

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

SARA LOBATO DA SILVA

ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DA SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA DE
OCIMUM BASILICUM L. (MANJERIÇÃO): INIBIÇÃO *IN VITRO* DA
CAPTAÇÃO DE GABA

BELÉM

2009

SARA LOBATO DA SILVA

ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DA SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA DE
OCIMUM BASILICUM L. (MANJERIÇÃO): INIBIÇÃO *IN VITRO* DA
CAPTAÇÃO DE GABA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de
Biomedicina da Universidade Federal
do Pará, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina.

BELÉM
2009

SARA LOBATO DA SILVA

ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE DA SOLUÇÃO HIDROALCOÓLICA DE
OCIMUM BASILICUM L. (MANJERIÇÃO): INIBIÇÃO *IN VITRO* DA
CAPTAÇÃO DE GABA

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Biomedicina
da Universidade Federal do Pará, como
requisito parcial para a obtenção do grau
de Bacharel em Biomedicina.

Local e data da defesa: Belém (PA), 16 de dezembro de 2009.

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Maria Elena Crespo-López
ICB – UFPA
(Orientadora)

Prof^o Dr^o Anderson Manuel Herculano Oliveira da Silva
ICB – UFPA

Prof^o Dr^o Amauri Gouveia Jr.
ICB – UFPA

“Sem sonhos, a vida não tem brilho. Sem metas, os sonhos não têm alicerces. Sem prioridade, os sonhos não se tornam reais. Sonhe, trace metas, estabeleça prioridade e corra riscos para executar seus sonhos. Melhor é errar por tentar do que errar por se omitir! Não tenhas medo dos tropeços da jornada. Não podemos esquecer que nós, ainda que incompleto, fomos o maior aventureiro da história.”

Augusto Cury

*Dedico este trabalho
aos meus pais,
aos meus irmãos
pelo incentivo
apoio e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força, saúde, paciência e perseverança para prosseguir minha caminhada.

Aos meus pais incríveis, Colombiano Teixeira e Maria das Graças Lobato, pelo amor incondicional, pela compreensão, pelo auxílio emocional, físico e econômico que vocês me ofereceram ao longo de toda minha trajetória acadêmica. Obrigada!

Aos meus queridos irmãos, André Henrique e Nadja, por estarem sempre ao meu lado.

Agradeço ao meu namorado, George, pelo amor, pela compreensão e confiança dedicada a todos esses anos juntos. Realmente, não dá para descrever aqui o quanto eu sou grata por tudo que você tem feito por mim. Sua presença na minha vida se tornou algo indispensável. Te amo!!!

À Dr^a Maria Elena Crespo-López por toda sua dedicação e zelo na execução deste trabalho. Pela confiança depositada, por mostrar-se atenciosa e preocupada com nossa formação e, principalmente pelo exemplo de profissionalismo.

Aos meus queridos amigos de laboratório: Gisele Macedo, Gabriela Arrifano, Allan Malaquias e especialmente ao meu “amigo do peito” Rogério Monteiro que sempre esteve ao meu lado na realização dos experimentos oferecendo apoio, espírito de companheirismo e amizade.

Agradeço aos meus amigos de graduação, em especial, a Fernanda Loureiro, Amanda Hage e Eliane Trindade pelas conversas de incentivo, pelas boas risadas que só nós quatro entendíamos, pelas discussões que eram inevitáveis, mas necessária para que pudéssemos dar o nosso melhor. Vocês, meninas foram fundamentais na minha vida acadêmica e pessoal, nunca esquecerei de vocês.

Aos professores Herculano e Luís pelo apoio técnico, eficiência e boa vontade que contribuíram muito para o desenvolvimento deste trabalho. A todos os alunos e estagiários dos laboratórios de neuroendocrinologia e neuroquímica celular e molecular pela amizade e ajuda prática oferecida durante os experimentos.

SUMÁRIO

EPÍGRAFE	i
DEDICATÓRIA	ii
AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1-EPILEPSIA	1
1.2-EPIDEMIOLOGIA DA EPILEPSIA	1
1.3-ETIOLOGIA	2
1.4-CLASSIFICAÇÃO DA EPILEPSIA	3
1.5-TRATAMENTO DA EPILEPSIA – DROGAS ANTIEPILEPTICAS	4
1.6- MODELO DE ESTUDO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL – RETINA	7
1.7- FITOTERAPIA – UMA NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA	7
2. JUSTIFICATIVA	11
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1-CULTURA DE RETINA DE EMBRIÃO DE GALINHA	13
4.2- SOLUÇÃO EXTRATIVA DE <i>OCIMUM BASILICUM L.</i>	13
4.3-EXPOSIÇÃO AO EXTRATO DE <i>OCIMUM BASILICUM L.</i>	13
4.4-INCORPORAÇÃO DE [³ H]-GABA EM CULTURA DE CÉLULAS RETINIANAS	14
4.5-AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR	14
4.6-ANÁLISE ESTATÍSTICA	15
5. RESULTADOS	16
6. DISCUSSÃO	19
7. CONCLUSÕES	24
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

RESUMO

A epilepsia é a maior desordem neurológica do cérebro, caracterizada por crises epiléticas ou convulsões que estão associadas a uma descarga anormal dos neurônios cerebrais. Atualmente, o tratamento farmacológico é dirigido à sintomatologia com um sucesso limitado e importantes efeitos secundários, o que tem provocado múltiplas pesquisas com o objetivo de encontrar novos produtos que possam vir a ser usados como fármacos anticonvulsivantes. Assim, na medicina tradicional, várias plantas vêm sendo utilizadas no tratamento da epilepsia, dentre elas o *Ocimum basilicum* L.(manjerição). Neste trabalho investigamos um dos possíveis mecanismos moleculares da ação anticonvulsivante da solução extrativa hidroalcoólica de *Ocimum basilicum* (SEHOB), através da avaliação da recaptação do neurotransmissor inibitório GABA. Resumidamente, retinas de embrião de galinha com sete dias de vida (E7) foram dissecadas, tratadas com tripsina 0,05% e incubadas a 37°C em DMEM com 10% de soro fetal bovino. Após sete dias, as células nervosas foram pré-incubadas durante 30 minutos com 0-700 µg/ml de SEHOB e em seguida foi realizado o ensaio de captação de [³H]-GABA. A viabilidade celular foi avaliada, a partir da realização do método de MTT. Nossos resultados demonstraram que a SEHOB inibe a captação de GABA (reduções em relação ao grupo controle de 22,9±14,34%, 18,6±2,5%, 55±17,4%, 64,7±5,7% com as doses de 50, 100, 200 e 700 µg/ml, respectivamente; n=3-5). O ensaio de MTT demonstrou que não aconteceu diminuição na viabilidade celular após a incubação com as diferentes concentrações da SEHOB. Portanto, nossos resultados nos permitem concluir que a inibição da captação de GABA produzida pela exposição à SEHOB, que aumentaria assim a quantidade do neurotransmissor na fenda sináptica, poderia ser uma possível explicação para a ação anticonvulsivante do extrato do *Ocimum basilicum* L.

Palavras-chave: epilepsia, captação de GABA, *Ocimum basilicum* L.

ABSTRACT

Epilepsy is a major neurological disorder of the brain, characterized by seizures or seizures with an abnormal discharge of brain neurons. Currently, pharmacological treatment is directed to the symptoms with limited success and significant side effects. This has led several searches in order to find new products that may be used as anticonvulsants. Thus, in traditional medicine, many plants have been used in the treatment of epilepsy, including the *Ocimum basilicum* L. (basil). In this work, one of the possible molecular mechanisms of anticonvulsant action of hydroalcoholic solution of *Ocimum basilicum* (SEHOB) was investigated by assessing the uptake of the inhibitory neurotransmitter GABA. Briefly, retinas of chick embryo with seven days of life (E7) were dissected, treated with 0.05% trypsin and incubated at 37 ° C in DMEM with 10% fetal bovine serum. After seven days, nerve cells were pre-incubated for 30 minutes with 0-700 mg/ml of SEHOB and the assay of [³H]-GABA uptake was performed. Cell viability was assessed by the method of MTT. Our results showed that the SEHOB inhibits the GABA uptake (reductions in the control group from 22,9±14,34%, 18,6±2,5%, 55±17,4%, 64,7±5,7% with doses of 50, 100, 200 and 700 mg/ml, respectively, n = 3-5). The MTT test showed no decrease in cell viability after incubation with different concentrations of the SEHOB. Therefore, our results showed that the inhibition of GABA uptake caused by the SEHOB exposure (that may increase the amount of neurotransmitter in the synaptic cleft) could be a possible explanation for the anticonvulsant action of *Ocimum basilicum* L. extract.

Keywords: epilepsy, GABA uptake, *Ocimum basilicum* L.

