética mitocondrial daquele circuito tenha sido esgotada, ou então, pode ser atribuído a disfunções mitocondriais (ROWLEY; PATEL, 2013). As mitocôndrias possuem diversas funções celulares que podem apresentar um impacto

direto e/ou indireto na excitabilidade neuronal como, por exemplo, a geração de Adenosina Trifosfato (ATP), a biossíntese de neurotransmissores, a homeostase de Cálcio (Ca^{2+}), controle da morte celular, além de serem um dos principais locais de produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) (KOVAC *et al.*, 2017; ROWLEY; PATEL, 2013).

A mitocôndria é formada por uma membrana interna e uma externa. O processo de síntese de ATP ocorre na membrana interna da mitocôndria, através da doação de elétrons gerados no Ciclo de Krebs. Esses elétrons passam por complexos moleculares denominados Cadeia Transportadora de Elétrons. Simultaneamente, prótons são transferidos por entre a membrana interna através dos complexos I, III e IV para estabelecer um potencial de membrana, que o complexo V aproveita para formar a ATP. Uma pequena porção de elétrons escapa da cadeia transportadora de elétrons como íons superóxido (O_2^-) que levam a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e, conseqüentemente, do radical hidroxila (OH) (Figura 2) (INOUE *et al.*, 2003; JONES, 2006; TURRENS, 2003; VAN HOUTEN *et al.*, 2006).

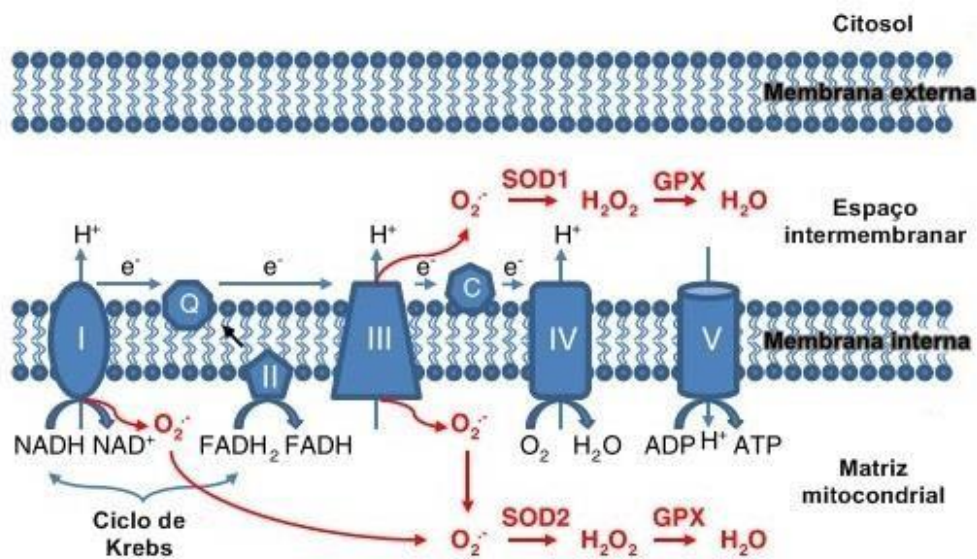


Figura 2: Produção e enzimas associadas na catálise de espécies reativas de oxigênio (EROs) na mitocôndria. Adaptado de Li *et al.*, (2013)

O H_2O_2 , o O_2^- , a OH e outras espécies reativas de oxigênio (EROs) são produzidas tanto por reações enzimáticas, quanto por reações não enzimáticas, como consequência de um metabolismo aeróbico (TURRENS, 2003). Sob condições fisiológicas normais as EROs possuem papéis importantes na sinalização celular, porém quando produzidas

em excesso podem levar a um estado de estresse oxidativo (AGUIAR *et al.*, 2012; VALKO *et al.*, 2007). “Estresse oxidativo” é uma expressão utilizada para descrever vários processos resultantes de uma produção excessiva de EROs e uma limitada defesa antioxidante, que irão danificar ou até mesmo causar a morte da célula (TURRENS, 2003).

O O_2^- é um radical livre e, por possuir um elétron não pareado em sua última camada da eletrosfera, é consideravelmente reativo e propenso a reações químicas, sendo que a principal produção de O_2^- ocorre pelo vazamento de elétrons dos complexos mitocondriais I e III (VALKO *et al.*, 2007). Quando produzido em excesso ou devido a falta de enzimas antioxidantes o H_2O_2 pode reagir com íons ferro (Fe^{2+}) e acabar produzindo a OH, um forte oxidante, além de outros compostos que irão danificar macromoléculas dentro das mitocôndrias, incluindo lipídios, proteínas e o próprio DNA (TURRENS, 2003; VAN HOUTEN *et al.*, 2006; VOSS *et al.*, 2008).

A peroxidação lipídica, ou seja, a reação entre EROs e os lipídeos de membranas, leva a produção de Malondialdeído (MDA). O MDA afeta a troca de íons através da membrana das células, levando a uma permeabilidade iônica alterada, assim como causa disfunções nas atividades enzimáticas. O MDA também pode reagir com o DNA, portanto altos níveis desse composto podem ser mutagênicos, genotóxicos e carcinogênicos. Por ser o produto mais importante da peroxidação lipídica, a quantificação de MDA é utilizada muitas vezes como na avaliação de parâmetros oxidativos (GULER *et al.*, 2016).

As proteínas podem sofrer alterações em suas estruturas primárias, secundárias e terciárias e uma elevada suscetibilidade proteolítica após a exposição a EROs, sendo que suas cadeias de aminoácidos são especialmente propensas a várias formas de oxidação, reversíveis ou irreversíveis, que acabarão levando a um funcionamento inadequado dessas proteínas. A aconitase mitocondrial e o complexo mitocondrial I estão entre as proteínas já conhecidas por sofrerem modificações pós-transducionais ou mesmo serem inibidas pelas EROs durante o processo da epileptogênese (JARRETT *et al.*, 2008; ROWLEY; PATEL, 2013; RYAN *et al.*, 2012).

As aconitases são proteínas que contêm agregados de ferro (Fe) e enxofre (S) e são encontradas tanto nas mitocôndrias, quanto no citosol das células. A presença de agregados de Fe-S no sítio ativo dessas proteínas é essencial para a sua atividade catalítica, porém as torna altamente vulnerável a EROs (HAN *et al.*, 2005). As aconitases são extremamente propensas a serem inativadas pela oxidação por O_2^- , sendo

que tal oxidação promove uma instabilidade em seus agregados de Fe-S e a consequente perda de átomos de Fe e formação de H_2O_2 (CANTU *et al.*, 2009), levando a um ciclo de produção de EROs induzida por EROs.

Durante o processo de epileptogênese o complexo mitocondrial I também pode ser alvo de modificações oxidativas, sendo que tais modificações podem diminuir ou até mesmo inibir as funções deste complexo (RYAN *et al.*, 2012). Kudin *et al.*, (2002) e Jarrett *et al.*, (2008), demonstraram que a atividade epiléptica causada pela administração de pilocarpina e cainato em ratos pode causar uma grande redução no DNA mitocondrial, o que leva a uma redução na atividade dos complexos mitocondriais I e IV em neurônios hipocâmpais. Deficiências no complexo mitocondrial I já foram encontradas no foco epiléptico de humanos com epilepsia do lobo temporal, e tais deficiências podem ter contribuído para a morte de neurônios piramidais ocorrida naquela região hipocâmpal (KUNZ *et al.*, 2000).

Reduções na atividade de complexos mitocondriais podem gerar deficiências no metabolismo energético neuronal. Visto que o controle interno de íons e, conseqüentemente o potencial da membrana neuronal, é controlado pela Na^+/K^+ ATPase, uma redução na produção de ATP tornaria os neurônios mais excitáveis, contribuindo para uma maior susceptibilidade a crises epiléticas (KUDIN *et al.*, 2002; PATEL, 2004; ROWLEY; PATEL, 2013). Além disso, as mitocôndrias também são importantes sequestrantes de Ca^{2+} . Essa captação de Ca^{2+} é importante para muitas funções celulares, porém uma prolongada elevação na concentração intramitocondrial de Ca^{2+} leva a morte neuronal por apoptose (KUDIN *et al.*, 2002; PATERGNANI *et al.*, 2011).

Uma das formas pela qual as mitocôndrias são capazes de induzir a apoptose é através da presença de uma transição de permeabilidade mitocondrial. Essa permeabilização ocorre pela abertura de grandes poros não seletivos que possibilitam a entrada tanto de solutos de carga positiva, quanto de carga negativa pela membrana interna das mitocôndrias (KOWALTOWSKI *et al.*, 2001; QIAN *et al.*, 1997). A presença de EROs e de grandes concentrações de Ca^{2+} são capazes de induzir a abertura dos poros ligados a transição de permeabilidade mitocondrial (YUSUF *et al.*, 2018) que, após abertos, levam a expansão das mitocôndrias até o ponto em que ocorre a ruptura da membrana externa e, conseqüentemente, a liberação de moléculas como o citocromo c, caspase 9 e o fator indutor de apoptose, causando assim a morte da célula (BHAT *et al.*, 2015; GREEN; REED, 1998).

Como a morte neuronal pode ser um importante fator que contribui para a epileptogênese, mecanismos que influenciam a viabilidade neuronal, como o estresse oxidativo, também podem contribuir para a epileptogênese (PATEL, 2004). Apesar de a exata função das EROs na epilepsia não ter sido definida, tem sido observado que repetidas crises epiléticas levam a um aumento nos níveis de EROs e a consequente morte neuronal (CHUANG *et al.*, 2009; COCK *et al.*, 2002; KUNZ *et al.*, 2000; RONG *et al.*, 1999; WALDBAUM *et al.*, 2010).

A manutenção do balanço entre os efeitos benéficos e maléficos das EROs é muito importante para todos os organismos vivos. Quando a produção de EROs está muito elevada ou as defesas antioxidantes estão muito baixas, um mecanismo de “sinalização redox” é ativado. Essa sinalização é responsável por induzir respostas protetoras contra danos oxidativos após uma exposição a EROs (WULF, 2002). Os mecanismos celulares de proteção contra os possíveis efeitos deletérios de um dano oxidativo incluem defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas (WANG; HAI, 2016), como será descrito a seguir.

1.3. Antioxidantes

Para evitar que os radicais livres possam causar danos celulares, os organismos desenvolveram diversos mecanismos de defesa. Os mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo gerado por radicais livres incluem mecanismos de prevenção, mecanismos de reparo, defesas físicas e defesas antioxidantes (VALKO *et al.*, 2007). Antioxidantes são moléculas capazes de “sequestrar” as EROs no momento em que são produzidas para então neutralizá-las. As defesas antioxidantes podem ser de origem enzimática ou não enzimática (AGUIAR *et al.*, 2012).

As defesas antioxidantes enzimáticas incluem as enzimas Catalase (CAT), Superóxido Dismutase (SOD) e Glutaciona Peroxidase (GPx). Enquanto que as defesas não enzimáticas são representadas por moléculas como a Vitamina C, Vitamina E, carotenoides, flavonoides, glutaciona, ferritina, melatonina, albumina, entre outros (MIRONCZUK-CHODAKOWSKA *et al.*, 2018; VALKO *et al.*, 2007). Todas as enzimas antioxidantes são codificadas pelo genoma nuclear e após o processo de tradução dessas enzimas, as mesmas são transportadas até as mitocôndrias. Já as moléculas antioxidantes podem ser produzidas endogenamente ou adquiridas através da alimentação (LI *et al.*, 2013; MIRONCZUK-CHODAKOWSKA *et al.*, 2018).

A enzima SOD é responsável por catalisar O_2^- em H_2O_2 . Foram identificadas três isoformas dessa enzima, sendo elas SOD1, SOD2 e SOD3. A SOD1 encontra-se amplamente distribuída pelo núcleo, citoplasma da célula e no espaço intermembranar da mitocôndria. Já a SOD2 é encontrada somente na matriz mitocondrial, enquanto que SOD3 é encontrada no espaço extracelular (LI *et al.*, 2013; OKADO-MATSUMOTO; FRIDOVICH, 2001).

Após o O_2^- ser catalisado em H_2O_2 , a enzima CAT vai ser responsável por reduzir H_2O_2 em água (H_2O) e uma molécula de oxigênio (AGUIAR *et al.*, 2012). A enzima GPx também é responsável pela redução de H_2O_2 em H_2O , porém através de outra reação, que utiliza uma molécula de glutathiona reduzida para produzir duas moléculas de água como produto da sua reação (VENDITTI; DI STEFANO; DI MEO, 2013).

Estudos têm demonstrado que as defesas antioxidantes de pacientes com epilepsia, mesmo em tratamento com FAE, estão prejudicadas e, conseqüentemente, elevados níveis de produção de EROs foram encontrados. Nesses pacientes, foram detectados níveis reduzidos de atividade das enzimas SOD e CAT e elevados níveis de peroxidação lipídica e de degradação de proteínas (GULER *et al.*, 2016; MENON *et al.*, 2012). Além disso, após a primeira crise epiléptica, níveis aumentados de oxidação de proteínas, lipídeos e de DNA já foram encontrados no plasma de humanos (MENON *et al.*, 2012), demonstrando que as defesas antioxidantes do organismo não conseguem conter a alta produção de EROs desde as primeiras crises, levando então a um estresse oxidativo.

O uso de compostos antioxidantes já foi avaliado em diversos modelos animais com as crises epilépticas sendo induzidas por diferentes compostos e resultados promissores foram descobertos. Foi possível observar efeitos protetores na manifestação das crises epilépticas, assim como em marcadores de estresse oxidativos (para mais detalhes sobre os modelos animais e antioxidantes testados ver Devi *et al.*, (2008)).

Uma opção viável para pacientes que sofrem de epilepsia seria a ingestão de compostos antioxidantes através da alimentação ou como adjuvantes em seu tratamento. De fato, o uso de antioxidantes no tratamento da epilepsia parece ser bem promissor, pois, mesmo se o uso de antioxidantes não for capaz de proteger completamente os danos causados pela doença, ele poderia ser capaz de diminuir a severidade e frequência das crises (ROWLES; OLSEN, 2012).

1.4. Ácido Rosmarínico

Devido à habilidade que as plantas medicinais têm de sintetizar uma grande variedade de compostos químicos (alcaloides, polifenóis, terpenoides, etc.), tanto para o seu desenvolvimento, quanto para sua proteção, elas ganharam grande interesse da indústria farmacêutica (EL ALAOUI *et al.*, 2017). Dentre os compostos naturais, os polifenóis tem atraído uma considerável atenção, devido ao fato de muitos estudos terem demonstrado o efeito neuroprotetor, através da capacidade antioxidante dos mesmos (SCALBERT *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2008).

O Ácido Rosmarínico (AR) é um composto polifenólico, sendo um éster formado pelo ácido cafeico e ácido 3,4-dihidroxifenilático (FACHEL *et al.*, 2019; PETERSEN; SIMMONDS, 2003) (Figura 3). O AR foi inicialmente isolado e descrito a partir do Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) por Scarpati; Oriente, (1958), mas atualmente sabe-se que esse composto está presente em 39 famílias de plantas, dentre elas muitas espécies das famílias Lamiaceae e Boraginaceae (PETERSEN, 2013).

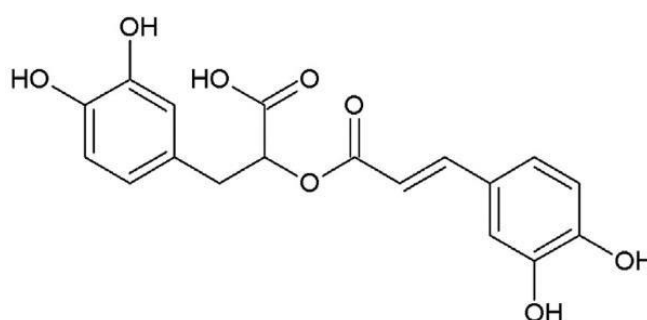


Figura 3: Estrutura química do Ácido Rosmarínico.

