

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

ERICA APARECIDA GELFUSO ROSSETE

Os alcaloides eritrínicos (+)-eritravina e (+)-11- α -hidroxieritravina: efeitos antiepiléptico, neuroprotetor e na preservação da memória/cognição em animais submetidos ao modelo de pilocarpina.

RIBEIRÃO PRETO
ESTADO DE SÃO PAULO

2017

ERICA APARECIDA GELFUSO ROSSETE

Os alcaloides eritrínicos (+)-eritravina e (+)-11- α -hidroxieritravina: efeitos antiepiléptico, neuroprotetor e na preservação da memória/cognição em animais submetidos ao modelo de pilocarpina.

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

Orientador: Prof. Dr. Renê Oliveira Belebani.

RIBEIRÃO PRETO
ESTADO DE SÃO PAULO

2017

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

- Universidade de Ribeirão Preto -

Rossete, Erica Aparecida Gelfuso, 1985 -.
R829a Os alcaloides eritrínicos (+)- eritravina e (+)-11- α -
hidroxieritravina: efeitos antiepiléptico, neuroprotetor e na preservação da
memória/cognição em animais submetidos ao modelo de pilocarpina.
Erica Aparecida Gelfuso Rossete. - - Ribeirão Preto, 2017.
113 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. Rene de Oliveira Belebani.

Tese (doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,
Biotecnologia aplicada a saúde. Ribeirão Preto, 2017.

1. *Erythrina verna*. 2. (+)-*eritravina*. 3. (+)-11- α -
hidroxieritravina. 4. Hipocampo. 5. Memória. 6. Modelo de
Pilocarpina. I. Título.

ÉRICA APARECIDA GELFUSO ROSSETE

OS ALCALOIDES ERITRÍNICOS (+)-ERITRAVINA E (+)-11-A-HIDROXIERITRAVINA: EFEITOS ANTIANTIÉPILÉTICO, NEUROPROTETOR E NA PRESERVAÇÃO DA MEMÓRIA/COGNIÇÃO EM ANIMAIS SUBMETIDOS AO MODELO DE PILOCARPINA

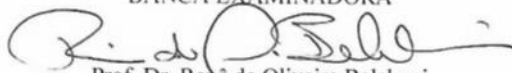
Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

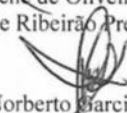
Data da defesa: 27 de abril de 2017

Resultado: Aprovada

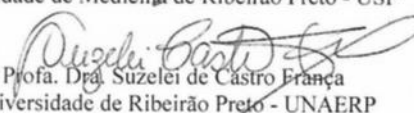
BANCA EXAMINADORA



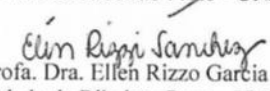
Prof. Dr. René de Oliveira Beleboni
Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP




Prof. Dr. Norberto Garcia Cairasco
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP



Profa. Dra. Suzelei de Castro França
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Profa. Dra. Ellen Rizzo Garcia
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Profa. Dra. Marina de Toledo Durand
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

RIBEIRÃO PRETO

2017

Dedico este trabalho
ao meu esposo Celso
aos meus pais Wilson e Cleide.

Obrigada pelo apoio infinito!

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e pelas pessoas que o Senhor colocou em meu caminho. Algumas delas me inspiram, me ajudam, me desafiam e me encorajam a ser cada dia melhor.

Ao meu esposo Celso que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem. Pela motivação, paciência e compreensão. Obrigada por nunca me deixar desistir!

Aos meus pais Cleide e Wilson pelo amor, dedicação e valores que me ensinaram.

Aos meus irmãos por estarem ao meu lado e suas inúmeras caronas.

Aos meus sogros Conceição e José Augusto pelo apoio e compreensão.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rene de Oliveira Belebony pela orientação, dedicação, amizade, liberdade de criação e oportunidades concedidas.

À Prof.^a Dr.^a Márcia Renata Mortari pela amizade, carinho, dedicação, ensinamentos desde minha graduação e por colaborar em mais este estudo.

Ao Prof. Dr. Jan Tytgat pela disponibilidade, orientação prestada, e oportunidade de aprendizado no Laboratório de Toxicologia e Farmacologia na KU Leuven.

Às Professoras Dr.^a Camila Fávero Oliveira e Dr.^a Fernanda Gonçalves Basso pelas discussões científicas e amizade.

Aos professores do programa de Pós-graduação em Biotecnologia que contribuíram para minha formação acadêmica e pessoal. Em especial às professoras Dr.^a Silvia Helena Taleb Contini e Dr.^a Suzelei de Castro França.

À Prof.^a Dr.^a Alexandra Olímpio Siqueira Cunha e ao Dr. Aldo de Albuquerque Cunha pela amizade e ensinamentos.

À minha amiga e técnica responsável no Laboratório de Patologia – UNAERP, Marilena Heredia por compartilhar suas experiências em histologia geral, nossas deliciosas conversas, cafezinhos e viagens ao longo do processo histológico.

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

Aos meus amigos Gustavo, Luzitano e Gabriel Mortari Ferreira por sempre estarem de portas abertas e me acolherem em seus lares, e especialmente ao Gabriel pela nossa amizade, pelas histórias antes de dormir e cantorias matinais.