1. INTRODUÇÃO

1.1- EPILEPSIA

A epilepsia é um tipo de disfunção cerebral caracterizada clinicamente por alterações comportamentais súbitas (“crises epiléticas”) que tendem a se repetir ao longo da vida do paciente. Essas crises refletem atividade elétrica anormal e paroxística, acometendo preferencialmente uma ou várias áreas do córtex cerebral e podem ser causadas por inúmeras patologias estruturais ou neuroquímicas (Palmini, 1998 *apud* Gitaí *et al.*, 2008; Chang & Lowenstein, 2003).

As crises epiléticas ou convulsões são eventos característicos na epilepsia, o onde que se inicia como descarga local anômala pode propagar-se para outras áreas do cérebro. O local da descarga primária e o grau de sua propagação determinam os sintomas produzidos, que podem variar desde um breve lapso de atenção a uma convulsão, dependendo da função da região do cérebro afetada. Assim, o envolvimento do córtex motor causa convulsões, além de desordens motoras, sensoriais, cognitivas e psíquicas. O envolvimento do hipotálamo provoca descargas anômalas periféricas e o envolvimento da formação reticular na parte alta do tronco encefálico leva à perda da consciência (Steinlein, 2004; Katzung, 2005; Rang *et al.*, 2008).

1.2- EPIDEMIOLOGIA DA EPILEPSIA

A epilepsia não possui obstáculos sociais, étnicas, geográficas, etárias ou sexuais. É o transtorno neurológico crônico grave mais comum (Gomes, 2000 *apud* Lima, 2001). Ela também está associada a problemas sociais e econômicos, tornando-se assim um problema de saúde pública (Gomes, 2000 *apud* Lima, 2001). Aproximadamente 1-1,5% da população mundial apresenta epilepsia, sendo esta patologia o segundo distúrbio neurológico mais comum depois do acidente vascular cerebral (Lopes-Cendes, 2008; Pitkänen & Lukasiuk, 2009). Após a primeira crise convulsiva, cerca de 80% dos pacientes está sujeito a outra crise nos primeiros três anos (Hart *et al.*, 1990).

A prevalência de epilepsia nos países economicamente avançados é de 400-600 em 100.000 habitantes. Já a incidência anual de epilepsia na Europa e América do Norte é de 40-70 em 100.000 habitantes. Quando considerado a faixa etária, esta incidência torna-se mais elevada em crianças (aproximadamente metade de todas as primeiras convulsões ocorre em indivíduos abaixo dos 20 anos de idade). Em países em desenvolvimento, esta incidência é duas vezes maior do que nos países desenvolvidos, devido à alta taxa de parasitas cerebrais e à carência nos serviços médicos (Parton & Cockerell, 2003).

1.3- ETIOLOGIA

A epilepsia não é uma doença inteiramente singular, mas sim uma variedade de transtornos subjacentes, que refletem na disfunção cerebral, podendo resultar de numerosas causas diferentes (Fisher *et al.*, 2005). Um pressuposto básico associa patogênese da epilepsia e a geração de atividade neuronal sincronizada (convulsões) há um desequilíbrio entre os aminoácidos excitatórios e inibitórios produzidos por uma diminuição na transmissão GABAérgica e/ou um aumento na transmissão glutamatérgica (Sugaya & Onozuka, 1978; Bradford, 1995; Pena & Tapia, 2000). O glutamato e outros aminoácidos excitatórios são responsáveis pela transmissão sináptica excitatória, enquanto que, o GABA (ácido gama-aminobutírico) e a glicina são responsáveis pela neurotransmissão sináptica inibitória (Ängehangen *et al.*, 2003).

O termo epileptogênese refere-se a um processo através do qual um cérebro previamente assistomático torna-se capaz de gerar crises epiléticas espontâneas. De maneira operacional, a epileptogênese é definida como um processo entre o insulto inicial prejudicial ao cérebro e a ocorrência da primeira crise epilética espontânea. As lesões cerebrais mais freqüentemente associadas ao desenvolvimento de epilepsia podem ter causas, tanto internas como externas (defeitos congênitos, erros inatos do metabolismo, infecção, traumatismo, febre, hemorragia intracraniana, tumores, distúrbios bioquímicos, anoxia, hipoglicemia, bem como doses excessivas de fármacos ou sua interrupção abrupta (Raffa *et al.*, 2006; Da Silva & Cabral, 2008; Pitkäken & Lukasiuk, 2009).

1.4- CLASSIFICAÇÃO DA EPILEPSIA

A epilepsia manifesta-se através de várias formas clínicas dificultando o diagnóstico e o tratamento da doença. O tipo de medicação utilizado é determinado pela natureza empírica da crise convulsiva e a distribuição da descarga anômala. Diante desse motivo, esforços consideráveis são empregados para classificar as crises convulsivas. Esta classificação está em evolução, com mais de 50 síndromes descritas (Commission Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 1989; Engel, 2001).

A classificação clínica da epilepsia define duas categorias principais de crises epiléticas: as crises focais ou parciais, as quais acontecem quando alterações fisiopatológicas em uma parte de um hemisfério cerebral iniciam uma crise e são acompanhadas por anormalidades focais no eletroencefalograma (EEG) e as crises generalizadas, cujas características clínicas e do EEG indicam o envolvimento inicial simultâneo de todos ou grande parte dos dois hemisférios cerebrais (Minneman *et al.*, 2006).

Recentemente, a ILAE (International League Against Epilepsy) divulgou uma nova forma de agrupar os diferentes tipos de epilepsia baseado em conceitos modernos de neuroimagem e biologia molecular, além de tecnologias genômicas. De acordo com esta nova classificação, os termos epilepsia “idiopática”, “sintomática” e “criptogênica” definidas em 1989 foram abandonadas pela Comissão, que por sua vez, redefiniu os conceitos de grupos. Os três seguintes grupos de causas são reconhecidos como:

- Epilepsia Genética: é decorrente do resultado direto de um defeito genético presumido ou conhecido em que as crises epiléticas são os principais sintomas da doença. Exemplos de síndromes epiléticas que seriam classificadas como epilepsias genéticas incluem: epilepsia de ausência da infância, epilepsia autossômica dominante noturna do lobo frontal e síndrome de Dravet.

- Epilepsia Estrutural/Metabólica: este grupo não se ajusta a um padrão eletro-clínico específico, ou seja, as características clínicas, sinais e sintomas não definem uma desordem reconhecível e distinta. As lesões estruturais de curso incluem: desordens adquiridas, como acidente vascular cerebral, trauma e infecção. Também, podem ser de origem genética, como a esclerose tuberosa e muitas malformações no desenvolvimento cortical.

- Epilepsia de causas desconhecidas: compreende aquelas que devem ser tomadas de forma neutra e para designar que a natureza da causa subjacente ainda é desconhecida. As epilepsias pertencentes a este grupo podem ser originadas de um defeito genético fundamental em seu núcleo, ou podem ser consequência de uma doença ou condição ainda não reconhecida.

Segundo, esta nova classificação as crises epiléticas envolvem todas as redes de neurônios, podendo ser relativamente localizada, amplamente distribuída e limitada a um hemisfério ou bilateral. Essas redes, muitas vezes envolvem ambas as estruturas corticais e subcorticais. Conseqüentemente, os termos “focal” e “generalizada”, definidos na classificação de 1981, foram redefinidos para refletir a fisiopatologia atual e substratos anatômicos de eventos epiléticos (Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, 2009).

1.5- TRATAMENTO DA EPILEPSIA – DROGAS ANTIEPILEPTICAS

Uma droga antiepilética ou anticonvulsivante pode ser definida como uma substância que quando administrada por um determinado período, pode diminuir a incidência ou severidade das crises epiléticas que acometem pacientes portadores de epilepsia. Desse modo, o objetivo da terapia com fármacos antiepiléticos é prevenir as convulsões e minimizar os efeitos colaterais, através do uso de um regime de fármacos o mais simples possível (Minneman *et al.*, 2006; Porto *et al.*, 2007).

O diagnóstico e o tratamento precoces dos distúrbios convulsivos com um único agente apropriado oferecem a melhor perspectiva de alcançar períodos longos sem convulsões com o menor risco de toxicidade (Goldman & Gilman, 2006).

As drogas anticonvulsivantes atuais são eficazes no controle de crises convulsivas, porém seu uso é restrito, pois como são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica apresentam potencial suficiente para causar toxicidade sistêmica e neurológica, promovendo diversos efeitos colaterais e o desenvolvimento de tolerância (Minneman *et al.*, 2006; Wade *et al.*, 2008).