Dentre as muitas capacidades já conhecidas do AR estão a sua atividade antioxidante, anti-inflamatória, antiapoptótica, antimutagênica, neuroprotetora e antidepressiva, além de ser capaz de proteger o DNA de danos induzidos pelo estresse oxidativo, através do aumento na expressão de genes de reparo (COELHO *et al.*, 2015; JIN *et al.*, 2013; KHAMSE *et al.*, 2015; RIZK *et al.*, 2017; ROCHA *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2008).

A capacidade antioxidante do AR já foi alvo de muitos estudos. Em um desses estudos, Pérez-Fons *et al.*, (2010) demonstraram que o AR, dentre outros compostos presentes no Alecrim, possui a capacidade de proteger membranas celulares do estresse

oxidativo. O AR possui essa capacidade, devido ao seu efeito de estabilizar membranas lipídicas e impedir a propagação de radicais livres, através da doação de seus elétrons livres.

O AR também se mostrou efetivo na prevenção de morte neuronal induzida por apoptose em um modelo animal de ELT induzido por Cainato (KHAMSE *et al.*, 2015). Além disso, nesse mesmo estudo foi demonstrado que a administração de 10 mg/kg por dia, durante 6 semanas, é capaz de diminuir os níveis de peroxidação lipídica gerado pelas crises epiléticas. Gao *et al.*, (2005) também demonstraram que o AR é capaz de diminuir os níveis de MDA, indicador de peroxidação lipídica, e de EROs em astrócitos, aumentando assim a sobrevivência de mitocôndrias, portanto diminuindo o estresse oxidativo.

Em relação à genotoxicidade do AR, esse composto demonstrou não causar dano ao DNA de tecidos encefálicos de ratos Wistar (PEREIRA *et al.*, 2005), pelo contrário, demonstrou ser capaz de proteger o DNA e a quebra de cromossomos induzida por agentes químicos (FURTADO *et al.*, 2010). Apesar de não estar completamente elucidado, acredita-se que o efeito antígeno-tóxico encontrado por Furtado e colaboradores, esteja ligado a capacidade antioxidante do AR.

Além disso, Rizk *et al.*, (2017) associaram as propriedades antioxidante, antiapoptótica, e anti-inflamatória do AR a sua capacidade de diminuir os níveis da citocina pró-inflamatória TNF- α (Fator de Necrose Tumoral Alfa) e de outros biomarcadores de estresse oxidativo, induzidos pelo agente quimioterápico Doxorrubicina, demonstrando assim um importante efeito neuroprotetor. O efeito neuroprotetor do AR também foi demonstrado por Coelho *et al.*, (2015), onde esse composto foi capaz de diminuir o dano ao DNA e os danos causados pelo estresse oxidativo gerados por crises epiléticas induzidas por pentilenotetrazol.

O exato mecanismo de ação do AR ainda não está claro, porém seu efeito neuroprotetor contra danos causados pelo estresse oxidativo parece ser resultado de sua potente atividade antioxidante. Além disso, o efeito antiepilético do AR, encontrado por Coelho *et al.*, (2015) e Grigoletto *et al.*, (2016) também não teve seus mecanismos elucidados. Porém, estudos recentes tem demonstrado que o AR pode estar agindo através do sistema GABAérgico, inibindo a GABA Transaminase (GABA T), enzima que degrada o neurotransmissor, e aumentando a expressão de algumas subunidades do receptor GABA_A e das enzimas GAD₆₅ e GAD₆₇, envolvidas da síntese desse neurotransmissor (AWAD *et al.*, 2009; KWON *et al.*, 2017). Outro mecanismo de ação

do AR recentemente descoberto é a modulação de canais de Ca^{2+} do tipo T (CCTT) ativados em baixas voltagens (EL ALAOUI *et al.*, 2017).

Os CCTT podem ser ativados por pequenas despolarizações na membrana neuronal e possuem importantes funções na regulação da concentração intracelular de Ca^{2+} . Esses canais possuem uma ativação rápida e uma desativação lenta, sendo amplamente expressos no encéfalo e em tecidos periféricos e disfunções ou mutações nesses canais têm sido ligadas a doenças como a epilepsia, por isso moléculas capazes de bloquear os CCTT podem ser de grande utilidade terapêutica (PEREZ-REYES, 2003; POWELL *et al.*, 2013).

Podemos classificar os CCTT em três subtipos, sendo eles Cav3.1, Cav3.2 e Cav3.3 (POWELL *et al.*, 2013). Em seu trabalho, El Alaoui *et al.*, (2017) demonstraram que o AR é capaz de inibir os CCTT do tipo Cav3.2 de forma dependente de concentração e que a sua ação ocorre durante o estado de inativação desses canais, estabilizando-os em seu estado inativo. Isso demonstra um interessante mecanismo pelo qual o AR é capaz de diminuir a excitabilidade neuronal e a concentração de Ca^{2+} intracelular, agindo assim como neuroprotetor e tendo um importante papel na inibição de crises epiléticas.

Levando em consideração a literatura acima citada, que demonstra os potenciais efeitos benéficos do AR como um importante antioxidante, antígeno tóxico, antiapoptótico, anti-inflamatório e neuroprotetor, além do seu potencial efeito em inibir crises epiléticas, esse trabalho visou avaliar o efeito neuroprotetor do AR em modelos animais de crises epiléticas induzidas por 4-aminopiridina e picrotoxina.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o perfil farmacológico e neuroprotetor do Ácido Rosmarínico através de diferentes modelos de crises epiléticas agudas, parâmetros bioquímicos e função mitocondrial.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar o efeito do Ácido Rosmarínico sobre crises epiléticas induzidas por picrotoxina;

2.2.2. Avaliar o efeito do Ácido Rosmarínico sobre crises epiléticas induzidas por 4-aminopiridina;

2.2.3. Analisar parâmetros bioquímicos (produção de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica, dano ao DNA e a atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase) em ambos os modelos de crises epiléticas;

2.2.4. Analisar a atividade dos complexos mitocondriais (complexo I-III e II) em ambos os modelos de crises epiléticas.

3. RESULTADOS

3.1. Artigo – Rosmarinic acid improves oxidative stress parameters and mitochondrial activity following 4-aminopyridine and picrotoxin-induced seizure in mice. *Jordana Griebler Luft¹, Luiza Steffens², Ana Moira Morás², Mateus Strucker da Rosa³, Guilhian Leipnitz^{3,4}, Gabriela Gregory Regner¹, Pricila Fernandes Pflüger¹, Débora Gonçalves¹, Dinara Jaqueline Moura², Patrícia Pereira^{1*}*

Publicado na revista Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.



Rosmarinic acid improves oxidative stress parameters and mitochondrial respiratory chain activity following 4-aminopyridine and picrotoxin-induced seizure in mice

Jordana Griebler Luft¹ · Luiza Steffens² · Ana Moira Morás² · Mateus Strucker da Rosa³ · Guilhian Leipnitz^{3,4} · Gabriela Gregory Regner¹ · Pricila Fernandes Pflüger¹ · Débora Gonçalves¹ · Dinara Jaqueline Moura² · Patrícia Pereira¹

Received: 1 March 2019 / Accepted: 7 June 2019 / Published online: 14 June 2019
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

Studies have indicated that epilepsy, an important neurological disease, can generate oxidative stress and mitochondrial dysfunction, among other damages to the brain. In this context, the use of antioxidant compounds could provide neuroprotection and help to reduce the damage caused by epileptic seizures and thereby the use of anticonvulsant drugs. Rosmarinic acid (RA) is an ester of caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid that prevents cell damage caused by free radicals, acting as an antioxidant. It also presents anti-inflammatory, antimutagenic, and antiapoptotic properties. In this work, we used two models of acute seizure, 4-aminopyridine (4-AP) and picrotoxin (PTX)-induced seizures in mice, to investigate the anticonvulsant, antioxidant, and neuroprotective profile of RA. Diazepam and valproic acid, antiepileptic drugs already used in the treatment of epilepsy, were used as positive controls. Although RA could not prevent seizures in the models used in this study, neither enhance the latency time to first seizure at the tested doses, it exhibited an antioxidant and neuroprotective effect. RA (8 and 16 mg/kg) decreased reactive oxygen species production, superoxide dismutase activity, and DNA damage, measured in hippocampus, after seizures induced by PTX and 4-AP. Catalase activity was decreased by RA only after seizures induced by 4-AP. The activity of the mitochondrial complex II was increased by RA in hippocampus samples after both seizure models. The results obtained in this study suggest that RA is able to reduce cell damage generated by the 4-AP and PTX seizures and therefore could represent a potential candidate in reducing pathophysiological processes involved in epilepsy.

Keywords 4-aminopyridine · Mitochondrial respiratory chain · Oxidative stress · Picrotoxin · Rosmarinic acid · Seizure

Introduction

Epilepsy is a neurological disease that causes a high predisposition to seizures, which are transient occurrence of signs and/or symptoms due to abnormal excessive or synchronous neuronal activity in the brain (Fisher et al. 2014, 2005). The existence of more than 30 antiepileptic drugs (AEDs) offers a wide choice of treatments to more than 65 million people affected by this serious disease (Jacob and Nair 2016; Ngugi et al. 2010). Unfortunately, around 20–30% of patients do not respond to medication, making it necessary to search for new drugs which can be effective in the treatment of refractory patients and trigger few adverse effects (Wahab et al. 2010).

Studies have shown that prolonged epileptic seizures induce mitochondrial dysfunctions and oxidative stress, as well as increase brain susceptibility to further injury, such as DNA

✉ Patrícia Pereira
patriciapereira@ufrgs.br

¹ Neuropharmacology and Preclinical Toxicology Laboratory, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil

² Laboratory of Genetic Toxicology, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA), Sarmiento Leite st., Porto Alegre, RS 245, Brazil

³ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS 90035-003, Brazil

⁴ Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS 90035-190, Brazil

damage (Patel 2004; Rowley and Patel 2013). The use of antioxidants as adjuvants in the treatment of epilepsy has been evaluated because of its potential in protecting nervous cells from these damaging processes, as well as reducing the severity and frequency of seizures (Martinc et al. 2014). Therefore, administration of antioxidants would have the benefit of decreasing the use and dose of antiepileptic drugs, causing the reduction of their adverse effects, and thus, leading to a better quality of life of these patients (Rowles and Olsen 2012).

Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) directly drive pro-inflammatory cytokine production which, in turn, increases ROS, amplifying the inflammatory response (Li et al. 2013). This suggests that refractory epilepsy may partly result from a pathologic cycle of inflammation and seizures, where upon inflammatory factors, and specifically microglial activation and proliferation, provoke seizures that consecutively activate and sustain immune processes (Devinsky et al. 2013; Najjar et al. 2011).

Rosmarinic acid (RA) is an ester of caffeic acid and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid. It was initially isolated from *Rosmarinus officinalis* (Lamiaceae), but it is also present in many species of the Lamiaceae and Boraginaceae families. Among the known biological activities of RA are the ability to prevent cell damage caused by free radicals, acting as an antioxidant, and to exert anti-inflammatory, antimutagenic, antiapoptotic, antibacterial, and antiviral activities (Rocha et al. 2015; Coelho et al. 2015, 2016; Rizk et al. 2017; Fachel et al. 2019).

Recently, our research group showed that RA has remarkable antioxidant activity in N9 microglial cells. It attenuated the expression of the iNOS marker from the microglia activation state M1 and the levels of proinflammatory factors, including TNF- α , IL-1 β , and IL-6. RA also increased the expression of the Arg-1 marker of the microglia activation state M2 and inhibited, at least in part, ROS generation and loss of mitochondrial outer membrane permeabilization through the inhibition of cleaved caspase-3 activation (Coelho et al. 2017). These findings suggest that RA can minimize the increase of free radicals in epileptogenesis.

Rizk et al. (2017) showed that RA is able to protect against doxorubicin-induced neurotoxicity, probably due to its antioxidant, anti-inflammatory, and antiapoptotic properties, whereas Gok et al. (2018) confirmed the neuroprotective effect of RA by assessing its effect on the Alzheimer's disease model induced by administration of A β 42 peptide. The latter suggests that RA neuroprotection is due to its effects on the antioxidant-oxidant imbalance and cholinergic impairment, as it potentiates the antioxidant action and reduces the lipid peroxidation. In addition, using a model of Parkinson's disease, previous study demonstrated neuroprotective effect of RA against nigrostriatal neurodegeneration, probably by reducing the iron levels in

the black substance and regulating the expression of the apoptotic regulators Bcl-2/BAX (Wang et al. 2012).

Considering the previous data showing RA-induced beneficial effects both in animal models and in vitro studies, the aim of this work was to evaluate the effects of this phenolic compound in 4-aminopyridine (4-AP) and picrotoxin (PTX)-induced seizures in mice. Parameters of oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and DNA damage were also evaluated in hippocampal samples.

Materials and methods

Animals

To carry out the study, 138 CF1 male mice (2–3 months old, 30–40 g) obtained from the Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS) nursery were used. Mice were housed in plastic cages (five per cage), with water and food ad libitum, under a 12-h light/dark cycle (lights on at 8:00 AM) and at a constant temperature of 23 ± 2 °C. Before the experiments, the mice were left in an adaptive period for nearly 2 weeks to avoid stress.

The experimental procedures were carried out in accordance with the national and international legislation (Guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation—CONCEA—and EU Directive 2010/63/EU for animal experiments), with the approval of the Committee on the Ethical Use of Animals of Federal University of Rio Grande do Sul (authorization number 31722). All protocols were designed aiming to reduce the number of animals used to a minimum, as well as to minimize their suffering.

Drugs and pharmacological procedures

Picrotoxin, 4-AP, and RA were purchased from Sigma-Aldrich Co (St. Louis, MO, USA), Valproic acid (Depakene®) from Abbott Laboratory, Diazepam (Compaz®) from Cristália, and Tween80 from Dinâmica®. Saline was prepared before the experiments and the RA doses were dissolved in 5% Tween 80. Doses of DZP, PTX, 4-AP, and RA were chosen based on previous studies from our lab (Coelho et al. 2016; Pflüger et al. 2018). The injection volume used was 0.1 mL/10 g of the weight of the animal.

All experiments were carried out between 8 a.m. and 4 p.m. After behavioral tests, mice were decapitated, the brains were removed, and the hippocampus were dissected out on ice for subsequent biochemical analysis (comet assay, evaluation of free radical levels, superoxide dismutase, catalase activity, and the enzymatic activities of the mitochondrial respiratory chain complexes I-III and II). Hippocampus were placed in 0.5-mL vial bottles and stored at -80 °C.

To conduct the behavioral experiments, animals were divided into eight groups that received two administrations as described below: Sal/4-AP, Sal/PTX, valproic acid/4-AP, diazepam/PTX, RA 8 mg/kg/4-AP, RA 16 mg/kg/4-AP, RA 8 mg/kg/PTX, RA 16 mg/kg/PTX. Diazepam (DZP) and valproic acid (VPA) were used as positive controls in the behavioral tests. To perform the seizure-induction tests, we used a total of 16 animals per group. Furthermore, two Sal/Sal groups were used as negative controls for the biochemical assays and for the evaluation of mitochondrial complexes activity (five animals per group).

Thirty minutes after treatment with saline, DZP, VPA, or RA, the animals received injections of the seizure inductors 4-AP (13 mg/kg) or PTX (5 mg/kg). Then, they were placed individually in acrylic observation chambers and evaluated for 30 min (4-AP-seizure induction test) or 60 min (PTX-seizure induction test).

