

## Avaliação do potencial neuroprotetor do óleo essencial de *Citrus limon* em hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsões induzidas pela pilocarpina

[Evaluation of neuroprotective potential of *Citrus limon* essential oil in hippocampus and striatum of mice after pilocarpine-induced seizures]

Lidiane Mayra Lopes CAMPÊLO<sup>1</sup>, Chistiane Mendes FEITOSA<sup>1</sup>, Adriana da Rocha TOMÉ<sup>2</sup>, Rivelilson Mendes de FREITAS<sup>1,\*</sup>,

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Núcleo de Tecnologia Farmacêutica, Laboratório de Pesquisa em Neuroquímica Experimental, Universidade Federal do Piauí (NTF/LAPNEX/UFPI), Teresina - Piauí, Brazil.

<sup>2</sup>Universidade Estadual do Ceará, Campus do Itaperi, Avenida Parajana 1700, Fortaleza, Ceará, Brazil.

Contactos | Contacts: Rivelilson Mendes de FREITAS E-mail address: [rivelilson@pq.cnpq.br](mailto:rivelilson@pq.cnpq.br)

### Abstract

The seizures can produce neuronal damage in several brain structures. The aim of this study was to investigate the potential neuroprotective effect of essential oil of *Citrus limon* (EOCL) on the histopathological changes observed in the hippocampus and striatum of mice after seizures induced by pilocarpine. Adult Swiss mice were 2 months old. The animals were divided into four groups. The first group was treated with 0.05% Tween 80 (control group) and the second with pilocarpine (400 mg/kg group P400). The third and fourth group were treated with EOCL (150 mg/kg) and 30 min after received P400 (P400 + EOCL group) or 0.05% Tween 80, respectively. After treatment, all groups were observed for 24 h, then sacrificed and their brains removed for histopathological analysis. The group P400, presented with seizures that progressed to status epilepticus in 75% of animals. Pretreatment with EOCL produced a 25% reduction in this index. Groups P400 and P400 + EOCL showed 83.33% and 25% of animals with brain damage in the hippocampus, respectively. In the striatum of group P400 was a compromise of 75%. In turn, in the striatal region of group EOCL P400 + was seen a decrease of 58.34% in this neuronal damage. The seizures induced by pilocarpine are installed by the cholinergic system and produce brain damage. According to our results we suggest that the EOCL may modulate epileptogenesis and promote neuroprotective effects during the seizures in the model investigated.

**Keywords:** Seizures; Histopathology; Striatum; Pilocarpine; *Citrus limon*

### Resumo

As convulsões podem produzir danos neuronais em diversas estruturas cerebrais. O objetivo desse estudo foi investigar o potencial efeito neuroprotetor do óleo essencial de *Citrus limon* (OECL) nas alterações histopatológicas observadas no hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsão induzida por pilocarpina. Foram utilizados camundongos *Swiss* adultos com 2 meses de idade. Os animais foram divididos em 4 grupos. O primeiro grupo foi tratado com Tween 80 0,05% (grupo controle) e o segundo com pilocarpina (400 mg/kg, grupo P400). Já o terceiro e quarto grupo foram tratados com OECL (150 mg/kg), e 30 min depois receberam P400 (grupo OECL + P400) ou Tween 80 0,05% 0,9% (grupo OECL), respectivamente. Após os tratamentos, todos os grupos foram observados durante 24 h e em seguida sacrificados e seus cérebros removidos para as análises histopatológicas. O grupo P400, apresentou convulsões que progrediram para o estado epilético em 75% dos animais. O pré-tratamento com OECL produziu uma redução de 25% nesse índice. Os grupos P400 e OECL + P400 apresentaram 83,33% e 25% de animais com lesão cerebral no hipocampo, respectivamente. No corpo estriado dos animais do grupo P400 houve um comprometimento de 75%. Por sua vez, na região estriatal dos animais do grupo OECL + P400 foi visto uma redução de 58,34% nesse comprometimento. As convulsões induzidas pela pilocarpina são instaladas pelo sistema colinérgico e produzem dano cerebral. De acordo com nossos resultados podemos sugerir que o OECL pode modular a epileptogênese e promover ação neuroprotetora durante as convulsões no modelo investigado.

**Palabras Clave:** Convulsão; Histopatologia; Corpo Estriado; Pilocarpina; *Citrus limon*

**Recibido | Received:** 27 de Enero de 2011.

**Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form:** 10 de Febrero de 2011.

**Publicado en línea | Published online:** 30 de Marzo de 2011.

**Declaración de intereses | Declaration of interests:** financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Rivelilson Mendes de Freitas e Chistiane Mendes Feitosa são bolsistas de produtividade do CNPq

**Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as:** Lidiane Mayra Lopes CAMPÊLO, Chistiane Mendes FEITOSA, Adriana da Rocha TOMÉ, Rivelilson Mendes de FREITAS. 2011. Avaliação do potencial neuroprotetor do óleo essencial de *Citrus limon* em hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsões induzidas pela pilocarpina. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 10(2): 116 – 126.

## INTRODUÇÃO

O gênero *Citrus* da família Rutaceae é uma das mais importantes culturas de frutas do mundo e é consumido principalmente na forma de fruto fresco ou suco devido ao seu valor nutricional e sabor especial (Guimarães *et al.*, 2010). Os benefícios para saúde das frutas cítricas têm sido atribuídos a presença de constituintes bioativos como compostos fenólicos, vitamina C e carotenóides (Marchand, 2002). Muitos autores têm verificado atividade biológica e as propriedades antioxidantes de óleos essenciais de plantas medicinais (Sacchetti *et al.*, 2005; Proteggente *et al.*, 2002; Vinson *et al.*, 2001).

