

Universidade de Ribeirão Preto  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia  
Unidade de Biotecnologia

ERICA APARECIDA GELFUSO ROSSETE

Análise da atividade anticonvulsivante e neuroprotetora de alcaloides eritrínicos da planta *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth em ratos submetidos ao modelo de epileptogênese induzida pela pilocarpina

RIBEIRÃO PRETO

2013

ERICA APARECIDA GELFUSO ROSSETE

Análise da atividade anticonvulsivante e neuroprotetora de alcaloides eritrínicos da planta *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth em ratos submetidos ao modelo de epileptogênese induzida pela pilocarpina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto UNAERP. Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde.

**Orientador:** Prof. Dr. Rene de Oliveira Beleboni.

RIBEIRÃO PRETO

2013

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico  
da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

Rossete, Erica Aparecida Gelfuso, 1985 -.  
R829a Análise da atividade anticonvulsivante e neuroprotetora de  
alcaloides eritrínicos da planta *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth em ratos  
submetidos ao modelo de epileptogênese induzida pela pilocarpina.  
Erica Aparecida Gelfuso Rossete. - - Ribeirão Preto, 2012.  
57 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. Rene de Oliveira Belebani.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Ribeirão Preto,  
UNAERP, Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2012.

1. Biotecnologia. 2. Pilocarpina. 3. *Erythrina mulungu*.  
I. Título.

CDD: 660

ERICA APARECIDA GELFUSO ROSSETE

Análise da atividade anticonvulsivante e neuroprotetora de alcaloides eritrínicos da planta *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth em ratos submetidos ao modelo de epileptogênese induzida pela pilocarpina

Dissertação apresentada à Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP, como requisito para obtenção do título de mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

Data da apresentação: \_\_\_\_\_.

Resultado: \_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins  
Universidade de Ribeirão Preto

\_\_\_\_\_

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alexandra O. S. Cunha  
Universidade de São Paulo

\_\_\_\_\_

Prof. Dr. Rene de Oliveira Beleboni  
Universidade de Ribeirão Preto

\_\_\_\_\_

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelos exemplos, valores, sacrifícios e apoio.

Ao Prof. Dr. Rene de Oliveira Beleboni, meu orientador, por ter me proporcionado a oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pela liberdade de criação.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alexandra Olímpio Siqueira Cunha pela amizade, carinho, paciência, dedicação, ensinamentos desde minha graduação e por colaborar em mais este estudo.

Ao meu esposo Celso, pela paciência e apoio nos momentos difíceis.

A todos os professores do programa de Pós-graduação em Biotecnologia que contribuíram para minha formação, não só acadêmica, mas pessoal. Em especial às professoras Dr<sup>a</sup>. Silvia Helena Taleb Contini e Dr<sup>a</sup>. Suzelei de Castro França.

Aos amigos e técnicos do Laboratório Experimental Animal, Gleidson e Carla, pelo apoio técnico, imprescindível para o bom andamento do meu trabalho.

Aos professores Dr. Rodrigo Abdala Freitas e Dr<sup>a</sup>. Camila Favero de Oliveira e técnicos Elton e Marilena pelo auxílio nas técnicas histológicas e conversas agradáveis.

Ao amigo Amauri Ramos Pinhal pelos ensinamentos, carinho e amizade.

Às amigas Milene C. Almeida, Adriana C. Pereira, D. Nina, Daiane S. Rosa, Gabi Coetti, Dani e Edna pelo carinho, amizade e apoio.

À UNAERP, Capes e FAPESP pelo auxílio financeiro.

Aos animais pelo sacrifício.

## RESUMO

Cerca de 40% dos pacientes com diagnóstico médico de epilepsia são acometidos pela Epilepsia do Lobo Temporal (ELT), sendo este tipo de epilepsia aquele correspondente ao maior índice de ineficácia do tratamento convencional. Além disso, muitos fármacos utilizados para este tratamento promovem efeitos colaterais severos, ocasionando ao paciente impossibilidade total ou parcial para as atividades de trabalho ou aquelas sociais comuns. A planta *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth. (Leguminosae-Papilionaceae) utilizada pela população na forma de chá e em preparações fitoterápicas industriais possui propriedades sedativas, hipnóticas, analgésicas, anticonvulsivantes e ansiolíticas. A atividade anticonvulsivante tem sido foco de pesquisas de nosso grupo através de modelos animais de estado patológico agudo, constatando serem os alcaloides (+)-eritavina, (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritavina e erisotrina os responsáveis pelos efeitos observados. Entretanto e até o momento, nenhum estudo tem sido apresentado de modo a investigar os efeitos dos alcaloides identificados, com atividade anticonvulsivante comprovada, em modelos crônicos de indução de crises convulsivas. Isto é importante de modo a determinar de maneira mais clara a ação anticonvulsivante/neuroprotetora destes compostos, e ainda tal, promover um melhor entendimento do processo de epileptogênese e propagação/recorrência das crises epiléticas. Para tanto, ratos Wistar (200-220g) foram induzidos ao *status epilepticus* (SE) pelo uso de pilocarpina, que reproduz em muito a ELT crônica observada em pacientes humanos. Posteriormente, estes animais foram tratados por quatro dias consecutivos e as incidências de crises recorrentes, a latência para as crises e o número de mortes de animais monitoradas para avaliar o desempenho anticonvulsivante de diferentes doses dos alcaloides por um período de 15 dias, em comparação com grupos controles positivos e negativos. Ao final deste período, realizou-se análise histológica da região hipocampal dos animais através do método do Cresil-Violeta (Método de Nissl) para observação da atividade neuroprotetora em nível da viabilidade das células neuronais, sobretudo nas áreas hipocampais CA1, CA3 e Giro Denteado. Nossos resultados revelaram que os tratamentos com os alcaloides apresentaram atividade anticonvulsivante equiparada aos tratamentos com os grupos controles positivos, constituídos de anticonvulsivantes clássicos usados no tratamento da ELT (Diazepam, Carbamazepina, Quetamina e Fenitoína). Houve aumento da latência para o surgimento da primeira crise em animais tratados com os alcaloides e também o índice de mortalidade de animais do grupo controle negativo foi maior comparativamente aos grupos controles positivos e aqueles tratados com os alcaloides eritrínicos. Quando comparadas as estimativas de morte de células piramidais do hipocampo, os dados indicaram que todos os tratamentos com os diferentes alcaloides, tão bem como com os anticonvulsivantes comuns, exerceram um efeito neuroprotetor significativo em relação ao grupo controle negativo, no que se entende menor morte neuronal como neuroproteção. Finalmente, estes dados demonstram os efeitos anticonvulsivante e neuroprotetor dos alcaloides eritrínicos em escala crônica, corroborando resultados anteriores em escala aguda, revalidando assim o potencial biotecnológico dos referidos compostos em teste.

Palavras-chave: Anticonvulsivantes. Crises crônicas. Epileptogênese. Erisotrina. (+)-eritavina. *E. mulungu*. Pilocarpina. (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritavina.

## ABSTRACT

Temporal lobe epilepsy (TLE) is responsible for 40% of diagnosed cases of epilepsy. ELT is considered the most refractory type of epilepsy when considered the different types of antiepileptic drugs (AEDs). In addition, AEDs are currently associated to different side effects, causing the total or partial patient inability to working activity or in common social activities. The plant *E. mulungu* Mart. ex Benth. (Leguminosae-Papilionaceae) has been used in the folk medicine and also in industrial phytoterapical preparations due to its sedative, anticonvulsant, hypnotic and anxiolytic properties. Indeed, recent reports have pointed to a marked anticonvulsant effects of *E. mulungu* in different acute animal models of epilepsy. Those anticonvulsant effects have been attributed to the presence of (+)-erythravine, (+)-11 $\alpha$ -hidroxierythravine and erysothrine alkaloids isolated from flowers of plant. However, no experimental approach has been used to evaluate the anticonvulsant effects of those alkaloids a chronic animal model of epilepsy, which is important to a better understanding of anticonvulsant and neuroprotective properties of those compounds as well as to a better elucidation of mechanisms evolved on epileptogenesis of TLE as well as in its maintenance and progression. This work aims at the evaluation of the anticonvulsant/neuroprotective effects of erithrinian alkaloids using a chronic model of epilepsy in which seizures are induced by pilocarpine. Therefore, male Wistar rats (200-220g) were subjected to *status epilepticus* (SE) using pilocarpine, which reproduces in a good extent the TLE observed in humans. Subsequently, these animals were treated during four consecutive days and the percentage incidence of recurrent seizures, latency to first seizure and animal death were evaluated during a period of 15 days and compared to control groups. Histological parameters of analysis like neuronal damage were used to measure the neuroprotection of hippocampal cells (CA1, CA3 and *Dentate Gyrus* areas) exerted by different doses of alkaloids using the Nissl staining method. In animals treated with different doses of erithrinian alkaloids we observed anticonvulsant effect similar to those in animals subjected to treatments with traditional AEDs (Diazepam, Carbamazepine, Ketamine and Phenytoin). Furthermore, the number of animals that evolved to death was higher in negative control when compared to animals of positive controls and experimental ones. Also, the latency to seizures was increased in positive controls and animals treated with alkaloids when compared to negative controls. Comparing the estimates of the hippocampal pyramidal cells death, the data indicated that all treatments (positive control and experimental) exerted a neuroprotective effects in relation to negative control group. Finally, these data validate the anticonvulsant effects of erithrinian alkaloids in a chronic scale of epilepsy corroborating previous results in acute scale, which reinforce once more the biotechnological potential of those compounds.

Keywords: Anticonvulsants. Chronic epileptic seizures. Epileptogenesis. Erysothrine. (+)-erythravine. *E. mulungu*. Pilocarpine. (+)-11 $\alpha$ -hidroxierythravine.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema da estrutura cerebral e detalhe do hipocampo.....	15
Figura 2 - Foto da <i>Erythrina mulungu</i> (esquerda) e detalhe da flor (direita). .....	16
Figura 3 - Estrutura química dos alcaloides erisotrina, (+)-eritravina, (+)- $\alpha$ -hidroxierisotrina e (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritravina .....	18
Figura 4 - Espectroscopia de RMN dos alcaloides eritrínicos.....	22
Figura 5 - Procedimento cirúrgico para a implantação da cânula guia. ....	24
Figura 6 - Região da implantação da cânula guia no encéfalo do rato.....	25
Figura 7 - Efeitos comportamentais após injeção da pilocarpina por via i.c.v.....	29
Figura 8 - Cortes histológicos representativos do hipocampo na região da CA1.....	34
Figura 9 - Cortes histológicos representativos do hipocampo na região da CA3.....	35
Figura 10 - Cortes histológicos representativos do hipocampo na região do GD. ....	36
Figura 11 - Densidade de células neuronais viáveis da região CA1. ....	37
Figura 12 - Densidade de células neuronais viáveis da região CA1. ....	38
Figura 13 - Densidade de células neuronais viáveis da região CA3. ....	40
Figura 14 - Densidade de células neuronais viáveis da região CA3. ....	41
Figura 15 - Densidade de células neuronais viáveis da região GD. ....	42
Figura 16 - Densidade de células neuronais viáveis da região GD. ....	43



## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 Critérios comportamentais para classificação das crises límbicas. ... 26

Tabela 2 Incidência de crises recorrentes após SE induzido pela injeção de pilocarpina e tratamento com fármacos de escolha em ratos Wistar..... 30

Tabela 3 Incidência de crises recorrentes após SE induzido pela injeção de pilocarpina e tratamento com alcaloides eritrínicos em ratos Wistar..... 30

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AED</b>	Droga Antiepiléptica Convencional
<b>CA1</b>	Corno de Amon 1
<b>CA3</b>	Corno de Amon 3
<b><i>E. mulungu</i></b>	<i>Erythrina mulungu</i>
<b>ELT</b>	Epilepsia do Lobo Temporal
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>GD</b>	Giro Denteado
<b>i.m.</b>	Intramuscular
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>i.c.v.</b>	Intracerebroventricular
<b>Kg</b>	Quilo
<b>L-Glu</b>	L-Glutamato
<b>mg</b>	Miligrama
<b>mL</b>	Mililitro
<b>NMDA</b>	N-Metil-D-Aspartato
<b>PTZ</b>	Pentilenotetrazol
<b>SE</b>	<i>status epilepticus</i>
<b><math>\mu</math>g</b>	Micrograma
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro
<b><math>\mu</math>m</b>	Micrometro
<b>UNAERP</b>	Universidade de Ribeirão Preto
<b>WHO</b>	World Health Organization
<b><math>\chi^2</math></b>	Qui-quadrado

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
1.1 EPILEPSIA – CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	12
1.2 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL E O MODELO DE PILOCARPINA .....	13
1.3 <i>Erythrina mulungu</i> .....	15
<b>2 OBJETIVO GERAL</b> .....	21
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	22
3.1 OBTENÇÃO DOS ALCALOIDES DE INTERESSE.....	22
3.2 FÁRMACOS E REAGENTES .....	23
3.3 ANIMAIS .....	23
3.4 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA .....	24
3.5 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO E DOSES .....	25
3.6 INDUÇÃO DO <i>status epilepticus</i> (SE).....	25
3.7 TRATAMENTOS DOS ANIMAIS E ANÁLISES COMPORTAMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO ANTICONVULSIVANTE DOS ALCALOIDES EM ESTUDO .....	26
3.8 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS PARA ANÁLISE DE AÇÃO NEUROPROTETORA.....	27
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	29
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	49
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	50
<b>ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA</b> .....	58

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 EPILEPSIA – CONSIDERAÇÕES GERAIS

A epilepsia é a mais frequente das desordens cerebrais, afetando cerca de 1-2% de toda a população mundial. Deste percentual, aproximadamente 80% dos casos são constantes de países em desenvolvimento, dos quais 60% das pessoas diagnosticadas não recebem tratamento adequado (LÖSCHER, 1998; WHO, 2012). A referida desordem é encontrada em pacientes de ambos os sexos, atingindo diferentes faixas etárias e diferentes segmentos sócio-étnicos, levando a prejuízos de ordens emocionais, pessoais e sociais aos indivíduos que a apresentam (BORGES et al., 2010; D'AVILA et al. 2011). De acordo com Noronha e colaboradores (2007), a prevalência de indivíduos que apresentam crises epiléticas no Brasil varia entre 11,9/1000 a 21/1000 habitantes, sendo este quadro mais evidente em idosos e pessoas de baixa escolaridade. Como exemplo, podemos citar o estudo realizado por Borges e colaboradores (2004) na cidade de São José do Rio Preto, interior de São Paulo, onde 4,9% das crises epiléticas foram apresentadas por indivíduos de 0-4 anos, 11,7% de 5-14 anos, 20,3% de 15-64 anos e 32,8% em indivíduos com mais de 65 anos. Além disso, ainda de acordo com os autores, estes dados são semelhantes a outros obtidos em diferentes países, principalmente aqueles localizados na América Latina.

A epilepsia consiste de um conjunto de manifestações neurológicas caracterizadas pela ocorrência de crises recorrentes espontâneas parciais focais ou generalizadas, envolvendo estas últimas, ambos os hemisférios difusamente, cuja origem é vinculada ao córtex cerebral e a outras regiões subcorticais (CUNHA et al., 2009; ZHANG et al., 2010; FURTADO et al., 2011). Do ponto de vista neuroquímico, as disfunções no balanço químico de neurotransmissores inibitórios e excitatórios, particularmente GABA (Ácido  $\gamma$ -aminobutírico) e Glutamato, respectivamente, podem ser a principal causa tanto do desenvolvimento quanto da manutenção de atividade elétrica epileptiforme (MORTARI et al., 2007).

A compreensão do processo da epileptogênese para prevenção e tratamento da epilepsia é fundamental, principalmente em relação à Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) que é a responsável pela maior parcela de todos os tipos de epilepsias em adultos. Embora se acredite que as epilepsias sejam desencadeadas por uma grande variedade de causas, ainda faz-se necessário o estudo dos fatores que podem estar associados às alterações patológicas visando o entendimento deste processo, sobretudo, em nível celular (TILELLI et al., 2005; PEREIRA et al., 2008).

Atualmente sabe-se que a progressiva esclerose do hipocampo, comum na ELT, reduz a possibilidade de sucesso do tratamento pela administração de drogas antiepilépticas convencionais muito utilizadas nas últimas décadas no controle das crises parciais recorrentes (LÖSCHER, 1998; TILELLI et al., 2005). Tais drogas podem ser ineficientes em cerca de 30% de todos os tipos de epilepsia, e em até 60-70% para os casos de ELT. Este problema leva a uma busca constante por novas alternativas terapêuticas, importantes tanto para uma melhor compreensão da epilepsia quanto para o tratamento da desordem, incluindo melhorias na eficácia e redução de efeitos colaterais como sedação, prejuízo cognitivo, letargia e teratogênese (LEPPIK, 1992; MELDRUM, 1997; VILLETTI et al., 2001; PERUCCA, 2005; LANGER, BRANDT e LÖSCHER, 2011).

## **1.2 EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL E O MODELO DE PILOCARPINA**

A ELT é amplamente estudada, uma vez que esta forma de epilepsia se distingue como o tipo mais comum, sendo caracterizada por crises parciais recorrentes e respondendo por cerca de 40-50% dos casos de diagnóstico. Esta síndrome é de difícil tratamento, uma vez que cerca de 60-70% dos pacientes tornam-se refratários à terapêutica pelo uso de fármacos convencionais, como aqueles que ativam a neurotransmissão GABAérgica, inibem a neurotransmissão glutamatérgica ou que modulam a atividade de canais iônicos (LEPPIK, 1992; DE DEYN, 1992; ANDRADE-VALENÇA et al., 2006; D'AVILA et al., 2011).