The seizures were rated using a modified Racine scale. Latency to first seizure (LFS) and the percentage of occurrence of clonic forelimb seizures (CFS) longer than 3 s (stage 3 in the modified Racine scale) was used to evaluate the PTX-induced seizure. LFS and the percentage of occurrence of tonic-clonic seizures (TCS) (stage 4 in the modified Racine scale) were used to evaluate the 4-AP-induced seizure.

Measurement of oxidative stress parameters

Hippocampus was vigorously vortexed in lysis buffer (Tris-HCl 50 mM plus phenylmethylsulfonyl fluoride 1%), left to rest for 30 min, submitted to six 30-s ice/vortex cycles, and then centrifuged for 5 min at 16,000 rpm. The supernatant was used for the assays, and all procedures were performed under cold conditions. The supernatant was also used to determine the protein concentration in according to the method described by Lowry et al. (1951) using serum bovine albumin as standard.

DCF oxidation

Hippocampus homogenates were mixed in 96-well dark plate with 20 μ M of 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H_2DCFDA) in PBS and incubated for 30 min at 37 °C. At the end of the incubation period, the fluorescence of the homogenates was measured on a SpectraMax M2^c Microplate Reader (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Sunnyvale, California). The excitation/emission wavelengths for DCF were 480/520 nm. Values of relative fluorescence units (RFU) were expressed as RFU mg protein⁻¹.

Superoxide dismutase and catalase activity

SOD activity was evaluated by quantifying the inhibition of superoxide-dependent autoxidation of epinephrine, verifying

the absorbance of the samples at 480 nm (Misra and Fridovich 1972). Briefly, hippocampus homogenates were incubated in 50 mM glycine buffer and 10 mM catalase. After that, epinephrine was added and the absorbance was immediately recorded every 36 s for 15 min at 480 nm in SpectraMax. One SOD unit is defined as the amount of SOD necessary to inhibit 50% of epinephrine autoxidation and the specific activity is reported as SOD U/mg protein.

CAT activity was assayed according to the method described by Aebi (1984), based on the disappearance of H_2O_2 at 240 nm in potassium phosphate buffer (KH_2PO_4 50 mM, Na_2HPO_4 50 mM, pH 7.0). After the addition of H_2O_2 , the absorbance is immediately recorded every 30 s for 5 min, using SpectraMax. One CAT unit is defined as 1.0 μ mole of hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity is calculated as the number of CAT U mg protein⁻¹.

TBARS

The lipid peroxidation was determined by the reaction of thiobarbituric acid (TBA) with malondialdehyde (MDA), a product formed by lipid peroxidation. The assays were performed according to Salgo and Pryor (1996), with minor modifications. The hippocampus homogenates were incubated with trichloroacetic acid, HCl, and thiobarbituric acid for 15 min at 100 °C. As TBA reacts with other products of lipid peroxidation in addition to MDA, results are expressed in terms of TBARS, which was determined by absorbance at 532 nm using SpectraMax. Hydrolyzed tetramethoxypropane (TMP) was used as the standard. The results were normalized by protein content.

Comet assay

A single-cell suspension from the hippocampus was obtained according to the method described by Hartmann et al. (2003). Prior to the test, tissue samples were mixed with PBS and cell viability was checked by using Trypan blue dye-exclusion assay and Countess® Automated Cell Counter (Invitrogen). Briefly, this brain area was placed in a separated microtube with 300 μ L of a chilled solution (PBS with 20 mM EDTA and 10% DMSO) and chopped into pieces with a pair of scissors. The pieces were allowed to settle and the supernatant containing the single cells was taken. The isolated cells were counted in a Neubauer Chamber to determine cell density. The alkaline comet assay was performed to determine DNA single-strand breaks in accordance with Singh et al. (1988) and Hartmann and Speit (1997). Briefly, the hippocampus cell suspension was mixed with low melting point agarose solution and spread on agarose-precoated microscope slides. Slides were incubated in ice-cold lysis solution (2.5 mol/L NaCl, 10 mmol/L Tris, 100 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100 and 10% DMSO, pH 10.0) at 4 °C for 24 h to remove

cell membranes. Then, slides were placed in a horizontal electrophoresis unit and incubated with fresh alkaline buffer solution (300 mmol/L NaOH, 1 mmol/L EDTA, pH 13.0) at 4 °C for 15 min to allow DNA unwinding and the expression of alkali-labile sites. Electrophoresis was conducted for 15 min at 25 V (94 V/cm). All these steps were performed under yellow light or in the dark to prevent additional DNA damage. Slides were stained using silver nitrate. One hundred cells from each treatment were selected and analyzed for DNA migration. The damage index is an arbitrary score calculated for cells in different damage classes, which are scored visually according to the tail length of the “comet” into five classes: class 0, undamaged, without a tail; class 1, with a tail shorter than the diameter of the head nucleus; class 2, with a tail length one-to two-fold greater than the diameter of the head; class 3, with a tail longer than two-fold the diameter of the head; and class 4, comets with no heads. The damage index ranges from 0 (no tail) to 400 (maximum migration).

Mitochondrial respiratory chain complex activities

For the analysis of the respiratory chain enzymatic activities (complexes I-III and II), hippocampus was homogenized and prepared as described by Grings et al. (2017). Subsequently, the enzymatic activities were measured in the hippocampus homogenates. The activity of NADH/cytochrome *c* oxidoreductase (complex I-III) was assayed by following the reduction of cytochrome *c* (50 μM) at 25 °C at 550 nm, according to the method described by Schapira et al. (1990). The activity of succinate-2,6-dichloroindophenol (DCIP)-oxidoreductase (complex II) was evaluated by following the reduction of DCIP (8.3 μM) at 25 °C at 600 nm, according to the method of Fischer et al. (1985). These methods were slightly modified, as described in details in a previous report by Da Silva et al. (2002). The activities of the respiratory chain complexes were calculated as nmol min⁻¹ mg protein⁻¹.

Statistics

Statistical analyses were performed using Prism 6.0. Data were expressed as means ± standard error of the mean (SEM) values. The statistical analysis of the LFS was executed with Kruskal-Wallis followed by Dunn's, while the percentage of seizures was analyzed by Fisher exact test. Statistical analyses of the measurement of oxidative stress parameters were performed using one-way ANOVA, and the means were compared using Tukey's multiple comparison test. To analyze the enzymatic activity of the mitochondrial respiratory chain, the one-way ANOVA test was used, followed by Duncan post hoc test. *P* values less than 0.05 were considered to be significant.

Results

PTX-induced seizure test

In the Fig. 1, it is observed that RA was not able to alter the PTX-induced seizure pattern in both LFS and CFS ($p > 0.05$). DZP group showed a reduction in the percentage of seizure ($p = 0.0001$; Fig. 1a) and a significant increase in the LFS ($p \leq 0.001$; Fig. 1b).

4-AP-induced seizure test

The results obtained show that only the positive control group (VPA) was able to reduce the TCS occurrence induced by 4-AP ($p = 0.0002$; Fig. 2a) and to increase the LFS ($p \leq 0.001$; Fig. 2b). The groups treated with RA

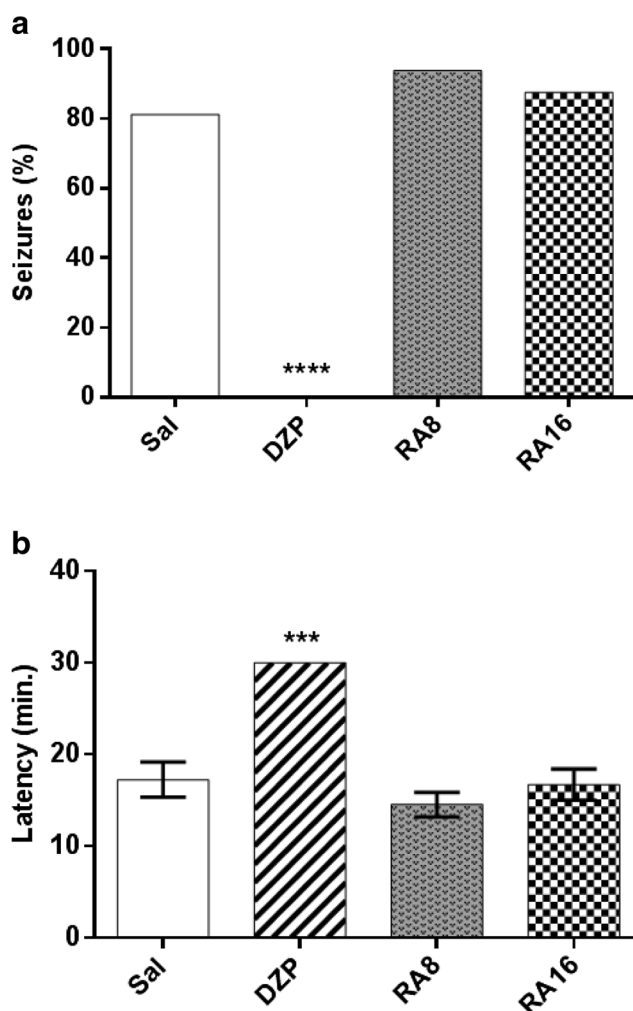


Fig. 1 Effect of rosmarinic acid (RA) on the **a** percentage of clonic seizures (CFS) and the **b** latency to first seizure (LFS) induced by PTX in mice. Statistics: CFS = Fisher exact test, where **** $p \leq 0.0001$; LFS = Kruskal-Wallis followed by Dunn's, where *** $p \leq 0.001$. Each bar represents the mean ± SEM. of 16 animals per group

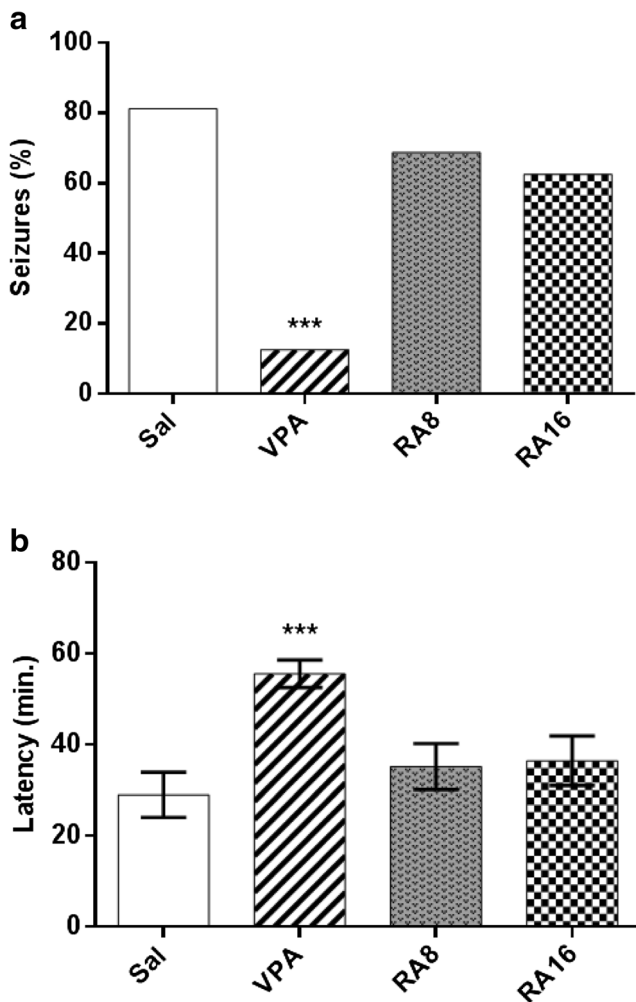


Fig. 2 Effect of rosmarinic acid (RA) on the **a** percentage of tonic-clonic seizures (TCS) and the **b** latency to first seizure (LFS) induced by 4-AP in mice. Statistics: TCS = Fisher exact test, where *** $p \leq 0.001$; LFS = Kruskal-Wallis followed by Dunn's, where *** $p \leq 0.001$. Each bar represents the mean \pm SEM of 16 animals per group

showed no significant difference when compared to the negative control group ($p > 0.05$).

DCF oxidation

The effect of RA on ROS production measured by DCF oxidation in the hippocampus is shown in Fig. 3. The PTX and 4-AP administration induced an increase of reactive species when compared to control, measured by DCF oxidation, although only values in the PTX group are significantly different from the Sal/Sal group ($p = 0.0227$ and $p = 0.6471$, respectively; Fig. 3a, b). DZP and VPA, used as positive control groups, were able to decrease the oxidative stress induced by PTX and 4-AP ($p = 0.0286$ and $p < 0.0001$).

RA 16 mg/kg significantly decreased DCF production in both PTX and 4-AP models ($p = 0.0120$ and $p = 0.0002$,

respectively; Fig. 3a, b). RA 8 mg/kg was able to reduce the oxidative stress only in the 4-AP model ($p < 0.0001$; Fig. 3b).

SOD and CAT activity

The administration of RA prevented the increase in CAT activity in the hippocampus of the animals treated with PTX and 4-AP, although it was only significant at the dose of 16 mg/kg of RA in the 4-AP treatment ($p = 0.0455$; Fig. 4b), indicating a return of the redox equilibrium in these animals that underwent seizure induction.

There was a downward trend in SOD activity in RA-treated groups; however, the results were only significant at the dose of 16 mg/kg in both models ($p = 0.0140$ and $p = 0.0222$; Fig. 5a, b). The increase of SOD activity induced

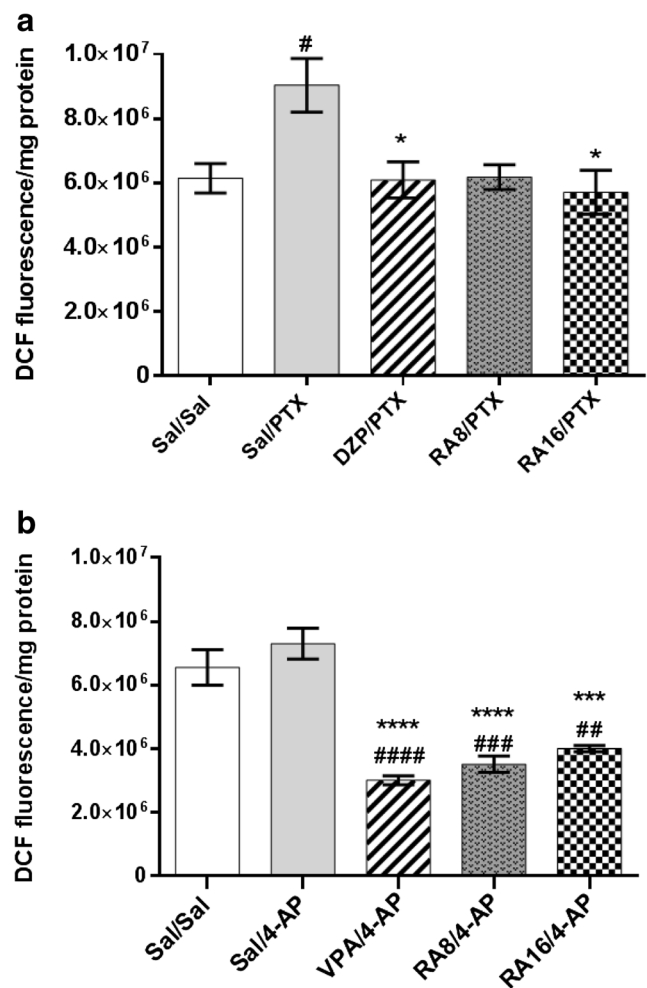


Fig. 3 The ROS production in the hippocampus area of the animals with seizures induced by **a** PTX or **b** 4-AP and treated with RA. Statistics: # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.01$, ### $p \leq 0.001$, or #### $p \leq 0.0001$ when compared to Sal/Sal; * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$, or *** $p \leq 0.0001$ when compared to Sal/PTX or Sal/4-AP. One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. Bars represent the means \pm SEM of five animals per group