Há um considerável número de plantas aromáticas cujos resultados tem sido promissores no sentido de obter novos fitoterápicos. Como exemplos pode-se citar os efeitos anticonvulsivantes e ansiolíticos em modelos animais dos extratos das folhas de plantas medicinais (Lian *et al.*, 2005; Grundmann *et al.*, 2007; Xiu-Yan *et al.*, 2007). Complementando os achados sobre ação farmacológica de plantas medicinais aromáticas, ensaios pré-clínicos realizados com *Thymus broussonetti* Boiss demonstraram atividade ansiolítica no teste da caixa claro e escura (Elhabazi *et al.*, 2006). De forma semelhante, foi avaliada a atividade anticonvulsivante dos extratos hidroalcoólicos das cascas do caule de *Erythrina velutina* e *Erythrina mulungu* (Vasconcelos *et al.*, 2007).

A busca por novas farmacoterapias de plantas medicinais aromáticas para doenças psiquiátricas progrediu significativamente na década passada. Isto pode ser observado no grande número de medicamentos a base de ervas (Minh Tu *et al.*, 2002; Mora *et al.*, 2005). Entre as plantas medicinais, o grupo das “aromáticas” tem despertado muito interesse. Essas espécies possuem substâncias odoríferas que tem várias funções (Enan, 2001; Bakkali *et al.*, 2008). Trabalhos têm relatado que os monoterpenos e seus derivados sintéticos apresentam várias propriedades farmacológicas, onde podemos citar algumas delas no SNC tais como antinociceptiva (De Sousa *et al.*, 2007c), anticonvulsivante e neuroprotetora como:  $\alpha,\beta$ -epóxi-carvona (De Sousa *et al.*, 2007a), o limoneno (Viana *et al.*, 2000), o citronelol (De Sousa *et al.*, 2006) e o  $\alpha$ -Terpineol (De Sousa *et al.*, 2007b).

Diante disso, e devido ao crescente número de estudos com plantas medicinais aromáticas para o tratamento de doenças neurodegenerativas; nós resolvemos investigar o efeito do óleo essencial

extraído das folhas de *C. limon* no modelo de convulsão induzido por pilocarpina. A pilocarpina é um agonista colinérgico muscarínico utilizado em modelos experimentais para reproduzir a fisiopatologia das crises convulsivas e que permite investigar e identificar novos agentes terapêuticos para o tratamento da epilepsia refratária (Jope *et al.*, 1986). Estudos anteriores demonstram que a administração de pilocarpina, induz o desenvolvimento de convulsões, estado de mal epiléptico e lesão cerebral em roedores (Turski *et al.*, 1989; Marinho *et al.*, 1997; Freitas *et al.*, 2003). O início das convulsões pode ser bloqueado por drogas anticolinérgicas e o bloqueio de receptores glutamatérgicos impede sua propagação e o desenvolvimento de danos cerebrais (Jope *et al.*, 1986; Marinho *et al.*, 1998; Morisset *et al.*, 1987).

Fazendo uso desse modelo de convulsões tem-se estudado a severidade e as áreas cerebrais afetadas durante o desenvolvimento das lesões cerebrais em roedores. No entanto, o potencial efeito neuroprotetor do óleo essencial extraído das folhas de *C. limon* durante a evolução temporal dessas lesões cerebrais ainda não foi completamente estabelecido. De uma maneira geral, as convulsões límbicas produzem danos neuronais em diversas áreas, causando perda neuronal em várias estruturas cerebrais (Clifford *et al.*, 1987; Honchar *et al.*, 1990).

Dessa forma, fazendo uso desse modelo de convulsão nos decidimos avaliar se o potencial efeito anticonvulsivante e neuroprotetor do óleo essencial das folhas de *C. limon* em hipocampo e corpo estriado de camundongos adultos, uma vez que, essas áreas têm sido sugeridas como responsáveis pela instalação e propagação e/ou manutenção da atividade convulsiva induzida por pilocarpina, respectivamente (Turski *et al.*, 1983).

## Material e Métodos

### Procedimento experimental

Foram utilizados camundongos *Swiss* adultos (2 meses de idade; machos;  $n=48$ ), com peso variando de 20 a 25 g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí. Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas de acrílico de 30 x 30 x 17 cm<sup>3</sup> onde foram observados durante 24 h com no máximo 6 animais, em condições ambientais semelhantes, com ciclo claro/escuro alternado de 12 horas (07:00 a.m.), recebendo ração padrão tipo Purina e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados e usos de animais de laboratório do

Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (EUA).

Os animais foram divididos em quatro grupos. O primeiro grupo foi tratado com Tween 80 0,05% (i.p.,  $n=12$ , grupo controle). O segundo grupo foi tratado com pilocarpina na dose de 400 mg/kg (i.p.,  $n=12$ ; P400). Já o terceiro e quarto grupo foram tratados com o óleo essencial na dose de 150 mg/kg por via intraperitoneal, e 30 min depois receberam pilocarpina (400 mg/kg, i.p.,  $n=12$ , grupo OECL + P400) ou Tween 80 0,05% (i.p.,  $n=12$ , grupo OECL), respectivamente. Após os tratamentos os grupos foram colocados em gaiolas para observação dos seguintes parâmetros (sinais colinérgicos periféricos (SCP), tremores, movimentos estereotipados (ME), convulsões, estado de mal epilético (EME) e a taxa de mortalidade). O grupo P400 foi constituído pelos animais que apresentaram convulsão, estado epilético e que sobreviveram ao período de 24 h observação.