Os fármacos antiepilépticos convencionais mais comumente utilizados no tratamento das epilepsias, apesar de suas limitações, são o fenobarbital, a carbamazepina, o ácido valpróico e a fenitoína (DUA et al., 2006). De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil (Portaria SAS/MS nº. 492 de 23 de setembro de 2010), o fenobarbital é indicado no tratamento de crises focais e generalizadas em todas faixas etárias, sendo seu mecanismo vinculado a modulação de receptores GABA<sub>A</sub>. Muito embora sua eficácia seja equivalente a da fenitoína, este fármaco apresenta efeitos colaterais, principalmente de natureza cognitiva, sendo a recomendação não feita ou feita com estrita cautela para o caso de idosos. A carbamazepina é indicada como monoterapia ou terapia auxiliar de crises focais, com ou sem generalização secundária em adultos e em crianças com mais de 1 ano de idade, muito embora a tolerância a este fármaco seja menor do que para a lamotrigina. Seu mecanismo de ação é vinculado ao bloqueio dos canais para sódio voltagem-dependentes. O ácido valpróico é indicado como monoterapia e terapia auxiliar em qualquer forma de epilepsia quando administrado em pacientes com mais de 10 anos de idade, muito embora possa causar alterações hormonais, ganho de peso e teratogenicidade. Seu

mecanismo de ação está relacionado com a ativação da condutância do potássio e, possivelmente, ação direta sobre outros canais iônicos além daqueles potássicos. A fenitoína age como bloqueador dos canais de sódio voltagem-dependentes e é indicada contra crises epiléticas de início focal em todas faixas etárias e durante ou após procedimentos neurocirúrgicos. Muito embora seja muito eficaz, a dose mínima eficaz e a dose máxima permitida são próximas daquele limite da toxicidade (LÖSCHER, 1998; SILVA e CABRAL, 2008; RAJ, GULATI e LODHA, 2011).

Além do difícil controle das crises convulsivas, diversos trabalhos revelam que portadores humanos de ELT, bem como ratos submetidos à lesão hipocampal, apresentam déficits funcionais severos, dentre os quais: diminuição da velocidade de processamento de informações, perda da codificação gráfico-motora, distúrbios de memória de curto e longo termo e distorções perceptuais, sintomas que prejudicam em muito a vida dos pacientes (HANNESSON e CORCORAN, 2000; RABINOVITZ et al., 2004).

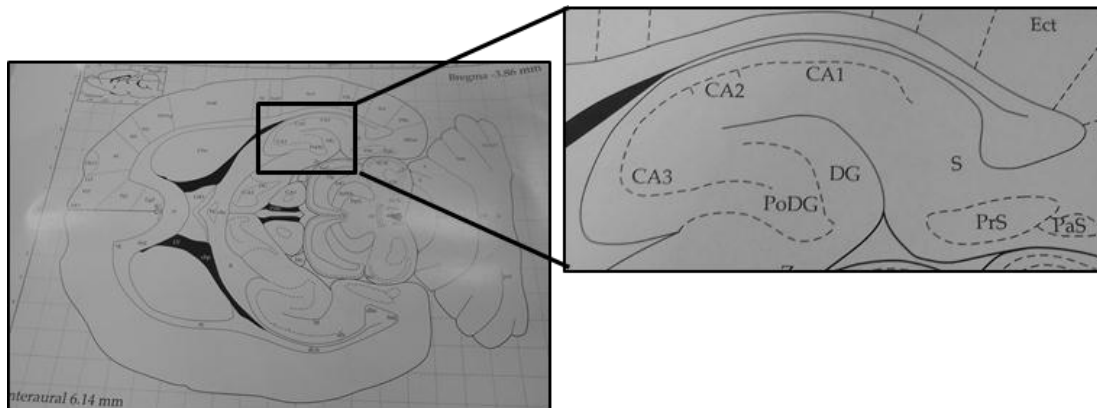
Os modelos crônicos de estudos da ELT em animais produzem o *status epilepticus* (SE) caracterizado por crises epiléticas contínuas através da indução de convulsões contínuas e duradouras pelo uso de agente iniciador químico, como a pilocarpina ou o ácido caínico, ou ainda elétrico persistente, resultando no surgimento das crises espontâneas e recorrentes, de caráter progressivo (PEREZ-MENDES et al., 2011). Os distúrbios convulsivos provocados pela administração sistêmica da pilocarpina em animais são divididos em três fases. A fase aguda caracterizada por crises límbicas que progridem para o SE e cuja duração é de 24 até 48 horas a partir da indução. A fase silenciosa que representa ausência de alterações comportamentais e eletrográficas das crises convulsivas e tem duração bem variada (4 a 44 dias após o SE). E, por fim, a fase crônica alcançada a partir da primeira crise espontânea que se tornará recorrente (com frequência de 2 a 3 crises por semana) até o final da vida do animal submetido ao modelo (SCORZA et al., 2005; 2009).

Por sua vez, o SE se distingue por um estado de convulsão que é consequência do aumento da frequência de despolarização neuronal subsequente e que causa danos cerebrais graves associados à perda de células neuronais na região hipocampal, sobretudo nas regiões CA1, CA3 e GD (Figura 1), gliose reativa e, rearranjos de plasticidade sináptica, como o brotamento das fibras musgosas, o que conseqüentemente, podem provocar deficiências cognitivas, epilepsia severa ou até mesmo a morte (CASTRO et al., 2011; RAJ, GULATI e LODHA, 2011).

A indução do SE pela injeção do agente colinérgico pilocarpina, desenvolvido por Turski e colaboradores em 1983, representa um modelo animal consolidado na abordagem

experimental das alterações moleculares, morfológicas, bioquímicas, farmacológicas e fisiológicas envolvidas no processo de epileptogênese. Muitas destas alterações assemelham-se àquelas que ocorrem em pacientes que apresentam ELT tanto em aspectos comportamentais, eletroencefalográficos, celulares quanto morfológicos dentre elas extensa morte celular, o brotamento das fibras musgosas e a gliose (LÖSCHER, 2002; EBERT et al., 2002; FURTADO et al., 2002). Isto representa uma grande vantagem do modelo em questão, sobretudo, porque atualmente acredita-se que os melhores modelos de epilepsia em animais sejam aqueles que fidelizem com o que acontece em humanos e, que sejam importantes no revelar de novas drogas, principalmente úteis no tratamento das epilepsias refratárias (SCIMEMI et al., 2006; CUNHA et al., 2007; DE FREITAS, 2010; CASTRO et al., 2011).

Figura 1 - Esquema da estrutura cerebral (esquerda) e detalhe do hipocampo (direita).



Fonte: modificado de Paxinos e Watson, 1998.

### 1.3 *Erythrina mulungu*

Inúmeras plantas têm sido investigadas na busca por novos agentes anticonvulsivantes e neuroprotetores (MCCHESENEY, VENKATARAMAN e HENRI, 2007). Em um estudo realizado por Gomes e colaboradores (2009), o principal grupo fitoquímico com atividade no Sistema Nervoso Central (SNC) apontado foram os alcaloides (38%), seguido por flavonóides (16%) e terpenos (11%), presentes em 84 plantas pesquisadas. O uso de plantas medicinais tem-se apresentado como relevante para a sociedade, onde estas são utilizadas como fontes alternativas/substitutivas ou ainda complementares aos fármacos convencionais. De acordo com estudos realizados por Newman e Cragg (2012) 15 novos fármacos de origem natural utilizados para o tratamento da epilepsia foram aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration) de 1981 até os dias de hoje. Baseando-se em dados etnofarmacológicos estes

tipos de estudo vêm aumentando gradativamente, sendo impulsionados pela procura das ditas fontes alternativas. Como exemplo, podemos citar o uso da Kava-Kava (*Piper methysticum*), com ação ansiolítica e anticonvulsivante comprovada, cuja receita anual gerada somente pela venda nos Estados Unidos é de U\$ 16,6 milhões (PEARL, DRILLINGS e CONRY, 2011).

Dentre as plantas medicinais com marcada atividade no SNC, destacam-se as do gênero *Erythrina*. A planta *Erythrina mulungu* (Mart. ex Benth.) (Leguminosae - Papilionaceae) (Figura 2) é uma árvore que alcança de 10 a 14 metros de altura, cuja copa se apresenta de forma arredondada com folhas compostas trifoliadas, flores reunidas em um pedúnculo formando cachos e frutos do tipo vagem. Esta espécie, nativa do sudeste brasileiro, é conhecida popularmente como mulungu, capa-homem, amansa-senhor, suinã, dentre outros, sendo encontrada nas regiões de Mata Atlântica e matas ciliares do bioma de Cerrado (LORENZI, 2002).

Com atividades de aplicação para males do SNC, a *E. mulungu* é empregada na medicina popular devido as suas propriedades calmante, antidepressiva, ansiolítica, anticonvulsivante, sedativa, hipotensora e hepatoprotetora, algumas validadas por diferentes modelos experimentais (RODRIGUES e CARVALHO, 2001; RODRIGUES et al., 2008; DE OLIVEIRA et al., 2012).

Figura 2 - Foto da *Erythrina mulungu* (esquerda) e detalhe da flor (direita).



Fonte: ([http://en.wikipedia.org/wiki/File:Erythrina\\_mulungu\\_flower.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Erythrina_mulungu_flower.jpg), 2012).

Inicialmente estudos com o extrato hidroalcoólico obtido das flores da *E. mulungu*, administrado por via oral evidenciaram seu efeito ansiolítico em tratamentos agudo e crônico nos modelos animais de labirinto em cruz elevado, transição claro/escuro e odor do gato. Neste sentido, Onusic e colaboradores (2002) observaram no labirinto em cruz elevado que o tratamento em escala aguda com o extrato hidroalcoólico das flores na dose 200 mg/kg



diminuiu a latência para o animal sair do braço fechado de modo similar ao tratamento com diazepam. No modelo de transição claro-escuro, o tratamento com o mesmo extrato nas doses 200 ou 400 mg/kg, assim como o diazepam, aumentaram o tempo de permanência no lado claro, enquanto o número de transições entre os lados claro-escuro foi estatisticamente significativa nos tratamentos com o extrato hidroalcoólico na dose 200 mg/kg ou diazepam. Além disso, neste grupo não foram constatadas alterações comportamentais dos animais por meio do teste de odor de gato e de campo aberto (ONUSIC et al., 2002).

Em 2003, novos estudos foram realizados pelo mesmo grupo de pesquisa com o extrato hidroalcoólico das flores da *E. mulungu*, agora em escala crônica usando os mesmos tipos de testes. Nestes estudos, no labirinto em T elevado, este extrato, em todas as doses avaliadas (50, 100 e 200 mg/kg), e administrado por via oral, diminuiu a latência para o animal sair do braço fechado de modo similar ao tratamento com diazepam. Quando avaliado o comportamento dos animais frente ao modelo de transição claro-escuro, tanto o tratamento com o extrato hidroalcoólico das flores na dose 50 mg/kg, assim como o diazepam, aumentaram o número de transições e o tempo gasto no lado claro, evidenciando o efeito ansiolítico também em escala crônica. E, novamente não foram constatadas alterações comportamentais dos animais por meio do teste de odor de gato e de campo aberto (ONUSIC et al., 2003).

Neste mesmo ano, testes antinociceptivos em escala aguda foram realizados com o extrato hidroalcoólico obtido das flores da *E. mulungu*, utilizando a via intraperitoneal. A atividade antinociceptiva foi demonstrada através da inibição do número de contrações abdominais produzida pela formalina nas fases neurogênica e anti-inflamatória após o tratamento com este extrato nas doses 200 e 400 mg/kg. Em adição, no teste da placa quente os animais tratados com o extrato na dose 400 mg/kg apresentaram um aumento no tempo de reação estatisticamente significativa quando comparados aos animais do grupo controle negativo aos 60 e 90 minutos posteriores ao tratamento (VASCONCELOS et al., 2003).

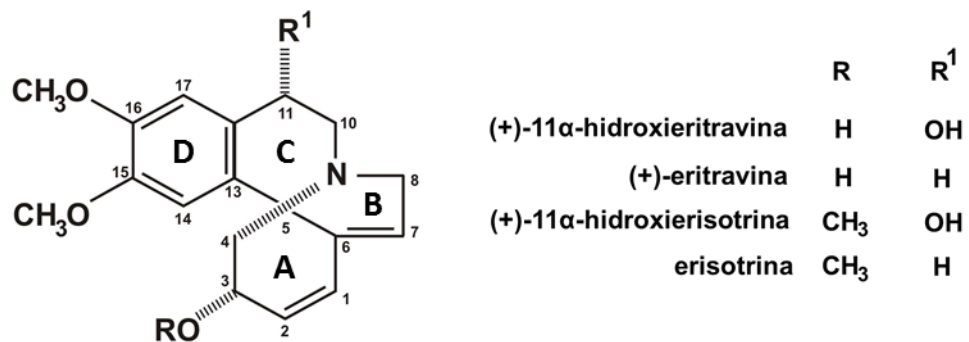
Em 2007, Vasconcelos e colaboradores observaram a atividade anticonvulsivante do extrato hidroalcoólico das flores da *E. mulungu* onde o tratamento com este extrato alterou significativamente o tempo para o início das crises convulsivas induzidas por estriquina quando administrado intraperitonealmente na dose 400 mg/kg.

No mesmo ano, a atividade ansiolítica do extrato hidroalcoólico das flores da *E. mulungu*, administrado por via oral, foi atribuída a presença dos alcaloides (+)-eritavina e (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritavina testados nos modelos animais transição claro-escuro e labirinto em "T" elevado. Nestes estudos, Flausino e colaboradores (2007a) relataram no modelo de

transição claro-escuro o aumento do tempo de permanência no lado claro para animais submetidos aos tratamentos via oral com os alcaloides isolados (+)-eritavina, nas doses 3 e 10 mg/kg, e na dose 10 mg/kg, para o alcaloide (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritavina, dados estes equivalentes ao tratamento com diazepam. Além disso, os autores constataram que o alcaloide (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritavina, na dose 3 mg/kg, aumentou o número de transições entre os compartimentos claro/escuro.

Estes mesmos autores (2007b), determinaram a estrutura química dos alcaloides isolados no trabalho anterior e de um novo alcaloide denominado (+)- $\alpha$ -hidroxierisotrina (Figura 3). Neste estudo, não foram observadas alterações na atividade locomotora dos animais tratados com todos os alcaloides isolados quando testados no modelo animal de campo aberto. Novamente, o modelo animal labirinto em “T” elevado foi utilizado confirmando os dados obtidos anteriormente, demonstrando ainda que o tratamento com o novo alcaloide isolado ((+)- $\alpha$ -hidroxierisotrina), nas doses 3 e 10 mg/kg, também reduziu a latência para o animal deixar o braço fechado, assim como não alterou a latência para deixar o braço aberto (FLAUSINO et al., 2007b).

Figura 3 - Estrutura química dos alcaloides erisotrina, (+)-eritavina, (+)- $\alpha$ -hidroxierisotrina e (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritavina



Fonte: modificado de Flausino et al. 2007.

Fundamentando-se nos dados revelados pela literatura citada até o momento e, sabendo que normalmente fármacos/ativos que sejam ansiolíticos, em geral, mas não sempre, podem ser também anticonvulsivantes, nosso grupo de pesquisa avaliou as atividades anticonvulsivantes dos referidos alcaloides, para os quais já têm sido demonstradas atividades ansiolíticas. Outro detalhe importante que nos faz cercar de justificativas razoáveis frente ao estudo deve-se ao fato de ser possível afirmar que tais alcaloides eritrínicos apresentam vantagens de ordens toxicológica, farmacodinâmica e farmacocinética de marcado interesse.

Como observado, a capacidade de atravessar a barreira trato-gastrointestinal e hematoencefálica é de relevada importância no desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, os alcaloides eritrínicos além de serem relativamente bem tolerados pelos animais, o que mostra relativa segurança de uso, demonstraram atividades farmacológicas diferentes/complementares e com relativa potência (ONUSIC et al., 2002; ONUSIC et al., 2003; VASCONCELOS et al., 2003; VASCONCELOS et al., 2007; FLAUSINO et al., 2007a; FLAUSINO et al., 2007b).

Neste contexto, a atividade anticonvulsivante dos alcaloides (+)-eritravina, (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritravina e de um novo alcaloide purificado durante o processo de isolamento, a erisotrina, foi analisada frente a crises tônico-clônicas generalizadas induzidas por diferentes convulsivantes, utilizando-se a via intracerebroventricular (i.c.v.) em ratos Wistar. Deve ser ressaltado que a erisotrina, que é obtida simultaneamente a purificação dos outros alcaloides eritrínicos, ainda não foi estudada pela comunidade científica, e por ser um análogo químico-estrutural dos demais alcaloides, pode apresentar semelhante potencial farmacológico, o que justifica também sua escolha para estudo (Figura 3),

Nestes estudos prévios de nosso grupo, o alcaloide (+)-eritravina apresentou proteções contra crises convulsivas induzidas por bicuculina de 40, 60 e 80%, respectivamente nas doses de 1, 2 e 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . As porcentagens de proteções contra crises induzidas pela administração de pentilenotetrazol (PTZ) e ácido caínico variaram de 40 a 100% nas doses de 1 e 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e quando utilizado o convulsivante N-Metil-D-Aspartato (NMDA) poucos animais foram protegidos mesmo em dosagens mais altas. Para o alcaloide (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritravina, foram obtidas proteções dos animais contra a crise induzida por bicuculina em 60 e 100%, respectivamente nas doses 0,5 e 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e de 80 e 100% no teste de NMDA para as mesmas doses. As proteções contra as crises induzidas pelo PTZ e ácido caínico variaram de 40 a 100% quando tratados nas doses de 1 a 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Posterior ao tratamento com o alcaloide erisotrina foram obtidas proteções dos animais contra a crise induzida por bicuculina em 100%, na dose de 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e nos testes de NMDA e PTZ as proteções foram de 40 a 100% nas doses de 2 e 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Quanto ao convulsivante ácido caínico, os dados demonstraram uma maior potência para a erisotrina em relação aos demais alcaloides, oferecendo proteção contra as crises de 40 a 100% em doses relativamente menores (0,25 e 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). Finalmente e, além disso, no caso dos animais não protegidos contra crises convulsivas, a administração dos alcaloides promoveu o aumento da latência contra todos os convulsivantes de no mínimo 3 vezes quando comparado ao grupo controle negativo, assim

como constatou-se a proteção contra a morte destes animais (FAGGION et al., 2011; ROSA et al., 2012).