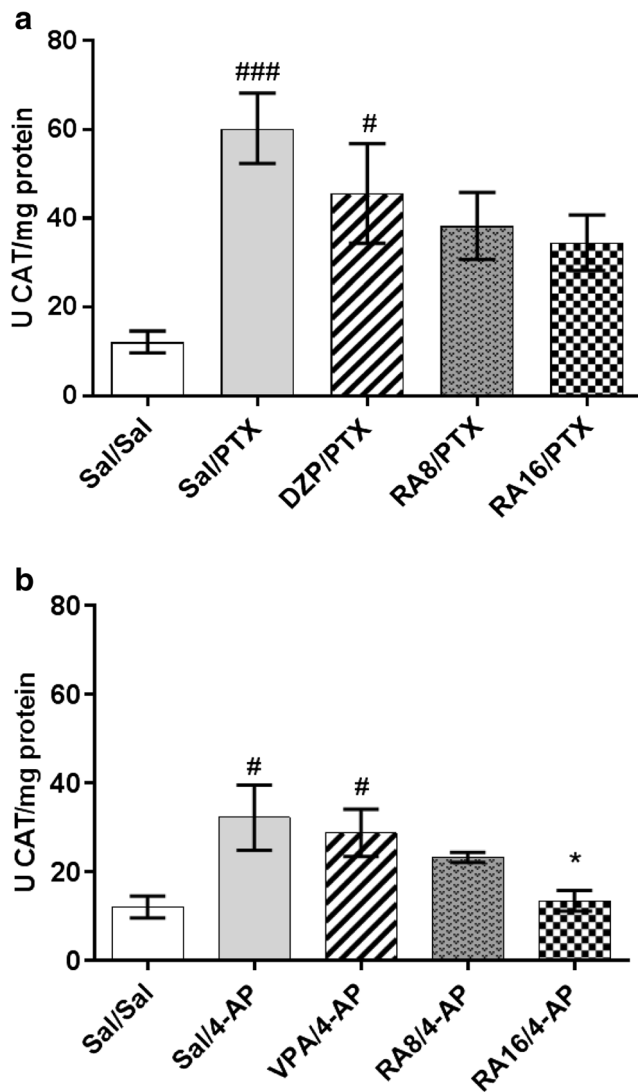


Fig. 4 Evaluation of CAT activity in the hippocampus tissue after **a** PTX and **b** 4-AP-induced seizure and treated with RA. Statistics: # $p \leq 0.05$ or ### $p \leq 0.001$ when compared to Sal/Sal; * $p \leq 0.05$ when compared to Sal/4-AP. One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. Bars represent the means \pm SEM of five animals per group

by the 4-AP seizures was also prevented with VPA administration ($p = 0.0217$; Fig. 5b).

Comet assay and TBARS

In order to determine the effect of RA on oxidative damage triggered by PTX and 4-AP, we examined the degree of DNA damage and lipid peroxidation in the hippocampus. Prior to the comet assay analysis, cell viability was checked and all samples demonstrated cell survival of $> 80\%$. As seen in Fig. 6, the treatment of animals with RA 8 and 16 mg/kg produced a significant reduction in the DNA damage caused by PTX ($p = 0.0364$ and $p = 0.0136$; Fig. 6a) and 4-AP ($p = 0.0168$ and $p = 0.0062$; Fig. 6b). However, the same was not

observed for lipid peroxidation reflected by MDA levels measured in TBARS assay (Fig. 7).

Mitochondrial respiratory chain complex activities

Considering the mitochondrial dysfunctions commonly associated with epilepsy, we investigated the enzymatic activities of the mitochondrial respiratory chain complexes I-III and II. Figure 8 shows that the transfer of electrons between complexes I and III (complex I-III activity) was reduced by PTX and 4-AP seizures. RA 16 mg/kg group that received PTX administration mitigated this reduction, but the enzymatic activity did not return to control levels ($p < 0.05$; Fig. 8a).

In addition, administration of 4-AP caused a reduction of mitochondrial complex II activity ($p < 0.05$) and RA, at both

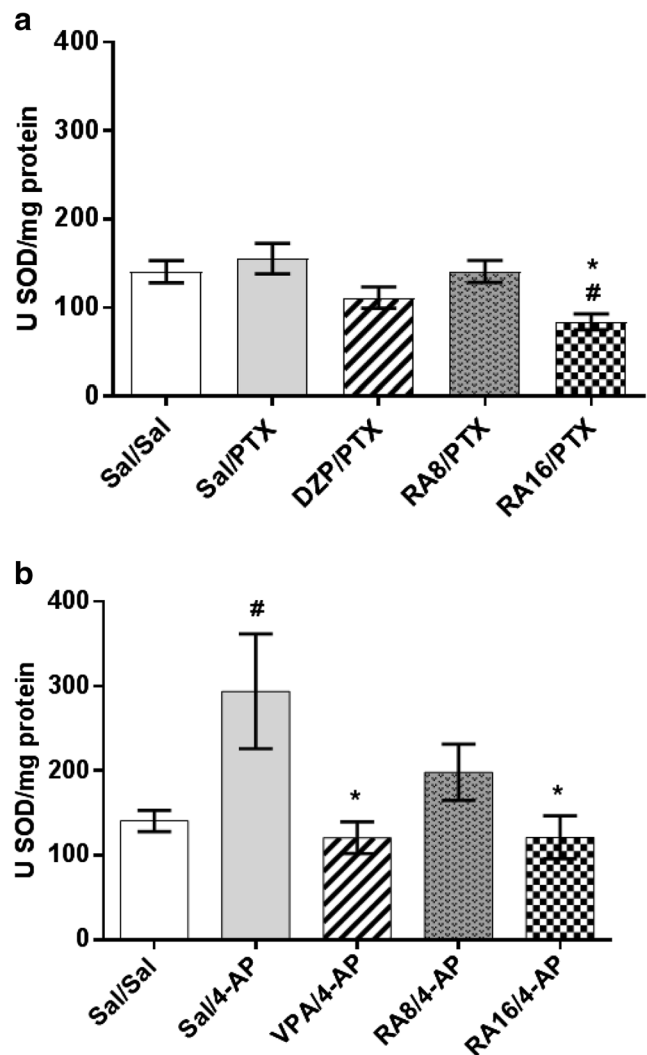


Fig. 5 Evaluation of SOD activity in the hippocampus tissue, after **a** PTX and **b** 4-AP-induced seizure and treatment with RA. Statistics: # $p \leq 0.05$ when compared to Sal/Sal; * $p \leq 0.05$ when compared to Sal/PTX or Sal/4-AP. One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. Bars represent the means \pm SEM of five animals per group

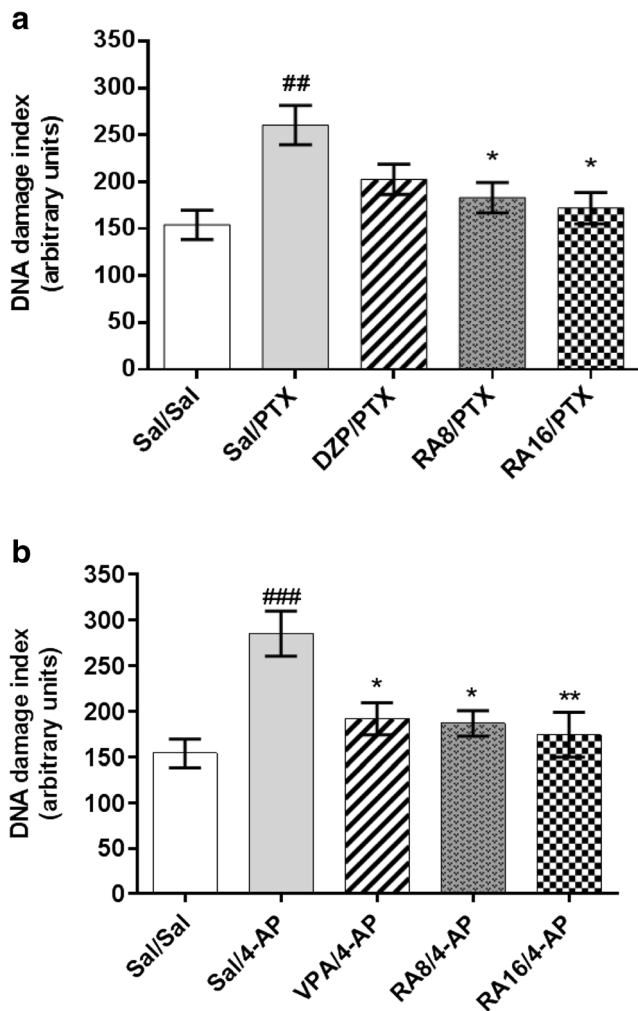


Fig. 6 Evaluation of DNA damage in the hippocampus area, after **a** PTX and **b** 4-AP-induced seizure and treatment with RA. Statistics: $##p \leq 0.01$ or $###p \leq 0.001$ when compared to Sal/Sal; $*p \leq 0.05$ or $**p \leq 0.01$ when compared to Sal/PTX or Sal/4-AP. One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. Bars represent the means \pm SEM of five animals per group

doses, was able to restore the levels of this activity ($p < 0.05$; Fig. 8b). Furthermore, RA 8 mg/kg increased complex II activity when compared to group that received PTX administration ($p < 0.05$; Fig. 8b).

Discussion

Regional differences in circuitry and cellular properties can determine seizure susceptibility and drug refractoriness. For this reason, several acute seizure models have been used to search for new drugs that may be effective in a greater number of patients. Two of these are the model of 4-AP-induced seizure, which leads to tonic-clonic seizure-like events (Wahab et al. 2010) and the PTX-induced seizure, which induces clonic crisis (Hasan et al. 2014). The 4-AP is a K^+ channel blocker,

whose activity enhances the release of multiple neurotransmitters, while PTX has a binding site at $GABA_A$ receptor in the Cl^- channel where it acts inhibiting non-competitively the channel (Avoli and De Curtis 2011; Salami et al. 2015).

The results obtained in this study showed that RA 8 and 16 mg/kg were not able to protect against seizures induced by 4-AP and PTX (Figs. 1 and 2). DZP, used as a positive control in the PTX model, was able to completely prevent CFS, while VPA, used as positive control in the 4-AP model, protected 87.5% of the TCS. The drugs used as a positive control also significantly extended the LFS when compared to Sal group.

Some considerations can be made regarding the lack of RA protection in the models used in this study. First, Coelho et al. (2016) reported that RA (2 and 4 mg/kg) could not prevent

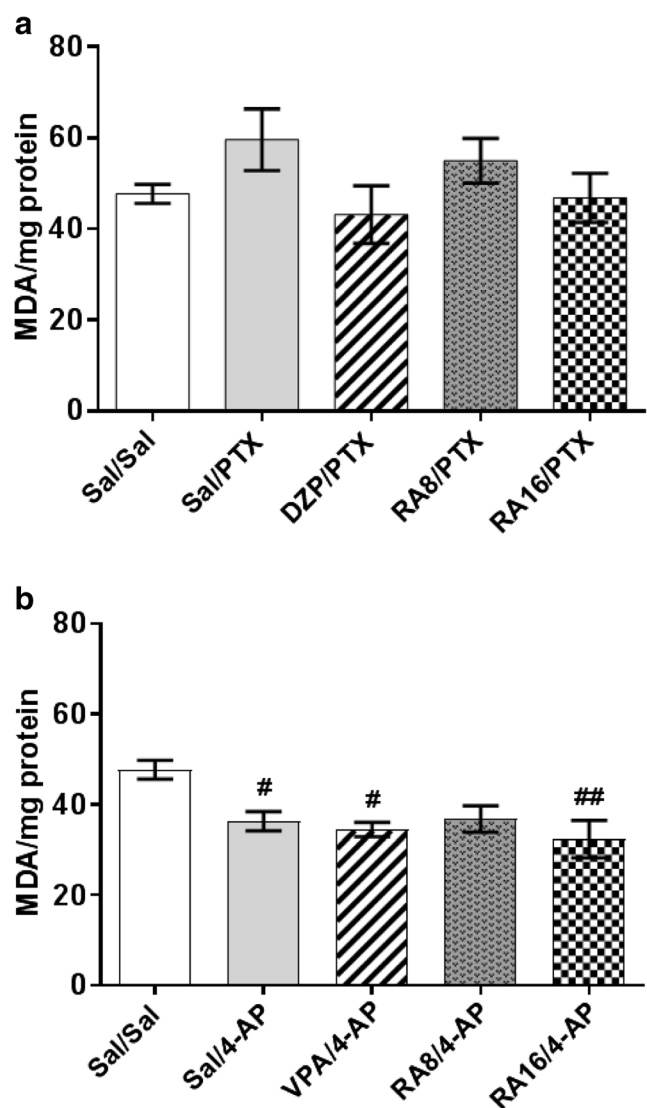


Fig. 7 Determination of lipid peroxidation in the hippocampus area after **a** PTX and **b** 4-AP-induced seizure and treatment with RA. Statistics: $#p \leq 0.05$ or $##p \leq 0.01$ when compared to Sal/Sal. One-way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. Bars represent the means \pm SEM of five animals per group

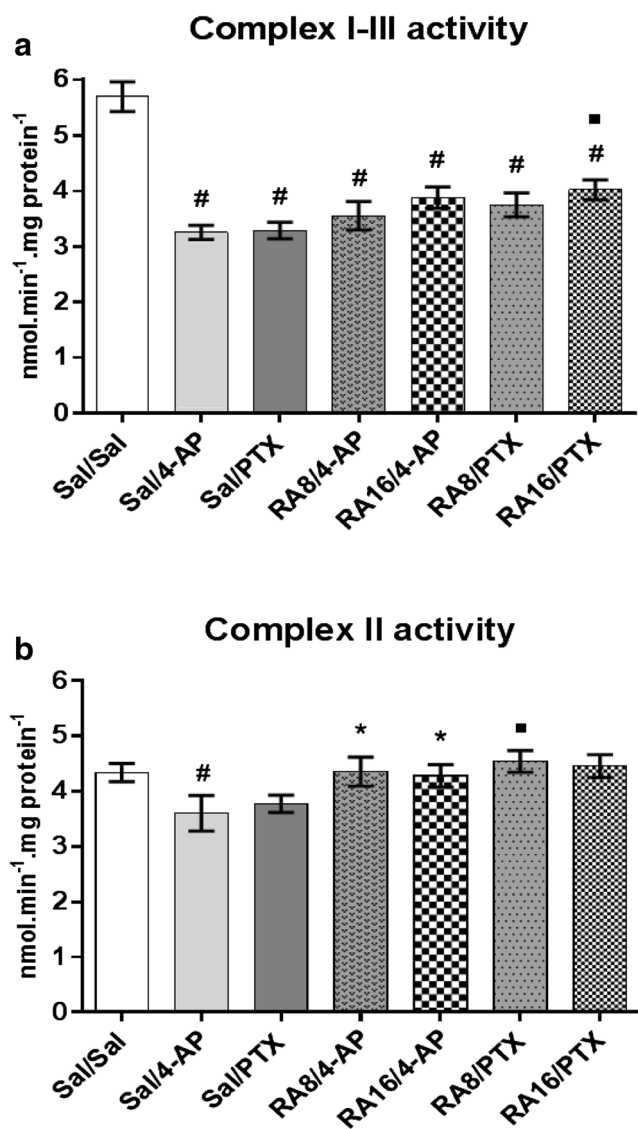


Fig. 8 Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity from complexes I-III (cytochrome c oxidoreductase) (a) and II (DCIP-oxidoreductase) (b) in hippocampus after PTZ or 4-AP-induced seizure, and treatment with RA. Statistics: [#] $p \leq 0.05$ when compared to Sal/Sal; ^{*} $p \leq 0.05$ when compared to Sal/4-AP; ^{*} $p \leq 0.05$ when compared to Sal/PTX. One-way ANOVA followed by Duncan post hoc test. Data are expressed as mean \pm SEM for five animals/group

acute seizures induced by pentylenetetrazole (PTZ) and pilocarpine (PIL) in mice, although showing a neuroprotective effect in biochemical parameters. However, Grigoletto et al. (2016) found that RA was able to increase the latency to myoclonic jerks induced by PTZ (60 mg/kg) or PIL (300 mg/kg) and the latency to PTZ-induced generalized seizures, but at a much higher dose than that employed in this study (30 mg/kg, p.o.). Thus, it is possible that higher doses of AR may be required for the seizure-like behavior to be effectively blocked.