#### Estudos histopatológicos

Após o período de observação de 24 h, todos os grupos foram sacrificados por decapitação. Seus cérebros foram removidos e fixados em formalina a 10% por 72 h para a realização das análises histopatológicas. Cortes sagitais, feitos em intervalos de 1 mm, foram obtidos a partir de um corte inicial próximo aos corpos mamilares. Para o estudo microscópico, secções de 10  $\mu$  foram feitas, coradas em Hematoxilina - Eosina (HE), e analisadas com auxílio de um microscópio óptico. As áreas cerebrais

foram observadas e classificadas de acordo com as descrições do Atlas de Paxinos & Watson (1986). O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada hipocampo e corpo estriado analisados de acordo com o método descrito anteriormente (Bureau et al., 1994; Ferreira et al., 1997). A lesão cerebral foi definida pela presença de pelo menos 50% de alteração histopatológica em cada hipocampo e corpo estriado analisados.

#### Análise estatística

Para a análise estatística os resultados não paramétricos (percentagens) foram analisados pelo programa GraphPad Prism versão 3.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA. Copyright (c) 1994-1999 por GraphPad software utilizando o teste do qui-quadrado. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a partir de  $p<0,05$ .

#### Resultados

A tabela 1 demonstra os rendimentos, a composição química e as percentagens relativas dos constituintes encontrados no óleo volátil das folhas de *C. limon*. Diante disso, nossos resultados permitiram calcular o rendimento com base na massa das folhas frescas usadas para extração, dessa forma nosso rendimento de 0,29% foi similar ao rendimento encontrado em trabalhos anteriores para o óleo volátil obtido das folhas de *Citrus* (Minh Tu, 2002).

**Tabela 1:** Rendimento da composição química do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus limon*.

Constituintes	Índice Kovats Calculado	Área (%)
<b>Limoneno</b>	1025.5	52,77
<b>Linalol</b>	1100	1,73
<b>cis-óxido-limoneno</b>	1129.3	2,68
<b>trans-óxido-limoneno</b>	1133.7	7,13
<b>Citronelol</b>	1150	2,77
<b>Neral</b>	1238.5	6,85
<b>Geraniol</b>	1268.9	5,49
<b>Nerol</b>	1363.3	4,04
<b>Acetato de Geraniol</b>	1384.2	9,92
<b>Total</b>	-	93,38
<b>Rendimento</b>	-	0,29

Por sua vez, a tabela 2 apresenta que todos os animais tratados com pilocarpina (grupo P400,  $n=12$ ), apresentaram SCP, ME e tremores. As convulsões ocorreram em 75% (9) dos animais, que progrediram

para o estado de mal epiléptico (EME) também em 75% (9) dos animais. A taxa de mortalidade desse grupo correspondeu a 66% (8).

**Tabela 2.** Efeito de pré-tratamento com óleo essencial de *Citrus limon* em ratos durante as convulsões límbicas.

<i>Grupos</i>	<i>SCP</i>	<i>ME</i>	<i>Tremores</i>	<i>Convulsões</i>	<i>Estado</i>	<i>Taxa de</i>	<i>Número de</i>
	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	<i>piléptico</i>	<i>animais por grupo</i>
						<i>mortalidade</i>	
						(%)	
<b>P400</b>	100	100	100	75	75	66	12
<b>OECL + P400</b>	100	100	100	50 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	25 <sup>a</sup>	12
<b>OECL</b>	00	00	00	00	00	00	12

O grupo P400 foi tratado com pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). O grupo OECL + P400 foi pré-tratado com o óleo essencial de *Citrus limon* (150 mg/kg, i.p.), e 30 min após o tratamento recebeu pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). E o grupo OECL foi tratado com o óleo essencial de *Citrus limon* (150 mg/kg, i.p.). Após os tratamentos os animais foram observados durante 24 h para a determinação dos sinais colinérgicos periféricos (SCP), movimentos estereotipados (ME), tremores, convulsões, estado epiléptico e a taxa de mortalidade. Os resultados dos estudos comportamentais foram expressos em percentagem.

<sup>a</sup> $p<0,05$ , quando comparado ao grupo P400. Teste do Qui-quadrado.

Os dados apresentados na tabela 2 sugerem que os efeitos produzidos pela estimulação colinérgica periférica não são bloqueados pelo óleo essencial de *Citrus limon* (OECL) na dose de 150 mg/kg. O pré-tratamento com o óleo essencial (grupo OECL + P400) não interfere nos SCP, ME e tremores induzidos pela pilocarpina. No entanto, produziu um aumento na latência da primeira convulsão e na latência da instalação do estado epiléptico (dados não mostrados). No mesmo grupo foi visto uma diminuição de 25% no número de animais que convulsionam e que evoluem para o EME ( $p<0,05$ ). Foi verificada também uma redução na taxa de mortalidade de 41% ( $p<0,05$ ). Os grupos tratados somente com solução Tween 80 0,05% (grupo controle) ou óleo essencial (grupo OECL) não apresentaram nenhuma alteração comportamental (Tabela 2).

A tabela 3 descreve as principais alterações histopatológicas observadas no corpo estriado de camundongos adultos machos do grupo P400. Por sua

vez, nos animais que foram pré-tratados com OECL, 30 minutos antes da administração de pilocarpina houve uma redução de 58,34% no número de animais com lesão cerebral, e daqueles que apresentaram convulsão e EME foi detectado alteração histopatológica no corpo estriado em apenas dois animais (16,66%). Também foi detectada uma redução de 42,58% no grau de comprometimento do corpo estriado no grupo OECL + P400, quando comparado ao grupo P400. Os grupos tratados somente com solução Tween 80 0,05% (grupo controle) ou óleo essencial (grupo OECL) não apresentaram nenhuma alteração histopatológica (Tabela 3). Por sua vez, a Figura 1 demonstra os efeitos do pré-tratamento com óleo essencial de *Citrus limon* no corpo estriado de camundongos após convulsão induzida por pilocarpina.