Os principais mecanismos relacionados à ação de fármacos anticonvulsivantes incluem: (1) agentes que inibem a função dos canais de sódio nas membranas neuronais; (2) agentes que inibem a função dos canais de cálcio nas membranas neuronais; e (3) agentes que potencializam a ação do neurotransmissor inibitório, o GABA. Dentre outros mecanismos de ação dos antiepilépticos, destacam-se agentes que inibem a atividade dos neurotransmissores excitatórios, como o ácido glutâmico e aspártico (Graig & Stitzel, 2004; Minneman *et al.*, 2006; Rang *et al.*, 2008).

O primeiro mecanismo inclui mudanças na função da membrana neuronal, devido alterações nos canais iônicos regulados por voltagem. Neste contexto, os fármacos reduzem a excitabilidade elétrica das membranas celulares por bloqueio uso-dependente dos canais de sódio dependentes de voltagem. Esses canais transportam a corrente de entrada necessária para a geração do potencial de ação. A chegada do potencial de ação desencadeia despolarização e a entrada de íons sódio para o interior da célula, em virtude da abertura do portão de inativação (estado aberto). Todavia, essa despolarização resulta na movimentação de um portão de inativação para dentro do canal (estado inativado). Drogas antiepilépticas, a exemplo da fenitoína interagem preferencialmente aos canais neste estado, impedindo-os de retornarem ao seu estado de repouso (portão de ativação fechado). Assim, um menor número de canais funcionantes fica disponível para a geração de potenciais de ação (Minneman *et al.*, 2006).

O segundo mecanismo envolve agentes eficazes contra as crises de ausência, pois restringem a ativação dos canais de cálcio do tipo T, diminuindo o fluxo de cálcio nesses tipos de canais nos neurônios talâmicos (Goldman & Gilman, 2006). A etossuximida bloqueia especificamente o canal de cálcio do tipo T, cuja ativação supostamente desempenha algum papel na descarga rítmica associada às crises de ausência (Minneman *et al*, 2006; Rang *et al.*, 2008).

O terceiro amplo mecanismo abrange a potencialização da ação do GABA, o principal neurotransmissor inibitório presente no Sistema Nervoso Central (SNC) dos mamíferos (Bowery & Smart, 2006). Três tipos de receptores GABA são encontrados no SNC maduro: receptores GABA_A, GABA_B e GABA_C. Os receptores GABA_A e GABA_C são ionotrópicos, enquanto, os receptores GABA_B são metabotrópicos e estão acoplados à proteína G (Brooks-Kayal *et al.*, 2009). A ativação de receptores GABA_B pós-sinápticos aumenta a condutância de íons potássio através da membrana, levando a hiperpolarização neuronal prolongada, já a ativação de receptores GABA_B pré-sinápticos reduz a condutância de íons cálcio e a liberação do neurotransmissor. Os receptores ionotrópicos GABA_A e GABA_C, por sua vez, são permeáveis aos íons cloreto e bicarbonato (Farant & Kaila, 2007).

Os receptores GABA_A são os principais alvos farmacológicos para o tratamento de crises epilépticas, pois contêm locais de ligação direta e indireta para diferentes fármacos anticonvulsivantes. Os benzodiazepínicos (diazepam, clonazepam e lorazepam) aumentam a eficácia da inibição mediada pelo GABA, através do aumento da frequência de abertura dos canais de Cl⁻. Os barbitúricos interagem com os receptores GABA_A em local de ligação adjacente ao canal de Cl⁻, desencadeando efeitos GABA mimético (ação direta sobre os canais de Cl⁻) e efeitos potencializadores do GABA, prolongando a abertura dos canais de Cl⁻ a partir de uma determinada quantidade de GABA (Minneman *et al*, 2006; Galanopoulou, 2008; Rang *et al.*, 2008).

Outros alvos óbvios para fármacos antiepilépticos potenciais são os receptores para aminoácidos excitatórios e antagonistas agindo sobre os receptores NMDA, AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionato) ou receptores metabotrópicos de

glutamato. Poucas destas substâncias que mostraram atividade anticonvulsivante em modelos animais foram testadas em humanos, mas em geral mostram uma margem estreita entre o efeito anticonvulsivante desejável e efeitos colaterais inaceitáveis, como perda da coordenação motora (Rang *et al.*, 2008).

1.6- MODELO DE ESTUDO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL – RETINA

A retina é uma delgada lâmina de tecido nervoso, conectada ao cérebro e localizada na região posterior do olho. Este tecido apresenta a maioria dos neurotransmissores e neuromoduladores encontrados no SNC. O principal neurotransmissor utilizado na via vertical do processamento visual é o glutamato. Células horizontais são principalmente GABAérgicas enquanto que muitas células amácrinas podem ser GABAérgicas ou glicinérgicas. As células amácrinas são as que conferem maior diversidade neuroquímica à retina (Portugal, 2006; Freitas, 2008).

A via de sinalização composta por fotorreceptores, células bipolares e células ganglionares é a rota mais direta, através da qual os fluxos de informação visual chegam ao cérebro. Na primeira camada sináptica, a Camada Plexiforme Externa, células horizontais modulam a transmissão entre fotorreceptores e células bipolares. Na segunda camada sináptica, a Camada Plexiforme Interna, as células amácrinas modulam a transmissão entre as células bipolares e células as células ganglionares, sendo que a transmissão mediada por GABA ocorre em ambas às camadas sinápticas (Eggers *et al.*, 2006).

1.7-FITOTERAPIA – UMA NOVA ABORDAGEM TERAPÊUTICA

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas

medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (Maciel *et al.*, 2002).

A fitoterapia utiliza diversos modos de aplicação das propriedades medicinais das plantas e o uso adequado destas formulações auxilia a saúde no combate a doenças e traumas diversos (Dos Santos Moraes *et al.*, 2007).

Os produtos que são originados de plantas são chamados genericamente de fitoterápicos, considerados como um importante instrumento na terapêutica, pois contêm princípios biologicamente ativos, e muitos desses são utilizados como modelo para síntese de vários fármacos. Cerca de 200 espécies de plantas encontradas no Brasil são empregadas na Medicina popular para o tratamento de doenças renais, infecções intestinais e urinárias, diabetes, hepatite, entre outras. Vários constituintes desses vegetais, quando isolados ou em sinergismo com outros compostos, têm ação analgésica, antiinflamatória, antiviral, hipoglicemiante, antiespasmódica e antialérgica (Guerra & Nodari, 2001; Calixto *et al.*, 1997).

O estímulo ao uso de fitoterápicos objetiva prevenir, curar ou minimizar os sintomas das doenças, com um custo mais acessível à população e aos serviços públicos de saúde, comparativamente àqueles obtidos por síntese química, que são, em geral, mais caros, devido às patentes tecnológicas envolvidas (Toledo *et al.*, 2003).

As plantas medicinais desempenham, portanto, um papel muito importante na medicina moderna e dentre essa grande variedade de vegetais e ervas medicinais, temos o *Ocimum basilicum* L., popularmente conhecido como manjerição. Trata-se de uma erva que pertence à família Lamiaceae, sendo extensivamente utilizada para adicionar um distintivo aroma e sabor aos alimentos. As folhas podem ser usadas frescas ou secas para a utilização como uma especiaria e os óleos essenciais, também são largamente utilizados nas indústrias cosmética, farmacêutica, alimentar e como flavorizantes (Loughrin & Kasperbauer, 2003; Copetta *et al.*, 2006; Affonso *et al.*, 2007).

O gênero *Ocimum* está representado por mais de 150 espécies e tem uma distribuição geográfica por todas as regiões de clima tropical e subtropical. É um importante grupo de plantas aromáticas que produzem óleo essencial rico em constituintes como: ácidos fenólicos, linalol, geraniol, citral, alcanfor, eugenol, timol, 1,8-cineol, acetato de nerila, e outros compostos. Seus diferentes componentes são usados na medicina popular como medicamentos de elevado poder antisséptico, hipnosedativo, regulador digestivo e diurético, bactericida, fungicida e antiparasitário (Tucakov, 1996; Govin *et al.*, 2000).

O linalol é um monoterpeno comumente encontrado em óleos essenciais, sendo um dos principais componentes do óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. (62,9%). Este composto é usado na medicina tradicional por produzirem efeitos sedativos e anticonvulsivos. O óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. com alta concentração de linalol é valorizado no mercado internacional e amplamente usado na indústria de condimentos e cosméticos (Beric *et al.*, 2008; Filho *et al.*, 2006; Brum *et al.*, 2001).

O manjerição (*Ocimum basilicum* L.) é considerado uma planta anual ou perene, comercialmente cultivada para fins medicinais com indicações antiespasmódica e sedativa (Figura 1). Há estudos que demonstram que o extrato aquoso e o extrato etanólico possuem substâncias como apigenina, linalol e ácido ursólico que exibem um largo espectro de atividade antiviral. Estes compostos apresentam forte atividade contra os vírus da hepatite B e o vírus do herpes (Chiang *et al.*, 2005 *apud* Venancio, 2006).