Previous studies indicated that RA inhibits GABA T activity (Awad et al. 2009) and is also capable to overexpresses

GAD_{65/67} and GABA_A receptor subunits ($\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 2$, and $\gamma 3$ subunits) (Kwon et al. 2017). As reported by Coelho et al. (2016), RA (2 and 4 mg/kg) administered with a low-dose DZP was able to increase LFS in the PTZ model, suggesting a synergistic effect between these drugs. However, when given alone, it has not been shown to protect against seizures induced by PTZ or PIL.

Also, 4-AP seems to have a non-specific action. It increases the release of excitatory amino acids, such as glutamate, in the hippocampus, with seizures being the result of this increased excitatory neurotransmission (Shiha et al. 2017). Seizures induced by 4-AP are known to be blocked by glutamatergic antagonists, such as N-methyl-D-aspartate (NMDA) and α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA), but not by GABAergic drugs (Dóczi et al. 1999; Peña and Tapia 2000). In our study, although not significant, RA (8 and 16 mg/kg) showed a tendency in reducing the number of seizures induced by 4-AP, probably for its action in other neurochemical pathways not involved in the pro-seizure mechanism of action of 4-AP, perhaps in the GABAergic system.

It is also likely that the lack of effect of RA on both models is related to the doses employed, even though it is a GABA-T inhibitor and capable of overexpresses GAD_{65/67} and GABA_A receptors subunits. The mechanism of action of RA on the GABAergic system has not yet been fully elucidated. It may not have affinity for specific sites on the GABA_A receptor, which means that it might not be able to effectively block PTX or PTZ-induced seizures.

Oxidative stress and mitochondrial dysfunction occur as a consequence of prolonged epileptic seizures and influence seizure-induced brain injury (Patel 2004). “Oxidative stress” is an expression used to describe various deleterious processes resulting from an imbalance between the excessive formation of ROS and/or reactive nitrogen species (RNS) and limited antioxidant defenses (Turens 2003).

The depolarization pattern of neurons during intense epileptiform activity results in mitochondrial depolarization and intramitochondrial Ca²⁺ accumulation and that leads to energy failure and mitochondrial superoxide production (Kudin et al. 2002). Superoxide is a moderately reactive radical, whose generation can lead to the formation of more reactive ROS (Venditti et al. 2013). An increased mitochondrial formation of ROS triggers the intrinsic pathway of apoptosis and cell death (Turens 2003; Rizk et al. 2017). Because of this, we sought to investigate a possible antioxidant effect of RA against oxidative stress induced by PTX- and 4-AP-induced seizures, to better characterize the neuroprotective effects of RA.

As presented in Fig. 3, RA shows a potential for reducing ROS produced by the seizures induced with PTX and 4-AP. The groups treated with VPA and DZP also had a significant reduction of the ROS production. This result is in accordance

with other studies that also found the RA potential of reducing the ROS production (Gao et al. 2005; Coelho et al. 2015). Although DCF oxidation cannot be used as a direct measure of H₂O₂ and is susceptible to artifacts, it can be used as a redox indicator probe that responds to changes in intracellular iron signaling or peroxynitrite formation (Kalyanaraman et al. 2012).

To defend themselves against the free radical attacks, cells have developed, during their evolution, different antioxidant systems, like the antioxidant enzymes: SOD, CAT, and glutathione peroxidase (Michiels et al. 1994; Rizk et al. 2017). SOD and CAT are responsible for degradation of superoxide and hydrogen peroxide (H₂O₂), respectively. The H₂O₂ is not a free radical itself, but at high concentration, it can react with superoxide and produce a highly reactive hydroxyl radical (Freitas et al. 2004). To find out if RA also reduces enzymatic activity related to ROS, we evaluated the enzymatic activity of CAT (Fig. 4) and SOD (Fig. 5).

In Fig. 4, we can observe that PTX and 4-AP enhanced CAT activity demonstrating a pro-oxidative effect of these epileptic agents. The treatment with RA 16 mg/kg decreased his activity in the hippocampus of the 4-AP group, but was not able to significantly reduce the activity of this enzyme at the 8-mg/kg dose and in the PTX model, although a downward trend can be observed.

Moreover, RA 16 mg/kg reduced the SOD activity increased by both seizure inductors (Fig. 5). The positive control, VPA, similarly prevented the increase of SOD activity, when compared to the Sal/4-AP group (Fig. 5). In previous study, Coelho et al. 2015 reported that RA given at lower doses (1, 2, and 4 mg/kg) was not able to reduce SOD activity, indicating that higher doses of RA may be effective in blocking this behavior induced by different agents.

Increased generation of ROS leads to lipid peroxidation and consequent disruption of membranes, being MDA the product of lipid peroxidation (Gao et al. 2005). So, in order to determine the neuroprotection of RA in damage triggered by PTX and 4-AP seizures, we examined the degree of DNA damage and lipid peroxidation in the hippocampus.

Interestingly, both RA doses (8 and 16 mg/kg) were able to prevent the DNA damage caused by seizures induced by PTX and 4-AP (Fig. 6), showing a dose-dependent decrease in DNA damage measured by comet assay. However, the same was not observed for lipid peroxidation, measured in terms of MDA levels in TBARS assay (Fig. 7). Our results show that 4-AP did not generate a significant lipid peroxidation in the hippocampus area, while RA 16 mg/kg, VPA and Sal/4-AP groups showed a reduction in the levels of lipid peroxidation when compared to Sal/Sal group. However, Khamse et al. (2015) confirmed the favorable antiepileptogenic effect of RA (10 mg/kg/day) by lowering lipid peroxidation and inhibiting hippocampal neuronal loss in the kainate model of temporal lobe epilepsy. Probably, the acute seizures did not

cause high lipid peroxidation as the kainate-model; consequently, RA had no better effects. Also, a study published in 2017 showed that RA administered for 14 days at a dose of 75 mg/kg significantly reduced the brain content of MDA in a model of doxorubicin-induced neurotoxicity (Rizk et al. 2017). Therefore, the fact that the doses of RA used in this study are lower and administered acutely may explain the lack of effect on the levels of MDA.

The potential of RA in reducing DNA damage was already reported by Coelho et al. (2015, 2016), where RA 4 mg/kg prevented DNA damage induced by PTZ and PIL in mice. Other studies also found that RA can protect brain and blood cells against ethanol-induced genotoxicity in mice and observed that caffeic acid (CA), RA major metabolite, decreases the DNA damage induced by H₂O₂ in brain tissue of rats (Pereira et al. 2006; De Oliveira et al. 2012).

The neuroprotective effects of RA seem to be linked to the antioxidant/radical scavenging properties of this compound and to the ability to modulate some of the intracellular cascades, like *c-fos* and NF- κ B, who lead to neuronal death (Fallarini et al. 2009). Also, RA inhibits lipoxygenase and cyclooxygenase, consequently inhibiting the expression of inflammatory cytokines (Rizk et al. 2017).

Mitochondrial and nuclear DNA represents an important target for oxidative damage, and if not repaired, can lead to mitochondrial dysregulation and also cell death (Van Houten et al. 2006; Singh et al. 2019). This led us to evaluate enzymatic activities of the mitochondrial respiratory chain (complexes I-III and II).

As shown in Fig. 8, complex I-III reduced their activity with the seizures induced by PTX and 4-AP, and this reduction was prevented by RA 16 mg/kg in the PTX group. Complex II activity from the 4-AP-induced seizures group was also reduced, but this effect was prevented by RA treatment in both doses. In addition, RA 8-mg/kg treatment also prevented complex II activity reduction induced by PTX (Fig. 8).

The production of mitochondrial superoxide radicals occurs primarily at two discrete points in the electron-transport chain, complex I (NADH dehydrogenase) and complex III (ubiquinone-cytochrome *c* reductase). Therefore, leakage of electrons caused by the inhibition of these complexes can lead to ROS generation (Selivanov et al. 2011; Bhat et al. 2015). It also has been suggested that the complex II is responsible for a substantial portion of ROS production (Orr et al. 2012; Paranagama et al. 2010; Quinlan et al. 2012), and damage or mutations to this complex can exacerbate this production (Guzy et al. 2008; Murphy 2009). By preventing the damage caused by the seizure inductors in the complexes I-III and complex II of the mitochondrial respiratory chain, RA was able to prevent ROS production, demonstrating an important antioxidant and neuroprotective effect.

Mitochondrial ROS directly drive pro-inflammatory cytokine production (Li et al. 2013) and studies suggest that

refractory epilepsy may partly result from a pathologic cycle of inflammation and seizures, in which inflammatory factors, and specifically microglial activation and proliferation, provoke seizures, that in turn activate and sustain immune processes (Najjar et al. 2011). Interestingly, it has been demonstrated that RA can attenuate the activation of microglial N9 cells through the downregulation of inflammatory cytokines and caspase-3; Moreover, RA inhibits neutrophil and T cell activity and modulates the NF- κ B pathway (Kang et al. 2003; Rocha et al. 2015; Coelho et al. 2017). Likewise, a study recently demonstrated interesting results of antioxidative and anti-inflammatory effects of RA 40 mg/kg daily dose in attenuating the development and existing pain (Rahbardar et al. 2018).

The use of antioxidants could have the benefit of reducing the use and dose of antiepileptic drugs and so reduce their adverse effects (Rowles and Olsen 2012). The literature data and our results demonstrate the important antioxidant and neuroprotective effect of RA, reducing ROS production and consequently the antioxidant enzyme activity, as well as preventing damage to the DNA and to mitochondrial complexes I-III and II. Higher doses of RA could be tested in acute and chronic seizure models to better evaluate their potential use as an anticonvulsant or as an adjunct to current drugs.

In this study, DZP and VPA were used as positive controls in behavioral tests, as described in the methodology. Also, these groups were included in the other trials whenever possible, except for the mitochondrial activity assay. As observed in the results, unlike DZP and VPA, RA was not able to block seizures induced by either picrotoxin or 4-aminopyridine. On the other hand, RA has been shown to protect against different cellular damage promoted by the convulsive agents, suggesting a neuroprotective effect, even though it did not present an anticonvulsant behavioral effect. Furthermore, when the VPA and DZP results are compared to those of RA in biochemical assays, it is possible to verify that the effect of RA is similar or better, except for the measurement of lipid peroxidation, confirming its neuroprotective effect.

In conclusion, our results show that although RA could not prevent seizures *in vivo*, it exhibited an antioxidant and neuroprotective effect, reducing possible permanent cell damage. The results demonstrated in this study corroborate previous studies and suggest that RA could be used in parallel to antiepileptic drugs in the treatment of certain types of seizures. Our research opens the need to test higher doses of RA and test other models of epilepsy, evaluating anti-inflammatory parameters as well.

Acknowledgments The authors were supported by the Brazilian's agencies: National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (Dr. Guilhian Leipnitz and Dr. P Pereira), and Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS).

Authors' contributions JGL, LS, AMM, MSR, and DG conducted the behavioral and biochemical experiments. GRG and PFP analyzed data. GL, DJM, JGL, and PP developed the experimental design, analyzed the data, and wrote the paper. All authors read and approved the manuscript.

Compliance with ethical standards Experimental protocol adhered to the Guidelines of Brazilian Council of Animal Experimentation—CONCEA—and EU Directive 2010/63/EU for animal experiments.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Aebi H (1984) Catalase in Vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Avoli M, de Curtis M (2011) GABAergic synchronization in the limbic system and its role in the generation of epileptiform activity. *Prog Neurobiol* 95:104–132. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2011.07.003>
- Awad R, Muhammad A, Durst T, Trudeau VL, Arnason JT (2009) Bioassay-guided fractionation of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) using an *In Vitro* measure of GABA transaminase activity. *Phytother Res* 23:1075–1081. <https://doi.org/10.1002/ptr>
- Bhat AH, Dar KB, Anees S, Zargar MA, Masood A, Sofi MA, Ganie SA (2015) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother* 74: 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.07.025>
- Coelho VR, Vieira CG, de Souza LP, Moyses F, Basso C, Papke DKM, Pires TR, Siqueira IR, Picada JN, Pereira P (2015) Antiepileptogenic, antioxidant and genotoxic evaluation of rosmarinic acid and its metabolite caffeic acid in mice. *Life Sci* 122:65–71. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.11.009>
- Coelho VR, Vieira CG, de Souza LP, da Silva LL, Pfluger P, Regner GG, Papke DKM, Picada JN, Pereira P (2016) Behavioral and genotoxic evaluation of rosmarinic and caffeic acid in acute seizure models induced by pentylenetetrazole and pilocarpine in mice. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 389:1195–1203. <https://doi.org/10.1007/s00210-016-1281-z>
- Coelho VR, Viau CM, Staub RB, de Souza MS, Pfluger P, Regner GG, Pereira P, Saffi J (2017) Rosmarinic acid attenuates the activation of murine microglial N9 cells through the downregulation of inflammatory cytokines and cleaved Caspase-3. *Neuroimmunomodulation* 24:171–181. <https://doi.org/10.1159/000481095>
- da Silva CG, Ribeiro CAJ, Leipnitz G, Dutra CS, Wyse ATS, Wannmacher CMD, Sarkis JJF, Jakobs C, Wajner M (2002) Inhibition of cytochrome c oxidase activity in rat cerebral cortex and human skeletal muscle by D-2-hydroxyglutaric acid in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1586:81–91. [https://doi.org/10.1016/S09254439\(01\)00088-6](https://doi.org/10.1016/S09254439(01)00088-6)
- De Oliveira NCD, Sarmento MS, Nunes EA, Porto CM, Rosa DP, Bona SR, Rodrigues G, Marroni NP, Pereira P, Picada JN, Ferraz ABF, Thiesen FV, da Silva J (2012) Rosmarinic acid as a protective agent against genotoxicity of ethanol in mice. *Food Chem Toxicol* 50: 1208–1214. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.01.028>
- Devinsky O, Vezzani A, De Lanerolle NC, Rogawski MA (2013) Glia and epilepsy: excitability and inflammation. *Trends Neurosci* 36: 174–184. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2012.11.008>
- Dóczy J, Banczerowski-Pelyhe I, Barna B, Világi I (1999) Effect of a glutamate receptor antagonist (GYKI 52466) on 4-aminopyridine-induced seizure activity developed in rat cortical slices. *Brain Res*