Aos meus amigos de laboratório Suelen, Denise, Cássio, Bruno e Luis pelas discussões ao longo deste aprendizado e momentos de descontrações.

Aos meus amigos do Neuropharma Lab em Brasília, especialmente à Flavia e Andreia, pela maravilhosa estadia e aprendizado. Meu muito obrigada também à Giovana (Gigi) e ao Helam por me acolherem em seu lar.

Aos meus amigos Prof. Dr. Paulo Pinto, Iziara, Steven, Eline, Lien e, especialmente ao Diogo Galan, pelos ensinamentos e convívio durante a estadia em Leuven.

À Rosane França e funcionários da Universidade, em especial à Tabata, Joana, Patrícia, Marcela, Sara, Letícia, Nadia e Cleusa pelo auxílio em diversos assuntos.

À UNAERP, Capes e FAPESP pelo auxílio financeiro.

Aos animais pelo sacrifício.

O mal não é tão grande como parece; é agudo, porque os nervos são doentes delicados, e ao menor toque retraem-se e gemem. Eu sou desses enfermos, como sabe, e como sabe também, doente sem médico.

Machado de Assis, 1908

RESUMO

A Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) corresponde a 40% do diagnóstico médico das diferentes formas de epilepsia e se distingue como aquela na qual o tratamento convencional repercute em maior taxa de ineficácia. Não obstante, os efeitos colaterais severos provocados pelos fármacos utilizados no tratamento da ELT acarretam aos pacientes a impossibilidade parcial ou total para as atividades sociais comuns ou de trabalho. Inflorescências da planta *Erythrina verna* utilizada de modo caseiro e em preparações fitoterápicas industriais possuem propriedades sedativas, hipnóticas, analgésicas, anticonvulsivantes e ansiolíticas. Tais atividades têm sido atribuídas ao conjunto de alcaloides eritrínicos exibidos pela planta. Destes, se destacam a (+)-eritravina e a (+)-11 α -hidroxieritravina, ambos com atividade anticonvulsivante e ansiolítica. Muito embora a atividade anticonvulsivante dos referidos alcaloides tenha sido bastante estudada em modelos agudos de convulsão, pouco se sabe sobre suas ações em modelos que mimetizam a epilepsia de fato, tão bem como sobre seus prováveis efeitos neuroprotetores, na memória/cognição e ainda acerca de seus mecanismos de ação. Com efeito, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a atividade anticonvulsivante/antiepiléptica, o efeito na memória/aprendizado e o potencial efeito citoprotetor/neuroprotetor dos alcaloides de interesse por meio do modelo de pilocarpina, além de investigar a potencial ação destes alcaloides em diferentes isoformas de canais de sódio e potássio e de receptores colinérgicos nicotínicos através de estudos de eletrofisiologia (*voltage-clamp*). Os resultados obtidos mostraram que os alcaloides apresentam marcado efeito anticonvulsivante/antiepiléptico, uma vez que reduzem significativamente a incidência, a amplitude e a duração das crises generalizadas no modelo de pilocarpina via monitoramento vídeo-eletroencefalográfico. Os referidos alcaloides também apresentam efeito positivo e progressivo no desempenho de memória/cognição dos animais submetidos ao teste do Labirinto Aquático de Morris. Por meio de técnicas de histologia e de imunohistoquímica foi possível demonstrar que os alcaloides protegem neurônios contra a morte e evitam a gliose reativa nas áreas hipocâmpais CA1, CA3 e Giro Denteado, o que pode explicar, ao menos parcialmente, o efeito anticonvulsivante/antiepiléptico observado neste trabalho e, sobretudo, os efeitos positivos destes alcaloides para memória/cognição. O mecanismo de ação anticonvulsivante/antiepiléptico dos alcaloides no plano molecular não envolve ações nos principais canais de sódio ou potássio, conforme demonstrado nos resultados de eletrofisiologia. Ao investigar eletrofisiologicamente a ação dos alcaloides em receptores colinérgico-nicotínicos, foi possível observar que, diferente da (+)-11 α -hidroxieritravina, a (+)-eritravina apresenta modulação inibitória sobre diferentes isoformas destes receptores, especialmente as dos tipos $\alpha_4\beta_2$ e α_7 . Assim e sendo os alcaloides análogos naturais, é possível concluir que pequenas alterações de radicais químicos localizados no anel eritrínico promovem grande alterações na atividade farmacológica observada para tais ativos. Finalmente, a ação da (+)-eritravina em receptores nicotínicos, pode ao menos parcialmente, explicar sua ação ansiolítica já comprovada no passado, o que junto com os demais resultados demonstra a grande valia etnofarmacológica e biotecnológica do trabalho em questão.

Palavras-Chaves: ELT. *Erythrina verna*. (+)-eritravina. (+)-11- α -hidroxieritravina. Hipocampo. Memória. Modelo de Pilocarpina.