Figura 1: Fotos da espécie *Ocimum basilicum* L.
Fonte: www.ImagensFromBulgaria.com e <http://primrose.be/pub/nl/show/buikipijn0/>.

2. JUSTIFICATIVA

O uso de plantas medicinais na terapêutica é muito antigo, e está intimamente relacionado com a própria evolução do homem. Para utilizarem as plantas como medicamentos, os homens antigos valiam-se de suas próprias experiências empíricas de acerto e erro, e da observação do uso de plantas pelos animais, além da intervenção divina para determinadas doenças. Em suma, percebe-se que mitos, lendas e tradições apontam para o emprego amplo de plantas medicinais em todos os tempos, em todas as camadas sociais e quase em toda a humanidade (Oliveira *et al.*, 2006).

Estes produtos naturais podem ser tão eficientes quanto os produzidos pela síntese química, contudo a transformação de uma planta em um medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância de sua ação biológica e a sua segurança de utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico. Para atingir esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios relativos a aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas (Miguel & Miguel, 1999).

Dessa forma, muitas etapas devem ser seguidas para que um medicamento fitoterápico seja comercializado, sendo necessário que o produto final apresente padrões adequados de eficácia, segurança e qualidade (Sonaglio *et al.*, 2003).

Os produtos de origem natural são importantes na pesquisa de novos fármacos, tendo em vista que vários princípios ativos de plantas medicinais, descobertos há dezenas de anos, são até hoje utilizados na terapêutica. As plantas do gênero *Ocimum* são usadas popularmente para o tratamento de alguns distúrbios associados ao SNC, como a depressão e também nos tratamentos do estresse (Venancio, 2006).

Em trabalhos preliminares desenvolvidos na UNIVILLE, foi possível verificar que a solução hidroetanólica 70% de folhas de *O. basilicum* apresenta atividade anticonvulsivante no modelo do pentilenotetrazol (PTZ) similar àquela produzida pelo

diazepam, no mesmo modelo experimental. Além disso, a partir da realização de testes de genotoxicidade em cultura de linfócitos humanos, no Laboratório de Farmacologia Molecular – UFPA pode-se concluir que os extratos da planta nas concentrações usadas não produzem efeito genotóxico.

O PTZ é um fármaco que atua bloqueando a ação do neurotransmissor GABA sobre os receptores GABA_A, os quais agem controlando a permeabilidade ao Cl⁻. A diminuição no influxo de íons cloreto provoca redução da hiperpolarização da membrana e o aumento na geração do potencial de ação, caracterizando a epilepsia e suas crises típicas

Sabendo que o PTZ é um antagonista do receptor GABA_A, supõe-se que o mecanismo de ação do extrato esteja relacionada com o sistema GABAérgico, tornando este sistema nosso principal alvo molecular para o estudo do mecanismo de ação anticonvulsivante do *Ocimum basilicum*.

3. OBJETIVOS

3.1-OBJETIVO GERAL

A proposta desse estudo é investigar um dos possíveis mecanismos moleculares da ação anticonvulsivante da solução extrativa hidroalcoólica de *Ocimum basilicum* (SEHOB), através da avaliação da recaptação do neurotransmissor inibitório GABA.

3.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a recaptação do neurotransmissor GABA em cultura primária de células nervosas da retina de embriões de galinha, expostas a diferentes concentrações da SEHOB;
- Avaliar a viabilidade celular das culturas primárias de células nervosas da retina de embriões de galinha, após incubação com SEHOB.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1-CULTURA DE RETINA DE EMBRIÃO DE GALINHA

Os embriões de galinha foram escalonados de acordo com Hamburger e Hamilton (1951) e sacrificados por decapitação. As culturas primárias de células nervosas da retina de embrião de galinha foram preparadas a partir do sétimo dia de vida (E7) como descrito por Do Nascimento *et al.* (1998). Resumidamente, as retinas foram dissecadas assepticamente em uma solução salina de Hank's livre de cálcio e magnésio. O tecido foi dissociado mecanicamente e tratado com tripsina 0,05%. As células dissociadas foram mantidas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contendo 10% de Soro Bovino Fetal, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 500 µg/ml de glutamina. Em seguida, as células foram semeadas em placas contendo 12 poços e cultivadas por sete dias a 37°C e 5% de CO₂ (Herculano *et al.*, 2006).

4.2- SOLUÇÃO EXTRATIVA DE *OCIMUM BASILICUM L.*

A solução extrativa hidroalcoólica (70%) de folhas de *Ocimum basilicum L.* (SEHOB) foi fornecida ao Laboratório de Farmacologia Molecular da UFPA pela Universidade de Joinville (UNIVILLE) seguindo as pautas do projeto de colaboração "Investigação da composição química de folhas de *Ocimum basilicum L.* e otimização dos processos tecnológicos de extração monitorados pela avaliação pré-clínica da atividade anticonvulsivante". A SEHOB foi diluída em solução de Hank's com sódio com uma concentração de 20,6 µg/µl.

4.3-EXPOSIÇÃO AO EXTRATO DE *OCIMUM BASILICUM L.*

Antes da realização dos experimentos, o meio foi removido e as células foram pré-incubadas por 30 minutos com 1 ml da SEHOB em diferentes concentrações (0-700

µg/ml) diluído em solução de Hank's contendo sódio. Essas doses correspondem à concentração sanguínea aproximada que obteve melhor efeito terapêutico nos experimentos prévios com animais.

4.4-INCORPORAÇÃO DE [³H]-GABA EM CULTURA DE CÉLULAS RETINIANAS

Para o ensaio de captação de GABA, as células foram previamente lavadas com 1 ml de tampão fosfato-salino (PBS). Após a lavagem, as células foram incubadas durante 15 minutos com 500 µL de solução salina de Hank's contendo: 128 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 3 mM CaCl₂, 12 mM glicose e 0.25 µCi de [³H]-GABA, pH 7.4.

Após o período de captação, as células foram lavadas três vezes com 1 ml de tampão PBS resfriado, a fim de interromper a captação do neurotransmissor estudado. Em seguida, as células foram solubilizadas em 0,1% de dodecilsulfato de sódio. A radioatividade de todas as amostras foi mensurada através do contador de cintilação líquida como descrito por Mohammadi *et al.* (2008).

4.5-AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE CELULAR

A morte celular foi estimada através do ensaio colorimétrico de viabilidade celular descrito por Mosmann (1983). Neste método, o reagente MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é reduzido à formazan púrpura pelas mitocôndrias de células vivas, uma vez que acontece somente quando a enzima redutase mitocondrial está ativa.

Após o tratamento com a SEHOB, retirou-se o extrato e as células foram lavadas com 1 ml de PBS. Em seguida, as células foram incubadas com MTT 0,5 mg/mL por 2 horas à 37 °C. Posteriormente, o MTT foi retirado de cada poço da placa e a camada

de células contendo o formazan insolúvel foi dissolvida em 200µl de dimetilsulfóxido. Para evitar a perda de células vivas no processo, o MTT retirado foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos e o pellet adicionado à respectiva amostra. A absorbância do material foi determinada em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 – 690nm.

4.6-ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes estatísticos foram realizados pelo software INSTAT. A comparação das médias entre os grupos foi realizada a partir da análise de variância de uma via (ANOVA), seguido de um teste *post hoc* Tukey, sendo considerado estatisticamente significativo um valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo revelaram que o extrato de *Ocimum basilicum* L. é capaz de inibir a recaptação do neurotransmissor GABA nas diferentes concentrações estudadas.

O tratamento das células com doses crescentes de SEHOB mostraram que a inibição da recaptação de GABA ocorre de forma dose-dependente (Figura 2). As doses de 50µg/ml e 100µg/ml já mostraram uma tendência para inibir a recaptação de GABA que foi significativamente evidente nas doses de 200µg/ml e 700µg/ml. Essas últimas doses foram capazes de inibir de forma eficiente a captação desse neurotransmissor.