Já na tabela 4 as principais mudanças histopatológicas no hipocampo dos camundongos adultos do grupo P400 podem ser verificadas. Por sua

vez, os animais pré-tratados com OECL, 30 minutos antes da administração de pilocarpina apresentaram uma redução de 58,33% no número de animais com lesão cerebral, e daqueles que apresentaram convulsão e EME foi detectado alteração histopatológica no hipocampo em três animais (25%). Também foi detectada uma redução de 49,76% no grau de comprometimento do hipocampo no grupo OECL +

P400, quando comparado ao grupo P400. Os grupos tratados somente com solução Tween 80 0,05% (grupo controle) ou óleo essencial (grupo OECL) não apresentaram nenhuma alteração histopatológica no hipocampo (Tabela 4). Além disso, na Figura 2 os efeitos do pré-tratamento com óleo essencial de *Citrus limon* no hipocampo de camundongos pode ser verificado após convulsão induzida por pilocarpina.

**Tabela 3.** Efeito de pré-tratamento com óleo essencial de *Citrus limon* nas alterações histopatológicas estriatais observadas em ratos adultos após convulsões induzidas pela pilocarpina.

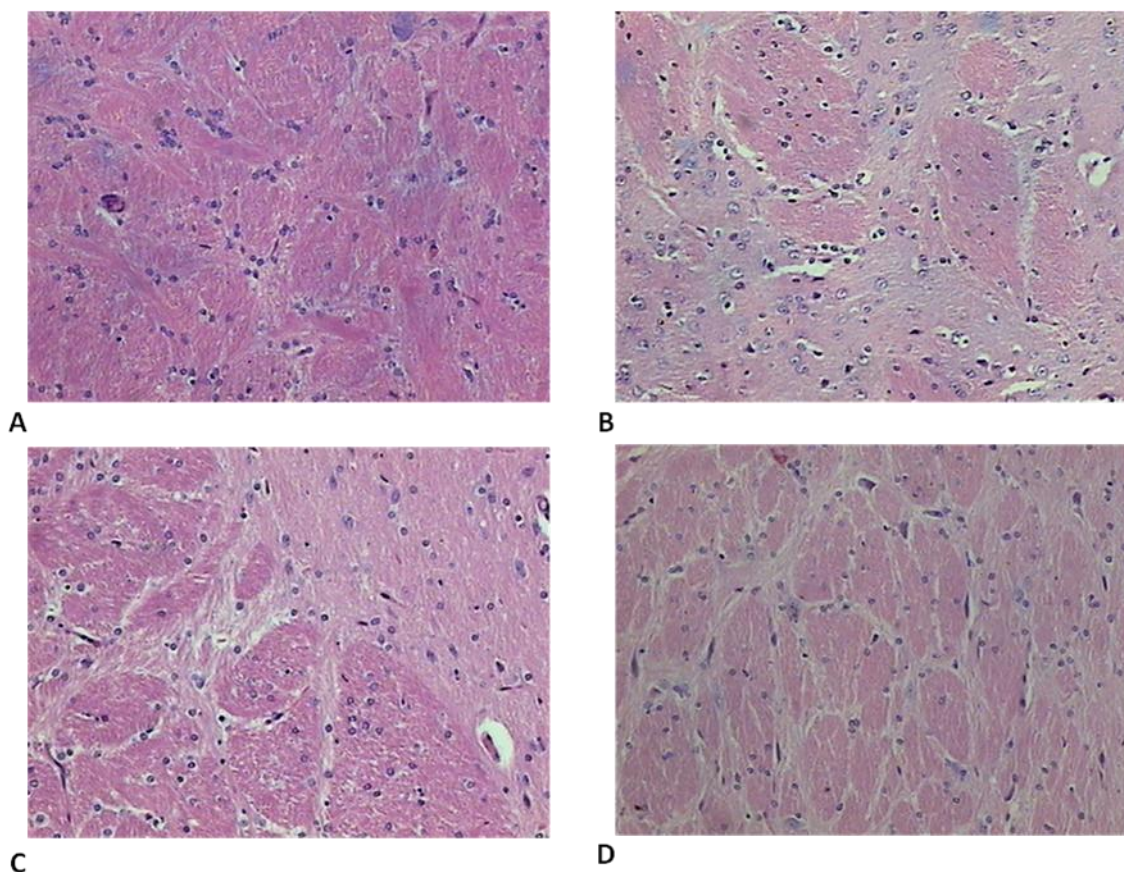
Grupos	Alterações histopatológicas no corpo estriado			
	Ratos com lesão (%)	Severidade da lesão (%)	Número de animais com lesão / grupo	Número total de animais / grupo
<b>P400</b>	75	55,39 ± 0,52	09	12
<b>OECL + P400</b>	16,66 <sup>a</sup>	12,81 ± 0,22 <sup>b</sup>	02	12
<b>OECL</b>	00	00	00	12

O grupo P400 foi tratado com pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). O grupo OECL + P400 foi pré-tratado com óleo essencial de *Citrus limon* (150 mg/kg, i.p.), e 30 min após recebeu pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). O grupo OECL foi tratado com óleo essencial de *Citrus limon* (150 mg/kg, i.p.). Após os tratamentos todos os grupos foram observados durante 24 h. O grau de comprometimento estriatal (severidade da lesão) foi expresso como a média ± S.E.M. dos escores do dano cerebral do número de animais com lesão no corpo estriado. Os animais foram definidos como tendo lesão cerebral quando havia pelo menos 50% de comprometimento no corpo estriado. <sup>a</sup>p<0,05, quando comparado ao grupo P400 (Teste do Qui-quadrado); <sup>b</sup>p<0,05, quando comprado ao grupo P400 (ANOVA e teste *t*-Student *post hoc*).

**Tabela 4.** Efeito de pré-tratamento com óleo essencial de *Citrus limon* nas alterações histopatológicas hipocampais observadas em ratos adultos após convulsões induzidas pela pilocarpina.