ABSTRACT

Temporal Lobe Epilepsy (TLE) accounts for 40% of the medical diagnosis of epilepsy and is distinguished as the one with the highest rate of treatment ineffectiveness. Nevertheless, the severe side effects caused by the drugs used in the treatment of TLE cause partial or total impossibility for common social or work activities. Flowerings of plant *Erythrina verna* are widely used in folk medicine thanks to their sedatives, hypnotics, analgesics, anticonvulsant and anxiolytic properties. Previous studies have attributed those properties to erythrinian alkaloids present in the plant. Among these, the presence (+)-erythravine and (+)-11 α -hydroxyerythravine is highlighted, both with attested anticonvulsant and anxiolytic properties. Although the anticonvulsant activity of these alkaloids has been extensively studied in acute seizure models, little is known about their actions in models that mimic epilepsy in fact, as well as on their likely neuroprotective effects on memory/cognition and even on their mechanisms of action. Thus, the present work aims to evaluate the anticonvulsant/antiepileptic action, the effect on memory/learning and the potential cytoprotective/neuroprotective effects of (+)-erythravine and (+)-11 α -hydroxyerythravine by use of the pilocarpine model, as well as to investigate the potential action of the alkaloids in nicotinic acetylcholine receptors and in voltage-dependent sodium and potassium ion channels by electrophysiology (voltage-clamp). The results evidenced that alkaloids have a marked anticonvulsive/antiepileptic effect, since they significantly reduce the incidence, amplitude and duration of generalized seizures in the pilocarpine model during the video-electroencephalographic monitoring. These alkaloids also have a positive and progressive effect on the memory / cognition performance of the animals submitted to the Morris Water Maze test. Through histological and immunohistochemical staining it has been possible to demonstrate that alkaloids protect neurons against death and avoid reactive gliosis in the hippocampal areas CA1, CA3 and DG, which may explain, at least partially, the anticonvulsant/antiepileptic effect observed here and also the positive effects of these alkaloids on memory/ cognition. The anticonvulsive/antiepileptic mechanism of action of alkaloids at the molecular level does not involve actions in the main sodium or potassium ion channels, as demonstrated in the electrophysiology results. By investigating electrophysiologically the action of alkaloids on cholinergic-nicotinic receptors, it was possible to observe that, different from the (+)-11 α -hydroxyerythravine, the (+)-erythravine showed inhibitory modulation on different isoforms of these receptors, especially the isoforms $\alpha_4\beta_2$ e α_7 . Thus, and being the natural analogous alkaloids, it is possible to conclude that small changes of chemical radicals located in the erythrin chemical ring promote large changes in the pharmacological activity observed for such compounds. Finally, the action of (+)-erythravine on nicotinic receptors can at least partially explain its anxiolytic action already proven, which together with the overall results demonstrates the great ethnopharmacological and biotechnological relevance of the present work.

Keywords: TLE. *Erythrina verna*. (+)-erythravine. (+)-11 α -hidroxierythravine. Hippocampus. Memory. Pilocarpine Model.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>Erythrina verna</i>	25
Figura 2 - Estrutura química dos alcaloides de interesse: (+)-eritravina e (+)-11 α -hidroxieritravina	26
Figura 3 - Foto da espécie <i>Xenopus laevis</i> (esquerda) e coleção de oócitos (direita)	32
Figura 4 – Microinjetor de cRNA	33
Figura 5 - Protocolo de pulso de voltagem utilizados para os registros da corrente de oócitos de <i>Xenopus laevis</i> conforme a isoforma de canal ou receptor estudado na presença ou ausência dos alcaloides de interesse.	36
Figura 6 - Implantação da cânula-guia no ventrículo lateral	37
Figura 7 - Representação esquemática do posicionamento dos eletrodos, da cânula-guia e do conector para os registros eletroencefalográficos.....	38
Figura 8 – Sistema de registros eletroencefalográficos	41
Figura 9 - Esquema do Labirinto Aquático de Morris.....	43
Figura 10 - Representação esquemática das áreas selecionadas para análise do dano neuronal	46
Figura 11 – Ensaio de citotoxicidade em oócitos nus para o alcaloide (+)-11 α -hidroxieritravina	52
Figura 12 - Ensaio de citotoxicidade em oócitos nus para o alcaloide (+)-eritravina	53
Figura 13 – Estudo da interação do alcaloide (+)-11 α -hidroxieritravina com as diferentes isoformas de canais de K ⁺ estudadas	54
Figura 14 – Estudo da interação do alcaloide (+)-11 α -hidroxieritravina com as diferentes isoformas de canais de Na ⁺ estudadas	55
Figura 15 – Estudo da interação do alcaloide (+)-eritravina com diferentes isoformas de canais de K ⁺ estudadas	56
Figura 16 – Estudo da interação do alcaloide (+)-eritravina com diferentes isoformas de canais de Na ⁺ estudadas.....	57
Figura 17 – Estudo da interação do alcaloide (+)-11 α -hidroxieritravina com as diferentes isoformas de receptores nicotínicos.....	58
Figura 18 - Estudo da interação do alcaloide (+)-eritravina com as diferentes isoformas de receptores nicotínicos	59
Figura 19 – Ensaio com diferentes concentrações do alcaloide (+)-eritravina em α_7	60
Figura 20 - Ensaio com diferentes concentrações do alcaloide (+)-eritravina em $\alpha_4\beta_2$	60
Figura 21 - Ensaio com diferentes concentrações do alcaloide (+)-eritravina em $\alpha_4\beta_4$	61
Figura 22 - Representação ilustrativa do perfil eletroencefalográfico de um animal sadio	66
Figura 23 - Representação ilustrativa do perfil eletroencefalográfico de um animal com crise generalizada	67