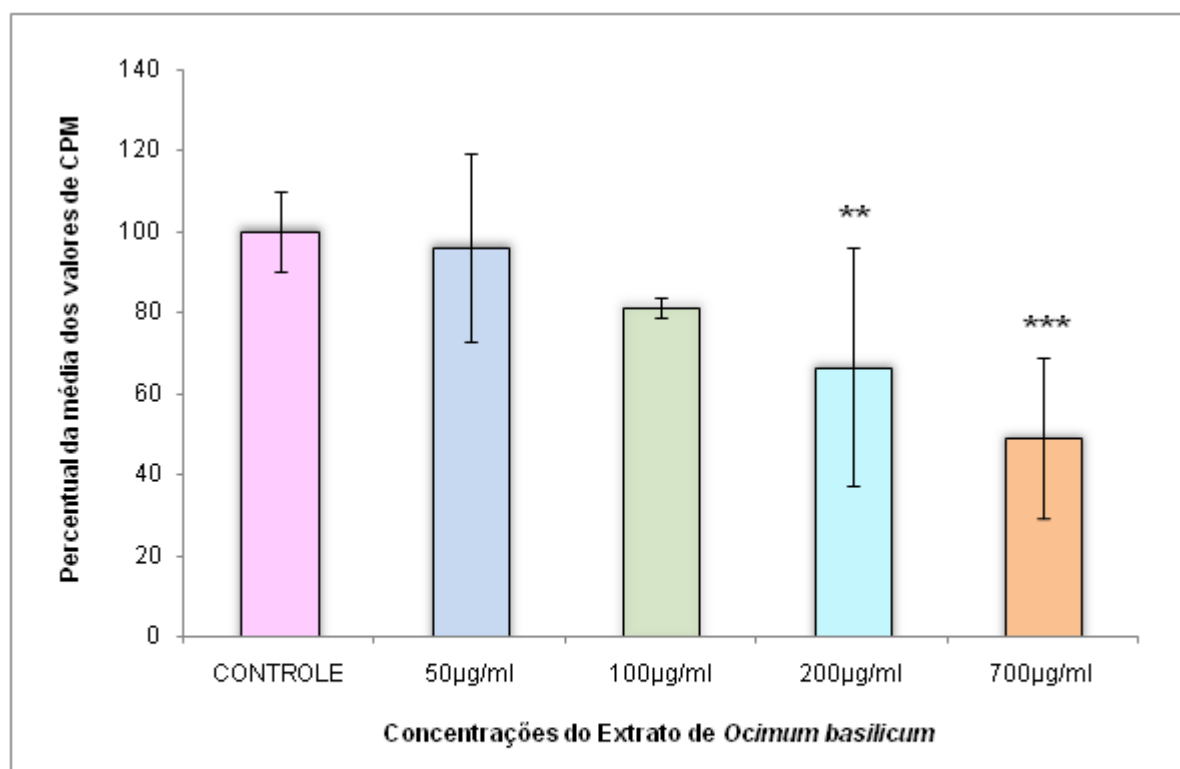


FIGURA 2: Presença de GABA marcado (medido em percentuais de CPM relativo ao controle) no interior das células após 30 minutos de incubação com diferentes concentrações de SEHOB. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão (n=3-6). ** $p < 0,01$ vs Controle e *** $p < 0,001$ vs Controle.

As reduções na recaptação de GABA em relação ao grupo controle foram de $3,82 \pm 23,17\%$, $18,63 \pm 2,51\%$, $33,38 \pm 29,25\%$ e $51,03 \pm 19,78\%$, respectivamente para as doses de 50 a 700 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 3).

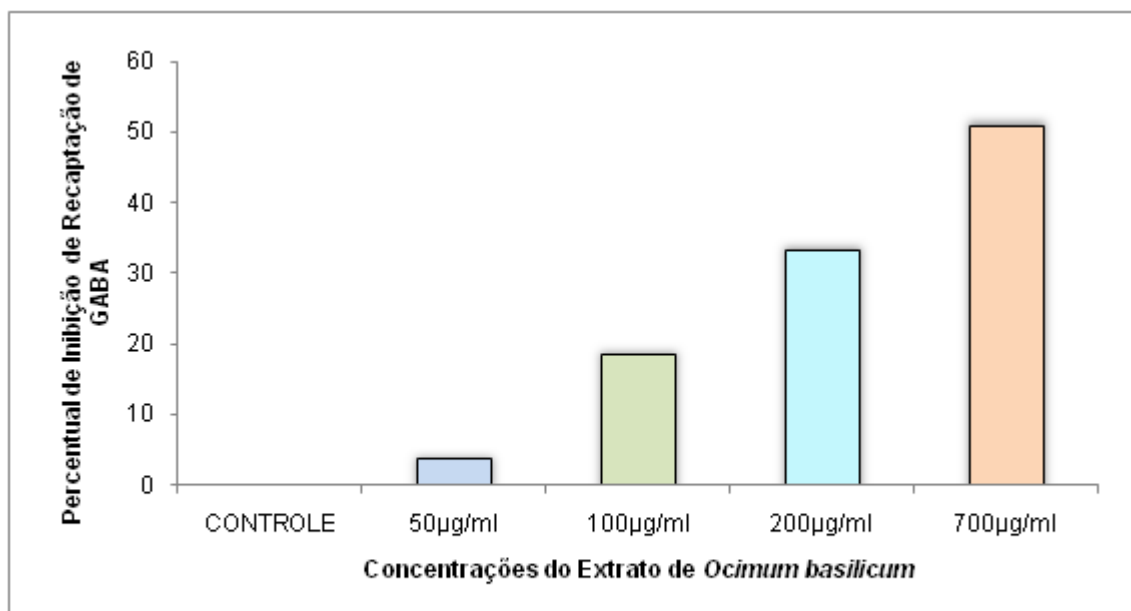


FIGURA 3: Percentual de Inibição de Recaptação de GABA em relação às concentrações do extrato de *O. basilicum* testadas.

O valor de EC_{50} (concentração da droga que produz 50% de inibição) do extrato de *Ocimum basilicum* L. foi calculado a partir do ajuste sigmoidal ($R^2 = 0,986$, ANOVA $p < 0,001$) da curva concentração-resposta resultando em 243,2 $\mu\text{g/ml}$.

Poder-se-ia pensar que a diminuição na captação de GABA produzida pela exposição às crescentes concentrações do extrato de *Ocimum basilicum* L. seria devido a um efeito tóxico da planta que estaria eliminando as células. No entanto, o resultado de MTT estabeleceu claramente que a viabilidade celular não diminuiu (Figura 4). Interessantemente, a exposição às concentrações de 200 $\mu\text{g/ml}$ e 700 $\mu\text{g/ml}$ aumentou ligeiramente a absorbância em relação ao controle.

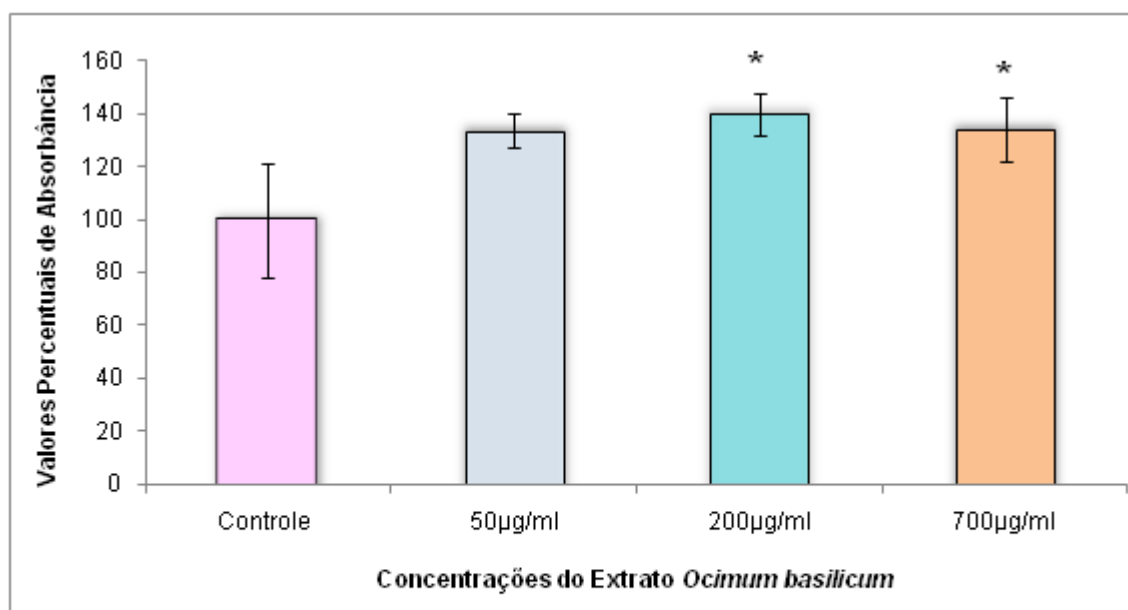


FIGURA 4: Viabilidade celular (medida em percentual da absorbância relativo ao controle) após 30 minutos de incubação com diferentes concentrações de extrato de *O. basilicum*. Os dados foram expressados como média $\pm$ erro padrão (n=3-6). *p<0,05 vs Controle.