Grupos	Alterações histopatológicas no hipocampo			
	Ratos com lesão (%)	Severidade da lesão (%)	Número de animais com lesão / grupo	Número total de animais / grupo
<b>P400</b>	83,33	59,92 ± 0,23	10	12
<b>OECL + P400</b>	25 <sup>a</sup>	10,16 ± 0,51 <sup>b</sup>	03	12
<b>OECL</b>	00	00	00	12

O grupo P400 foi tratado com pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). O grupo OECL + P400 foi pré-tratado com óleo essencial de *Citrus limon* (150 mg/kg, i.p.), e 30 min após recebeu pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). O grupo OECL foi tratado com óleo essencial de *Citrus limon* (150 mg/kg, i.p.). Após os tratamentos todos os grupos foram observados durante 24 h. O grau de comprometimento hipocampal (severidade da lesão) foi expresso como a média ± S.E.M. dos escores do dano cerebral do número de animais com lesão hipocampal. Os animais foram definidos como tendo lesão cerebral quando havia pelo menos 50% de comprometimento no hipocampo. <sup>a</sup>p<0,05, quando comparado ao grupo P400 (Teste do Qui-quadrado); <sup>b</sup>p<0,05, quando comprado ao grupo P400 (ANOVA e teste *t*-Student *post hoc*).



**Figura 1:** Efeitos do pré-tratamento com óleo essencial de *Citrus limon* no corpo estriado de ratos após convulsão induzida por pilocarpina.

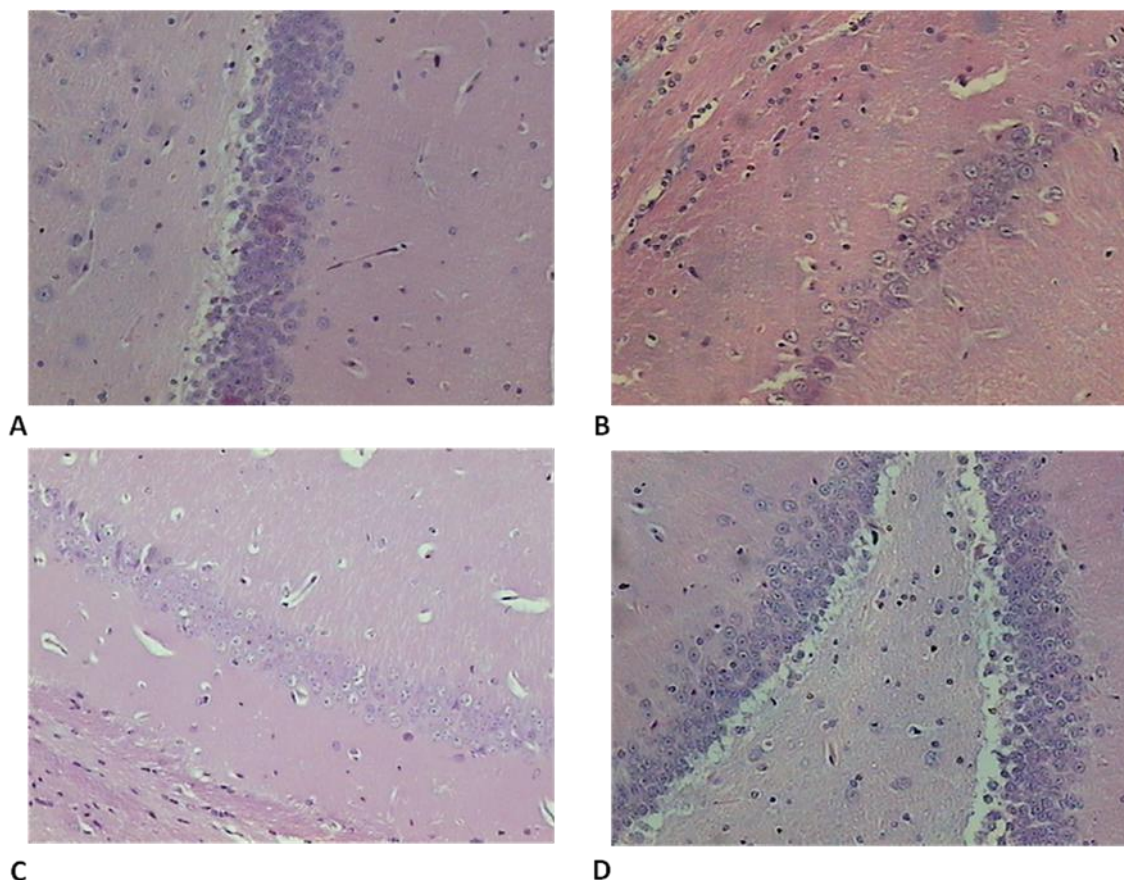
**A** - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado de ratos adultos observados por 24 h após administração do veículo - Tween 80 0,05% (dissolvido em solução salina 0,9%), i.p.;  $n=12$ , controle) (Hematoxilina – Eosina (HE) - X40);

**B** - Perda neuronal, gliose, atrofia e degeneração no corpo estriado de ratos adultos que apresentaram convulsão, estado epiléptico e que foram sacrificados 24 h após a administração de P400 (400 mg/kg, i.p.,  $n=9$ ) (HE X40);

**C** - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado de ratos adultos pré-tratados com óleo essencial de *Citrus limon* (150 mg/kg, i.p.) e que após 30 min receberam pilocarpina (400 mg/kg, i.p.,  $n=2$ , OECL + P400) (HE X40).