Figura 24 - Média das latências de escape para encontrar a plataforma durante os dias de treinamento	72
Figura 25 - Cortes histológicos representativos de porções hipocampais (Coloração HE).....	76
Figura 26 – Cortes histológicos representativos da região hipocampal CA1 (Coloração Nissl)	78
Figura 27 – Quantidade de perfis celulares viáveis na região hipocampal CA1	79
Figura 28 - Cortes histológicos representativos da região hipocampal CA3 (Coloração Nissl)	80
Figura 29 - Quantidade de perfis celulares viáveis na região hipocampal CA3.....	81
Figura 30 - Cortes histológicos representativos da região hipocampal HGD (Coloração Nissl)	82
Figura 31 - Quantidade de perfis celulares viáveis na região hipocampal HGD	83
Figura 32 - Cortes histológicos representativos da região hipocampal CA1 (Imunohistoquímica NeuN)	85
Figura 33 - Quantidade de perfis celulares da região hipocampal CA1 (Imunohistoquímica NeuN)	86
Figura 34 - Cortes histológicos representativos da região hipocampal CA3 (Imunohistoquímica NeuN)	87
Figura 35 - Quantidade de perfis celulares da região hipocampal CA3	88
Figura 36 - Cortes histológicos representativos da região hipocampal HGD (Imunohistoquímica NeuN)	89
Figura 37 - Quantidade de perfis celulares da região hipocampal HGD.....	90
Figura 38 - Cortes histológicos representativos da região da CA1 no hipocampo (Imunohistoquímica GFAP)	91
Figura 39 - Distribuição de glia através da intensidade da cor cinza na região da CA1 (Imunohistoquímica GFAP)	92
Figura 40 - Cortes histológicos representativos da região da CA3 no hipocampo (Imunohistoquímica GFAP)	93
Figura 41 - Distribuição de glia através da intensidade da cor cinza na região da CA3 (Imunohistoquímica GFAP)	94
Figura 42 - Cortes histológicos representativos da região do HGD no hipocampo (Imunohistoquímica GFAP).....	95
Figura 43 - Distribuição de glia através da intensidade da cor cinza na região do HGD (Imunohistoquímica GFAP)	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Canais estudados por meio de voltage-clamp na presença e ausência dos alcaloides de interesse	34
Tabela 2 - Medidas de referência para o implante dos eletrodos corticais.....	39
Tabela 3 - Critérios comportamentais para classificação das crises límbicas.	39
Tabela 4 - Relação entre os eletrodos, os pinos conectores e os canais de registro do sistema de eletroencefalografia	41
Tabela 5 - Protocolo de treinamento dos animais no Labirinto Aquático de Morris	44
Tabela 6 - Concentração efetiva do alcaloide (+)-eritavina para inibição de 50% em diferentes isoformas de receptores nicotínicos.....	61
Tabela 7 - Média do tempo nos quadrantes durante o probe trial	73

LISTA DE ABREVIATURAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
[^3H]	Triciado
ANOVA	Análise de variância
Ca^{++}	Íon cálcio
Cl^-	Íon cloreto
cm	Centímetro
-COOH	Grupo funcional ácido carboxílico
CA	Corno de Ammon
cRNA	ácido ribonucleico complementar
DAB	Cromógeno líquido diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EEG	Eletroencefalográfico
<i>E. verna</i>	<i>Erythrina verna</i>
ELT	Epilepsia do Lobo Temporal
EUA	Estados Unidos da América
g	Gramma
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GABA _A	Receptor de GABA do tipo A
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
HE	Hematoxilina-Eosina
HEPES	Solução tampão ácido ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-2-etanosulfonico
HGD	<i>Hilus</i> do Giro Denteado
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitoneal
i.c.v.	Intracerebroventricular
ILAE	International League Against Epilepsy
K^+	Íon potássio
KCl	Cloreto de potássio