6. DISCUSSÃO

No presente trabalho foi demonstrado, pela primeira vez, que o extrato hidroalcoólico de *Ocimum basilicum* L. (SEHOB) inibe a captação do neurotransmissor GABA em células nervosas retinianas tratadas com crescentes concentrações do extrato. Assim, a inibição na captação de GABA estaria aumentando a quantidade do neurotransmissor na fenda sináptica, fazendo com que o GABA tenha um efeito inibitório potencializado pela interação com um número maior de receptores.

Interessantemente, esta inibição esteve relacionada diretamente com a concentração da SEHOB, ou seja, a SEHOB é capaz de inibir a captação do GABA de maneira dose-dependente (Figura 4 e 5). Além disso, os resultados obtidos a partir da avaliação do metabolismo celular indicaram que a SEHOB não está sendo lesiva para as células retinianas, após a exposição às mesmas concentrações (Figura 6).

A metodologia deste trabalho é concordante com as citações na literatura referentes à utilização do tecido retiniano como modelo experimental para o estudo do desenvolvimento e maturação do SNC. Este tecido compartilha a mesma origem embrionária e complexidade neuroquímica semelhante à outras regiões do SNC (Yamasaki *et al.*, 1999; Portugal, 2006; Freitas, 2008).

A retina possui ainda, circuitos sinápticos restritos ao tecido e seu desenvolvimento independe de outras áreas do sistema nervoso. Isso permite que técnicas de cultura e explante de retina sejam utilizadas tanto para estudos de sinalização intercelular como estudos farmacológicos, pois possuem muitas das propriedades do tecido *in vivo* (De Mello *et al.*, 1982; Portugal, 2006; Freitas, 2008).

Especificamente, a retina é um tecido facilmente obtido nos mais variados estágios do desenvolvimento, constituindo um excelente modelo para estudos de proliferação, comunicação e desenvolvimento celular (Coloumbre, 1955). O desenvolvimento embrionário da retina nesta espécie dura apenas 21 dias. Os progenitores de células horizontais e amácrinas (principais responsáveis pela transmissão

mediada pelo GABA) iniciam seu ciclo celular no terceiro dia do desenvolvimento embrionário (E3) finalizando em E9 e E10, respectivamente. O ápice deste processo é atingido entre E6 e E7 (Prada *et al.*, 1991 *apud* Portugal, 2006).

Dessa forma, neste estudo foram utilizadas culturas de células nervosas maduras que estavam no auge de seu desenvolvimento celular como neurônios GABAérgicos. Este momento do desenvolvimento é ideal para estudar a inibição mediada pelo GABA, já que a retina apresenta uma quantidade relativamente pequena de tipos neuronais estruturalmente distribuídos em camadas facilmente reconhecíveis (Eggers *et al.*, 2006; Anccasi, 2008).

Nos últimos três anos, um projeto de colaboração entre a Universidade da região de Joinville e o Laboratório de Farmacologia Molecular da Universidade Federal do Pará, vem sendo desenvolvido para estudar a atividade anticonvulsivante da solução extrativa hidroalcoólica de *Ocimum basilicum* L. Durante a execução deste projeto, experimentos *in vivo* foram realizados e verificou-se que a SEHOB possui um potente efeito anticonvulsivante em modelo animal de epilepsia. Este modelo baseou-se no uso do pentilenotetrazol para induzir as crises convulsivas (o PTZ é caracterizado por bloquear o canal de Cl^- do complexo do receptor GABA_A). Assim, nos experimentos *in vivo*, as injeções de 600 e 700 mg/kg de SEHOB geraram um aumento da latência para o aparecimento da primeira convulsão, redução do número de convulsões e, conseqüentemente, aumento do tempo e do índice de sobrevivência dos animais (Coelho *et al.*, 2007). Os resultados obtidos com esses experimentos *in vivo* revelaram ainda que o potencial anticonvulsivante dessa planta está diretamente relacionado à dosagem administrada (Coelho *et al.*, 2007). Entretanto, todos os estudos *in vivo* realizados até o momento, não conseguiram esclarecer qual o mecanismo molecular de ação da SEHOB.

Assim, o presente trabalho utilizou as concentrações testadas *in vivo* para estudar com maior precisão a dosagem do extrato com melhor efeito anticonvulsivante.

Nossos resultados demonstraram que no intervalo das concentrações de 50 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$, a SEHOB já mostrou certa tendência a inibir a captação de GABA

(Figura 4). Assim, esse fato explicaria a produção de apenas efeitos sensibilizatórios para a convulsão, visto que, neste mesmo intervalo de doses, a injeção de SEHOB gerou pouca ou nenhuma influência contra os efeitos do PTZ nos experimentos *in vivo* (Coelho *et al.*, 2007).

Entretanto, o melhor resultado na inibição da captação de GABA (próximo aos 50% de inibição) foi obtido quando as culturas primárias foram expostas a 700 µg/ml do extrato (Figura 5). Também, os resultados *in vivo* corroboraram que, essa mesma concentração de SEHOB é capaz de produzir a mais eficaz e importante atividade anticonvulsivante (Coelho *et al.*, 2007), validando nosso modelo *in vitro*. Provavelmente, esta inibição aumenta a concentração de GABA na fenda sináptica e sua atividade no encéfalo, diminuindo a susceptibilidade a convulsões e protegendo o SNC contra as condições epilépticas (Beleboni *et al.*, 2004).

Ainda, no presente trabalho, a exposição *in vitro* a concentrações crescentes de SEHOB ajustou-se a uma curva de saturação (ver Resultados) e doses superiores a 700µg/ml não aumentaram a inibição da captação de GABA (dados não mostrados). Esse fato apóia a idéia de que o efeito do SEHOB seria sobre o transportador de GABA, chegando a bloquear completamente todos os transportadores presentes na membrana nas doses mais altas. Esta condição de saturação também é chamada em farmacologia de efeito máximo, onde o aumento da concentração da droga ou fármaco já não é capaz de aumentar o efeito.

Tendo em vista a capacidade da solução extrativa hidroalcoólica de *O. basilicum* de inibir de forma eficaz a captação de GABA, é provável que a propriedade anticonvulsivante do extrato seja devida principalmente à interação com o sistema GABAérgico, causando efeitos modulatórios. No entanto, não é possível descartar outros possíveis mecanismos moleculares como a interação com receptores e/ou canais iônicos e mais estudos serão necessários para esclarecer essas questões.

Para confirmar que a diminuição da quantidade de GABA medido não foi devida a uma diminuição do número de células viáveis, foi realizado o ensaio de redução

do tetrazólio MTT nas culturas primárias incubadas com o extrato. Interessantemente, neste ensaio, a presença do extrato de *Ocimum basilicum* L., nas diferentes concentrações estudadas (50, 200 e 700 µg/ml) não diminuiu, pelo contrário aumentou a viabilidade das células nervosas retinianas quando comparadas com o controle (Figura 6). Contudo, esse ligeiro aumento na absorbância de MTT será investigado detalhadamente porque, teoricamente, um tempo de incubação de 30 minutos não seria suficiente para que se completasse o ciclo celular e se obtivesse uma proliferação significativa. Dessa forma, provas fluorescentes com brometo de etídio serão realizadas para investigar a viabilidade celular. Este método tem como objetivo avaliar possíveis alterações na integridade da membrana citoplasmática, sendo baseado na capacidade das células reterem ou excluírem o corante brometo de etídio. Caso, a membrana citoplasmática esteja rompida ou danificada, a integridade da célula é destruída e o corante liga-se firmemente ao DNA celular emitindo fluorescência. Estima-se, ainda que a análise nas variações morfológicas das células seja efetuada, a fim de constatar qualquer dano ocorrido às células em cultura.

A importância do presente trabalho é originária da grande carência que ainda hoje existe no tratamento da epilepsia, uma doença crônica que afeta 1% da população mundial (Katzung, 2008). A farmacoterapia convencional da epilepsia é direcionada as terminações neuronais pós-sinápticas visando, principalmente canais iônicos envolvidos na neurotransmissão ou na modulação dos sistemas de neurotransmissores (Boison, 2007). Mesmo com a introdução de novas drogas anticonvulsivantes, cerca de 30% dos pacientes portadores de epilepsia não controlam a ocorrência de episódios convulsivos (Almeida *et al.*, 2002). Isso ocorre devido aos significativos efeitos colaterais decorrentes do uso crônico (Quintans-Júnior *et al.*, 2002). Desse percentual, 40% dos pacientes apresentam “farmacorresistência”, o que denota a ineficiência dos medicamentos até agora presentes no mercado (Löscher & Schmidt, 2002; Regesta & Tanganelli, 1999).