Com base nos dados promissores obtidos até o momento é natural esperar que o uso de um modelo crônico de estudo da ação destes alcaloides, prevendo suas ações anticonvulsivantes e neuroprotetoras para a prospecção de uma nova droga, seja realizado. Estes estudos são importantes de modo a substanciar de maneira mais clara a ação anticonvulsivante e, mesmo neuroprotetora de tais compostos. Não obstante, estes estudos promovem um melhor entendimento do processo de epileptogênese e propagação/recorrência das crises epiléticas em escala crônica na presença ou ausência destes referidos compostos de interesse.

## 2 OBJETIVO GERAL

Considerando-se a necessidade de buscar novas drogas anticonvulsivantes/neuroprotetoras, sobretudo aquelas que atuem sobre a progressão da ELT, e o potencial farmacológico dos alcaloides eritrínicos como anticonvulsivantes, previamente estabelecido em modelos agudos de indução de crises convulsivas, o presente trabalho tem como objetivo principal: Avaliar a atividade anticonvulsivante dos alcaloides de interesse face ao modelo crônico de SE pela injeção de pilocarpina em ratos, avaliando o desempenho dos ativos de maneira geral e comparada a fármacos de escolha, além da análise histológica de cortes hipocampais de animais submetidos ao mesmo modelo, avaliando-se aspectos morfológicos e celulares importantes, que sejam indicadores de ação neuroprotetora *per se* ou em comparação com fármacos de eleição.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

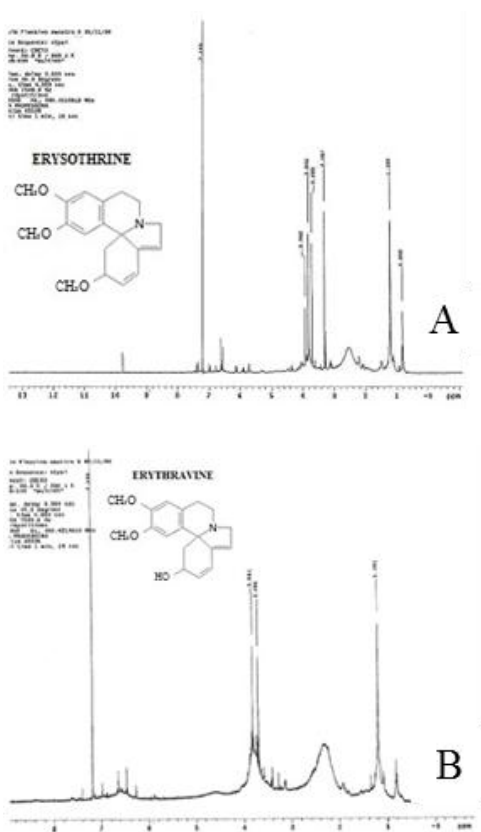
1. Analisar a atividade anticonvulsivante de diferentes doses dos alcaloides erisotrina, (+)-eritravina e (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritravina no período de 15 dias após a indução do SE e comparar esta atividade aos anticonvulsivantes comerciais: carbamazepina, quetamina, diazepam e fenitoína;
2. Analisar a atividade neuroprotetora, através da quantificação do dano neuronal e sinapses aberrantes causados à formação hipocampal, na presença e ausência dos alcaloides eritrínicos após 15 dias da indução do SE através da utilização de histologia com coloração por violeta de cresila para contagem de células. Assim como, comparar esta atividade aos fármacos carbamazepina, quetamina, diazepam e fenitoína;

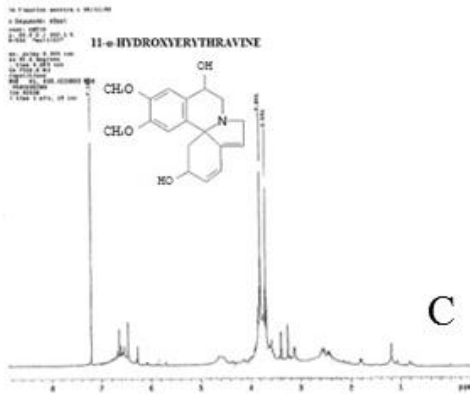
### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DOS ALCALOIDES DE INTERESSE

Os alcaloides erisotrina, (+)-eritravina e (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritravina foram cedidos pela Prof<sup>a</sup> Dra Ana Maria Pereira Soares (Unidade de Biotecnologia - UNAERP) e obtidos de acordo com Flausing e colaboradores, 2007a. A identidade química, bem como o nível de pureza dos referidos compostos, foram devidamente checadas através de técnicas cromatográficas e espectrofotométricas (Figura 4) pela Prof<sup>a</sup> Dra Ana Maria Pereira Soares. A coleta dos espécimes na natureza para obtenção dos alcaloides respeitou a legislação brasileira vigente (02001.005109/2011-10).

Figura 4 - Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear dos alcaloides eritrínicos





A) Erisotrina, B) (+)-eritravina e C) (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritravina, isolados do extrato hidroalcoólico de flores de *E. mulungu*. Fonte: Faggion et al. 2011.

### 3.2 FÁRMACOS E REAGENTES

Foram adquiridos hidrocloreto de pilocarpina (Sigma), diazepam (Germed), fenitoína (Hidantal® - Hoechst Marion Roussel), carbamazepina (Tegretol® - Novartis Biociências), quetamina (Ketalar® – Agner) e xilazina (Hertape Calier). Os solventes para purificação dos alcaloides foram de grau HPLC (Merck). Outros reagentes foram da marca Sigma, Merck ou Flucka.

### 3.3 ANIMAIS

Os ratos Wistar albinos pesando entre 200 e 220 g, provenientes da empresa ANILAB (Paulínia-SP), foram acondicionados quatro a quatro em gaiolas separadas e mantidos em biotério de manutenção com água e alimentação *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura ( $20 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e umidade (55%) controladas.

Todos os protocolos experimentais envolvendo animais estabeleceram-se conforme as diretrizes para o uso de animais em pesquisa segundo o Manual de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório, aprovado junto à Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento, evitando o sofrimento e o sacrifício desnecessários de animais. O trabalho atual obteve, sob título de sua forma de projeto, a aprovação prévia do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto sob o número de registro 37/2011 (Anexo A).

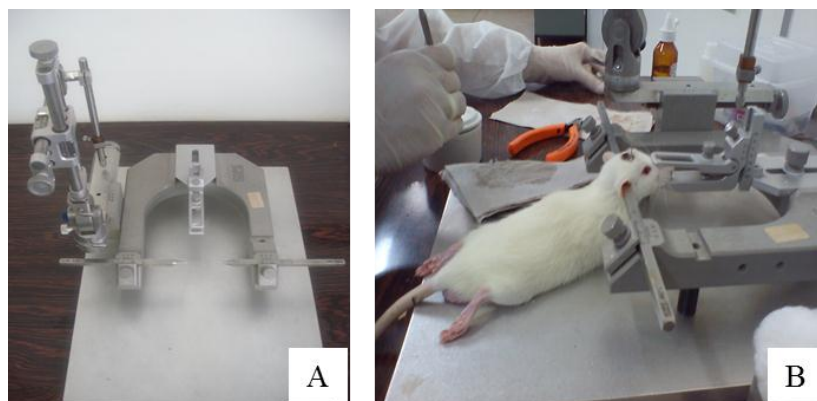
### 3.4 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Ratos Wistar albinos (n=6-8, por grupo) foram anestesiados através do uso da associação de cloridrato de quetamina 10% e xilazina nas doses 60 mg/kg e 8 mg/kg, respectivamente (via i.p). Em seguida estes animais foram posicionados no aparelho estereotáxico (Stoelting-Standard) (Figura 5) e receberam uma dose de anestésico local (cloridrato de lidocaína 2%) via subcutânea.

Posteriormente, se prosseguiu com a cirurgia de forma a expor o crânio permitindo acesso e subsequente perfuração do mesmo para a implantação da cânula guia constituída de um segmento de agulha hipodérmica (BD-25X7-22G; 15 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro externo). A cânula foi devidamente posicionada no ventrículo lateral direito de cada animal de acordo com as coordenadas descritas por Paxinos e Watson (1998) (Figura 6) a partir da superfície do crânio (0,9 mm posterior ao Bregma; 1,6 mm lateral à linha mediana e 3,4 mm dorsoventral).

A seguir realizou-se uma segunda perfuração paralelamente à primeira para a fixação de um pequeno parafuso de aço inoxidável. Este parafuso serviu como apoio para resina de acrílico auto polimerizante (Clássico LTDA), utilizada para proteção do crânio após a cirurgia e como uma compensação referente ao peso da cânula guia, permitindo-se assim equilíbrio de peso com a primeira. Após a polimerização do cimento acrílico, a cânula foi selada com fio de aço inoxidável a fim de se evitar a obstrução da mesma. Posteriormente à cirurgia, os animais receberam o analgésico/anti-inflamatório Banamine<sup>R</sup> na dose 1,1 mg/kg via intramuscular (i.m.) de modo a favorecer a completa recuperação dos mesmos.

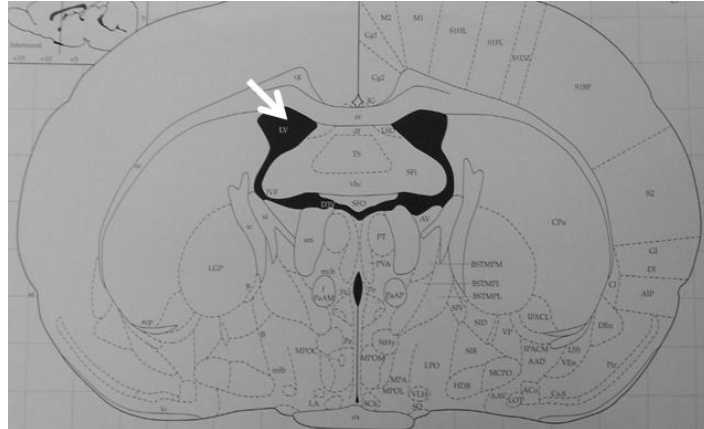
Figura 5 - Procedimento cirúrgico para a implantação da cânula guia.



A) Aparelho estereotáxico utilizado para implantação da cânula guia. B) Rato posicionado durante procedimento cirúrgico. Fonte: arquivo pessoal.



Figura 6 - Região da implantação da cânula guia no encéfalo do rato.



Fonte: Paxinos e Watson, 1998.

### 3.5 VIAS DE ADMINISTRAÇÃO E DOSES

A razão do volume de cada microinjeção/velocidade via i.c.v. foi de 1  $\mu\text{L}$ /minuto, sendo a administração realizada através de um sistema de injeção manual por meio de uma seringa Hamilton (10  $\mu\text{L}$ ) conectada a um tubo de polietileno (PE-10) e à cânula de injeção com 15 mm de comprimento e 0,4 mm de diâmetro externo, confeccionada a partir de uma agulha gengival odontológica (30G). Para cada injeção via i.p. o volume utilizado foi de 0,2 mL através do uso de uma seringa de insulina comum (1 mL).

### 3.6 INDUÇÃO DO *STATUS EPILEPTICUS* (SE)

Após a recuperação da cirurgia estereotáxica e canulação dos animais (cerca de 5-7 dias), os mesmos foram submetidos à indução do SE pela injeção i.c.v. de pilocarpina (2,4 mg/ $\mu\text{L}$ ) sendo então observada a latência para o início do SE. Três horas após o início das crises, interrompeu-se o SE pela injeção i.p. de tiopental sódico (30 mg/kg). Para critério de definição do SE, utilizou-se da tabela de classificação de crises límbicas segundo Racine (1972) (Tabela 1), sendo descartados do quadro experimental os animais que não desenvolveram SE em nível de escore suficiente (4 e/ou 5) ou aqueles que o reverteram espontaneamente no período de 3 horas.

Tabela 1 - Critérios comportamentais para classificação das crises límbicas.

Classe	Comportamentos
1	Movimentos orofaciais, piscar de olhos
2	Mioclonia de cabeça e/ou movimentos clônicos faciais severos
3	Mioclonia dos membros anteriores
4	Convulsões clônicas dos membros anteriores com elevação
5	Convulsões tônico-clônicas generalizadas associadas à perda do controle postural

Modificado de Racine colaboradores 1972.

### 3.7 TRATAMENTOS DOS ANIMAIS E ANÁLISES COMPORTAMENTAIS PARA AVALIAÇÃO DE DESEMPENHO ANTICONVULSIVANTE DOS ALCALOIDES EM ESTUDO

Os diferentes tratamentos dos animais (grupos de n=6-8) se iniciaram uma hora após o término das crises motoras induzidas por pilocarpina e, consistiram de injeções de salina (0,9%, via i.c.v.), carbamazepina (120 mg/kg, via i.p.), quetamina (50 mg/kg, via i.p.), diazepam (2 mg/kg, via i.p.), fenitoína (60 mg/kg, via i.p.), dos alcaloides erisotrina (1 µg/µL; 2 µg/µL; 3 µg/µL), (+)-eritavina (1 µg/µL; 2 µg/µL; 3 µg/µL) ou (+)-11α-hidroxieritavina (1 µg/µL; 2 µg/µL; 3 µg/µL), separadamente em animais de grupos controles (negativo: salina ou positivos: AEDS) e experimentais. Um outro grupo controle, denominado “SHAM” (n=6), recebeu tratamento com salina, via i.c.v, muito embora não tenha sofrido a indução de SE. Cada tratamento foi repetido por quatro dias, sendo as aplicações feitas sempre no mesmo horário de cada dia.

As doses de fármacos controles positivos (Carbamazepina, Quetamina, Diazepam e Fenitoína) foram definidas segundo Cunha e colaboradores (2009), enquanto aquelas dos alcaloides baseadas nos experimentos anteriores realizados por Faggion e colaboradores (2011) em animais em estado patológico agudo. Durante os 15 dias de observação foram analisadas a latência para primeira crise e a morte dos animais de cada grupo. Além disso, após sete dias, os animais submetidos ao SE foram filmados em oito janelas temporais de uma hora por dia, escolhidos aleatoriamente, durante uma semana, para verificação da incidência de crises recorrentes seguindo o mesmo critério de avaliação para caracterização do SE. As gravações foram analisadas obedecendo-se um período de 5 minutos para cada 20 minutos de gravação realizada para coleta de dados relativos à análise de desempenho anticonvulsivante

em estado patológico crônico para ativos testes e fármacos controles num comparado entre estes grupos e aquele injetado com salina.

### **3.8 PROCEDIMENTOS HISTOLÓGICOS PARA ANÁLISE DE AÇÃO NEUROPROTETORA**

Após o término do bioensaio para análises neuroetológicas, os animais foram sacrificados em câmara de gás carbônico e submetidos a uma perfusão por via intra-cardíaca através do ventrículo esquerdo com solução de salina 0,9% seguida de paraformaldeído 4% (Dinâmica, Brasil) (Tampão Fosfato 0,5 M; pH 7,4), com duração aproximada de 8 minutos para cada etapa, no que se seguem injeções em volumes aproximados de salina (40 mL) e paraformaldeído 4% (120 mL). A seguir, os encéfalos foram removidos e fixados em solução de paraformaldeído 4% por 18 horas a 4°C. Posteriormente, os encéfalos foram colocados em soluções de sacarose a 10, 20 e 30%, diluídas em PBS a 0,1M, por um período total de 72 horas a 4°C. Após esta etapa, os mesmos foram submetidos a uma bateria de desidratação seguida de inclusão em parafina. Depois, os encéfalos foram seccionados transversalmente em um micrótomo (3 µm/corte) de acordo com o atlas de Paxinos e Watson (1998) (variando de -3,14 mm a -4,52 mm, a partir do bregma), sendo os cortes distendidos em lâminas gelatinizadas (Solução de gelatina a 0,5% e alúmen de cromo a 0,05%). As lâminas foram submetidas à coloração por violeta de cresila (Sigma-Aldrich, EUA) pelo método de Nissl e, então, as lâminas montadas com entellan (Merck, Alemanha).

Para a obtenção das imagens, observação e análise das lâminas utilizou-se um microscópio óptico (Tension), adaptado de máquina fotográfica, conectado a um computador, usando de uma objetiva com aumento de 40 vezes, sendo cinco os campos selecionados de tamanho 2048 x 1536 pixels. As células viáveis das camadas piramidais da CA1 e CA3 e da camada granulosa do GD foram contadas manualmente, sendo as dimensões das áreas analisadas medidas pelo programa imageJ (National Institutes of Health – USA). O número estimado de células viáveis ( $n$ ) foi determinado pela média dos valores obtidos de 03 cortes selecionados, para cada animal, e o número real de células calculado utilizando-se o método de correção de Abercrombie (1949):

$$N \text{ (por mm}^2\text{)} = n [T/(T+D)]/A \quad (1)$$

onde  $N$  é o número verdadeiro de células,  $T$  é a espessura da secção,  $D$  é o diâmetro médio de cada núcleo na população da amostra (sendo esta medida capturada por meio de uma objetiva com aumento de 1000 vezes), e  $A$  é área medida (em  $\text{mm}^2$ ) de cada região hipocampal (KWAK et al. 2005).