K _v	Canal para potássio voltagem dependente
L	Litro
LAM	Labirinto Aquático de Morris
LTP	Long-Term Potentiation
M	Molar
ml	Mililitro
ms	Milissegundo
mV	Milivolt
Na ⁺	Íon sódio
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina
NaOH	Hidróxido de sódio
Na _v	canal para sódio voltagem dependente
ND-96	Solução de Ringer
NEUN	Neuronal specific nuclear protein
-NH ₂	Grupo funcional amino
nM	Nanomolar
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
-O	Grupo funcional éter
-OH	Grupo funcional hidroxila
P.A.	Pureza analítica ou alto grau de pureza
PBS	Solução tampão fosfato de sódio
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
RNA	Ácido ribonucleico
-SH	Grupo funcional sulfidrilo
SE	<i>Status Epilepticus</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
SUS	Sistema Único de Saúde
UNAERP	Universidade de Ribeirão Preto
α	Letra grega alfa
β	Letra grega beta
χ ²	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 EPILEPSIA - CONSIDERAÇÕES GERAIS	19
1.2 A EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL.....	21
1.3 A PLANTA <i>Erythrina verna</i> , OS ALCALOIDES ERITRÍNICOS E A ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE.....	24
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	31
3.1 OBTENÇÕES DOS ALCALOIDES DE INTERESSE	31
3.2 FÁRMACOS E REAGENTES	31
3.3 ENSAIOS <i>IN VITRO</i>	32
3.3.1 Eletrofisiologia (“voltage-clamp”)	32
3.3.1.1 Obtenção dos oócitos e expressão dos diferentes canais iônicos (Na ⁺ e K ⁺) ou receptores de acetilcolina.....	32
3.3.1.2 Medidas eletrofisiológicas	34
3.3.1.3 Protocolo de Pulsos de Voltagem.....	35
3.4 RATOS	36
3.5 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA	37
3.6 BIOENSAIOS	39
3.6.1 Indução ao <i>Status Epilepticus</i> (SE)	39
3.6.2 Avaliação dos Padrões Epileptiformes por Vídeo-Eletroencefalografia (Video-EEG) ..	40
3.6.3 Tratamento Subcrônico dos Animais para Realização do Teste Labirinto Aquático de Morris e Ensaio de Histologia/Imunohistoquímica	42
3.6.4 Teste do Labirinto Aquático de Morris (Navegação Espacial)	42
3.6.5 Preparo de Material para Histoquímica e Imunohistoquímica	44

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 ELETROFISIOLOGIA	50
4.2 <i>STATUS EPILEPTICUS</i>	63
4.3 ELETROENCEFALOGRAFIA	66
4.4 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS	68
4.5 ENSAIOS HISTOLOGICOS	74
4.5.1 Histologia com coloração hematoxilina-eosina.....	75
4.5.2 Histologia com coloração de Nissl	77
4.5.3 Imunohistoquímica com anticorpo NeuN	83
4.5.4 Imunohistoquímica com anticorpo GFAP	90
4.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	97
5 CONCLUSÃO.....	99
REFERÊNCIAS	102
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	113

INTRODUÇÃO



Vincent van Gogh, 1889

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPILEPSIA - CONSIDERAÇÕES GERAIS

A epilepsia é descrita como uma desordem neurológica crônica evidenciada por crises epiléticas repetidas de natureza autossustentada e não provocada, sendo as crises resultantes da hiperexcitabilidade de neurônios em áreas cerebrais determinantes no processo de epileptogênese/manutenção das crises (ILAE, 2010; FISHER et al., 2014). A ocorrência da excitação anormal e sincronizada pode ser iniciada por neurônios que estão localizados em uma região específica do córtex cerebral ou outras regiões subcorticais de um único hemisfério ou de maneira difusa em ambos hemisférios cerebrais conjuntamente (FURTADO et al., 2011; REDDY e KURUBA, 2013).

Esta desordem neurológica complexa acomete entre 45 e 100 milhões de pessoas no mundo e deste montante, aproximadamente 80% dos casos diagnosticados são provenientes de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (FONG e FONG, 2001; WOLF, 2003; WHO, 2012; FURTADO et al., 2011; REDDY e KURUBA, 2013; YACUBIAN et al., 2014). Em que pese subnotificações ou notificações errôneas, no Brasil, a estimativa atual de indivíduos portadores dos mais diferentes tipos de epilepsia é de 3 milhões de habitantes, segundo a Liga Brasileira de Epilepsia (NORONHA et al., 2007).

Grande parte destas pessoas estão sem o tratamento adequado, muitas vezes em decorrência do desconhecimento e do estigma frequentemente relacionados à síndrome, tão bem como em decorrência das dificuldades técnicas inerentes a terapêutica *per se*. Neste último caso, a manifestação de efeitos colaterais mais severos e ineficácia farmacológica podem repercutir em baixa adesão terapêutica além de outras problemáticas importantes (FERNANDES et al., 2008; GOMES, 2011).

Com relação à epileptogênese e manutenção recorrente e progressiva das crises, modelos animais e estudos envolvendo dados obtidos de pacientes com epilepsia demonstraram que as mesmas estão relacionadas com eventos celulares e moleculares bastante variados. Estes eventos envolvem alterações na circuitaria cerebral, alterações na expressão de genes, alterações morfológicas de células e sinapses, alterações bioquímicas em receptores/transportadores ou canais iônicos e na concentração de diferentes neurotransmissores (NAVIDHAMIDI, GHASEMI e MEHRANFARD, 2017). Além disso, estão envolvidas a neurogênese irregular, além de um desequilíbrio entre as contrapartes excitatórias e inibitórias do Sistema Nervoso Central (SNC), mormente determinadas pelos

neurotransmissores glutamato e GABA, respectivamente (MORTARI et al., 2007; FISHER et al., 2014).