Dessa forma, o desenvolvimento de novas drogas anticonvulsivantes com alto potencial de bloqueio das crises epiléticas, que controlem de forma seletiva os diversos tipos de epilepsias e que apresentem baixa toxicidade torna-se necessário (Löscher, 1998). Neste sentido, as plantas medicinais surgem como fonte promissora de novas

moléculas químicas com propriedades biológicas apreciáveis. Muitas plantas ou produtos de origem naturais têm sido propostos para o tratamento de várias patologias, tais como diabetes, ansiedade, depressão e epilepsia (Quintans-Júnior *et al.*, 2008).

Algumas plantas já são conhecidas por serem popularmente utilizadas no tratamento da epilepsia, como a kokwaro (Família Anacardiaceae) tradicionalmente usada no sul da África para o tratamento de convulsões infantis (Ojewole, 2007). Outra planta é o ginkgo biloba (Família Ginkgoaceae), que possui efeito antioxidante que auxilia no tratamento de convulsões (Ilhan *et al.*, 2006). A espécie *Melissa officinalis* L., popularmente conhecida com erva-cidreira, apresenta atividade anticonvulsivante. Pesquisas realizadas por Awad *et al.* (2009) demonstraram que esta espécie atua como um inibidor da enzima GABA transaminase (GABA-T) *in vitro*.

No entanto, é a primeira vez que um mecanismo molecular para o potencial anticonvulsivante de preparados (soluções extrativas) obtidos a partir do *Ocimum basilicum* L. é demonstrado, reforçando a importância da continuidade deste estudo. Este trabalho além de incentivar a pesquisa da flora nacional como fonte para o desenvolvimento de medicamentos legitimamente nacionais, constitui o primeiro passo para o esclarecimento do mecanismo molecular de ação deste novo fitoterápico.

7. CONCLUSÕES

- Neste estudo, o extrato de *Ocimum basilicum* L. é capaz de inibir *in vitro* a captação de GABA nas diferentes concentrações testadas (0-700 µg/ml);
- A inibição na captação de GABA produzida pela SEHOB esteve diretamente relacionada à dose administrada;
- A concentração de 700 µg/ml foi a dosagem que, com cerca de 50% de inibição na captação de GABA, demonstrou efeito máximo;
- No ensaio de MTT, as diferentes concentrações estudadas não desencadearam morte celular nas culturas primárias de células nervosas de embrião de galinha. No entanto, experimentos futuros serão realizados a fim de investigar o ligeiro aumento na absorbância de MTT.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANCCASI, R.M. Morte Celular Induzida por ATP nas Células de Retina Embrionária de Galinha. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro. Universidade Federal Fluminense, 2008. 80p.
- AFFONSO, V. R.; SATO, A.; LAGE, C. L. S.; BIZZO, H. R. Produção de Compostos Voláteis em Plantas in vitro de *Ocimum basilicum* L. In: **Simpósio Brasileiro de óleos essenciais**, 4, 2007, Fortaleza. p. 56.
- ALMEIDA, R.N.; MOTTA, S.C.; LEITE, J.R. Óleos Essenciais com Propriedades Anticonvulsivantes. **Boletín Latino Americano y Del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas**, 2: 1-11. 2002.
- ÄNGEHAGEN, M.; BEN-MENACHEM, E.; RÖNNBÄCK, L.; HANSSON, E. Novel Mechanisms of Action of Three Antiepileptic Drugs, Vigabatrin, Tiagabine and Topiramate. **Neurochemical Research**, 28: 333-340. 2003.
- 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. **Phytother. Res.** 23: 1075–1081. 2009.
- BELEBONI, R.O.; CAROLINO, R.O.G.; PIZZO, A.B.; CASTELAN-BALDAN, L.; COUTINHO-NETTO, J.; SANTOS, W.F.; COIMBRA, N.C. Pharmacological and biochemical aspects of GABAergic neurotransmission: pathological and neuropsychobiological relationships. **Cell Mol. Neurobiol**, 0: 0. 2004.
- BOISON, D. Cell and Gene Therapies for Refractory Epilepsy. **Current Neuropharmacology**, 5: 115-125. 2007.
- BERIC', T.; NIKOLIC',B.; STANOJEVIC', J.; VUKOVIC'-GAC'IC',B.; KNEZ'EVIC'-VUKC'EVIC', J. Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis. **Food and Chemical Toxicology**, 46: 724-732. 2008.
- BOWERY, N.G & SMART, T.G. GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. **British Journal of Pharmacology**, 147: 109-119. 2006.
- BRADFORD, H.F. Glutamate GABA and epilepsy. **Prog Neurobiol**, 47: 477–511. 1995.
- BROOKS-KAYAL, A.R.; RAOL, Y.H.; RUSSEK, S. Alteration of Epileptogenesis Genes. **Neurotherapeutics**, 6: 312-318. 2009.

- BRUM, L. F. S.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D.O.; ELISABETSKY, E. Effects of Linalool on Glutamate Release and Uptake in Mouse Cortical Synaptosomes. **Neurochemical Research**, **26**: 191–194.2001.
- CALIXTO, J. B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! **Ciência hoje**, **21**: 26-30. 1997.
- COELHO, D.S.; LOUREIRO, F.S.; SOARES, L.; DOILE, M.M.; RODRIGUES, M.; FERNANDES, G.A.C; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; DA SILVA-SANTOS, J.E. Coelho, D. S. Efeito Anticonvulsivante e ausência de potencial genotóxico causados pelo extrato hidroalcoólico das folhas do *Ocimum basilicum* L.In: **Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, **40**, 2008, São Paulo. Anais do Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental. São Paulo: Hotel Vacance, 2008. p. 60.
- COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. PROPOSAL FOR REVISED CLASSIFICATION OF EPILEPSIES AND EPILEPTIC SYNDROMES. **Epilepsia**, **30**: 389-399. 1989.
- COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. PROPOSAL FOR REVISED CLASSIFICATION OF EPILEPSIES AND EPILEPTIC SYNDROMES. **Epilepsia**: 1-19. 2009.
- COPETTA, A.; LINGUA, G.; BERTA, G. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. Genovese. **Mycorrhiza**, **16**: 485-494. 2006.
- COULOMBRE, A.J. Correlations of Structural and Biochemical changes in the Developing retina of the chick. **Am J Anat**, **96**: 153-189. 1955.
- CHANG, B.S & LOWENSTEIN, D.H. Epilepsy. **N Engl J Med**, **349**: 1257-1266. 2003;
- CHIANG, L.; NG, L.; CHENG, P.; CHIANG, W.; LIN, C. Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, **32**: 811-816. 2005 apud VENANCIO, A.M. **Toxicidade Aguda e Atividade Antinociceptiva do óleo essencial do *Ocimum basilicum* L. (manjeriço), em *Mus musculus* (camundongos)**. Dissertação de Mestrado. Sergipe. Universidade Federal de Sergipe, 2006. 108p.
- DA SILVA, A. V. & CABRAL, F.R. Ictogênese, Epileptogênese e Mecanismo de Ação das Drogas na Profilaxia e Tratamento da Epilepsia. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, **14**: 39-45. 2008.

- DE MELLO, M.C.; VENTURA, A.L.; PAES-DE-CARVALHO, R.; KLEIN, W.L.; DE MELLO, F.G. Regulation of dopamine – and adenosine-dependent adenylate cyclase systems of chicken embryo retina cells in culture. **Proc. Natl. Acad. Sci**, **79**: 5708-5712. 1982.
- DO NASCIMENTO, J.L.; KUBRUSLY, R.C.; REIS, R.A. Atypical effect of dopamine in modulating the functional inhibition of NMDA receptors of cultured retina cells. **European Journal of Pharmacology**, **343**: 103-110. 1998.
- DOS SANTOS MORAES, A.C.; SILVA, K.A.M.; COELHO, M.C.; SOUSA, S.M.F.; SILVA, M. Uso e Consumo de Fitoterapicos na Localidade Tinguís, na Cidade de Altos-PI. In: **Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica**, **2**, 2007, João Pessoa.
- ENGEL, J. A Proposed Diagnostic Scheme for People with Epileptic Seizures and with Epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. **Epilepsy**, **42**: 796-803. 2001.
- EGGERS, E.D.; ICHINOSE, T.; SADULLAEV, B.T.; LUKASIEWICZ, P.D. Retinal GABA receptors and visual processing: a model system for presynaptic inhibition. **Cellscience Reviews**, **2**. 2006.
- FARRANT, M. & KAILA, K. The cellular, molecular and ionic basis of GABA_A receptor signaling. **Progress in Brain Research**, **160**: 59-87. 2007.
- FILHO, J. L. S. C.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; EHLERT, P.A.D.; MELO A.S.; CAVALCANTI, S.C.H.; ARRIGONI-BLANK, M.F.; SILVA-MANN,R. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, **16**: 24-30. 2006.
- FISHER, R.S.; BOAS, W.V.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**, **46**: 470-472. 2005.
- FREITAS, R.C.C. **Papel da caveolina-1 no desenvolvimento da retina de pinto**. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro. Universidade Federal Fluminense, 2008. 120p.
- GALANOPOULOU, A.S. GABA_A receptors in normal development and seizures: Friends or Foes? **Current Neuropharmacology**, **6**: 1-20. 2008.
- GOLDMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. In: **Farmacoterapia das epilepsias**. Mc Namara, J.O (eds.). Rio de Janeiro, Mc Graw Hill, 2006. p. 447-468.