**D** - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado de ratos adultos observados por 24 h após administração de óleo essencial de *Citrus limon* (150 mg/kg, i.p.;  $n=12$ , OECL) (HE X40);

Todos os grupos foram observados durante 24 h, em seguida eutanasiados para remoção dos cérebros para realização dos estudos histopatológicos. O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada corpo estriado examinado. Os animais foram definidos como tendo lesão cerebral quando havia pelo menos 50% de alteração no corpo estriado.



**Figura 2:** Efeitos do pré-tratamento com óleo essencial de *Citrus limon* no hipocampo de ratos após convulsão induzida por pilocarpina.

**A** - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de ratos adultos observados por 24 h após administração do veículo - Tween 80 0,05% (dissolvido em solução salina 0,9%), i.p.;  $n=12$ , controle) (Hematoxilina – Eosina (HE) - X40);

**B** - Perda neuronal, gliose, atrofia e degeneração no hipocampo de ratos adultos que apresentaram convulsão, estado epiléptico e que foram sacrificados 24 h após a administração de P400 (400 mg/kg, i.p.,  $n=10$ ) (HE X40);

**C** - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de ratos adultos pré-tratados com óleo essencial de *Citrus limon* (150 mg/kg, i.p.) e que após 30 min receberam pilocarpina (400 mg/kg, i.p.,  $n=3$ , OECL + P400) (HE X40).

**D** - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de ratos adultos observados por 24 h após administração do óleo essencial de *Citrus limon* (150 mg/kg, i.p.;  $n=12$ , OECL) (HE X40);

Todos os grupos foram observados durante 24 h, em seguida eutanasiados para remoção dos cérebros para realização dos estudos histopatológicos. O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada corpo estriado examinado. Os animais foram definidos como tendo lesão cerebral quando havia pelo menos 50% de alteração no corpo estriado.

### Discussão

Na literatura há diversos estudos que demonstram as ações de terpenos carbonilados sobre o SNC. Por exemplo, terpenos do tipo cetona (carvona), aldeído

(citronelal), ácido carboxílico (ácido kaurenóico) e éster (jasmonato de metila) apresentam significativa atividade antinociceptiva em roedores (Block et al., 1998). Os terpenos de menor massa molecular

(monoterpenos) são encontrados nos óleos essenciais de diversas plantas medicinais que exercem atividade farmacológica no SNC. Portanto, no presente estudo avaliamos os efeitos neuroprotetores e anticonvulsivantes do óleo essencial de *C. limon* constituído de diversos monoterpenos potencialmente psicoativos.

No presente estudo, nós demonstramos que o OECL reduz o número de animais que apresentam convulsões e EME induzido por pilocarpina, e também aumenta o índice de sobrevivência dos animais. Alguns estudos têm demonstrado que o *Citrus limon* apresenta atividade antioxidante devido à presença em sua composição do ácido ascórbico e flavonóides, sugerindo uma possível atividade neuroprotetora para o óleo essencial extraído de *Citrus limon* (Vinson *et al.*, 2001; Protegente *et al.*, 2002).

Os resultados de muitos estudos demonstram que os antioxidantes exógenos podem remover os radicais livres produzidos durante as crises e pelo estado de mal epilético induzido por pilocarpina (Barros *et al.*, 2007). Nossos resultados sugerem que OECL pode exercer atividade anticonvulsivante contra as crises e reduzir a frequência de instalação do estado de mal epilético induzido por pilocarpina, como demonstrado pelo aumento na latência do início das crises convulsivas e pela diminuição da taxa de mortalidade dos animais após a administração do estímulo convulsivo.

Dados anteriores evidenciaram que o aumento do conteúdo de radicais livres durante as convulsões ocorre aumento da concentração de glutamato e conseqüentemente há uma facilitação da propagação das convulsões, bem como do dano neuronal em várias regiões cerebrais (Barros *et al.*, 2007). Com os resultados apresentados observa-se que o OECL pode participar do sistema de defesa celular contra as alterações histopatológicas induzidas por radicais livres, e conseqüentemente também pode promover alterações benéficas em parâmetros comportamentais modificados durante convulsões induzidas pela pilocarpina.

O modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina tem sido extensivamente analisado quanto às mudanças histopatológicas. As alterações observadas no hipocampo e corpo estriado reproduzem muitas destas alterações observadas em humanos epiléticos, incluindo perda neuronal e remoção do tecido de sustentação do SNC (Holmes *et al.*, 2004; Marchetti *et al.*, 2005; Garcia-Cairasco *et al.*, 1996). A literatura registra danos morfológicos em diversas estruturas cerebrais após convulsão (Kok, 1997;

Holmes *et al.*, 2004;). As principais alterações são o alargamento dos ventrículos, a deformação do giro dentado com moderada dispersão das células granulares e a perda neuronal em diversas áreas (hipocampo, córtex cerebral, corpo estriado, córtex piriforme, amígdala, tálamo, núcleo subtalâmico, corpo caloso, córtex motor e área septal).

Esses danos neuronais, também foram observados no hipocampo, amígdala, córtex piriforme, córtex entorrinal, septum lateral, tálamo, neocórtex e substância negra de camundongos convulsivos (Honchar *et al.*, 1983; Clifford *et al.*, 1987) Neste trabalho, vários animais foram distribuídos para o estudo histopatológico, sendo detectada lesão cerebral, vacuolização e gliose no grupo P400. Esses dados sugerem que durante o estabelecimento das convulsões e o desenvolvimento de alterações histopatológicas há uma participação direta do sistema colinérgico e, provavelmente uma deficiência dos sistemas antioxidantes cerebrais, uma vez que foi visto um bloqueio dessas lesões por drogas anticolinérgicas e uma redução no número de animais com dano cerebral e na severidade da lesão em ratos pré-tratados com compostos antioxidantes antes da administração do estímulo convulsivo (Barros *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2008; Militão *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2010). Em nosso estudo as estruturas cerebrais mais afetadas com a administração de pilocarpina foram, em ordem decrescente de severidade da lesão, o hipocampo, córtex fronto-parietal e entorrinal, seguidos do córtex piriforme, corpo estriado e substância negra (dados não mostrados).