- Bull 49(6):435–440. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(99\)00079-9](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(99)00079-9)
- Fachel FNS, Schuh RS, Veras KS, Bassani VL, Koester LS, Henriques AT, Braganhol E, Teixeira HF (2019) An overview of the neuroprotective potential of rosmarinic acid and its association with nanotechnology-based delivery systems: a novel approach to treating neurodegenerative disorders. *Neurochem Int* 122:47–58. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.11.003>
- Fallarini S, Miglio G, Paoletti T, Minassi A, Amoruso A, Bardelli C, Brunelleschi S, Lombardi G (2009) Clovamide and rosmarinic acid induce neuroprotective effects in in vitro models of neuronal death. *Br J Pharmacol* 157:1072–1084. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00213.x>
- Fischer JC, Ruitenbeek W, Berden JA, Trijbels JMF, Veerkamp JH, Stadhouders AM, Sengers RCA, Janssen AJM (1985) Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta* 153:23–36. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(85\)90135-4](https://doi.org/10.1016/0009-8981(85)90135-4)
- Fisher RS, Boas WE, Blume W, Elger C, Genton P, Lee P, Engel J (2005) Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the international league against epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). *Epilepsia* 46(4):470–472. <https://doi.org/10.1111/j.0013-9580.2005.66104.x>
- Fisher RS, Acevedo C, Arzimanoglou A, Bogacz A, Cross JH, Elger CE, Engel J, Forsgren L, French JA, Glynn M, Hesdorffer DC, Lee BI, Mathern GW, Moshé SL, Perucca E, Scheffer IE, Tomson T, Watanabe M, Wiebe S (2014) A practical clinical definition of epilepsy. *Epilepsia* 55(4):475–482. <https://doi.org/10.1111/epi.12550>
- Freitas RM, Nascimento VS, Vasconcelos SMM, Sousa FCF, Viana GSB, Fonteles MMF (2004) Catalase activity in cerebellum, hippocampus, frontal cortex and striatum after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. *Neurosci Lett* 365:102–105. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.04.060>
- Gao LP, Wei HL, Zhao HS, Xiao SY, Zheng RL (2005) Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes. *Pharmazie* 60:62–65
- Gok DK, Hidisoglu E, Ocak GA, Er H, Acun AD, Yargicoglu P (2018) Protective role of rosmarinic acid on amyloid beta 42-induced ehoic memory decline: implication of oxidative stress and cholinergic impairment. *Neurochem Int* 118:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2018.04.008>
- Grigoletto J, de Oliveira CV, Grauncke ACB, de Sousa TL, Souto NS, de Freitas ML, Furian AF, Santos ARS, Oliveira MS (2016) Rosmarinic acid is anticonvulsant against seizures induced by pentylenetetrazol and pilocarpine in mice. *Epilepsy Behav* 62:27–34. <https://doi.org/10.1016/j.yebeh.2016.06.037>
- Grings M, Moura AP, Parmeggiani B, Pletsch JT, Cardoso GMF, August PM, Matté C, Wyse ATS, Wajner M, Leipnitz G (2017) Bezafibrate prevents mitochondrial dysfunction, antioxidant system disturbance, glial reactivity and neuronal damage induced by sulfite administration in striatum of rats: implications for a possible therapeutic strategy for sulfite oxidase deficiency. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1863(9):2135–2148. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.05.019>
- Guzy RD, Sharma B, Bell E, Chandel NS, Schumacker PT (2008) Loss of the SdhB, but not the SdhA, subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 28(2):718–731. <https://doi.org/10.1128/MCB.01338-07>
- Hartmann A, Speit G (1997) The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol Lett* 90:183–188. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(96\)03847-7](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(96)03847-7)
- Hartmann A, Agurell E, Smith A, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Beevers C, Speit G, Thybaud V, Tice RR (2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis* 18(1):45–51. <https://doi.org/10.1093/mutage/18.1.45>
- Hasan ZA, Razzak RLA, Alzoubi KH (2014) Comparison between the effect of propofol and midazolam on picrotoxin-induced convulsions in rat. *Physiol Behav* 128:114–118. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.01.027>
- Jacob S, Nair AB (2016) An updated overview on therapeutic drug monitoring of recent antiepileptic drugs. *Drugs RD* 16:303–316. <https://doi.org/10.1007/s40268-016-0148-6>
- Kalyanaraman B, Darley-Usmar V, Davies KJA, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, Mann GE, Moore K, Roberts LJ, Ischiropoulos H (2012) Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med* 52:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.09.030>
- Kang M, Yun S, Won J (2003) Rosmarinic acid inhibits Ca²⁺-dependent pathways of T-cell antigen receptor-mediated signaling by inhibiting the PLC-Gamma1 and Itk activity. *Blood* 101(9):3534–3542. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-07-1992>
- Khamse S, Sadr SS, Roghani M, Hasanzadeh G, Mohammadian M (2015) Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect in the kainate rat model of temporal lobe epilepsy: underlying mechanisms. *Pharm Biol* 53(12):1818–1825. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1010738>
- Kudin AP, Kudina TA, Seyfried J, Vielhaber S, Beck H, Elger CE, Kunz WS (2002) Seizure-dependent modulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 15:1105–1114. <https://doi.org/10.1152/jn.01053.2003>
- Kwon YO, Hong JT, Oh KW (2017) Rosmarinic acid potentiates pentobarbital-induced sleep behaviors and non-rapid eye movement (NREM) sleep through the activation of GABA_a-ergic systems. *Biomol Ther* 25(2):105–111. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2016.035>
- Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H, Yang X (2013) Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol* 6(1):19. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-19>
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Martinc B, Grabnar I, Vovk T (2014) Antioxidants as a preventive treatment for epileptic process: a review of the current status. *Curr Neuropharmacol* 12:527–550. <https://doi.org/10.2174/1570159X12666140923205715>
- Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J (1994) Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and CU/ZN-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 17(3):235–248. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)90079-5](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90079-5)
- Misra HP, Fridovich I (1972) The role of superoxide anion in the epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *J Biol Chem* 247(10):3170–3175
- Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417:1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>
- Najjar S, Pearlman D, Miller DC, Devinsky O (2011) Refractory epilepsy associated with microglial activation. *Neurologist* 17(5):249–254. <https://doi.org/10.1097/NRL.0b013e31822aad04>
- Ngugi AK, Bottomley C, Kleinschmidt I, Sander J, Newton CR (2010) Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: A meta-analytic approach. *Epilepsia* 51:883–889. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2009.02481.x>
- Orr AL, Quinlan CL, Pervoshchikova IV, Brand MD (2012) A refined analysis of superoxide production by mitochondrial sn-glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 287(51):42921–42935. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.397828>
- Paranagama MP, Sakamoto K, Amino H, Awano M, Miyoshi H, Kita K (2010) Contribution of the FAD and quinone binding sites to the production of reactive oxygen species from *Ascaris suum* mitochondrial complex II. *Mitochondrion* 10:158–165. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2009.12.145>

- Patel M (2004) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med* 37:1951–1962. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.08.021>
- Peña F, Tapia R (2000) Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus *in vivo*: role of glutamate- and GAMA-mediated neurotransmission and of ion channels. *Neuroscience* 101(3):547–561
- Pereira P, De Oliveira PA, Ardenghi P, Rotta L, Henriques JAP, Picada JN (2006) Neuropharmacological analysis of Caffeic acid in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 99:374–378. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.03.003>
- Pflüger P, Regner GG, Coelho VR, da Silva LL, Nascimento L, Viau CM, Zanette RA, Hoffmann C, Picada JN, Saffi J, Pereira P (2018) Gamma-Decanactone improves biochemical parameters associated with pilocarpine-induced seizures in male mice. *Curr Mol Pharmacol* 11(2):162–169. <https://doi.org/10.2174/1874467210666171002114954>
- Quinlan CL, Orr AL, Perevoshchikova IV, Treberg JR, Ackrell BA, Brand MD (2012) Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse. *J Biol Chem* 287(32):27255–27264. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374629>
- Rahbardar MG, Amin B, Mehri S, Mimajafi-Zadeh SJ, Hosseinzadeh H (2018) Rosmarinic acid attenuates development and existing pain in a rat model of neuropathic pain: an evidence of anti-oxidative and anti-inflammatory effects. *Phytomedicine* 40:59–67. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.01.001>
- Rizk HA, Masoud MA, Maher OW (2017) Prophylactic effects of ellagic acid and **rosmarinic acid** on doxorubicin-induced neurotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 31(12). <https://doi.org/10.1002/jbt.21977>
- Rocha J, Eduardo-Figueira M, Barateiro A, Fernandes A, Brites D, Bronze R, Duarte CMM, Serra AT, Pinto R, Freitas M, Fernandes E, Silva-Lima B, Mota-Filipe H, Sepodes B (2015) Anti-inflammatory effect of Rosmarinic acid and an extract of *Rosmarinus officinalis* in rat models of local and systemic inflammation. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 116:398–413. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12335>
- Rowles J, Olsen M (2012) Perspectives on the Development of Antioxidant Antiepileptogenic Agents. *Mini-Reviews Med Chem* 12:1015–1027. <https://doi.org/10.2753/RES1060-939322036>
- Rowley S, Patel M (2013) Mitochondrial involvement and oxidative stress in temporal lobe epilepsy. *Free Radic Biol Med* 62:121–131. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.002>
- Salami P, Lévesque M, Gotman J, Avoli M (2015) Distinct EEG seizure patterns reflect different seizure generation mechanisms. *J Neurophysiol* 113:2840–2844. <https://doi.org/10.1152/jn.00031.2015>
- Salgo MG, Pryor WA (1996) Trolox inhibits Peroxynitrite-mediated oxidative stress and apoptosis in rat Thymocytes. *Arch Biochem Biophys* 333(2):482–488. <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0418>
- Schapira AHV, Mann VM, Cooper JM, Dexter D, Daniel SE, Jenner P, Clark JB, Marsden CD (1990) Anatomic and disease specificity of NADH CoQ₁ reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 55:2142–2145. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1990.tb05809.x>
- Selivanov VA, Votyakova TV, Pivtoraiko VN, Zeak J, Sukhomlin T, Trucco M, Roca J, Cascante M (2011) Reactive oxygen species production by forward and reverse electron fluxes in the mitochondrial respiratory chain. *PLoS Comput Biol* 7(3):1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1001115>
- Shiha AA, de la Rosa RF, Delgado M, Pozo MA, García-García L (2017) Subacute fluoxetine reduces signs of hippocampal damage induced by a single Convulsant dose of 4-Aminopyridine in rats. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 16(6):694–704. <https://doi.org/10.2174/1871527315666160720121723>
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191
- Singh A, Kukreti R, Saso L, Kukreti S (2019) Oxidative stress: a key modulator in neurodegenerative diseases. *Molecules* 24(8):1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules24081583>
- Turrens JF (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552:335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Van Houten B, Woshner V, Santos JH (2006) Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)* 5:145–152. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2005.03.002>
- Venditti P, Di Stefano L, Di Meo S (2013) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion* 13:71–82. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.01.008>
- Wahab A, Albus K, Gabriel S, Heinemann U (2010) In search of models of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsia* 51:154–159. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2010.02632.x>
- Wang J, Xu H, Jiang H, Du X, Sun P, Xie J (2012) Neurorescue effect of rosmarinic acid on 6-hydroxydopamine-lesioned nigral dopamine neurons in rat model of Parkinson's disease. *J Mol Neurosci* 47: 113–119. <https://doi.org/10.1007/s12031-011-9693-1>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

4. DISCUSSÃO GERAL

Apesar de as moléculas antioxidantes demonstrarem grande efeito na redução de danos decorrentes do estresse oxidativo causados pelas crises epiléticas, a falta de efeito na prevenção das crises ainda é um problema. Essa falta de efeito na prevenção de crises pode ocorrer porque os tratamentos administrados possuem um efeito muito rápido ou porque sua ação é muito demorada (PAULETTI *et al.*, 2017).

Em humanos, a ingestão de AR por via oral faz que seus níveis cheguem a uma concentração máxima no sangue dentro de trinta minutos, sendo então metabolizado dentro de 2 horas e excretado pela urina em até 6 horas (BABA *et al.*, 2005). Porém, tem sido demonstrado que, além de sua rápida metabolização, a biodisponibilidade do AR é baixa após sua passagem pelo trato gastrointestinal, quando administrado por via oral (WANG *et al.*, 2017). Em nosso trabalho, a administração do AR foi realizada por via intraperitoneal, apesar não haverem estudos avaliando a biodisponibilidade do AR em animais, quando administrados por essa via, é possível que ela também seja baixa.

Levando em consideração que Grigoletto *et al.*, (2016) utilizaram doses mais altas do AR, quando comparados ao nosso trabalho, e demonstraram melhores efeitos na diminuição de crises epiléticas e de marcadores de estresse oxidativo, pode-se supor que concentrações mais altas desse composto estavam biodisponíveis para realizar as ações encontradas em tal estudo.

Para que o AR possa ser utilizado no tratamento da epilepsia e outras doenças, novas tecnologias têm sido estudadas para que esse composto possa ser administrado por via oral e consiga ultrapassar as barreiras biológicas, estando biodisponível em concentrações mais altas e efetivas, principalmente para chegar a alvos difíceis de alcançar como o encéfalo. Uma tecnologia que recentemente se mostrou muito eficiente no aumento da biodisponibilidade do AR é o nanoencapsulamento (FACHEL *et al.*, 2019). Essa tecnologia é capaz de aumentar a solubilidade, estabilidade, permeabilidade através de membranas e, conseqüentemente a biodisponibilidade dos compostos. Nos trabalhos de Madureira *et al.*, (2015, 2016) é possível observar que, quando encapsulado em nanopartículas, o AR pode ser completamente absorvido pelo intestino delgado, possibilitando assim, que ele esteja disponível em maiores concentrações.

Além disso, a combinação de antioxidantes com ações complementares pode ser mais efetiva, como Pauletti *et al.*, (2017) demonstraram em seu trabalho. No estudo de

Pauletti e colaboradores, os autores utilizaram dois antioxidantes, um de ação aguda (N-acetilcisteína) e outro que aumenta a longo-prazo as defesas antioxidantes endógenas (sulforafano) do organismo. Foi demonstrado que essa combinação não só diminui o estresse oxidativo durante a epileptogênese, mas também é capaz de bloquear a progressão das crises espontâneas, reduzindo a perda neuronal e diminuindo as comorbidades associadas à doença.

Como visto no trabalho de Pauletti *et al.*, (2017) a intervenção com medicamentos antioxidantes pode representar um importante alvo terapêutico para o estresse oxidativo que ocorre no encéfalo após o primeiro *status epilepticus* (crise epiléptica que dura mais de cinco minutos) e que também pode ser observado na epilepsia crônica.

Além do mais, como discutido anteriormente, o AR tem demonstrado atuar em diversas vias que podem estar afetadas na epilepsia como, por exemplo, a via GABAérgica e os CCTT e ainda é capaz de atenuar a produção de EROs e assim diminuir, ou até mesmo evitar, as consequências que o estresse oxidativo gerado pelas crises epiléticas pode causar. Portanto, demonstrando um importante potencial do AR para atuar como agente antiepiléptico ou como adjuvante no tratamento da epilepsia.

Apesar de não significativo, o AR apresentou uma tendência em reduzir a porcentagem de crises induzidas por 4-AP. Sabe-se que as crises epiléticas induzidas por 4-AP não podem ser bloqueadas pela ativação do sistema GABAérgico (PENA; TAPIA, 2000), portanto o maior efeito do AR sobre as crises parece ser devido ao seu bloqueio dos CCTT, diminuindo a excitabilidade neuronal causada pela administração de 4-AP. Já em relação ao modelo de indução por PTX, o AR demonstrou não ser efetivo nas avaliações comportamentais relacionadas às crises, porém demonstrou promissores resultados nos parâmetros bioquímicos.

Os resultados encontrados na avaliação da produção de EROs, através do métodos de fluorescência de DCF, estão de acordo com a literatura, confirmando o efeito antioxidante de moléculas polifenólicas, como o AR (RODRIGUES *et al.*, 2013; SCOLA *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2008). O método utilizado para a avaliação da produção EROs é capaz de identificar mudanças na sinalização de ferro e na presença de citocromo c, além de várias EROs (KALYANARAMAN *et al.*, 2012), portanto, é capaz de identificar várias moléculas liberadas após danos mitocondriais.