Estas alterações isoladamente e/ou em conjunto podem culminar em extensa morte neuronal, que uma vez ocorrida em áreas específicas do encéfalo, como no hipocampo, iniciam um quadro permanente e progressivo de lesão que leva a autosustentação e recorrência das crises. Estas últimas variam entre si nos mais variados quadros nosológicos e tipos de epilepsia e, por consequência, nas manifestações clínicas associadas (BIALER e WHITE, 2010; ROSSI et al., 2013; FISHER et al., 2014).

Do ponto de vista mais puramente neuroquímico, é de conhecimento bastante progresso que o desenvolvimento da atividade epileptiforme assim como a manutenção deste evento, estão relacionados com o desequilíbrio no balanço funcional e temporal de neurotransmissores inibitórios e excitatórios, como dito anteriormente.

Este desequilíbrio pode ser resultante de canalopatias em que são perdidas as corretas modulações/regulações bioquímicas, sobretudo, de canais voltagem-dependentes para sódio, potássio e cálcio (NAVIDHAMIDI, GHASEMI e MEHRANFARD, 2017). As alterações nas funções destes canais, associadas ou não com outras alterações de eventos sinápticos como a liberação/receptação, repercutem direta ou indiretamente no aumento da transmissão Glutamatérgica e/ou atenuação da transmissão GABAérgica, que por suas vezes, desequilibram o balanço entre ações excitatórias e inibitórias em áreas específicas do encéfalo, levando, pois, ao estabelecimento de diferentes quadros e tipos de epilepsias (MORTARI et al., 2007; NAVIDHAMIDI, GHASEMI e MEHRANFARD, 2017).

Obviamente e, muito embora bastante importante e aceita, a explicação exclusiva dos diferentes tipos de epilepsias com base ou entendimento residente apenas nas alterações das neurotransmissões de GABA e glutamato é simplista e limitada. Neste contexto e para explicação mais satisfatória, devem ser agrupados a etiologia/manutenção da desordem uma gama bem mais variada de sistemas neurotransmissores e eventos sinápticos diversos ocorrentes a curto, médio e longo termo e em diferentes áreas do cérebro (MORTARI et al., 2007; BRIGGS e GALANOPOULOU, 2011).

Do ponto de vista mais causal e prático, na grande parcela dos casos, a origem das crises epilépticas e, pois, das epilepsias, está ligada a insultos cerebrais de diferentes tipos, como tumores, quadros febris descontrolados na primeira infância, uso de drogas, acidente vascular cerebral, traumas ou infecções. Isto posto, é compreensível as diferentes formas de epilepsia manifestarem-se em pacientes de ambos os sexos, atingirem diferentes faixas etárias e distintos segmentos sócio-étnicos, levando a prejuízos de ordens pessoais e sociais aos indivíduos que

delas padecem (BORGES et al., 2010; BIALER E WHITE, 2010; FISHER et al., 2014). Além disso, as epilepsias implicam em prejuízos econômicos variados para diversos países, na medida em que o tratamento atual é ineficiente e oneroso, e boa parcela dos pacientes são da base economicamente ativa da população, repercutindo em alto absenteísmo e/ou inoperância/limitações para variados tipos de trabalho (BIALER e WHITE, 2010; BORGES et al., 2010).

Assim sendo e considerado o escopo das informações acima descritas, é natural compreender as epilepsias como problemas de saúde pública no Brasil e no mundo, carecendo de mais investigações para o seu mais completo entendimento e providências para um tratamento mais seguro e eficaz.

1.2 A EPILEPSIA DO LOBO TEMPORAL

Dentre as diferentes formas de epilepsia a Epilepsia do Lobo Temporal (ELT) é o tipo com maior parcela diagnóstica em adultos, correspondendo em até 40% dos casos clinicamente identificados (ANDRADE-VALENÇA et al., 2006). A ELT em humanos é caracterizada por extensa esclerose hipocampal e numerosas crises recorrentes e espontâneas, sendo esta forma de epilepsia de difícil tratamento, uma vez que é comumente refratária aos medicamentos anticonvulsivantes convencionais (MAZZUFERI et al., 2012; DI MAIO et al., 2015).

Duas hipóteses são mais amplamente reconhecidas quanto ao início, manutenção e progressão das crises epiléticas na ELT. Uma delas correlaciona a difusão das fibras musgosas pelo hipocampo, que são excitatórias. Estas fibras agem sobre sítios sinápticos hipocampais resultando em um ciclo/circuito auto-excitatório recorrente (ANDRADE-VALENÇA et al., 2006; GUEDES et al., 2006). A segunda hipótese considera a morte das células musgosas, na qual resulta em diminuição dos estímulos excitatórios para o cesto dormente (células gabaérgicas de caráter inibitório), resultando em perda da inibição dos sistemas de neurotransmissão com consequente desequilíbrio em favor da excitação generalizada do SNC. Ambas as hipóteses envolvem a consideração de alterações no equilíbrio excitatório e inibitório do SNC, mais particularmente determinado pelos neurotransmissores GABA e glutamato, como apresentado anteriormente (ANDRADE-VALENÇA et al., 2006; GUEDES et al., 2006).