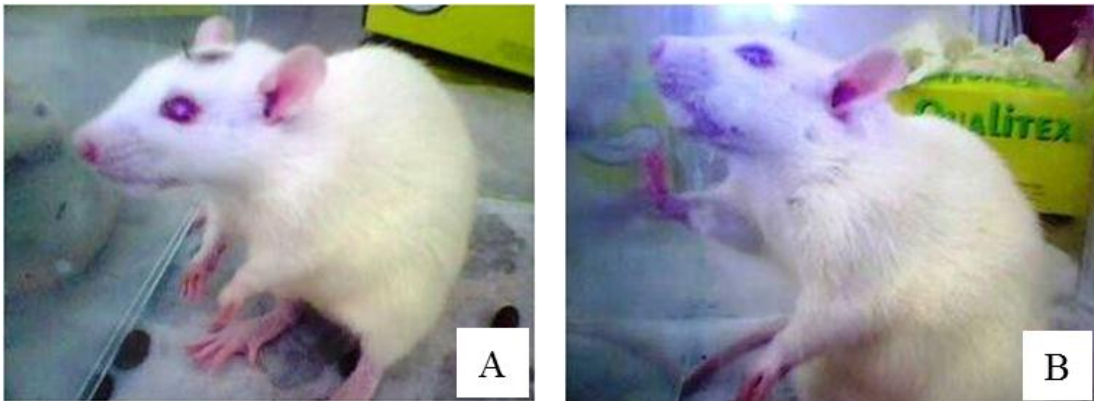
### **3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O número de animais que apresentaram crises recorrentes em cada grupo ( $n=6-8$ ) e o número de mortes foram comparadas utilizando-se o teste de  $\chi^2$ . As contagens de células para cada área foram submetidas ao teste de Análise de variância de uma via (ANOVA), seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.1 (GraphPad Software), considerando  $p < 0,05$ , como estatisticamente significante.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 15 minutos da injeção i.c.v. do agente colinérgico pilocarpina, e anteriormente aos diferentes tratamentos em animais controles ou experimentais, aproximadamente 90% dos animais apresentaram crises recorrentes de escore adequado (4-5), sem reversão espontânea do quadro ou evolução para óbito. Brevemente, os comportamentos observados inicialmente, consistiram de automatismos orofaciais e mioclonias localizadas, evoluindo mais tarde para hipersalivação, elevação e queda límbica (Figura 7).

Figura 7 - Efeitos comportamentais após injeção da pilocarpina por via intracerebroventricular.



(A) Animal com mioclonia de pata dianteira 10 minutos após a administração de pilocarpina. A seguir, observa-se elevação e queda límbica acompanhada de hipersalivação (B). Fonte: Arquivo pessoal.

A não observação das crises comportamentais recorrentes nos animais submetidos ao SE após os diferentes tratamentos foram entendidas como a atividade anticonvulsivante e demonstrada na tabela 2 para o grupo de animais tratados via i.p. com os fármacos de escolha e, na tabela 3, para os grupos de animais tratados via i.c.v. com as diferentes doses dos diferentes alcaloides, num comparado entre os diferentes grupos e grupo controle salina. A latência para a primeira crise comportamental recorrente em cada grupo controle positivo ou tratado com diferentes doses dos diferentes alcaloides também é apresentada nestas tabelas.

Quando observada a incidência de crises recorrentes entre os grupos controles positivos ou experimentais não foram observadas diferenças estatísticas significantes para maioria dos casos ( $\chi^2=16,68$ ;  $p<0,05$ ), o que concorre para uma satisfatória equivalência de ação anticonvulsivante entre AEDs e os alcaloides em teste.

Tabela 2 - Incidência de crises recorrentes após SE induzido pela injeção de pilocarpina e tratamento com fármacos de escolha em ratos Wistar.

Tratamento	% de animais sem crises*	Latência para 1ª crise recorrente** (Dias)
<b>Salina</b> (0,9%)	15,38 (2/13)	6
<b>Diazepam</b> (2 mg/kg) #	66,67 (4/6)	8
<b>Fenitoína</b> (60 mg/kg)	60,00 (3/5)	9
<b>Carbamazepina</b> (120 mg/kg) #	66,67 (4/6)	8
<b>Quetamina</b> (50 mg/kg)	50,00 (4/8)	8

\*Crises recorrentes de classe 4 da escala de Racine (1972). Entre parenteses encontra-se o número de animais que não apresentaram crises recorrentes/número de animais induzidos ao SE; \*\* Número de dias pós-SE da primeira crise recorrente no grupo. Tratamento via intraperitoneal (0,2 mL). Dados analisados pelo teste  $\chi^2$  e fisher.  $p < 0,05$ , # diferença estatística contra grupo de animais submetidos ao SE e tratados com salina.

Tabela 3 - Incidência de crises recorrentes após SE induzido pela injeção de pilocarpina e tratamento com alcaloides eritrínicos em ratos Wistar.

Tratamento	% de animais sem crises*	Latência para 1ª crise recorrente** (Dias)
<b>(+)-Eritravina</b> (1 $\mu$ g/ $\mu$ L) #	66,67 (4/6)	8
<b>(+)-Eritravina</b> (2 $\mu$ g/ $\mu$ L)	57,14 (4/7)	7
<b>(+)-Eritravina</b> (3 $\mu$ g/ $\mu$ L)	42,86 (3/7)	7
<b>(+)-11<math>\alpha</math>-hidroxieritravina</b> (1 $\mu$ g/ $\mu$ L)	62,50 (5/8)	8
<b>(+)-11<math>\alpha</math>-hidroxieritravina</b> (2 $\mu$ g/ $\mu$ L)	50,00 (4/8)	8
<b>(+)-11<math>\alpha</math>-hidroxieritravina</b> (3 $\mu$ g/ $\mu$ L)	60,00 (3/5)	7
<b>Erisotrina</b> (1 $\mu$ g/ $\mu$ L)	62,50 (5/8)	8
<b>Erisotrina</b> (2 $\mu$ g/ $\mu$ L)	0 (0/6)	8
<b>Erisotrina</b> (3 $\mu$ g/ $\mu$ L)	0 (0/7)	8

\*Crises recorrentes de classe 4 da escala de Racine (1972). Entre parenteses encontra-se o número de animais que não apresentaram crises recorrentes/número de animais induzidos ao SE; \*\* Número de dias pós-SE da primeira crise recorrente no grupo. Tratamento via intracerebroventricular (1  $\mu$ L). Dados analisados pelo teste  $\chi^2$  e fisher.  $p < 0,05$ , # diferença estatística contra grupo de animais submetidos ao SE e tratados com salina.

Durante o período compreendido entre o sétimo e décimo quarto dia após o SE, observamos que apenas 15% dos animais submetidos ao SE e tratados com salina (grupo controle negativo) não apresentaram crises recorrentes. Obviamente, os animais do grupo SHAM não apresentaram crises. Entretanto, em relação aos tratamentos com fármacos convencionais, 50% e 60% dos animais não apresentaram crises recorrentes quando tratados com quetamina ou fenitoína, respectivamente. A atividade anticonvulsivante foi similarmente evidenciada nos tratamentos com diazepam e carbamazepina, onde 66,67% dos animais de cada um destes tratamentos não apresentaram crises recorrentes, apontando diferença estatística quando estes grupos foram comparados aos animais tratados com salina após o SE ( $p=0,0460$ ).

Com relação ao tratamento com o alcaloide (+)-eritavina, o grupo de animais tratados com 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  apresentou proteção contra as crises convulsivas recorrentes em 66,67% quando comparados aos animais do grupo controle negativo ( $p=0,0460$ ), resultado este semelhante aos observados nos grupos controles positivos tratados com diazepam e carbamazepina. Quanto às demais doses testadas deste alcaloide, observou-se a ausência de crises recorrentes em 57,14% no grupo de animais tratados com a dose de 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , sendo esta porcentagem maior que aquela apresentada pelo grupo de animais tratados com quetamina e salina. Em relação a maior dose utilizada deste alcaloide (3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ), o não aparecimento de crises recorrentes ficou em torno de 42,86%, porcentagem esta ainda bem maior que aquela observada para os animais tratados com salina. Portanto, em todas as doses testadas do alcaloide (+)-eritavina podemos observar a melhora no quadro de incidência de crises recorrentes comparadas aos animais tratados com salina, indicando evidente atividade anticonvulsivante.

Em relação ao grupo de animais tratados com 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  do alcaloide (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritavina podemos observar que 62,5% não apresentaram crises recorrentes, porcentagem esta maior que aquela observada para os grupos de animais tratados com quetamina, fenitoína e salina, e similar aos dados obtidos com diazepam e carbamazepina. Estes dados também se repetiram para os animais tratados com 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  deste alcaloide, onde constatamos a ausência de crises recorrentes para 60% dos animais. Assim como, para o grupo de animais tratados com 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  observamos que a porcentagem de proteção foi de 50%. Este resultado foi similar ao observado no grupo de animais tratados com quetamina e superior ao grupo de animais tratados com salina. Logo, novamente podemos constatar que todas as doses testadas da (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritavina exerceram significativa atividade anticonvulsivante.

Quanto aos grupos de animais tratados com o alcaloide erisotrina ainda que as duas maiores doses testadas (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) não inibiram o aparecimento de crises recorrentes, a ausência de crises recorrentes com a dose de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  foi constatada para 62,5% dos animais tratados, porcentagem esta maior quando comparada aos grupos de animais tratados com quetamina (60%), fenitoína (50%) e, principalmente o grupo tratado com salina (15%), apontando, portanto, para uma interessante atividade anticonvulsivante também.

Com relação a latência para primeira crise, observa-se que para os grupos controles positivos e experimentais um aumento de até 1,5 vezes no número de dias para início da crise, o que repercute em proteção adicional para os animais além da diminuição da incidência de crises. Ou seja, quando o animal não é totalmente protegido da crise pelo AED ou uma dose qualquer dos alcaloides em teste quando funcional, estes animais demoram mais tempo para desenvolverem a crise recorrente, o que se torna significativo na análise global dos dados. Consideração especial deve ser dada aos tratamentos com carbamazepina (tabela 1), quetamina (tabela 1), diazepam (tabela 1), (+)-eritrovina 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (tabela 2), (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritrovina 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (tabela 2), (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritrovina 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (tabela 2), erisotrina 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (tabela 2) e fenitoína (tabela 1). A latência não é contabilizada para o grupo SHAM, devido a ausência total de crises em todos os animais pertencentes a este escalão.

Quando analisamos a incidência de mortes nos grupos de animais submetidos ao SE e tratados com 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  do alcaloide (+)-eritrovina observamos apenas uma morte no grupo. Este mesmo número de morte se repetiu para os grupos de animais tratados com 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  do alcaloide (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritrovina e 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  do alcaloide erisotrina. Não obstante, para os outros grupos de animais, o que inclui todos os controles positivos e demais grupos experimentais, que receberam tratamento após o SE não foram constatadas nenhuma morte, assim como para o grupo SHAM. Todavia, para os animais submetidos ao SE e tratados com salina (0,9%) foram constatadas três mortes durante o período experimental, o que repercute em nova proteção exercida para a maioria das doses dos alcaloides testadas e, sobretudo para os AEDs (Dados não apresentados).

Em referência às análises de neuroproteção em nível celular, por meio do uso do método de Nissl, a análise histopatológica quantitativa na região da CA1 demonstrou que os animais submetidos ao SE e tratados com salina (grupo controle negativo) apresentaram perda neuronal e presença de núcleos picnóticos bastante aumentadas (Figura 8C). No mesmo contexto, para os animais tratados com fenitoína (Figura 8F) e quetamina (Figura 8G), observamos a presença de quantidade significativa de núcleos picnóticos e/ou vacuolizações. Entretanto, para o grupo de animais que não foram submetidos ao SE (SHAM) (Figura 8B) e



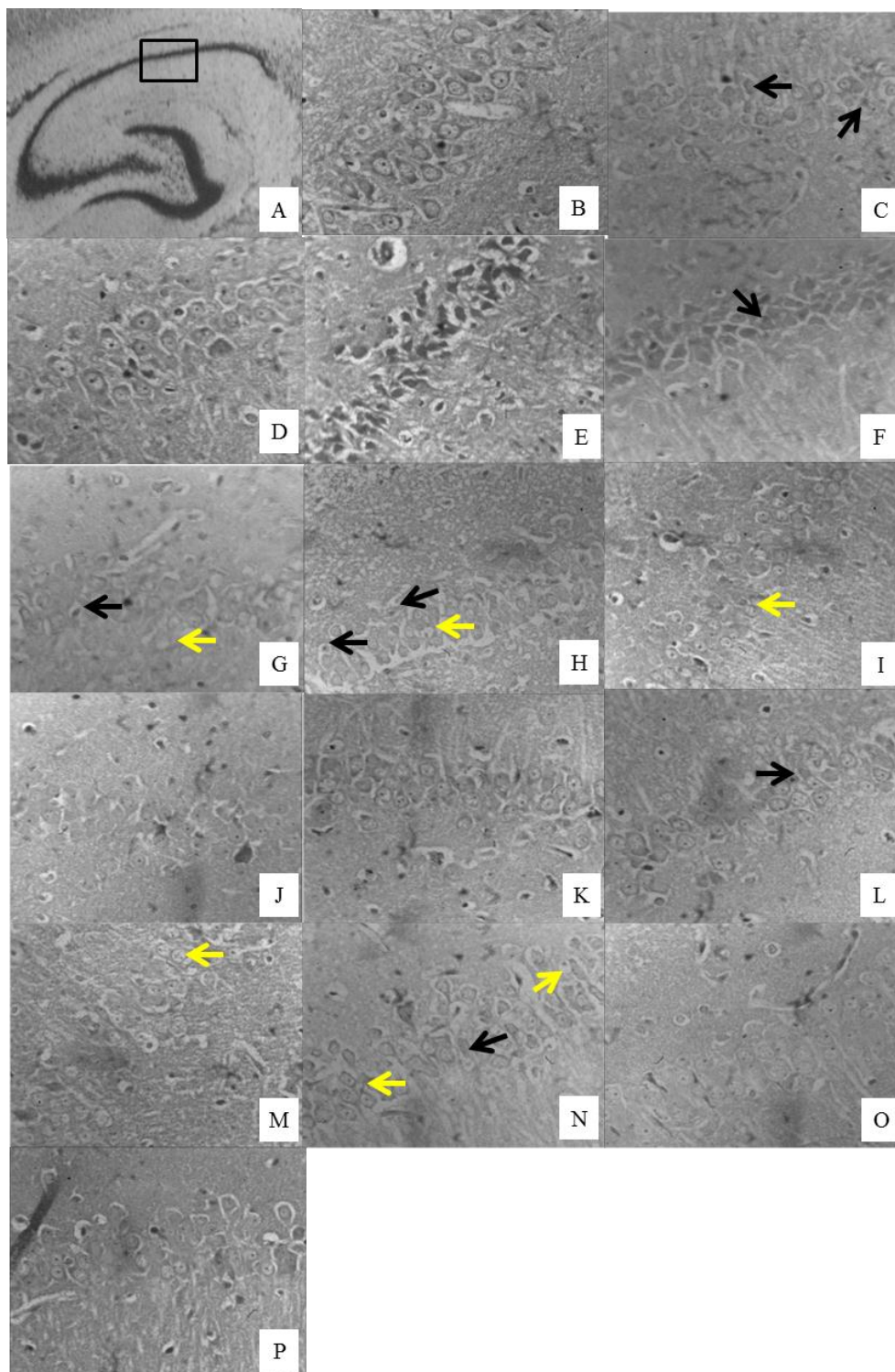
aqueles submetidos ao SE e tratados com diazepam (Figura 8D) e carbamazepina (Figura 8E) nada foi constatado, quando se consideram os parâmetros de presença de perda neuronal, núcleos picnóticos e vacuolizações. Estes mesmos resultados foram observados para os grupos de animais tratados com o alcaloide (+)-eritavina na maior dose testada 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 8J), para os grupos de animais tratados com o alcaloide (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritavina nas doses 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 8K) e 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 8L) e no grupo de animais tratados com as doses 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 8O) e 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 8P) do alcaloide erisotrina, indicando a neuroproteção celular exercida pelos mesmos.

Quando observada a região da CA3 hipocampal, novamente, para o grupo de animais não submetidos ao SE (SHAM) (Figura 9B) e aqueles tratados com diazepam (Figura 9D), carbamazepina (Figura 9E), o alcaloide (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritavina nas doses 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 9L) e 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 9M) e o alcaloide erisotrina nas doses 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 9O) e 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 9P) não foram constatadas vacuolização, presença de núcleos picnóticos e/ou perda neuronal significativa, diferentemente dos demais grupos testados e o grupo controle negativo (Figura 9C), indicando atividade neuroprotetiva também para esta região hipocampal.