Nosso estudo mostrou uma alta percentagem de animais com lesão cerebral após administração de pilocarpina. Por sua vez, no grupo dos animais pré-tratados com OECL, 30 minutos antes da administração de pilocarpina foi verificado um menor número de animais com lesão cerebral. Além disso, naqueles animais que apresentaram convulsão e EME foi detectada alteração histopatológica no corpo estriado em apenas dois deles, sugerindo, assim, que as lesões decorrentes do processo convulsivo, podem ocorrer devido à produção de radicais livres. Portanto, esses resultados indicam que o uso de compostos antioxidantes extraídos de plantas medicinais pode apresentar ação neuroprotetora durante o tratamento das convulsões em humanos.

O corpo estriado foi descrito como sendo responsável pela propagação da atividade convulsiva induzida por pilocarpina. Estudos realizados com drogas antioxidantes demonstraram um menor índice de lesões estriatais em animais epiléticos (Honchar *et*



al., 1983; Santos et al., 2008). As mudanças histopatológicas no hipocampo reproduzem muitas alterações vistas na epilepsia do lobo temporal em humanos, incluindo perda neuronal e remoção do tecido de sustentação do SNC (Holmes et al., 2004). Nossos dados concordam com os anteriormente descritos, uma vez que observamos degeneração neuronal, gliose, atrofia e vacuolização no hipocampo e corpo estriado de camundongos após administração do estímulo convulsivo. Além disso, foram evidenciados efeitos neuroprotetores do OECL nas duas áreas cerebrais analisadas, por meio da diminuição do número de animais que apresentam dano cerebral e na redução da severidade da lesão.

As convulsões induzidas por pilocarpina são instaladas pelo sistema colinérgico, enquanto que, a propagação e o desenvolvimento do dano cerebral devem-se ao aumento da produção de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) e pela estimulação do sistema glutamatérgico. Os compostos antioxidantes extraídos de plantas medicinais podem apresentar um potencial terapêutico para pacientes epiléticos na proteção contras as lesões cerebrais durante a atividade epilética, provavelmente, por meio da remoção de radicais livres, pelas mudanças nas propriedades da membrana celular e, ainda pela estabilização das funções sinápticas neuronais.

## CONCLUSÃO

Nossos dados sugerem que OECL pode influenciar a epileptogênese e promover ações anticonvulsivantes e neuroprotetoras durante as convulsões induzidas por pilocarpina. Entretanto, novos estudos devem ser realizados no intuito de fortalecer os mecanismos de ação do OECL que justifiquem o seu uso no tratamento clínico de pacientes epiléticos.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Rivelilson Mendes de Freitas e Chistiane Mendes Feitosa são bolsistas de produtividade do CNPq. Gostaríamos de agradecer a Stênio Gardel Maia pela assistência técnica.

## REFERÊNCIAS

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem Toxicol* 46: 446 - 475.

Barros DO, Xavier SM, Barbosa CO, Silva RF, Maia FD, Oliveira AA, Freitas RM. 2007. Effects of the vitamin E in catalase activities in

hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. *Neurosci Lett* 416: 227 - 230.

- Block LC, Santos ARS, De Souza MM, Scheidt C, Yunes RA, Santos MA, Monache FD, Filho VC. 1998. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. *J Ethnopharmacol* 61: 85 - 89.
- Bureau YRJ, Peredery O, Persinger MA. 1994. Concordance of quantitative damage within the diencephalon and telencephalon following systemic pilocarpine (380 mg/kg) or lithium (3 mEq/kg)/pilocarpine (30 mg/kg) induced seizures. *Brain Res* 648: 265 - 269.
- Clifford DB, Olney JW, Maniotis A, Collins RC, Zorumski CF. 1987. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. *Neuroscience* 23: 953 - 968.
- De Sousa DP, Gonçalves JCR, Quintans-Júnior L, Cruz JS, Araújo DAM, Almeida R. N. 2006. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. *Neurosci Lett* 401: 231 - 235.
- De Sousa, DP, Nóbrega FFF, Claudino FS, De Almeida RN, Leite JR, Mattei R. 2007a. Pharmacological effects of the monoterpene  $\alpha$ - $\beta$ -epoxy-carvone in mice. *Rev Bras Farmacol* 17: 170 - 175.
- De Sousa, DP, Quintans JL, Almeida, RN. 2007b. Evaluation of the anticonvulsant activity of alfa-Terpineol. *Pharm Biol* 45: 69 - 70.
- De Sousa DP, Junior EVM, Oliveira FS, De Almeida RN, Nunes XP, Barbosa-Filho JM. 2007c. Antinociceptive activity of structural analogues of rotundifolone: structure-Activity relationship. *Z Naturforsch C* 62: 39 - 42.
- Elhabazi K, Dicko A, Desor F, Dalal A, Younos C, Soulimani R. 2006. Preliminary study on immunological and behavioural effects of *Thymus broussonetii* Boiss, an endemic species in Morocco. *J Ethnopharmacol* 103: 413 - 419.
- Enan E. 2001. Insecticidal activity of essential oils: octopaminergic sites of action. *Comm Biochem Physiol* 130: 325 - 337.
- Ferreira ALA, Matsubara LS. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Brasil* 4: 61 - 68.