Atualmente é conhecido que na ELT ocorrem descargas elétricas provenientes de estruturas límbicas, preferencialmente do córtex entorrinal, através da via perfurante para o hipocampo, subiculum, amígdala e demais estruturas límbicas (PEDROSO, 2005; TOYODA, 2013; FURMAN, 2013). Além disso, sabe-se que a ELT é responsável por mudanças estruturais

generalizadas nas redes neurais do hipocampo e do Lobo Temporal Mesial (FERNANDES, 2008). O desenvolvimento desta síndrome geralmente é caracterizado por três etapas. A primeira é marcada por um insulto inicial, muitas vezes ocorrido na infância. A segunda etapa é caracterizada por um período de latência com reorganizações e plasticidade neuronais/gliais. Já a terceira é considerada a fase crônica da epilepsia, na qual geralmente as crises são recorrentes (FAURE et al., 2013; GILLING et al., 2013).

Com relação ao tratamento da ELT, este ainda é considerado muito difícil. Os antiepilépticos utilizados atualmente no controle das crises parciais recorrentes são ineficazes para cerca de 30-40% dos casos, mesmo quando usados em sistemática de associação/politerapia (PARINEJAD et al., 2009). Além disso, estes medicamentos, especialmente quando em associação, causam diversos efeitos colaterais, sobretudo em escala crônica, como sedação, dependência, prejuízo cognitivo, letargia e teratogênese, podendo prejudicar a segurança e continuidade do tratamento (JALLON, 1997; MELDRUM, 1997; VILLETTI et al., 2001).

Ainda que prejudicados pela eficácia relativa, dentre os fármacos mais comumente utilizados no tratamento da ELT e mesmo outros tipos de epilepsias estão o fenobarbital (95%), a carbamazepina (93%), a fenitoína (86%) e o ácido valpróico (87%). Considerando apenas o fenobarbital, a carbamazepina e a fenitoína, a despesa terapêutica mensal de cada paciente estimada ainda na década 90 e no Brasil, era de US\$ 10, US\$ 40 e US\$ 20, respectivamente para cada um dos fármacos citados (JALLON, 1997; DUA et al., 2006).

No contexto da toxicologia e mais caracterizadamente para alguns dos fármacos, o fenobarbital pode causar depressão e hipotensão grave, o ácido valpróico induz alterações hormonais significativas, ganho de peso e teratogenicidade. A fenitoína apresenta dose efetiva muito próxima ao limite da toxicidade, revelando, pois, baixo índice terapêutico (D'AVILA et al., 2011; RAJ et al., 2011).

No intuito de melhorar a qualidade de vida dos pacientes acometidos pela ELT, no século XX novos fármacos foram desenvolvidos, caracterizados como os da nova geração. Alguns deles são a lamotrigina, topiramato, gabapentina, pregabalina, felbamato, lacosamida e levetiracetam. Tais fármacos apresentam menos efeitos colaterais quando comparados aos de primeira geração, ainda muito utilizados em associações multiterapêuticas. Apesar do crescente uso, mesmo os fármacos de nova geração ainda apresentam inconvenientes apresentados pelos mais antigos e apresentam falha de eficácia para 20-30% dos casos (DALKARA e KARAKURT, 2012; LOPES et al., 2013).

Assim e considerando o impacto médico e econômico da ELT, associados as perdas pessoais e sociais causadas pela síndrome, bem como a ineficácia e toxicidade relativa do tratamento atual, é natural ponderar que novas opções terapêuticas, mais seguras e eficientes, se fazem urgentes (DALKARA e KARAKURT, 2012; LOPES et al., 2013).

No estudo de novas possibilidades terapêuticas para a ELT, o uso de modelos animais crônicos é importante para um quadro mais abrangente de estudo. Os modelos que utilizam um agente iniciador químico no intuito de produzir o SE são deverás relevantes. Estes são caracterizados por promoverem crises epilêpticas recorrentes através da indução de convulsões contínuas e duradouras, resultando no surgimento das crises espontâneas e recorrentes, de caráter permanente e progressivo (LEITE e CAVALHEIRO, 1995; PEREZ-MENDES et al., 2011).

Dentre as alterações observadas no hipocampo de animais submetidos aos modelos crônicos de epilepsia, seja por indução química ou elétrica, estão a esclerose hipocampal, sendo que esta envolve perda neuronal nas regiões do *Hilus* do Giro Denteado, CA1 e CA3 (visualizada através de métodos de colorações histológicas e imunohistoquímicas) (PITKÄNEN e SUTULA, 2002; ARAUJO et al., 2014). É possível observar também a neurogênese aumentada, que por sua vez promove a manutenção da excitabilidade das células piramidais da CA3, o que pode ser checado através de estudos eletrofisiológicos. Além disso, aparecerem o “*sprouting*” axonal das células granulares (sendo que estas podem liberar zinco e serem visualizadas através do método de coloração conhecido como neo-timm) e a proliferação das células gliais (gliose reativa), também visualizada através de métodos imunohistoquímicos (PITKÄNEN e SUTULA, 2002; ARAUJO et al., 2014).