Em relação à análise da região do GD os grupos de animais tratados com fenitoína (Figura 10F), diazepam (Figura 10D), (+)-eritavina nas doses 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 10H) e 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 10I), (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritavina em todas as doses testadas 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 10K), 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 10L) e 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 10M), e erisotrina nas duas maiores doses 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 10O) e 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Figura 10P), apresentaram resultados semelhantes ao grupo SHAM, ou seja, nenhuma ou muito pouca observação de vacuolização, presença de núcleos picnóticos e/ou perda neuronal, o que implica em neuroproteção. Para os demais grupos experimentais ou animais tratados com quetamina e carbamazepina, os resultados assemelharam-se aos do grupo controle negativo (Figura 10C).

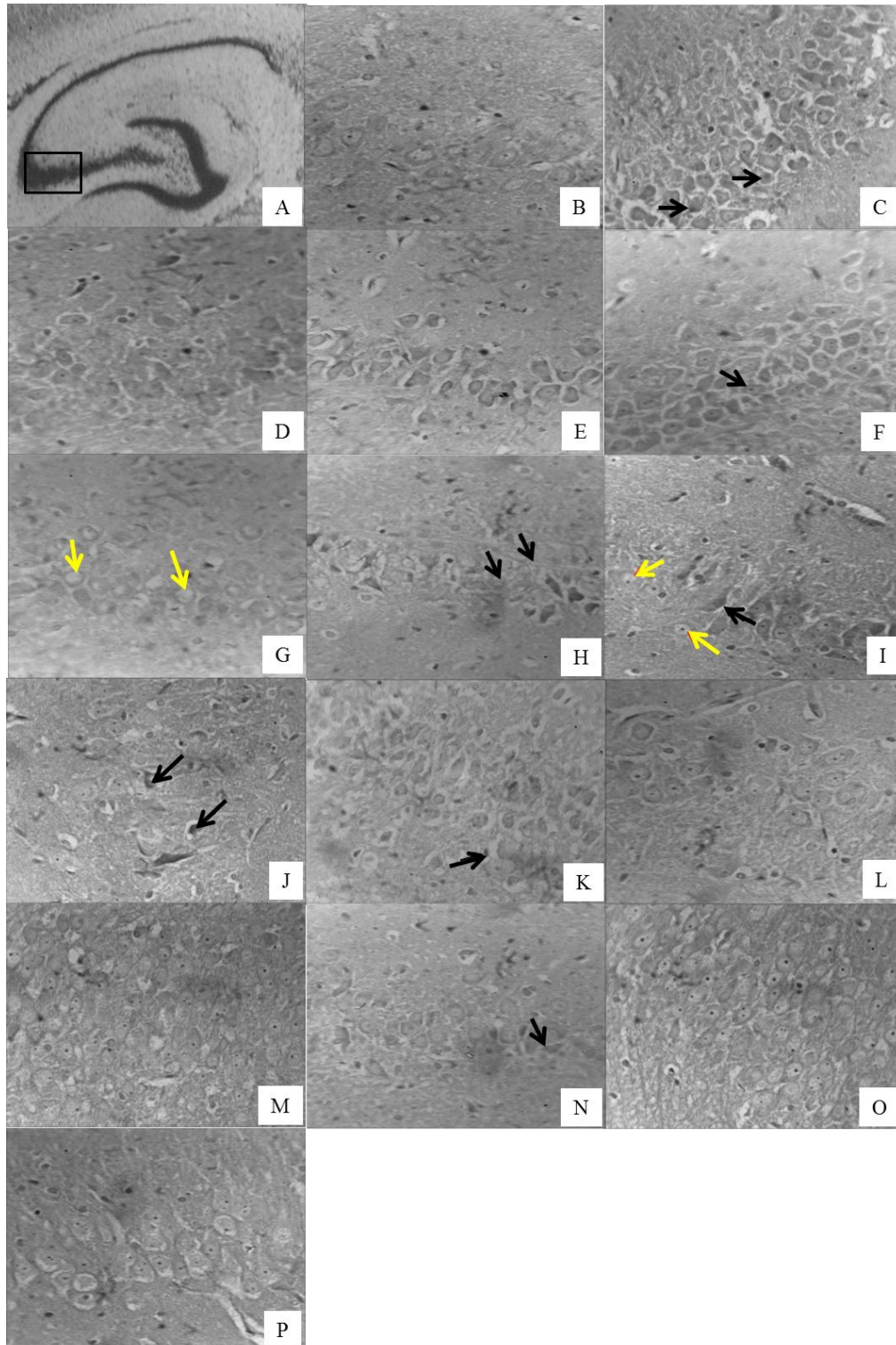
Estes dados revelam, portanto, que em todas as regiões hipocampais analisadas (CA1, CA3 e GD) dos animais tratados com cada um dos três alcaloides estudados, e em grande parte de suas doses analisadas, foi possível observar o efeito neuroprotetor em nível celular dos compostos em teste de maneira bastante similar ou até melhor que para os fármacos de escolha, utilizados como controles positivos em nossos estudos, ou ainda quanto ao nível muito baixo ou ausente de indicativos de lesão naqueles animais não submetidos ao SE (SHAM).

Figura 8 - Cortes histológicos representativos do hipocampo na região da CA1.



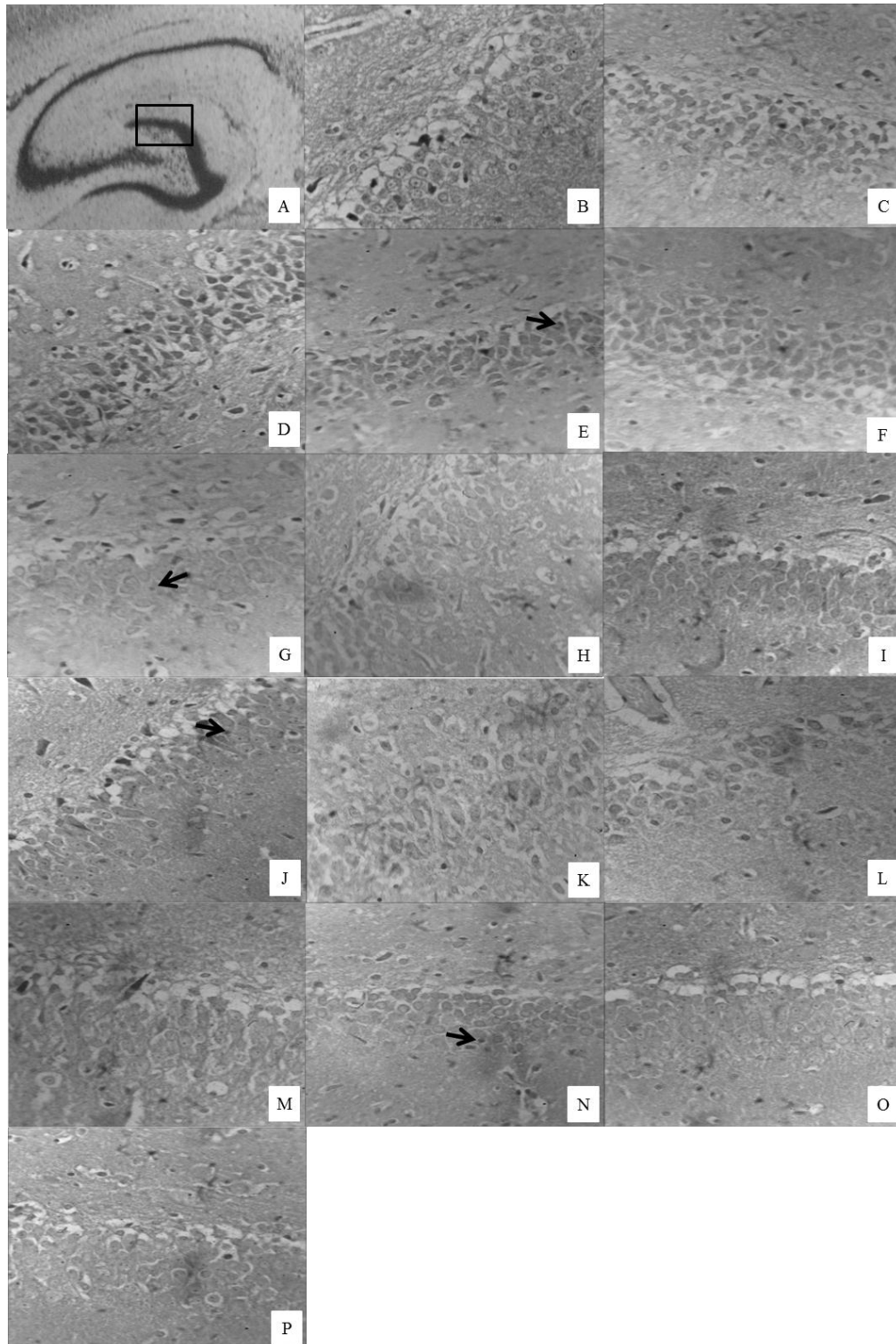
A) Figura retirada de Paxinos e Watson (1998), na qual a área analisada está em destaque. B) Animais não submetidos ao SE. Animais pós-indução do SE tratados com: C) salina (0,9%); D) Diazepam (2 mg/kg); E) Carbamazepina (120 mg/kg); F) Fenitoína (60 mg/kg); G) Quetamina (50 mg/kg); H) (+)-eritravina (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); I) (+)-eritravina (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); J) (+)-eritravina (3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); K) (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritravina (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); L) (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritravina (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); M) (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritravina (3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); N) Erisotrina (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); O) Erisotrina (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); P) Erisotrina (3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). As setas pretas indicam núcleos picnóticos, as setas amarelas indicam vacuolizações. Secções de 3  $\mu\text{m}$ , visualizadas em aumento de 400x. Coloração por violeta de cresila.

Figura 9 - Cortes histológicos representativos do hipocampo na região da CA3.



A) Figura retirada de Paxinos e Watson (1998), na qual a área analisada está em destaque. B) Animais não submetidos ao SE. Animais pós-indução do SE tratados com: C) salina (0,9%); D) Diazepam (2 mg/kg); E) Carbamazepina (120 mg/kg); F) Fenitoína (60 mg/kg); G) Quetamina (50 mg/kg); H) (+)-eritavina (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); I) (+)-eritavina (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); J) (+)-eritavina (3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); K) (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritavina (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); L) (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritavina (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); M) (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritavina (3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); N) Erisotrina (1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); O) Erisotrina (2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ); P) Erisotrina (3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ). As setas pretas indicam núcleos picnóticos, as setas amarelas indicam vacuolizações. Secções de 3  $\mu\text{m}$ , visualizadas em aumento de 400x.

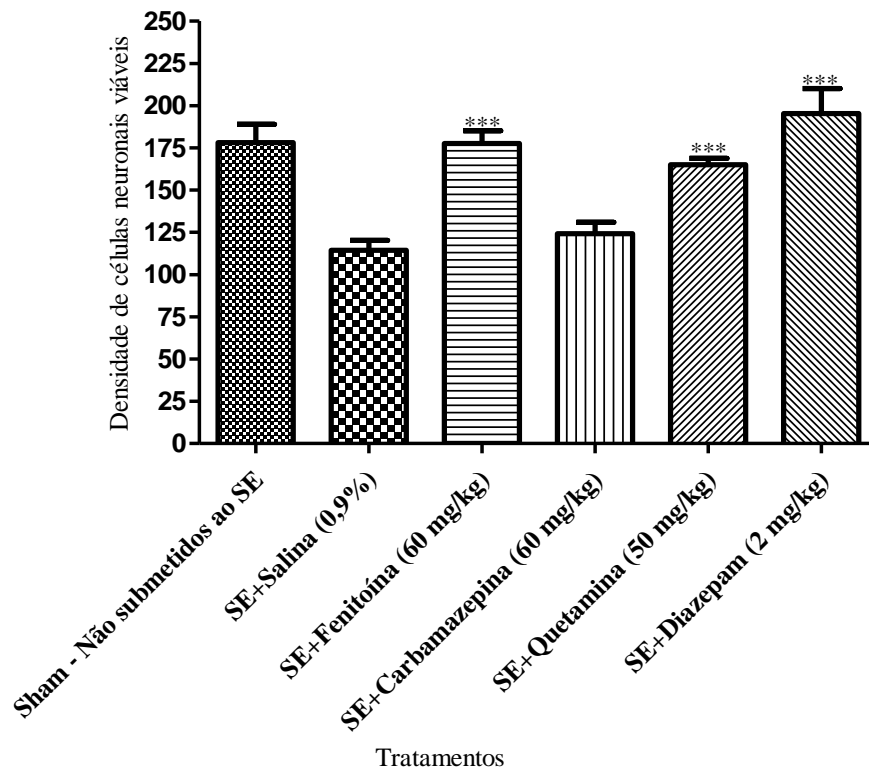
Figura 10 - Cortes histológicos representativos do hipocampo na região do GD.



A) Figura retirada de Paxinos e Watson (1998), na qual a área analisada está em destaque. B) Animais não submetidos ao SE. Animais pós-indução do SE tratados com: C) salina (0,9%); D) Diazepam (2 mg/kg); E) Carbamazepina (120 mg/kg); F) Fenitoína (60 mg/kg); G) Quetamina (50 mg/kg); H) (+)-eritavina (1 µg/µL); I) (+)-eritavina (2 µg/µL); J) (+)-eritavina (3 µg/µL); K) (+)-11α-hidroxieritavina (1 µg/µL); L) (+)-11α-hidroxieritavina (2 µg/µL); M) (+)-11α-hidroxieritavina (3 µg/µL); N) Erisotrina (1 µg/µL); O) Erisotrina (2 µg/µL); P) Erisotrina (3 µg/µL). As setas pretas indicam núcleos picnóticos, as setas amarelas indicam vacuolizações. Secções de 3 µm, visualizadas em aumento de 400x.

Em relação à análise histológica quantitativa das células neuronais hipocâmpais viáveis dos animais submetidos ao SE, através da coloração por violeta de cresila, observou-se diferenças estatísticas na região CA1 entre os animais submetidos ao SE e tratados com salina (grupo controle negativo) quando comparados aos grupos de animais tratados com diazepam, quetamina e fenitoína [ $F(5,84)=12,72$ ;  $p<0,001$ ] e ao grupo de animais que não foram submetidos ao SE (SHAM) ( $p<0,001$ ) (Figura 11). Em relação aos grupos de animais tratados com o alcaloide (+)-eritavina observou-se neuroproteção em todas as doses utilizadas quando comparado ao grupo controle negativo [ $F(4,74)=10,27$ ;  $p<0,05$ ] (Figura 12). Nesta mesma figura 12, pode-se constatar a neuroproteção dos animais tratados com a dose 1 µg/µL do alcaloide (+)-11α-hidroxieritavina [ $F(4,64)=17,06$ ;  $p<0,001$ ], assim como nos grupos de animais tratados com as três doses do alcaloide erisotrina [ $F(4,74)=10,30$ ;  $p<0,01$ ] ambos quando comparados aos animais pertencentes ao grupo controle negativo.

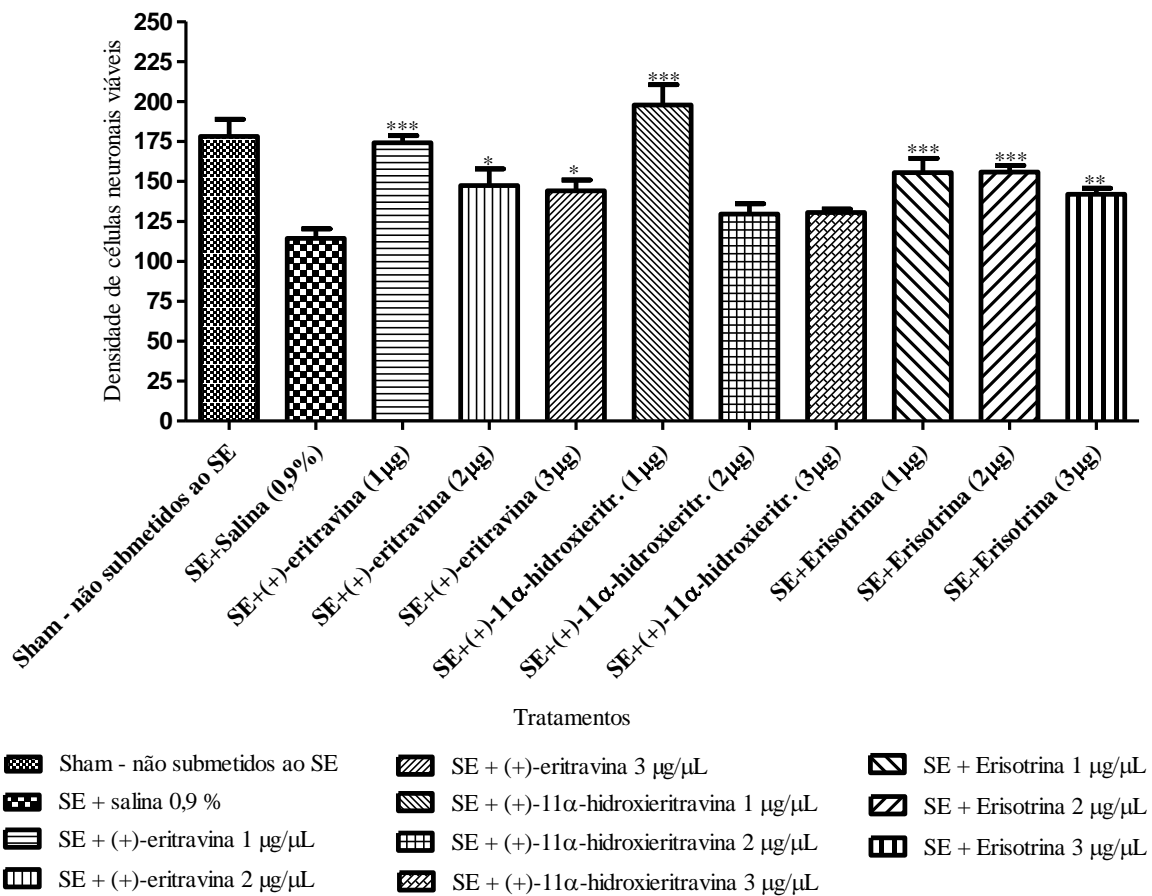
Figura 11 - Densidade de células neuronais viáveis da região CA1.



Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman-Keuls, sendo \*\*\* para diferença estatística contra grupo controle negativo com  $p < 0,001$ .

Figura 12 - Densidade de células neuronais viáveis da região CA1.

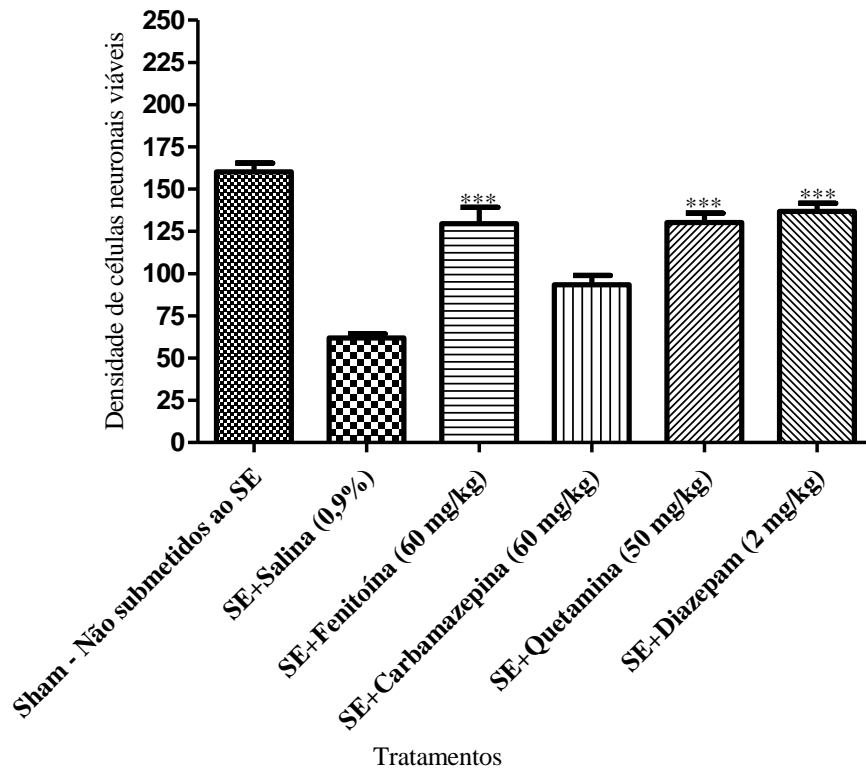




Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman-Keuls, sendo \* para diferença estatística contra grupo controle negativo com  $p < 0,001$ , \*\* com  $p < 0,05$  e \*\*\* com  $p < 0,001$ .

Através da observação das células neuronais viáveis na região da CA3 constatamos que os animais tratados com os fármacos convencionais carbamazepina, quetamina, diazepam e fenitoína foram neuroprotegidos quando comparados aos animais do grupo controle negativo [F(5,84)=44,34;  $p < 0,001$ ] (Figura 13). Similarmente, diferenças estatísticas foram observadas entre o grupo controle negativo quando comparado a todas as três doses testadas dos alcaloides (+)-eritavina (1 µg/µL, 2 µg/µL e 3 µg/µL) [F(4,74)=77,90;  $p < 0,001$ ] (Figura 14), (+)-11α-hidroxi-eritavina (1 µg/µL, 2 µg/µL e 3 µg/µL) [F(4,64)=119,70;  $p < 0,001$ ] (Figura 14) e erisotrina (1 µg/µL, 2 µg/µL e 3 µg/µL) [F(4,74)=58,19;  $p < 0,001$ ] (Figura 14). Nesta região podemos observar a grande perda neuronal do grupo de animais submetidos ao SE quando comparamos ao grupo SHAM [F(5,84)=44,34;  $p < 0,001$ ].

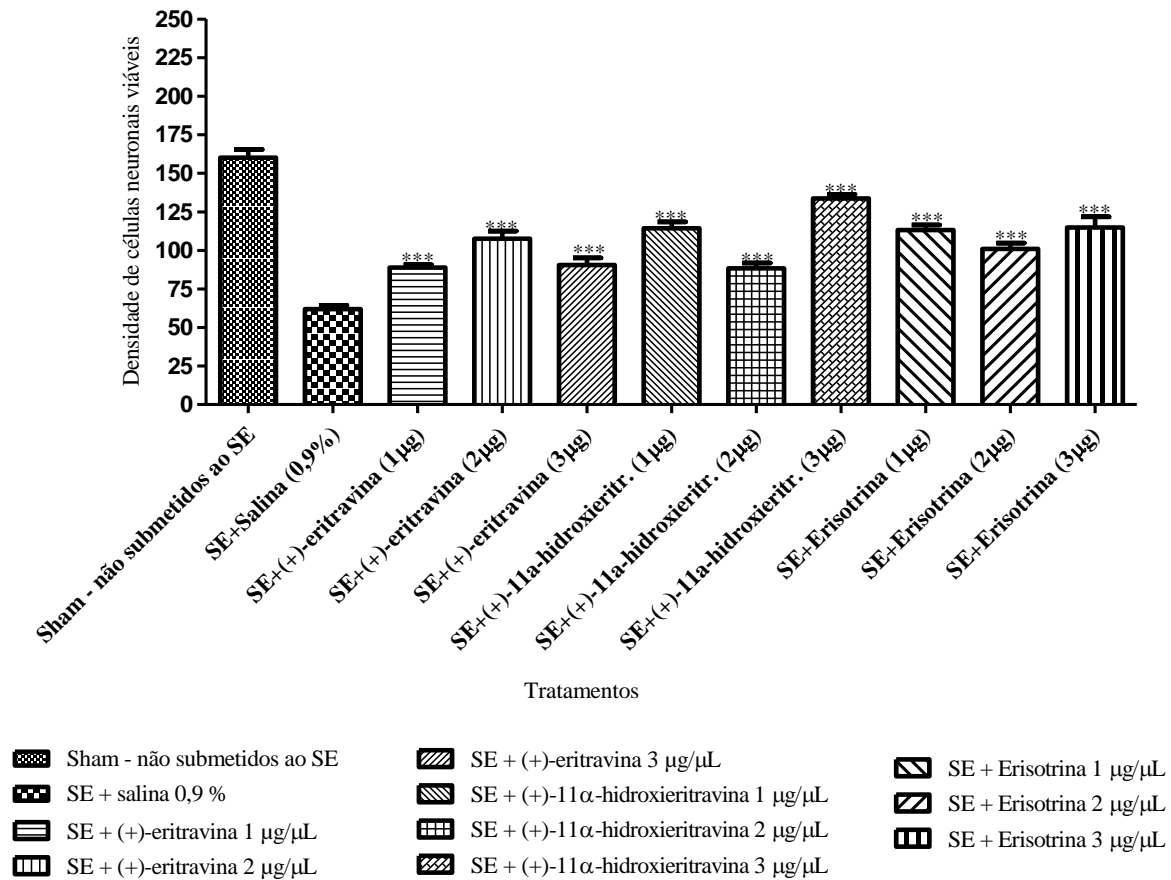
Figura 13 - Densidade de células neuronais viáveis da região CA3.



Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman-Keuls, sendo \*\*\* para diferença estatística contra grupo controle negativo com  $p < 0,001$ .



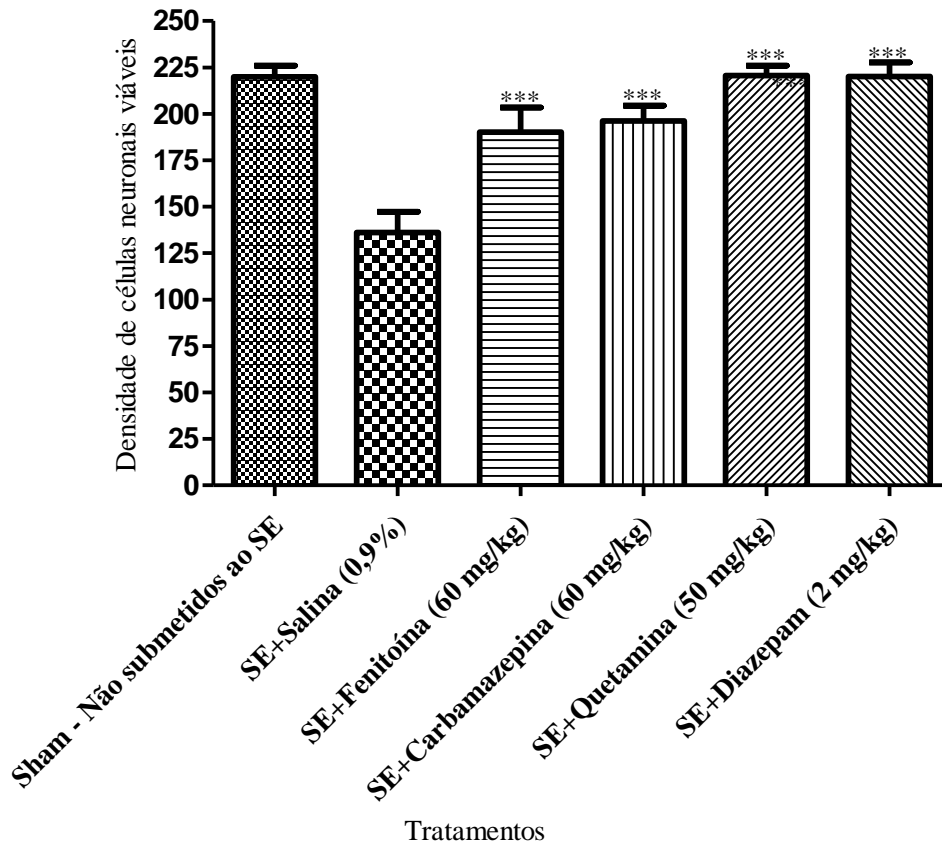
Figura 14 - Densidade de células neuronais viáveis da região CA3.



Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman-Keuls, sendo \*\*\* para diferença estatística contra grupo controle negativo com  $p < 0,001$ .

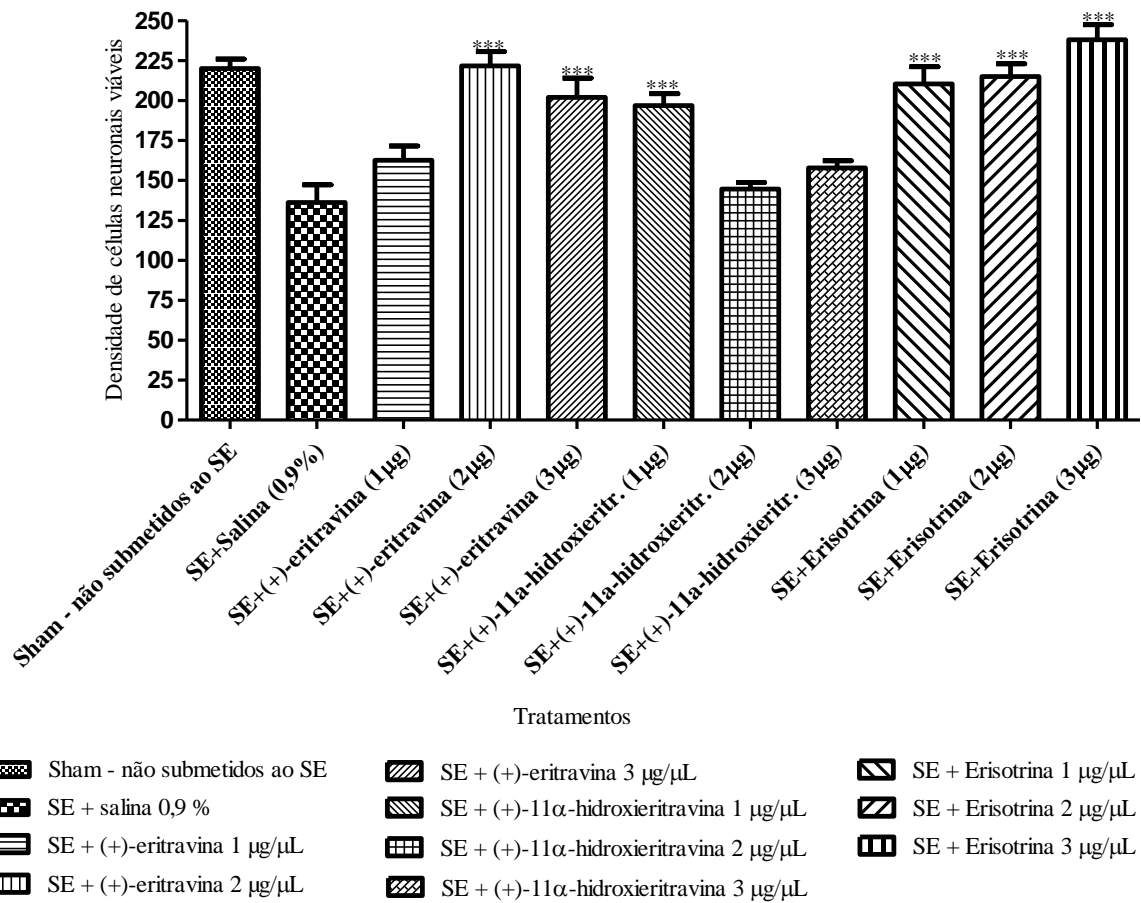
Em relação à região do GD, a análise quantitativa histológica também demonstrou diferenças estatísticas entre os grupos de animais SHAM e aqueles tratados com os fármacos diazepam, fenitoína, quetamina e carbamazepina quando comparados ao grupo controle negativo [ $F(5,84) = 15,49$ ;  $p < 0,001$ ] (Figura 15). Em relação ao tratamento com o alcaloide (+)-eritravina, observou-se neuroproteção para os grupos de animais tratados com as doses 2 µg/µL e 3 µg/µL quando estes também foram comparados ao grupo controle negativo [ $F(4,74) = 15,32$ ;  $p < 0,001$ ] (Figura 16). Assim como, observamos resultados positivos para a neuroproteção quando comparamos os resultados obtidos no grupo de animais tratados com 1 µg/µL do alcaloide 11α-hidroxierritravina em comparação ao grupo de animais submetidos ao SE e tratados com salina (0,9%) [ $F(4,64) = 24,82$ ;  $p < 0,001$ ] (Figura 16). Da mesma forma podemos observar a neuroproteção nos animais tratados com todas as doses testadas do alcaloide erisotrina quando comparados aos animais submetidos ao SE e tratados com salina (0,9%) [ $F(4,74) = 18,02$ ;  $p < 0,001$ ] (Figura 16).

Figura 15 - Densidade de células neuronais viáveis da região GD.



Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman-Keuls, sendo \*\*\* para diferença estatística contra grupo controle negativo com  $p < 0,001$ .

Figura 16 - Densidade de células neuronais viáveis da região GD.



Dados analisados pelo teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Newman-Keuls, sendo \*\*\* para diferença estatística contra grupo controle negativo com  $p < 0,001$ .

Em síntese, os resultados obtidos demonstraram que para o grupo de animais tratados com o alcaloide (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritrovina na dose de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , o número de células viáveis foi maior quando comparado ao dos animais submetidos ao SE e tratados com salina em todas as regiões analisadas (CA1, CA3 e GD). Estes dados também foram constatados quando administradas as outras doses deste mesmo alcaloide somente na região da CA3. Assim como, o número de células neuronais viáveis nos animais tratados com o alcaloide (+)-eritrovina foram comprovadamente maior quando comparado aos animais submetidos ao SE e tratados com salina (0,9%) nas regiões do CA1 e CA3 em todas as doses testadas e na região do GD para as doses 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Finalmente, quando comparamos as regiões CA1, CA3 e GD após a indução do SE e o tratamento em diferentes doses do alcaloide erisotrina com as regiões dos animais tratados com salina (0,9%), podemos observar diferenças estatísticas em todas elas. Desta forma podemos sugerir a atividade neuroprotetora destes alcaloides, tanto qualitativamente como quantitativamente.

No contexto geral, a epileptogênese tem sido amplamente estudada por meio de modelos animais crônicos no qual são observadas alterações histológicas, fisiológicas e

comportamentais semelhantes aquelas vistas em humanos. Dentre estes modelos, o modelo da pilocarpina é bastante caracterizado em roedores, onde a administração deste alcaloide induz inicialmente crises límbicas, que mais tarde se transformam em crises generalizadas. Nestes estudos, as respostas comportamentais são mensuradas e analisadas posteriormente, uma vez que se assemelham à Epilepsia do Lobo Temporal observada em humanos. Dentre tais parâmetros investigados estão a incidência e latência para crise, assim como a morte dos animais, caracterizando desta forma a atividade anticonvulsivante para os compostos que retardam ou impedem tais eventos/parâmetros ou mesmo impedem o óbito (ROSSETTI et al., 2012; KHARATISHVILI et al., 2013; LOPES et al., 2013).

No intuito de validar a atividade anticonvulsivante dos alcaloides (+)-eritrovina, (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritrovina e erisotrina foram observadas neste trabalho a incidência de crises comportamentais recorrentes, a latência para a primeira crise e a incidência de morte dos animais submetidos ao modelo de indução química de SE pela injeção via i.c.v. com pilocarpina.