- Freitas RM, Viana GSB, Fonteles MMF. 2003. Níveis dos neurotransmissores estriatais durante o estado epiléptico. *Rev Psiquiatr Clín* 30: 76 - 79.
- Garcia-Cairasco N, Wakamatsu H, Oliveira JAC, Gomes ELT, Del Bel EA, Mello LEA. 1996. Neuroethological and morphological (Neo - Tim staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible Wistar rats. *Epilepsy Res* 26: 177 - 192.
- Guimarães R, Barros L, Barreira J, Sousa M, Carvalho A, Ferreira I. 2010. Targeting excessive free radicals with peels and juices of Citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and Orange. *Food Chem Toxicol* 48: 99 - 106.
- Grundmann O, Nakajima JI, Seo S, Butterweck V. 2007. Anti-anxiety effects of *Apocynum venetum* L. in the elevated plus-maze test. *J Ethnopharmacol* 110: 406 - 411.
- Holmes GL, Cha BH, Akman C, Silveira DC, Liu X. 2004. Spontaneous recurrent seizure following status epilepticus enhances dentate gyrus neurogenesis. *Brain Dev* 26: 394 - 397.
- Honchar MP, Olney JW, Sherman WR. 1983. Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. *Science* 220: 323 - 325.
- Honchar MP, Vogler GP, Gish BG, Sherman WR. 1990. Evidence that phosphoinositide metabolism in rat cerebral cortex stimulated by pilocarpine, physostigmine, and pargyline in vivo is not changed by chronic lithium treatment. *J Neurochem* 55: 172 - 180.
- Joje RS, Morrisett RA, Snead OC. 1986. Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Exp Neurol* 91: 471 - 480.
- Lian XY, Zhang Z, Stringer JL. 2005. Anticonvulsant activity of ginseng on seizures induced by chemical convulsants. *Epilepsia* 46: 15 - 22.
- Kok AB. 1997. Ascorbate availability and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis. *Med Hypotheses* 48: 281 - 296.
- Marchand L. 2002. Cancer preventive effects of flavonoids - a review. *Biomed Pharmacother* 56: 296 - 301.
- Marchetti RL, Castro AWP, Kurcgant D, Cremonese E, Neto JG. 2005. Psychiatric disorders associated to epilepsy. *Rev Psiquiatr Clín* 32: 170 - 182.
- Marinho MMF, Sousa FCF, Bruin VMS, Aguiar LMV, Pinho RSN, Viana GSB. 1997. Inhibitory action of a calcium channel blocker (nimodipine) on seizures and brain damage induced by pilocarpine and lithium-pilocarpine in rats. *Neurosci Lett* 235: 13 - 16.
- Marinho MMF, Sousa FCF, Bruin VMS, Vale MR, Viana GSB. 1998. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. *Neurochem Int* 33: 299 - 306.
- Militão GCG, Ferreira PMP, Freitas RM. 2010. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. *Neurochemistry Int* 56: 16 - 20.
- Minh Tu NT, Thanh LX, Une A, Ukeda H, Sawamura M. 2002. Volatile constituents of *Vietnamese pummelo*, orange, tangerine and peels oils. *Flavour Frag J* 17: 169 - 174.
- Mora S, Diaz-Veliz G, Millán R, Lungenstrass H, Quiros S, Coto-Morales T, Hellión-Ibarrola MC. 2005. Anxiolytic and antidepressant-like effects of the hydroalcoholic extract from *Aloysia polystachya* in rats. *Pharm Biochem Behav* 82: 373 - 378.
- Morrisett RA, Joje RS, Snead OC. 1987. Effects of drugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administration of pilocarpine to lithium-pretreated rats. *Exp Neurol* 97: 193 - 200.
- Paxinos G, Watson C. 1986. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, 2<sup>nd</sup> ed, New York, pp. 435-456.
- Proteggente AR, Pannala AS, Paganga G, Van Buren L, Wagner E, Wiseman S, Van De Put F, Dacombe C, Rice-Evans CA. 2002. The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition. *Free Radical Res* 36: 217 - 233.
- Santos LFL, Freitas RLM, Xavier SML, Saldanha GB, Freitas RM. 2008. Neuroprotective actions of vitamin C related to decreased lipid peroxidation and increased catalase activity in adult rats after pilocarpine-induced seizures. *Pharm Biochem Behav* 89: 1 - 5.
- Santos IMS, Freitas RLM, Silva EP, Feitosa CM, Saldanha GB, Souza GF, Tomé AR, Feng D, Freitas RM. 2010. Effects of ubiquinone on hydroperoxide concentration and antioxidant enzymatic activities in the rat hippocampus

- during pilocarpine-induced seizures. *Brain Research* 1315: 33 - 40.
- Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem* 91: 621 - 632.
- Turski WA, Cavalheiro EA, Schwartz M, Czuczwar SJ, Kleinrok Z, Turski L. 1983. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. *Behav Brain Res* 9: 315 - 335.
- Turski L, Ikonomidou C, Turski WA, Bortolotto ZA, Cavalheiro EA. 1989. Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. *Synapse* 3: 154 - 171.
- Vasconcelos SMM, Lima NM, Sales GTM, Cunha GMA, Aguiar LMV, Silveira ER, Rodrigues ACP, Macedo DS, Fonteles MMF, Sousa FCF, Viana GSB. 2007. Anticonvulsant activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu*. *J Ethnopharmacol* 110: 271 - 274.
- Viana GSB, Vale TG, Silva CMM, Matos FJD. 2000. Anticonvulsant activity of essential oils and active principles from chemotypes of *Lippia alba* (MILL.) NE BROWN. *Biol Pharmac Bull* 23: 1314 - 1317.
- Vinson JA, Proch J, Bose P. 2001. Determination of quantity and quality of polyphenol antioxidants in foods and beverages. *Methods Enzymol* 335: 103 - 114.
- Xiu-Yan W, Jing-Yu Y, Jin-Hui, W, Chun-Fu, W. 2007. Anxiolytic effect of saponins from *Panax quinquefolium* in mice. *J Ethnopharmacol* 111: 613 - 618.