Como discutido previamente, a atividade neuronal excessiva, como a que ocorre durante as crises epiléticas, pode resultar em um aumento no vazamento de O_2^- dos complexos mitocondriais. Foi possível observar, especialmente no modelo de 4-AP que

houve um aumento na atividade da enzima SOD, responsável pela catálise de O_2^- em H_2O_2 , assim como uma diminuição na atividade dos complexos mitocondriais I-III. Esses resultados indicam que as crises epiléticas geraram um aumento na produção de EROs que podem ter induzido danos aos complexos mitocondriais. Além disso, danos ao complexo mitocondrial II, que também podem ser associados a uma produção de EROs (ORR *et al.*, 2012; QUINLAN *et al.*, 2012), foram encontrados em ambos os modelos.

Sabe-se que reduções na atividade dos complexos mitocondriais podem levar a deficiências no metabolismo energético neuronal, o que faz com que neurônios tornem-se mais excitáveis e, portanto, mais suscetíveis a crises epiléticas (ROWLEY; PATEL, 2013). Tem sido demonstrada a ocorrência de danos mitocondriais em modelos de epilepsia, além da ocorrência de deficiências no complexo mitocondrial I de humanos com ELT, efeitos ligados a morte neuronal observada em tecidos afetados pela epilepsia, confirmando os resultados encontrados nesse trabalho (ACHARYA; KATYARE, 2005; COCK *et al.*, 2002; KUNZ *et al.*, 2000).

Um aumento na produção de H_2O_2 , induzido pela administração 4-AP e PTX, pode ser observado através do aumento na atividade da CAT, uma das enzimas responsáveis pela catálise de H_2O_2 em água. Esse aumento na produção de H_2O_2 não foi suficiente para causar danos nas membranas lipídicas das células hipocâmpais, visto que não foram encontrados níveis significativos de produção de MDA, o mais importante produto gerado pela peroxidação lipídica. Porém, foi suficiente para causar danos ao DNA em ambos os modelos, como foi observado através do índice de dano ao DNA.

O AR se mostrou efetivo na redução de EROs em ambos os modelos, além de ser capaz de diminuir a atividade das enzimas SOD e CAT, possivelmente devido a diminuição na produção de EROs. Uma produção mais baixa de EROs também fez com que o AR impedisse o dano ao DNA causado pela indução das crises epiléticas, além de impedir uma redução na atividade dos complexos mitocondriais. Sendo que o melhor efeito observado na atividade dos complexos I-III do modelo induzido por PTX foi com a sua maior dose. Já na atividade do complexo II, o AR se mostrou efetivo em ambos os modelos. Mais uma vez demonstrando os importantes efeitos neuroprotetores de moléculas antioxidantes. O efeito neuroprotetor do AR encontrado nesse estudo está de acordo com estudos anteriores realizados por Coelho *et al.*, 2015, 2017; Grigoletto *et al.*, 2016; Khamse *et al.*, 2015; Furtado *et al.*, 2010 e Wang *et al.*, 2012.

5. CONCLUSÕES

Em relação ao efeito do Ácido Rosmarínico sob as crises epilépticas, podemos concluir que, nas doses testadas de 8 mg/kg e 16 mg/kg, esse composto não demonstrou efeito significativo no aumento da latência para a primeira crise epiléptica, assim como não foi capaz de diminuir a porcentagem de animais que apresentaram crises, em ambos os modelos avaliados (4-AP e PTX).

Quanto aos parâmetros bioquímicos analisados, é possível observar que o AR foi capaz de diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio produzidas pela administração de 4-AP e PTX em sua dose mais alta. Assim como, a dose de 16 mg/kg foi capaz de diminuir a atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, ligadas ao processo de catálise das espécies reativas de oxigênio.

No que se refere aos danos causados pela produção de espécies reativas de oxigênio, podemos observar que o AR, em ambas as doses, foi capaz de impedir o dano ao DNA causado pelas crises epilépticas nos dois modelos testados. Já os índices de peroxidação lipídica não sofreram grandes alterações após a indução das crises epilépticas, provavelmente pelo fato de as crises serem agudas.

Tendo em vista que foi possível observar uma redução na transferência de elétrons entre os complexos mitocondriais I e III, foi possível demonstrar que o AR é capaz de prevenir essa redução, em sua dose mais alta administrada no modelo de PTX. Enquanto que a atividade do complexo II, que sofreu uma redução em sua atividade no modelo de 4-AP, teve seus níveis de atividade protegidos com a administração do AR.

Portanto, podemos concluir que a administração do AR, nos modelos de crises epilépticas induzidas por 4-AP e PTX, é capaz de diminuir os marcadores de estresse oxidativo aumentados pela indução das crises, além de prevenir os danos causados pelo aumento da produção de EROs, porém não é capaz de prevenir a indução das crises epilépticas nos modelos estudados.

Mais estudos são necessários para avaliar o potencial do AR como adjuvante no tratamento da epilepsia. Os mecanismos de ação desse composto ainda devem ser completamente elucidados, além de que maiores doses devem ser testadas, sendo que a biodisponibilidade do AR deve ser levada em consideração.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, M. M.; KATYARE, S. S. Structural and functional alterations in mitochondrial membrane in picrotoxin-induced epileptic rat brain. **Experimental Neurology**, v. 192, n. 1, p. 79–88, 2005.

AGUIAR, C.C.T.; ALMEIDA, A. B.; ARAÚJO, P. V. P.; ABREU, R. N. D. C. DE; CHAVES, E. M. C.; VALE, O. C. DO; MACÊDO, D. S.; WOODS, D. J.; FONTELES, M. M. DE F.; VASCONCELOS, S. M. M. Oxidative stress and epilepsy: Literature review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 1–12, 2012.

ARELLANO, J. I.; MUÑOZ, A.; BALLESTEROS-YÁÑEZ, I.; SOLA, R. G.; DEFELIPE, J. Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. **Brain**, v. 127, p. 45–64, 2004.

AWAD, R.; MUHAMMAD, A.; DURST, T.; TRUDEAU, V. L.; ARNASON, J. T. Bioassay-guided Fractionation of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) using an In Vitro Measure of GABA Transaminase Activity. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1075–1081, 2009.

BABA, S.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; YASUDA, A.; MUTO, Y.; HIYOSHI, K.; TAKANO, H.; YOSHIKAWA, T.; TERAOKA, J. Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of *Perilla frutescens* extract in humans. **European Journal of Nutrition**, v. 44, p. 1–9, 2005.

BHAT, A. H.; DAR, K. B.; ANEES, S.; ZARGAR, M. A.; MASOOD, A.; SOFI, M. A.; GANIE, S. A. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 74, p. 101–110, 2015.

BOISON, D.; SANDAU, U. S.; RUSKIN, D. N.; KAWAMURA JR., M.; MASINO, S. A. Homeostatic control of brain function—new approaches to understand epileptogenesis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, p. 1–12, 2013.

BOISON, D.; STEINHÄUSER, C. Epilepsy and astrocyte energy metabolism. **Glia**, v. 66, p. 1235–1243, 2018.

CALCAGNOTTO, M. E.; PAREDES, M. F.; TIHAN, T.; BARBARO, N. M.; BARABAN, S. C. Dysfunction of Synaptic Inhibition in Epilepsy Associated with Focal Cortical Dysplasia. **Journal of Neuroscience**, v. 25, n. 42, p. 9649–9657, 2005.

CALCAGNOTTO, M. E.; RUIZ, L. P.; BLANCO, M. M.; SANTOS-JUNIOR, J. G.; VALENTE, M. F.; PATTI, C.; FRUSSA-FILHO, R.; SANTIAGO, M. F.; ZIPANCIC, I.; ÁLVAREZ-DOLADO, M.; MELLO, L. E.; LONGO, B. M. Effect of neuronal precursor cells derived from medial ganglionic eminence in an acute epileptic seizure model. **Epilepsia**, v. 51, n. SUPPL. 3, p. 71–75, 2010.

CANTU, D.; SCHAACK, J.; PATEL, M. Oxidative Inactivation of Mitochondrial Aconitase Results in Iron and H₂O₂-Mediated Neurotoxicity in Rat Primary Mesencephalic Cultures. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. 3–11, 2009.

CHEN, X.; DURISIC, N.; LYNCH, J. W.; KERAMIDAS, A. Inhibitory synapse

deficits caused by familial $\alpha 1$ GABA_A receptor mutations in epilepsy. **Neurobiology of Disease**, v. 108, p. 213–224, 2017.

CHUANG, Y.; CHEN, S.; LIOU, C.; LIN, T.; CHAN, S. H. H.; CHANG, A. Y. W. Contribution of nitric oxide, superoxide anion, and peroxynitrite to activation of mitochondrial apoptotic signaling in hippocampal CA3 subfield following experimental temporal lobe status epilepticus. **Epilepsia**, v. 50, n. 4, p. 731–746, 2009.

COCK, H. R.; TONG, X.; HARGREAVES, I. P.; HEALES, S. J. R.; CLARK, J. B.; PATSALOS, P. N.; THOM, M.; GROVES, M.; SCHAPIRA, A. H. V.; SHORVON, S. D.; WALKER, M. C. Mitochondrial dysfunction associated with neuronal death following status epilepticus in rat. **Epilepsy Research**, v. 48, p. 157–168, 2002.

COELHO, V. R.; VIEIRA, C. G.; DE SOUZA, L. P.; MOYSÉS, F.; BASSO, C.; PAPKE, D. K. M.; PIRES, T. R.; SIQUEIRA, I. R.; PICADA, J. N.; PEREIRA, P. Antiepileptogenic, antioxidant and genotoxic evaluation of rosmarinic acid and its metabolite caffeic acid in mice. **Life Sciences**, v. 122, p. 65–71, 2015.

CORNFORD, E. M.; SHAMSA, K.; ZEITZER, J. M.; ENRIQUEZ, C. M.; WILSON, C. L.; BEHNKE, E. J.; FRIED, I.; ENGEL, J. Regional Analyses of CNS Microdialysate Glucose and Lactate in Seizure Patients. **Epilepsia**, v. 43, n. 11, p. 1360–1371, 2002.

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

DURING, M. J.; FRIED, I.; KATZ, A.; SPENCER, D. D. Direct Measurement of Extracellular Lactate in the Human Hippocampus During Spontaneous Seizures. **Journal of Neurochemistry**, v. 62, p. 2356–2361, 1994.

EL ALAOUI, C.; CHEMIN, J.; FECHTALI, T.; LORY, P. Modulation of T-type Ca²⁺ channels by Lavender and Rosemary extracts. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, p. 1–21, 2017.

FACHEL, F. N. S.; SCHUH, R. S.; VERAS, K. S.; BASSANI, V. L.; KOESTER, L. S.; HENRIQUES, A. T.; BRAGANHOL, E.; TEIXEIRA, H. F. An overview of the neuroprotective potential of rosmarinic acid and its association with nanotechnology-based delivery systems: A novel approach to treating neurodegenerative disorders. **Neurochemistry International**, v. 122, p. 47–58, 2019.

FALCO-WALTER, J. J.; SCHEFFER, I. E.; FISHER, R. S. The new definition and classification of seizures and epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 139, n. November 2017, p. 73–79, 2018.

FISHER, R. S.; BOAS, W. VAN E.; BLUME, W.; ELGER, C.; GENTON, P.; LEE, P.; ENGEL, J. 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.

FISHER, R. S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLU, A.; BOGACZ, A.; CROSS, J. H.; ELGER, C. E.; ENGEL, J.; FORSGREN, L.; FRENCH, J. A.; GLYNN, M.; HESDORFFER, D. C.; LEE, B. I.; MATHERN, G. W.; MOSHÉ, S. L.; PERUCCA, E.; SCHEFFER, I. E.; TOMSON, T.; WATANABE, M.; WIEBE, S. A practical clinical

definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p. 475–482, 2014.

FISHER, R. S.; CROSS, J. H.; FRENCH, J. A.; HIGURASHI, N.; HIRSCH, E.; JANSEN, F. E.; LAGAE, L.; MOSHÉ, S. L.; PELTOLA, J.; ROULET PEREZ, E.; SCHEFFER, I. E.; ZUBERI, S. M. 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.

FUETA, Y.; AVOLI, M. Effects of antiepileptic drugs on 4-aminopyridine-induced epileptiform activity in young and adult rat hippocampus. **Epilepsy Res.**, v. 12, p. 207–215, 1992.

FURTADO, R. A.; RODRIGUES, F.; ARAÚJO, R. DE; RESENDE, A.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C. Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, p. 254–259, 2010.

GAO, L. P.; WEI, H. L.; ZHAO, H. S.; XIAO, S. Y.; ZHENG, R. L. Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes. **Pharmazie**, v. 60, n. 1, p. 62–65, 2005.

GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and Apoptosis. **Apoptosis**, v. 281, n. 28, p. 1309–1313, 1998.

GRIGOLETTO, J.; DE OLIVEIRA, C. V.; GRAUNCKE, A. C. B.; DE SOUSA, T. L.; SOUTO, N. S.; DE FREITAS, M. L.; FURIAN, A. F.; SANTOS, A. R. S.; OLIVEIRA, M. S. Rosmarinic acid is anticonvulsant against seizures induced by pentylenetetrazol and pilocarpine in mice. **Epilepsy & Behavior**, v. 62, p. 27–34, 2016.

GRONE, B. P.; BARABAN, S. C. Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 3, p. 339–343, 2015.

GULER, S. K.; AYTAC, B.; DURAK, Z. E.; COKAL, B. G.; GUNES, N.; YOLDAS, T. Antioxidative–oxidative balance in epilepsy patients on antiepileptic therapy: a prospective case–control study. **Neurological Sciences**, v. 37, n. 5, p. 763–767, 2016.

HAN, D.; CANALI, R.; GARCIA, J.; AGUILERA, R.; GALLAHER, T. K.; CADENAS, E. Sites and Mechanisms of Aconitase Inactivation by Peroxynitrite: Modulation by Citrate and Glutathione. **Biochemistry**, v. 44, p. 11986–11996, 2005.

INOUE, M.; SATO, E. F.; NISHIKAWA, M.; PARK, A.; KIRA, Y.; IMADA, I.; UTSUMI, K. Mitochondrial Generation of Reactive Oxygen Species and its Role in Aerobic Life. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2495–2505, 2003.

JACOB, S.; NAIR, A. B. An Updated Overview on Therapeutic Drug Monitoring of Recent Antiepileptic Drugs. **Drugs in R&D**, v. 16, n. 4, p. 303–316, 2016.

JARRETT, S. G.; LIANG, L.; HELLIER, J. L.; STALEY, K. J.; PATEL, M. Mitochondrial DNA damage and impaired base excision repair during epileptogenesis. **Neurobiology of Disease**, v. 30, p. 130–138, 2008.

JIN, X.; LIU, P.; YANG, F. Rosmarinic Acid Ameliorates Depressive-Like Behaviors in a Rat Model of CUS and Up-Regulates BDNF Levels in the Hippocampus and Hippocampal-Derived Astrocytes. p. 1828–1837, 2013.

JONES, D. P. Disruption of mitochondrial redox circuitry in oxidative stress. **Chemico-Biological Interactions**, v. 163, p. 38–53, 2006.

KALYANARAMAN, B.; DARLEY-USMAR, V.; DAVIES, K. J. A.; DENNERY, P. A.; JAY, H.; GRISHAM, M. B.; MANN, G. E.; MOORE, K.; ROBERTS, L. J.; ISCHIROPOULOS, H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 1–6, 2012.

KAMINSKI, R. M.; ROGAWSKI, M. A.; KLITGAARD, H. The Potential of Antiseizure Drugs and Agents that Act on Novel Molecular Targets as Antiepileptogenic Treatments. **Neurotherapeutics**, v. 11, n. 2, p. 385–400, 2014.