Os resultados obtidos para os grupos de animais tratados com os alcaloides (+)-eritrovina, (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritrovina e erisotrina em diferentes doses apontaram que a frequência observada das crises comportamentais se assemelham àquelas dos animais tratados com diferentes fármacos anticonvulsivantes comerciais (carbamazepina 76,77%, quetamina 50%, diazepam 76,77%, fenitoína 60%, (+)-eritrovina 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  57,14% e 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  42,86%, (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritrovina 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  62,50%, 2  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  50% e 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  60% e erisotrina 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  62,50%).

Além disso, em relação a incidência destas crises nos animais tratados com os fármacos ou com os alcaloides, após o SE, verificamos que a proteção comportamental ficou compreendida entre 1,4 e 2,5 vezes maior quando comparada aos animais tratados com salina, sendo importante ressaltar que os animais permaneceram em SE por 3 horas e em consequência deste período, o número de convulsões torna-se elevado após 48 horas da indução permanecendo desta forma a partir de então (MAZZUFERI, et al. 2012).

Com relação à latência para o aparecimento das crises recorrentes dos animais, ou seja, os animais em que o tratamento não inibiu o aparecimento das crises recorrentes, podemos observar que as diferentes doses dos alcaloides corresponderam a tempos similares aos observados nos grupos tratados com AED, sendo estes muito diferentes quando observados nos animais tratados com salina após o SE. Esse tipo de medida é válido quando analisada a atividade anticonvulsivante de um composto, uma vez que, demonstra a capacidade deste de retardar o aparecimento das crises recorrentes nos animais submetidos ao

SE. As pequenas variações de tempo entre os alcaloides e as diferentes AEDs podem ser explicadas pela variabilidade de resposta comportamental devido a fatores genéticos e/ou ambientais entre os animais (GOFFIN et al., 2007).

Assim como, não foram observadas mortes nos grupos de animais tratados após o SE com os fármacos de escolha e/ou os alcaloides eritrínicos nas diferentes doses. A exceção está para uma única dose de cada alcaloide da qual foi atestada apenas uma morte, sendo para (+)-eritrovina a dose 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , para 11 $\alpha$ -hidroxieritrovina 3  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e para erisotrina 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Entretanto, no grupo de animais submetidos ao SE e tratados com salina o número de mortes verificado foi 3 vezes maior durante o período experimental. Tais dados podem ser explicados devido à severidade do SE de longa duração, uma vez que a indução por pilocarpina promove descargas elétricas em até 72 horas após o SE e, por consequência maior taxa de morte (GAO et al., 2007).

Em relação às estimativas da quantificação neuronal, nossos dados indicaram na região da CA1 que a quantidade de células viáveis foi maior em 30% para os tratamentos com quetamina, diazepam, fenitoína, (+)-eritrovina, erisotrina e em uma dose do alcaloide (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritrovina quando comparada aos animais submetidos ao SE e tratados com salina. Da mesma forma, os grupos de animais tratados com os fármacos convencionais e os três alcaloides estudados mantiveram, aproximadamente, o número de células viáveis na região da CA3 duas vezes maior àquele observado nos animais tratados com salina. Resultados semelhantes aos encontrados na CA3 foram obtidos na região do GD para os tratamentos com os fármacos de escolha, o alcaloide erisotrina, a menor dose do alcaloide (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritrovina e as maiores doses testadas do alcaloide (+)-eritrovina.

Os distintos resultados apontados em termos da diferença de eficiência neuroprotetiva entre as diferentes áreas do hipocampo (CA1, CA3 e GD) para os diferentes alcaloides e AEDs podem ser explicados pelo fato de cada anticonvulsivante poder apresentar diferentes mecanismos de ação associados a alteração dos diferentes sistemas de neurotransmissão, sejam eles inibitórios e/ou excitatórios, quando de crises induzidas pela pilocarpina, um agonista colinérgico muscarínico tipo M1 (CURIA et al., 2008; DE FREITAS, 2011). Acredita-se que a ativação dos receptores muscarínicos seja responsável pela indução das crises convulsivas no modelo de pilocarpina, sendo a instalação e manutenção da atividade epiléptica dependentes do influxo de cálcio nas células promovido pelos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, principalmente no hipocampo, onde cerca de 90% de suas células são excitatórias (DRAGE et al., 2002; DE FREITAS, 2011).

A mesma ideia pode explicar as ligeiras diferenças de desempenho anticonvulsivante analisadas pelos quesitos de incidência de crises e latência para as mesmas (Tabelas 2 e 3) e mortes de animais, muito embora, fatores outros como os farmacocinéticos possam estar envolvidos. Com relação aos mecanismos neurobiológicos e neuroquímicos ocorrentes no hipocampo e em outras áreas cerebrais envolvidas no animal sob SE, estes não são totalmente conhecidos ainda, contudo, alterações em sistemas de neurotransmissão como os gabaérgicos, glutamatérgicos, seretonérgicos e noradrenérgicos são comumente apontadas (DE FREITAS, 2011; RUSSO et al., 2013; RISBUT e PORTER, 2013).

Quando comparamos, no presente estudo, a prevalência das células hipocampais viáveis em todas as regiões analisadas após qualquer tratamento com as diferentes doses dos alcaloides ou diferentes AEDs observamos uma maior quantidade das células viáveis na região do GD. Estes resultados podem ser explicados devido ao fato de nesta região haver prevalência de células granulosas e hilares, quando comparadas às regiões da CA1 e CA3 que apresentam uma prevalência de células piramidais. Posteriormente, temos a região da CA1 com maior número de células viáveis, uma vez que esta apresenta uma menor quantidade de receptores tipo NMDA, o que promove uma maior quantidade de morte neuronal comparada ao GD, embora menor quando comparada à região da CA3 (CHWIEJ et al., 2012).

Contrariamente ao mecanismo neurobiológico e neuroquímico envolvido na indução e manutenção do SE em animais e, ainda quanto ao mecanismo de ação dos alcaloides estudados, os mecanismos de ação relacionados aos AEDs em estudo estão bem estabelecidos na literatura científica. A quetamina é um antagonista não competitivo dos receptores glutamatérgicos NMDA, a fenitoína e carbamazepina atuam em sinapses excitatórias inibindo canais de  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem; e o diazepam age inibindo os receptores  $\text{GABA}_A$  em um sítio específico (benzodiazepínicos) nos canais iônicos permeáveis a íons de  $\text{Cl}^-$  acoplados ao receptor (KWAN et al., 2001; BIALER e WHITE, 2010; RAJ, GULAT e RODJA, 2011). Como salientado, os mecanismos de ação dos alcaloides ainda permanecem por serem descobertos, podendo os mesmos terem ou não mecanismos de ação similares aos AEDs usados neste estudo. Brevemente, estudos da atividade anticonvulsivante dos alcaloides eritrínicos analisados neste trabalho e, anteriores ao mesmo, apontaram uma ação predominante sobre a neurotransmissão glutamatérgica do alcaloide erisotrina, embora para (+)-eritavina e (+)-11  $\alpha$ -hidroxieritavina não foi constatada ação preferencial nas vias inibitórias (GABAérgicas) ou excitatórias (Glutamatérgica). Quanto a investigação neuroquímica, anteriormente estudada pelo nosso grupo também, não foi observada alteração na recaptação ou no *binding* sinaptosomal de [ $^3\text{H}$ ]-GABA e [ $^3\text{H}$ ]-Glutamato dos alcaloides

utilizados neste estudo em diferentes concentrações (0,001-10 µg/mL), sendo isso inclusive verdadeiro para erisotrina (FAGGION et al., 2011; ROSA et al., 2012). Neste contexto do mecanismo de ação dos alcaloides, novos estudos são urgentes, sejam eles ainda insistentes nas sinapses GABAérgicas e/ou glutamatérgicas, focando nos receptores GABA<sub>A</sub> ou NMDA mais precisamente, ou ainda envolvendo novos tipos de neurotransmissão, ou ainda canais iônicos, particularmente de Na<sup>+</sup>.

Ainda na discussão sobre prováveis mecanismos de ação, sabe-se que os alcaloides eritrínicos são compostos nitrogenados tetraheterocíclicos com um grupamento tetrahydroisoquinolino. Para outros alcaloides eritrínicos já estudados e diferentes daqueles investigados no presente estudo, seus mecanismos de ação envolvem ativação dos receptores GABA<sub>A</sub>, ativação dos receptores muscarínicos, dentre outros, como prováveis mecanismos de ação farmacológica (GARCIA-MATEOS et al., 2005; CARVALHO, 2009; JIRI, 2011; SOTO-HERNÁNDEZ, 2013). Como exemplo, Carvalho e colaboradores (2009) propuseram que o extrato aquoso da *Erythrina velutina*, com atividade anticonvulsivante, ativa os receptores GABA e libera acetilcolina, assim como também ativa os receptores muscarínicos aumentando o influxo de Ca<sup>2+</sup> para neurônios de áreas cerebrais implicadas no disparo de crises convulsivas. Apesar de a (+)-eritravina, (+)-11α-hidroxi-eritravina e erisotrina não alterarem a recaptação e *binding* de Glutamato e GABA, como demonstrado por experimentos prévios de nosso grupo, é importante salientar que a ação em receptores GABA<sub>A</sub> e NMDA não estão completamente descartadas, pois tais receptores apresentam sítios de modulação adicionais e diferentes daqueles estudados por nosso grupo anteriormente, no que novos estudos são ainda requeridos. Outra sugestão a ser dada seja que tais alcaloides possam agir como agonistas dos receptores muscarínicos, também de acordo com os estudos envolvendo o extrato aquoso da *Erythrina velutina* de Carvalho e colaboradores (2009), o que responderia pela atividade anticonvulsivante observada para os alcaloides por nós ensaiados frente ao modelo crônico de pilocarpina. A ação em receptores colinérgicos nicotínicos também não pode ser descartada. Como exemplo, temos o estudo de Soto-Hernández (2013) que propôs o mecanismo de ação do alcaloide eritrínico erisodina, isolado da *Erythrina americana*, como sendo um antagonista competitivo de receptores nicotínicos. Tal alcaloide é similar estruturalmente ao alcaloide (+)-eritravina apresentando apenas a inversão dos radicais nas posições 16 e 6 como diferença, além disso, não é relatada a atividade anticonvulsivante para erisodina, o que supostamente prova que pequenas variações entre os grupamentos hidroxila e metila podem ser as responsáveis por promover mecanismos e seletividade de ações diferentes (GARCIA-MATEOS et al., 2005; JIRI, 2011).

Como salientado, outros prováveis mecanismos não podem ser descartados do cabedal de possibilidades, como a modulação da expressão gênica de receptores GABA<sub>A</sub> e NMDA ao final da fase silenciosa do SE, isto porque se sabe que tais receptores estão, respectivamente, diminuídos e aumentados nesta fase do modelo de pilocarpina (RAJ, GULATI e LODHA, 2011; LÖSCHER, 2011), contribuindo para sua progressão e manutenção, no que modulação em sentido inverso poderia repercutir em atividade anticonvulsivante duradoura e neuroproteção. Além disso, é possível que cada alcaloide aqui estudado possa ter mecanismos de ações iguais, parecidos ou diferentes. As duas últimas hipóteses (parecidos e diferentes) podem ser reforçadas pela existência de ligeiras diferenças estruturais entre os alcaloides aqui estudados ao redor do núcleo eritrínico (Figura 3) e ainda, pelas diferenças de potência já observadas num mesmo modelo experimental e atividades farmacológicas diferentes. Neste sentido e, por exemplo, a (+)-eritavina e a (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritavina são, de acordo com nossos estudos prévios, anticonvulsivantes e ansiolíticas, enquanto a erisotrina apenas anticonvulsivante (FAGGION et al., 2011; ROSA et al., 2012).

Finalmente, a contínua investigação de ações farmacológicas outras dos alcaloides aqui estudados são ainda necessárias para um quadro mais completo e efetivo de exploração de possibilidades. Além disso, a descoberta do(s) mecanismo(s) de ação(es) em nível molecular pelo qual tais alcaloides exercem suas atividades anticonvulsivantes, ansiolíticas e neuroprotetoras são urgentes, podendo envolver novos estudos usando diferentes técnicas imunohistoquímicas, neuroquímicas, *voltage clamp* e, ainda através de PCR em Tempo Real. Com efeito, os estudos com plantas medicinais tem sido importantes e amplamente desenvolvidos, uma vez que, o Brasil representa uma fonte rica de diversidade biológica e química, representada por sua exuberante natureza, devendo ser notado que o estudo das plantas deve passar pelo isolamento de ativos e estudo e mecanismos de ação em nível molecular para que os mesmos possam ter abrangências científicas mais ampliadas (BARBOSA-FILHO et al., 2006a).



## 5 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que os alcaloides (+)-eritravina, (+)-11 $\alpha$ -hidroxieritravina e erisotrina isolados a partir do extrato hidroalcoólico das flores da *Erythrina mulungu* apresentaram um efeito anticonvulsivante similar/equivalente ao de fármacos convencionais (Diazepam, Carbamazepina, Fenitoína e Quetamina) administrados durante os quatro dias posteriores ao SE induzido pela injeção de pilocarpina via i.c.v. em ratos Wistar. Em nosso estudo, observamos que tais alcaloides reduziram a incidência e latência das crises recorrentes, assim como o número de mortes quando comparados aos animais tratados com salina. Estes dados foram equivalentes aos de fármacos comerciais, de diferentes mecanismos de ação, usualmente utilizados pela população no tratamento da ELT ou mesmo outros tipos de epilepsia. Da mesma forma, o efeito neuroprotetor para cada um destes alcaloides foi evidenciado assim como os fármacos de escolha quando observado que as regiões hipocâmpais CA1, CA3 e GD apresentaram números de neurônios viáveis maiores que para os animais tratados com salina, assim como a diminuição e/ou ausência de núcleos picnóticos e desorganização neuronal, numa análise qualitativa geral.

Portanto, a atividade anticonvulsivante e neuroprotetora dos alcaloides isolados da planta *E. mulungu* foi comprovada, agora, em uma escala crônica de epilepsia, em um modelo experimental que simula em muito os aspectos comportamentais e celulares/morfológicos da ELT em humanos. Entretanto, o(s) mecanismo(s) em nível(is) molecular(ES) pelo(s) qual(is) de como os referidos alcaloides exercem suas ações anticonvulsivante e neuroprotetora envolvidos são ainda preliminares ou ausentes, no que devem ser debruçados novos esforços nas etapas seguintes deste trabalho. Os estudos com estes alcaloides são importantes, uma vez que estes são bem absorvidos pelo trato gastrointestinal e atravessam a barreira hematoencefálica, além de serem bem tolerados pelos animais e possuírem diferentes ações farmacológicas comprovadas. Estes atributos fazem com que tais alcaloides sejam cercados de vantagens farmacológicas, toxicológicas e farmacocinéticas importantes no desenvolvimento de um novo fármaco com ação dirigida para o SNC.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE-VALENÇA, L. P. A.; VALENÇA, M. M.; VELASCO, T. R.; LEITE, J. P. Epilepsia do Lobo Temporal Mesial Associada à Esclerose Hipocampal. Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology, v. 12, n. 1, p. 31-36, 2006.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, p. 258-285, 2006a.
- BIALER, M.; WHITE, H. S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. Nature, v. 9, p. 68-82, 2010.
- BORGES, M. A.; MIN, L. L.; GUERREIRO, C. A. M.; YACUBIAN, E. M. T.; CORDEIRO, J. A.; TOGNOLA, W. A.; BORGES, A. P. P.; ZANETTA, D. M. T. Urban prevalence of epilepsy. Arquivos de Neuro-Psiquiatria, v. 64, n. 2, p. 199-205, 2004.
- BORGES, K. K.; BORGES, M. A.; DOS SANTOS, F. H.; SANTOS, A. B.; DE SOUZA, E. A. P. Issues that affect people with epilepsy quality of life. Revista Brasileira de Terapias Cognitivas, v. 5, n. 2, p. 28-44, 2010.
- CASTRO, O. W.; FURTADO, M. A.; TILELLI, C. Q.; FERNANDES, A.; PAJOLLA, G. P.; GARCIA-CAIRASCO, N. Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after status epilepticus induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. Brain Research, n. 1374, p. 43-55, 2011.
- CHWIEJ, J.; KUTORASINSKA, J.; JANECKO, K.; GZIELO-JUREK, K.; URAM, L.; APPEL, K.; SIMON, R.; SETKOWICZ, Z. Progress of elemental anomalies of hippocampal formation in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy-an X-ray fluorescence microscopy study. Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 404, p. 3071–3080, 2012.
- CUNHA, A. O. S.; MORTARI, M. R.; CAROLINO, R. O. G.; COUTINHO-NETTO, J.; SANTOS, W. F. Glutamate binding is altered in hippocampus and cortex of Wistar rats after pilocarpine-induced Status Epilepticus. Neuroscience Letters, n. 424, p. 51-54, 2007.
- CUNHA, A. O. S.; MORTARI, M. R.; LIBERATO, J. L.; SANTOS, W. F. Neuroprotective effects of diazepam, carbamazepine, phenytoin and ketamine after pilocarpine-induced Status Epilepticus. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, v. 104, n. 6, p. 470-477, 2009.

CURIA, G.; LONGO, D.; BIAGINIB, G.; JONES, R. S. G.; AVOLI, M. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. Journal of Neuroscience Methods, n. 172, p. 143–157, 2008.

D'AVILA, B. M.; LOPEZ, M. C. E.; PATRIARCHA, F. A.; RESTINI, C. B. A. Effect of green tea (*Camellia sinensis*) on epileptic seizures induced by pentylenotetrazol (PTZ) in rats. Pharmacologia, n. 2, v. 12, p. 362-368, 2011.