- GOMES, M.M. Epidemiologia: distribuição, fatores de risco e considerações prognósticas. Lemos editorial, p. 11-21. 2000 apud LIMA, H.L.S. **A Epilepsia e a Qualidade de Vida: Estudo da atividade física relacionada à saúde em adolescentes portadores de epilepsia, de ambos os sexos, na região do grande Recife.** Dissertação de Mestrado. Recife. Universidade do Porto, 2001. 82p.
- GOVÍN, E.S.; LÓPEZ, I.M.L.; HERNÁNDEZ, L.F.; FERRADA, C.A.R. Estúdio farmacognóstico de ocimum basilicum L. (albahaca blanca). **Rev Cubana Farm**, **34**: 187-195. 2000.
- GRAIG, C.R. & STITZEL, R.E. **Farmacologia Moderna com Aplicações Clínicas.** Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2005.
- GUERRA, P. M. & NODARI, O. R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: Simões, M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** Porto Alegre. p.15. 2001.
- HAMBURGER, H.L & HAMILTON. A series of normal stages in the development of chick embryo. **J. Morphol**, **88**: 49-92. 1951.
- HART, Y.M.; SANDER, J.W.A.S.; SHORVON, S.D.; JOHNSON, A.L. National General Practice Study of Epilepsy: recurrence after a first seizure. **The Lancet**, **336**: 1271-1274. 1990.
- HERCULANO, A.M.; CRESPO-LÓPEZ, M.E.; LIMA, S.M.A., PICANÇO-DINIZ, D.L.W.; DO NASCIMENTO, J.L.M. Methylmercury intoxication activates nitric oxide synthase in chick retinal cell culture. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, **39**: 415-418. 2006.
- ILHAN, A; IRAZ, M.; KAMISLI, S.; YIGITOGU, R. Pentylentetrazol- induced kindling seizure attenuated by Ginkgo biloba extract in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, **30**: 1504-1510. 2006.
- KATZUNG, B.G. Farmacologia básica & clínica. In: **Drogas Anticonvulsivantes.** Porter, R.J & Meldrum, B.S (eds.). Ed. Koogan, 2005. p. 319-336.
- KATZUNG, B.G. Farmacologia básica & clínica. Ed. Koogan. Rio de Janeiro, 2008.
- LOPES-CENDES, I. The genetics of epilepsies. **J Pediatr**, **84**: 1-7. 2008.
- LÖSCHER, W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. **European Journal of Pharmacology**, **342**: 1-13. 1998.

- LÖSCHER, W.L. & SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. **Epilepsy Research**, **50**: 3-16. 2002.
- LOUGHRIN, J.H. & KASPERBAUER, M.J. Aroma Content of Fresh Basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves is affected by light reflected from colored mulches. **J. Agric. Food Chem**, **51**: 2272-2276. 2003.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim Nova**, **25**: 429-438. 2002.
- MIGUEL, M. D. & MIGUEL, O. G. Desenvolvimento de Fitoterápicos. **São Paulo-Robe**, **2000**: 116. 1999.
- MINNEMAN, K.P.; WECKER, L.; LARNER, J.; BRODY, T.M. Farmacologia humana. In: **Tratamento dos distúrbios convulsivos**. Stringer, J.L. (eds.). Rio de Janeiro, Elsevier, 2006. p. 309-318.
- MOHAMMADI M.; GHANI E.; GHASEMI A. Synaptosomal GABA uptake decreases in paraoxon-treated rat brain. **Toxicology**, **244**: 42-48. 2008.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, **65**: 55-63. 1983.
- OJEWOLE, J. A. O. Anticonvulsant effect of *Sclerocarya birrea* (A. Rich.) Hochst. subsp. *caffra* (Sond.) Kokwaro (Anacardiaceae) stem-bark aqueous extract in mice. **J Nat Med**, **61**: 67-72. 2007.
- OLIVEIRA, M.J.R.; SIMÕES, M.J.S.; SASSI, C.R.R. Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Bras. Pl. Med**, **8**: 39-41. 2006.
- PALMINI, C.J. Introdução à epilepsia clínica e classificação das epilepsias e crises epiléticas. **São Paulo-Lemos**, **1**: 149-161. 1998 apud GITAÍ, D.L.G.; ROMCY-PEREIRA, R.N.; LEITE, J.P.; GARCIA-CAIRASCO, N.; PAÇO-LARSON, M.L. Genes e Epilepsia I: Epilepsia e Alterações genéticas. **Res Assoc Med Bras**, **54**: 272-278. 2008.
- PARTON, M & COCKERELL, C. Epilepsy – the aetiology and pathogenesis. **Hospital Pharmacist**, **10**: 288-295. 2003.
- 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**, **101**: 547–561. 2000.

- PITKÄNEN, A.; LUKASIUK, K. Molecular and cellular basis of epileptogenesis in symptomatic epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, **14**: 16-25. 2009.
- PORTO, L.A.; SIQUEIRA, J.S.; SEIXAS, L.N.; ALMEIDA, J.R.G.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. O papel dos canais iônicos nas epilepsias e considerações sobre as drogas antiepilépticas – uma breve revisão. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, **13**: 169-175. 2007.
- PORTUGAL, L.C.L. **Expressão de P27/KIP1 no desenvolvimento de retinas de galinha**. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro. Universidade Federal Fluminense, 2006. 67p.
- PRADA, C.; PUGA, J.; PEREZ-MENDEZ, L.; LOPEZ, R.; RAMIREZ, G. Spatial and Temporal Patterns of Neurogenesis in the Chick Retina. **Eur J Neurosci**. **3**: 559-569. 1991. apud PORTUGAL, L.C.L. **Expressão de P27/KIP1 no desenvolvimento de retinas de galinha**. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro. Universidade Federal Fluminense, 2006. 67p.
- QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; AGRA, M.F.; SOUSA, M.F.V.; BARBOSA-FILHO, J.M. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro. **Acta Farm Bonaerense**, **21**: 179-184. 2002.
- QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ALMEIDA, J.R.G.S.; LIMA, J.T.; NUNES, X.P.; SIQUEIRA, J.S.; OLIVEIRA, L.E.G.; ALMEIDA, R.N.; ATHAYDE-FILHO, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Plants with anticonvulsivant properties – a review. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, **18**: 798-819. 2008.
- RAFFA, R.B.; RAWLS, S.M.; BEYZAROV, E.P. **Atlas de Farmacologia de Netter**. Ed. Artmed. Porto Alegre, 2006. p.67.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. Farmacologia. In: RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. Fármacos antiepilépticos. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. Cap. 40, p. 575-587.
- REGESTA, G. & TANGANELLI, P. Clinical aspects and biological bases of drugresistant epilepsies. **Society for Neuroscience**, **34**: 109-122. 1999.
- SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de produtos fitoterápicos. In: Farmacognia: da planta ao medicamento, Simões et al. 5 ed. Ed UFRGS/UFSC, 2003, p.289-326.

- SUGAYA, E. & ONOZUKA, M. Intracellular calcium—its release from granules during bursting activity in snail neurons. **Science**, **202**: 1195–1197. 1978.
- STEINLEIN, O.K. Genetic Mechanisms That Underlie Epilepsy. **Nature Reviews/Neuroscience**, **5**: 400-408.2004.
- TOLEDO, A.C.O.; HIRATA, L.L.; BUFFON, M.C.M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, **21**: 7-13. 2003.
- TUCAKOV, J. Lec̑enje Biljem. In: **Fitoterapija Rad**, Beograd, p. 247–248, 1996.
- VENANCIO, A.M. **Toxicidade Aguda e Atividade Antinociceptiva do óleo essencial do *Ocimum basilicum* L. (manjeriçã), em *Mus musculus* (camundongos)**. Dissertação de Mestrado. Sergipe. Universidade Federal de Sergipe, 2006. 108p.
- WADE, J.F.; DANG, C.V.; NELSON, L.; WASSERBERGER, J. Emergent Complications of Newer Anticonvulsivants. **J Emergency Medicine**: 1-7. 2008.
- YAMAZAKI, E.N.; BARBOSA, V.D.; DE MELLO, F.G.; HOKOÇ, J.N. GABAergic system in the developing mammalian retina: dual sources of GABA at early stages of postnatal development. **Int. J. Devl. Neuroscience**, **17**: 201-213. 1999.