KANDRATAVICIUS, L.; BALISTA, P. A.; LOPES-AGUIAR, C.; RUGGIERO, R. N.; UMEOKA, H.; GARCIA-CAIRASCO, N.; BUENO-JUNIOR, L. S.; LEITE, J. P. Animal Models of Epilepsy: Utility and Limitations. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 10, p. 1693–1705, 2014.

KHAMSE, S.; SADR, S. S.; ROGHANI, M.; HASANZADEH, G.; MOHAMMADIAN, M. Rosmarinic acid exerts a neuroprotective effect in the kainate rat model of temporal lobe epilepsy: Underlying mechanisms. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 12, p. 1818–1825, 2015.

KOBAYASHI, M.; BUCKMASTER, P. S. Reduced Inhibition of Dentate Granule Cells in a Model of Temporal Lobe Epilepsy. **The Journal of Neuroscience**, v. 23, n. 6, p. 2440–2452, 2003.

KORSHOEJ, A. R.; HOLM, M. M.; JENSEN, K.; LAMBERT, J. D. C. Kinetic analysis of evoked IPSCs discloses mechanism of antagonism of synaptic GABA_A receptors by picrotoxin. **British Journal of Pharmacology**, v. 159, p. 636–649, 2010.

KOVAC, S.; KOSTOVA, A. T. D.; HERRMANN, A. M.; MEUTH, S. G.; GORJI, A. Metabolic and Homeostatic Changes in Seizures and Acquired Epilepsy — Mitochondria, Calcium Dynamics and Reactive Oxygen Species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 19, p. 1–19, 2017.

KOWALTOWSKI, A. J.; CASTILHO, R. F.; VERCESI, A. E. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 495, p. 12–15, 2001.

KUDIN, A. P.; KUDINA, T. A.; SEYFRIED, J.; VIELHABER, S.; BECK, H.; ELGER, C. E.; KUNZ, W. S. Seizure-dependent modulation of mitochondrial oxidative phosphorylation in rat hippocampus. **European Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 1105–1114, 2002.

KUNZ, W. S.; KUDIN, A. P.; VIELHABER, S.; BLUMCKE, I.; ZUSCHRATTER, W.; SCHRAMM, J.; BECK, H.; ELGER, C. E. Mitochondrial Complex I Deficiency in the Epileptic Focus of Patients with Temporal Lobe Epilepsy. **Annals of Neurology**, v. 48, n. 5, p. 766–773, 2000.

KWON, Y. O.; HONG, J. T.; OH, K. W. Rosmarinic acid potentiates pentobarbital-induced sleep behaviors and non-rapid eye movement (NREM) sleep through the activation of GABA_A-ergic systems. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 25, n. 2, p.

105–111, 2017.

LI, X.; FANG, P.; MAI, J.; CHOI, E. T.; WANG, H.; YANG, X. F. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 6, n. 1, p. 19, 2013.

LÖSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, n. 5, p. 359–368, 2011.

LÖSCHER, W. Animal Models of Seizures and Epilepsy: Past, Present, and Future Role for the Discovery of Antiseizure Drugs. **Neurochemical Research**, v. 42, n. 7, p. 1873–1888, 2017.

MADUREIRA, A. R.; CAMPOS, D. A.; FONTE, P.; NUNES, S.; REIS, F.; GOMES, A. M.; SARMENTO, B.; PINTADO, M. M. Characterization of solid lipid nanoparticles produced with carnauba wax for rosmarinic acid oral delivery. **RSC Advances**, v. 5, n. 29, p. 22665–22673, 2015.

MADUREIRA, A. R.; CAMPOS, D. A.; FERNANDES, J. C.; MARQUES, C.; GULLON, B.; RODRIGUEZ-ALCALA, L. M.; CALHAU, C.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. M.; REIS, F. Safety profile of solid lipid nanoparticles loaded with rosmarinic acid for oral use: in vitro and animal approaches. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 3621–3640, 2016.

MAIO, R. D. I. Neuronal mechanisms of epileptogenesis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. February, p. 1–2, 2014.

MARTINC, B.; GRABNAR, I.; VOVK, T. The Role of Reactive Species in Epileptogenesis and Influence of Antiepileptic Drug Therapy on Oxidative Stress. **Current Neuropharmacology**, v. 10, p. 328–343, 2012.

MCDONALD, T. S.; BORGES, K. Impaired hippocampal glucose metabolism during and after flurothyl-induced seizures in mice: Reduced phosphorylation coincides with reduced activity of pyruvate dehydrogenase. **Epilepsia**, v. 58, n. 7, p. 1172–1180, 2017.

MENON, B.; RAMALINGAM, K.; VINOTH, R. Oxidative stress in patients with epilepsy is independent of antiepileptic drugs. **Seizure: European Journal of Epilepsy**, v. 21, n. 10, p. 780–784, 2012.

MIRONCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, p. 68–78, 2018.

MYERS, T. L.; GONZALEZ, O. C.; STEIN, J. B.; BAZHENOV, M. Characterizing Concentration-Dependent Neural Dynamics of 4-Aminopyridine-Induced Epileptiform Activity. **Epilepsy Journal**, v. 4, n. 2, p. 1–9, 2016.

NGUGI, A. K.; BOTTOMLEY, C.; KLEINSCHMIDT, I.; SANDER, J. W.; NEWTON, C. R. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: A meta-analytic approach. **Epilepsia**, v. 51, n. 5, p. 883–890, 2010.

OKADO-MATSUMOTO, A.; FRIDOVICH, I. Subcellular Distribution of Superoxide Dismutases (SOD) in Rat Liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 42, p.

38388–38393, 2001.

OLSEN, R. W. Picrotoxin-like channel blockers of GABA_A receptors. **PNAS**, v. 103, n. 13, p. 6081–6082, 2006.

ORR, A. L.; QUINLAN, C. L.; PEREVOSHCHIKOVA, I. V.; BRAND, M. D. A Refined Analysis of Superoxide Production by Mitochondrial sn-Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 51, p. 42921–42935, 2012.

PATEL, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: Cause and consequence of epileptic seizures. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 12, p. 1951–1962, 2004.

PATERGNANI, S.; SUSKI, J. M.; AGNOLETTI, C.; BONONI, A.; BONORA, M.; MARCHI, E. DE; GIORGI, C.; MARCHI, S.; MISSIROLI, S.; POLETTI, F.; RIMESSI, A.; DUSZYNSKI, J.; WIECKOWSKI, M. R.; PINTON, P. Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). **Cell Communication and Signaling**, v. 9, n. 19, p. 1–10, 2011.

PAULETTI, A.; TERRONE, G.; SHEKH-AHMAD, T.; SALAMONE, A.; RAVIZZA, T.; RIZZI, M.; PASTORE, A.; PASCENTE, R.; LIANG, L.; VILLA, B. R.; BALOSSO, S.; ABRAMOV, A. Y.; VLIET, E. A. VAN; DEL GIUDICE, E.; ARONICA, E.; ANTOINE, D. J.; PATEL, M.; WALKER, M. C.; VEZZANI, A. Targeting oxidative stress improves disease outcomes in a rat model of acquired epilepsy. **Brain**, v. 140, n. 7, p. 1–15, 2017.

PEARSON-SMITH, J. N.; PATEL, M. Metabolic Dysfunction and Oxidative Stress in Epilepsy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2365, p. 1–13, 2017.

PENA, F.; TAPIA, R. Seizures and neurodegeneration induced by 4-aminopyridine in rat hippocampus in vivo: Role of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission and of ion channels. **Neuroscience**, v. 101, n. 3, p. 547–561, 2000.

PEREIRA, P.; TYSCA, D.; OLIVEIRA, P.; BRUM, L. F. DA S.; PICADA, J. N.; ARDENGHI, P. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 3, p. 199–203, 2005.

PÉREZ-FONS, L.; GARZÓN, M. T.; MICOL, V. Relationship between the Antioxidant Capacity and Effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Polyphenols on Membrane Phospholipid Order. **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 1, p. 161–171, 2010.

PEREZ-REYES, E. Molecular Physiology of Low-Voltage-Activated T-type Calcium Channels. **Physiological Reviews**, v. 83, p. 117–161, 2003.

PETERSEN, M. Rosmarinic acid: new aspects. **Phytochem Rev**, v. 12, n. 207, 2013.

PETERSEN, M.; SIMMONDS, M. S. . Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 121–125, 2003.

PITKÄNEN, A. Therapeutic approaches to epileptogenesis — Hope on the horizon. **Epilepsia**, v. 51, n. (Suppl. 3), p. 2–17, 2010.

PITKÄNEN, A.; LUKASIUK, K.; DUDEK, F. E.; STALEY, K. J. Epileptogenesis.

Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, v. 5, n. a022822, p. 1–18, 2015.

POWELL, K. L.; CAIN, S. M.; SNUTCH, T. P.; O'BRIEN, T. J. Low threshold T-type calcium channels as targets for novel epilepsy treatments. **The British Pharmacological Society**, v. 77, n. 5, p. 729–739, 2013.

QIAN, T.; NIEMINEN, A.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J. J. Mitochondrial permeability transition in pH-dependent reperfusion injury to rat hepatocytes. **The American journal of physiology**, v. 273, p. 1783–1792, 1997.

QUINLAN, C. L.; ORR, A. L.; PEREVOSHCHIKOVA, I. V.; TREBERG, J. R.; ACKRELL, B. A.; BRAND, M. D. Mitochondrial Complex II Can Generate Reactive Oxygen Species at High Rates in Both the Forward and Reverse. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 287, n. 32, p. 27255–27264, 2012.

QUINTAS, R.; RAGGI, A.; GIOVANNETTI, A. M.; PAGANI, M.; SABARIEGO, C.; CIEZA, A.; LEONARDI, M. Psychosocial difficulties in people with epilepsy: A systematic review of literature from 2005 until 2010. **Epilepsy & Behavior**, v. 25, n. 1, p. 60–67, 2012.

RIZK, H. A.; MASOUD, M. A.; MAHER, O. W. Prophylactic effects of ellagic acid and rosmarinic acid on doxorubicin-induced neurotoxicity in rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 31, n. 12, p. 1–8, 2017.

ROCHA, J.; EDUARDO-FIGUEIRA, M.; BARATEIRO, A.; FERNANDES, A.; BRITES, D.; BRONZE, R.; DUARTEL, C. M. M.; SERRA, A. T.; PINTO, R.; FREITAS, M.; FERNANDES, E.; SILVA-LIMA, B.; MOTA-FILIFE, H.; SEPODES, B. Anti-inflammatory Effect of Rosmarinic Acid and an Extract of *Rosmarinus officinalis* in Rat Models of Local and Systemic Inflammation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 116, p. 398–413, 2015.

RODRIGUES, A. D.; SCHEFFEL, T. B.; SCOLA, G.; DOS SANTOS, M. T.; FANK, B.; DANI, C.; VANDERLINDE, R.; HENRIQUES, J. A. P.; COITINHO, A. S.; SALVADOR, M. Purple grape juices prevent pentylenetetrazol-induced oxidative damage in the liver and serum of Wistar rats. **Nutrition Research**, v. 33, n. 2, p. 120–125, 2013.

RONG, Y.; DOCTROW, S. R.; TOCCO, G.; BAUDRY, M. EUK-134, a synthetic superoxide dismutase and catalase mimetic, prevents oxidative stress and attenuates kainate-induced neuropathology. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 9897–9902, 1999.

ROWLES, J.; OLSEN, M. Perspectives on the Development of Antioxidant Antiepileptogenic Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 1015–1027, 2012.

ROWLEY, S.; PATEL, M. Mitochondrial involvement and oxidative stress in temporal lobe epilepsy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 62, p. 121–131, 2013.

RYAN, K.; BACKOS, D. S.; REIGAN, P.; PATEL, M. Post-Translational Oxidative Modification and Inactivation of Mitochondrial Complex I in Epileptogenesis. **The Journal of Neuroscience**, v. 32, n. 33, p. 11250–11258, 2012.

SCALBERT, A.; MANACH, C.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Dietary

Polyphenols and the Prevention of Diseases. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 4, p. 287–306, 2005.

SCARPATI, M. L.; ORIENTE, G. Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *Rosmarinus off.*). **Ric. Sci.**, v. 28, p. 2329–2333, 1958.

SCOLA, G.; SCHEFFEL, T.; GAMBATO, G.; FREITAS, S.; DANI, C.; FUNCHAL, C.; GOMEZ, R.; COITINHO, A.; SALVADOR, M. Flavan-3-ol compounds prevent pentylentetrazol-induced oxidative damage in rats without producing mutations and genotoxicity. **Neuroscience Letters**, v. 534, p. 145–149, 2013.

SHELLY, S.; MAGGIO, N.; BOXER, M.; BLATT, I.; TANNE, D.; ORION, D. Computed Tomography Perfusion Maps Reveal Blood Flow Dynamics in Postictal Patients: A Novel Diagnostic Tool. **IMAJ**, v. 19, p. 553–556, 2017.

SILVA, J. P.; GOMES, A. C.; COUTINHO, O. P. Oxidative DNA damage protection and repair by polyphenolic compounds in PC12 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 601, n. 1–3, p. 50–60, 2008.

SINGH, A.; TREVICK, S. The epidemiology of global Epilepsy. **Neurologic Clinics**, v. 34, p. 837–847, 2016.

SINGH, B.; OGIWARA, I.; KANEDA, M.; TOKONAMI, N.; MAZAKI, E.; BABA, K.; MATSUDA, K.; INOUE, Y.; YAMAKAWA, K. A K_v4.2 truncation mutation in a patient with temporal lobe epilepsy. **Neurobiology of Disease**, v. 24, n. 2, p. 245–253, 2006.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, v. 552, n. 2, p. 335–344, 2003.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

VAN HOUTEN, B.; WOSHNER, V.; SANTOS, J. H. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. **DNA Repair**, v. 5, n. 2, p. 145–152, 2006.

VENDITTI, P.; DI STEFANO, L.; DI MEO, S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Mitochondrion**, v. 13, n. 2, p. 71–82, 2013.

VOSS, P.; ENGELS, M.; STROSOVA, M.; GRUNE, T.; HORAKOVA, L. Protective effect of antioxidants against sarcoplasmic reticulum (SR) oxidation by Fenton reaction, however without prevention of Ca-pump activity. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 1726–1733, 2008.

WAHAB, A.; ALBUS, K.; GABRIEL, S.; HEINEMANN, U. In search of models of pharmacoresistant epilepsy. **Epilepsia**, v. 51, n. (Suppl. 3), p. 154–159, 2010.

WALDBAUM, S.; LIANG, L.; PATEL, M. Persistent impairment of mitochondrial and tissue redox status during lithium-pilocarpine-induced epileptogenesis. **Journal of Neurochemistry**, v. 115, p. 1172–1182, 2010.

WANG, J.; XU, H.; JIANG, H.; DU, X.; SUN, P.; XIE, J. Neurorescue effect of

rosmarinic acid on 6-hydroxydopamine-lesioned nigral dopamine neurons in rat model of Parkinson's disease. **Journal of molecular neuroscience : MN**, v. 47, n. 1, p. 113–119, 2012.

WANG, J.; LI, G.; RUI, T.; KANG, A.; LI, G.; FU, T.; LI, J.; CAI, B. Pharmacokinetics of rosmarinic acid in rats by LC- MS/MS: absolute bioavailability and dose proportionality. **RSC Advances**, v. 7, p. 9057–9063, 2017.

WANG, X.; HAI, C. Novel insights into redox system and the mechanism of redox regulation. **Molecular Biology Reports**, v. 43, n. 7, p. 607–628, 2016.

WULF, D. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological Reviews**, v. 88, p. 47–95, 2002.

YUSUF, M.; KHAN, M.; ROBAIAN, M. A.; KHAN, R. A. Biomechanistic insights into the roles of oxidative stress in generating complex neurological disorders. **Biological Chemistry**, v. 399, n. 4, p. 305–319, 2018.