DE DEYN, P. P.; REUCK, J. D.; DEBERDT, W.; VLIETINCK, R.; ORGOGOZO, J. M. Treatment of acute ischemic stroke with piracetam. Members of the Piracetam in Acute Stroke Study (PASS) Group. Stroke, n. 28, v. 12, p. 2347-2352, 1992.

DE FREITAS, R. M. Sistemas de Neurotransmissão Envolvidos no Modelo de Epilepsia: Uma Revisão de Literatura. Revista Neurociências, v. 19, n. 1, p. 128-138, 2010.

DE OLIVEIRA, S. M. G.; AQUINO, A. B.; SILVA, D. L.; AQUINO, P. G. V.; SANTOS, M. S.; PORFÍRIO, A. P. R.; SANT'ANA, A. E. G.; SANTOS, B. V. O.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; ARAÚJO-JUNIOR, J. X. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts and fractions from *Erythrina mulungu*. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 22, n. 1, p. 157-161, 2012.

DRAGE, M. G.; HOLMES, G. L.; SEYFRIED, T. N. Hippocampal neurons and glia in epileptic EL mice. Journal of Neurocytology, n. 31, p. 681-692, 2002.

DUA, T.; DE BOER, H. M.; PRILIPKO, L. L.; SAXENA, S. Epilepsy Care in the World: Results of an ILAE/IBE/WHO Global Campaign Against Epilepsy Survey. Epilepsia, n. 47, v. 7, p. 1225-1231, 2006.

EBERT, U.; BRANDT, C.; LÖSCHER, W. Delayed sclerosis, neuroprotection, and limbic epileptogenesis after status epilepticus in the rat. Epilepsia, v. 43, n. 5, p. 86-95, 2002.

FAGGION, S. A.; CUNHA, A. O. S.; FACHIM, H. A.; GAVIN, A. S.; SANTOS, W. F.; PEREIRA, A. M. S.; BELEBONI, R. O. Anticonvulsant profile of the alkaloids (+)-erythravine and (+)-11- $\alpha$ -hydroxy-erythravine isolated from the flowers of *Erythrina mulungu* Mart ex Benth (Leguminosae–Papilionaceae). Epilepsy & Behavior, v. 20, n. 3, p. 441-446, 2011.

FLAUSINO JUNIOR, O.; PEREIRA, A. M.; BOLZANI, V. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. Anxiolytic effects of erythrinian alkaloids from *Erythrina mulungu*. Journal of Natural Products, v. 70, n. 1, p. 48-53, 2007a.

FLAUSINO JUNIOR, O.; SANTOS, L. A.; VERLI, H. PEREIRA, A. M.; BOLZANI, V. S.; NUNES-DE-SOUZA, R. Effects of erythrinian alkaloids isolated from *Erythrina mulungu* (Papilionaceae) in mice submitted to animal models of anxiety. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 30, n. 2, p. 375-378, 2007b.

FURTADO, M. A.; BRAGA, G. K.; OLIVEIRA, J. A.; DEL VECCHIO, F.; GARCIA-CAIRASCO, N. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. *Epilepsia*, v. 43, n. 5, p. 37-39, 2002.

FURTADO, M. A.; CASTRO, O. W.; DEL VECCHIO, F.; OLIVEIRA, J. A. C.; GARCIA-CAIRASCO, N. Study of spontaneous recurrent seizures and morphological alterations after status epilepticus induced by intrahippocampal injection of pilocarpine. *Epilepsy & Behavior*, v. 20, n. 2, p. 257-266, 2011.

GAO, X-G.; LIU, Y.; LIU, X-Z. Treatment of late lithium-pilocarpine-induced *status epilepticus* with diazepam. *Epilepsy Research*, n. 74, p. 126-130, 2007.

GARCIA-MATEOS, M. R.; SOTO-HERNÁNDEZ, R. M.; GUTIÉRREZ, R. J. M.; VILEGAS-MONTER, A. Alkaloids from several subcultures of *erythrina Americana miller calluses*. *Revista Chapingo*, vol. 11, n. 1, p. 21-26, 2005.

GOFFIN, K.; NISSINEN, J.; LAERE, K. V.; PITKANEN, A. Cyclicality of spontaneous recurrent seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy in rat. *Experimental Neurology*, n. 205, p. 501-505, 2007.

GOMES, N. G.; CAMPOS, M. G.; ÓRFÃO, J. M. C.; RIBEIRO, C. A. F. Plants with neurobiological activity as potential targets for drug discovery. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, v. 33, n. 8, p. 1372-1389, 2009.

HANNESSON, D. K.; CORCORAN, M. E. The mnemonic effects of kindling. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, n. 24, p. 725-751, 2000.

KHARATISHVILI, I.; SHAN, Z. Y.; SHE, D. T.; FOONG, S.; KURNIAWAN, N. D.; REUTENS, D. C. MRI changes and complement activation correlate with epileptogenicity in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *Brain Structure and Function*. Disponível em: doi:10.1007/s00429-013-0528-4, 2013.

KWAK, S. E.; KIM, J.E.; KIM, D.S.; WON, M. H.; CHOI, H. C.; KIM, Y. I.; SONG, H. K.; CHOI, S. Y.; KANG, T. C. Differential effects of vigabatrin and zonisamide on the

neuropeptide Y system in the hippocampus of seizure prone gerbil. *Neuropeptides*, n. 39, p. 507-513, 2005.

KWAN, P.; SILLS, G. J.; BRODIE, M. J. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. *Pharmacology & Therapeutics*, n. 90, p. 21-34, 2001.

LANGER, M.; BRANDT, C.; LÖSCHER, W. Marked strain and substrain differences in induction of status epilepticus and subsequent development of neurodegeneration, epilepsy, and behavioral alterations in rats. *Epilepsy Research*, v. 96, n. 3, p. 207-224, 2011.

LEPPIK, I. E. Intractable epilepsy in adults. *Epilepsy Research*, n. 5, p. 7-11, 1992.

LOPES, M. W.; SOARES, F. M.; DE MELLO, N.; NUNES, J. C.; CAJADO, A. G.; DE BRITO, D.; DE CORDOVA, F. M.; DA CUNHA, R. M.; WALZ, R.; LEAL, R. B. Time-dependent modulation of AMPA receptor phosphorylation and mRNA expression of NMDA receptors and glial glutamate transporters in the rat hippocampus and cerebral cortex in a pilocarpine model of epilepsy. *Experimental Brain Research*, n. 226, v. 2, p. 153-163, 2013.

LORENZI, H. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 512 p

LÖSCHER, W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. *European Journal Pharmacology*, n. 342, p. 1-13, 1998.

LÖSCHER, W. Animal models of epilepsy for the development of antiepileptogenic and disease-modifying drugs. A comparison of the pharmacology of kindling and *post-status epilepticus* models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsy Research*, n. 20, p. 105-123, 2002.

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

MAZZUFERI, M.; KUMAR, G.; ROSPO, C.; KAMINSKI, R. M. Rapid epileptogenesis in the mouse pilocarpine model: Video-EEG, pharmacokinetic and histopathological characterization. *Experimental Neurology*, n. 238, p. 156-167, 2012.

MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry*, n. 68, p. 2015-2022, 2007.

MELDRUM, B. S. Identification and preclinical testing of novel antiepileptic compounds. *Epilepsia*, v. 38, n. 9, p. 7-15, 1997.

MORTARI, M. R.; CUNHA, A. O. S.; FERREIRA, L. B.; SANTOS, W. F. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: From basic research to therapeutic application. *Pharmacology Therapeutics*, v. 114, n. 2, p. 171-183, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NORONHA, A. L.; BORGES, M. A.; MARQUES, L. H.; ZANETTA, D. M.; FERNANDES, P. T.; DE BOER, H.; ESPÍNDOLA, J.; MIRANDA, C. T.; PRILIPKO, L.; BELL, G. S.; SANDER, J. W.; LI, L. M. Prevalence and Pattern of Epilepsy Treatment in Different Socioeconomic Classes in Brazil. *Epilepsia*, n. 48, v. 5, p. 880-885, 2007.

ONUSIC, G. M.; NOGUEIRA, R. L.; PEREIRA, A. M. S.; VIANA, M. B. Effect of acute treatment with a water-alcohol extract of *Erythrina mulungu* on anxiety-related responses in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, n. 35, p. 473-478, 2002.

ONUSIC, G. M.; NOGUEIRA, R. L.; PEREIRA, A. M. S.; FLAUSINO-JUNIOR, O. A.; VIANA, M. B. Effects of chronic treatment with a water-alcohol extract from *Erythrina mulungu* on anxiety-related responses in rats. *Biological Pharmaceutical Bulletin*, v. 26, n. 11, p. 1538-1542, 2003.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 4.ed. San Diego: Academic Press, 1998. 1v. (nao paginado).

PEARL, P. L.; DRILLINGS, J. M.; CONRY, J. A. Herbs in epilepsy: evidence for efficacy, toxicity, and interactions. *Seminars in Pediatric Neurology*, v. 18, n. 3, p. 203-208, 2011.

PEREIRA, M. G. A. G.; GITAIÁ, D. L. G.; PAÇÓ-LARSON, M. L.; PESQUERO, J. B.; GARCIA-CAIRASCO, N.; COSTA-NETO, C. M. Modulation of B1 and B2 kinin receptors expression levels in the hippocampus of rats after audiogenic kindling and with limbic recruitment, a model of temporal lobe epilepsy. *International Immunopharmacology*, v. 8, n. 2, p. 200-205, 2008.

PEREZ-MENDES, P.; BLANCO, M. M.; CALCAGNOTTO, M. E.; CININI, S. M.; BACHIEGA, J.; PAPOTI, D.; COVOLAN, L.; TANNUS, A.; MELLO, L. E. Modeling epileptogenesis and temporal lobe epilepsy in a non-human primate. *Epilepsy Research*, v. 96, n. 1, p. 45-57, 2011.

PERUCCA, E. An introduction to antiepileptic drugs. *Epilepsia*, v. 46, n. 4, p. 31-37, 2005.

RABINOVITZ, S.; MOSTOFKY, D. I.; YEHUDA, S. Anticonvulsant efficiency, behavioral performance and cortisol levels: a comparison of carbamazepine (CBZ) and a fatty acid compound (SR-3). *Psychoneuroendocrinology*, v. 29, n. 2, p. 113-124, 2004.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr Clinical Neurophysiology*, v. 32, n. 3, p. 281-294, 1972.

RAJ, D.; GULATI, S.; LODHA, R. Status epilepticus. *Indian Journal of Pediatrics*, v. 78, n. 2, p. 219-226, 2011.

RISBUD, R. M.; PORTER, B. E. Changes in microRNA expression in the whole hippocampus and hippocampal synaptoneurosomes fraction following pilocarpine induced status epilepticus. *PLoS One*, n. 8, v. 1, p. 1-16, 2013.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Plantas Mediciniais do Cerrado. Lavras: Editora da Universidade Federal de Lavras, 2001.

RODRIGUES, E.; TABACH, R.; GALDURÓZ, J. C. F.; NEGRI, G. Plants with possible anxiolytic and/or hypnotic effects indicated by three brazilian cultures - indians, afro-brazilians, and river-dwellers. *Studies in Natural Products Chemistry*, vol. 35, p. 549-595, 2008.

ROSA, D. S.; FAGGION, S. A.; GAVIN, A. S.; SOUZA, M. A.; FACHIM, H. A.; SANTOS, W. F.; PEREIRA, A. M. S.; CUNHA, A. O. S.; BELEBONI, R. O. Erysothrine, an alkaloid extracted from flowers of *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth: Evaluating its anticonvulsant and anxiolytic potential. *Epilepsy & Behavior*, n. 23, p. 205-212, 2012.

ROSSETTI, F.; RODRIGUES, M. C.; MARRONI, S. S.; FERNANDES, A.; FORESTI, M. L.; ROMCY-PEREIRA, R. N.; DE ARAÚJO, D. B.; GARCIA-CAIRASCO, N. Behavioral and EEG effects of GABAergic manipulation of the nigro-tectal pathway in the Wistar audiogenic rat (WAR) strain II: an EEG wavelet analysis and retrograde neuronal tracer approach. *Epilepsy Behaviour*, n. 24, v. 4, p. 391-398, 2012.

RUSSO, I.; BONINI, D.; LA VIA, L.; BARLATI, S.; BARBON, A. AMPA Receptor Properties are modulated in the Early Stages Following Pilocarpine-induced Status Epilepticus. *Neuromolecular Medicine*, n. 15, v. 2, p. 324-338, 2013.

SCIMEMI, A.; SCHORGE, S.; KULLMANN, D. M.; WALKER, M. C. Epileptogenesis Is Associated With Enhanced Glutamatergic Transmission in the Perforant Path. *Journal Neurophysiology*, v. 95, n. 2, p. 1213-1220, 2006.

SCORZA, F. A.; ARIDA, R. M.; CYSNEIROS, R. M.; SCORZA, C. A.; CAVALHEIRO, E. Estudo qualitativo da formação hipocampal de animais hipertensos com epilepsia. Arquivo Neuropsiquiatria, v. 63, n. 2-A, p. 283-288, 2005.

SCORZA, F. A.; ARIDA, R. M.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G.; SCERNI, D. A.; CALDERAZZO, L.; CAVALHEIRO, E. A. The pilocarpine model of epilepsy: what have we learned? Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 81, n. 3, p. 345-365, 2009.

SILVA, A. V.; CABRAL, F. R. Ictogênese, Epileptogênese e Mecanismo de Ação das Drogas na Profilaxia e Tratamento da Epilepsia. Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology, n. 14, v. 2, p. 39-45, 2008.

SOTO-HERNÁNDEZ, R. M.; GARCIA-MATEOS, R.; MIGUEL-CHÁVEZ, R. S.; KITE, G.; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M.; RAMOS-VALDIVIA, A. C. Erythrina, a Potential Source of Chemicals from the Neotropics. Bioactive Compounds in Phytomedicine, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/bioactive-compounds-in-phytomedicine/erythrina-a-potential-source-of-chemicals-from-the-neotropics>>. Acesso em 15 mar.2013.

TILELLI, C. Q.; VECCHIO, F. D.; FERNANDES, A.; GARCIA-CAIRASCO, N. Different types of status epilepticus lead to different levels of brain damage in rats. Epilepsy & Behavior, v. 7, n. 3, p. 401-410, 2005.

TURSKI, W. A. CAVALHEIRO, E. A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S. J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. Behavioural Brain Research, v. 9, n. 3, p. 315-335, 1983.

VASCONCELOS, S. M. M.; OLIVEIRA, G. R.; CARVALHO, M. M.; RODRIGUES, A. C. P.; SILVEIRA, E. R.; FONTELES, M. M. F.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Antinociceptive activities of the hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu* in mice. Biological Pharmaceutical Bulletin, v. 26, n. 7, p. 946-949, 2003.

VASCONCELOS, S. M. M.; LIMA, N. M.; SALES, G. T. M.; CUNHA, G. M. A.; AGUIAR, L. M. V.; SILVEIRA, E. R.; RODRIGUES, A. C. P.; MACEDO, D. S.; FONTELES, M. M. F.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Anticonvulsant activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu*. Journal of Ethnopharmacology, v. 110, n. 2, p. 271-274, 2007.

VILLETI, G.; BREGOLA, G.; BASSANI, F.; BERGAMASCHI, M.; RONDELLI, I.; PIETRA, C.; SIMONATO, M. Preclinical evaluation of CHF3381 as a novel antiepileptic agent. Neuropharmacology, v. 40, n. 7, p. 866-878, 2001.



WHO, 2012. Media centre. Epilepsy. Fact sheet, n. 999, oct. 2012 Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html>>. Acesso em 03 dez. 2012.

ZHANG, Y. WANG, W.; SUN, Z.; FENG, D.; DENG, Y.; LIU, Y.; ZHAO, G.; WANG, H.; HUANG, Y. Granulocyte colony-stimulating factor treatment prevents cognitive impairment following *status epilepticus* in rats. Biological Pharmaceutical Bulletin, v. 33, n. 4, p. 572-579, 2010.

## ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



---

Ribeirão Preto, 26 de agosto de 2011.

Prezado(a) Pesquisador (a) Renê de Oliveira Beleboni

Vimos por meio desta informar que o Comitê de Ética em Pesquisa para Seres Humanos da UNAERP – Universidade de Ribeirão Preto analisou e aprovou sem restrições o projeto intitulado “**Análise da atividade neuroquímica e neuroprotetora dos alcalóides Eritravina, 11 $\alpha$ -Hidroxi-Eritravina e seu análogo Erisotrina isolados do extrato de flores da planta Erythrina mulungu Mart ex Benth (Leguminosae-Papilionaceae) em ratos Wistar submetidos ao modelo de epileptogênese induzida pela pilocarpina**”, tendo como pesquisador(a) Renê de Oliveira Beleboni, em reunião ocorrida em 14 de Junho de 2011, registrado sobre o **ComÉt: 37/2011**.

Temos ciência que o estudo em questão será conduzido na Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP.

Solicitamos que o Senhor(a) encaminhe os relatórios parciais e finais, bem como envie-nos possíveis emendas e novos termos de consentimento livre e esclarecido, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido e novas informações sobre a segurança/toxicidade para que possamos fazer o devido acompanhamento deste estudo.

Atenciosamente,



**Profª Drª Luciana Rezende Alves de Oliveira**

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa para Seres Humanos  
Universidade de Ribeirão Preto

---

Av. Costábile Romano, 2201 - Bairro Ribeirânia - Ribeirão Preto - SP - CEP. 14096-900

Fone: (16) 3603-6779 – e-mail: [cetica@unaerp.br](mailto:cetica@unaerp.br)