Um dos modelos que se enquadram adequadamente para o estudo da ELT é o modelo de *Status Epilepticus* (SE). Os modelos de SE são caracterizados como uma condição na qual as crises epilêpticas ocorrem repetidamente ou ininterruptamente, sem recuperação e, por um período mínimo de 30 minutos. Isto leva o animal a um estado crônico de crises, geralmente associado à perda de células neurais com degeneração da região hipocampal, particularmente no *Hilus* do Giro Denteado (HDG) e nas regiões CA1 e CA3, gliose reativa e brotamento de fibras musgosas (CURIA et al., 2008; CASTRO et al., 2011). Sendo assim, vários estudos descrevem alterações morfológicas no hipocampo de animais submetidos ao SE, assim como isso é verdadeiro para autópsias *post mortem* de pacientes com ELT (CUNHA et al., 2009; DO NASCIMENTO et al., 2012).

Dentre os diversos modelos, o modelo de SE que utiliza o agente colinérgico pilocarpina desenvolvido por Turski e colaboradores (Modelo de Pilocarpina) é bastante fidedigno com o

que acontece em humanos, tanto do ponto de vistas das alterações moleculares, celulares e estruturais do hipocampo, quanto quando consideradas as manifestações clínicas/crises decorrentes da esclerose hipocampal (TURSKI et al., 1983). Isto tem tornado o modelo vantajoso e importante no revelar de novos fármacos antiepilépticos, especialmente quando utilizado em estudos para o tratamento das epilepsias refratárias (LEITE et al., 2002; CAVARSAN et al., 2013).

Para o entendimento da ELT, descoberta e compreensão do mecanismo de ação de antiepilépticos mais potentes e seguros, é ainda imprescindível a utilização de modelos animais, como o da pilocarpina (LOSCHER, 2002; WHITE et al., 2006; LOSCHER et al., 2013). De fato, amostras humanas provenientes de atos cirúrgicos são de difícil obtenção, de difícil preservação, além de permitirem representação apenas dos estágios mais tardios do quadro epiléptico. Diferente disso, modelos animais, como o da pilocarpina, permitem analisar alterações celulares e moleculares tão logo seja causado um insulto transiente no cérebro em estudo, na presença ou ausência de novos fármacos em teste (LUKASIUK e PITKANEN, 2012; GOLDBERG e COULTER, 2013; CENDES et al., 2014).

Finalmente e, considerando, a fisiopatologia e todos os detalhes morfofuncionais da ELT, é natural admitir que novas investigações caracterizadas por diferentes arranjos de técnicas nas ordens molecular, celular e comportamental, como proposto neste trabalho, sejam de valia: a) no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas; b) para que se possa mais entender as bases neuromoleculares da ELT e, c) para o melhor entender do próprio modelo da pilocarpina. De fato, o entendimento mais aprofundado de modelos animais pode resgatar conhecimentos acerca de estudos do passado, estimular novas ideias e abordagens experimentais, bem como permitir um melhor aprimoramento dos mesmos, aumentando o alcance das descobertas futuras relacionadas a ELT, por exemplo (MARTÍN e POZO, 2006; KOVACS e HEINEMANN, 2014).

1.3 A PLANTA *Erythrina verna*, OS ALCALOIDES ERITRÍNICOS E A ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE

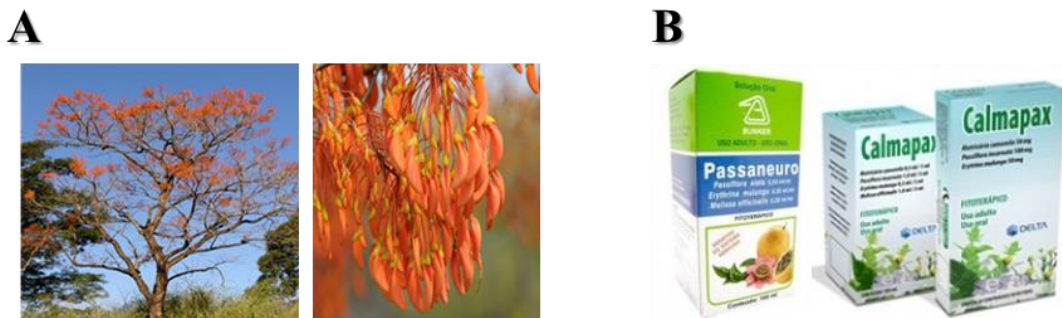
A investigação de produtos farmacológicos provenientes de plantas para utilização como fonte de fármacos ou fitoterápicos para diversas doenças e síndromes é extensa. Até a década de 1990, 80% de todos medicamentos novos disponíveis no mercado apresentaram como princípio ativo compostos obtidos a partir de raízes, caules, frutos, sementes e folhas de variadas espécies vegetais (MCCHESENEY et al., 2007). 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/anticonvulsivante comprovada, cuja receita anual gerada somente pela venda nos EUA é de U\$ 16,6 milhões, segundo dados de 2011 (PEARL et al., 2011).

O Brasil que é detentor de 22% - por volta de 55 mil espécies - de toda biodiversidade mundial, exuberando no bioma do Cerrado a planta *Erythrina verna*, anteriormente classificada como *Erythrina mulungu* (Mart. ex Benth.) (Equisetopsida C. Agardh – Fabaceae Lindl) (Figura 1A) (LORENZI e MATOS, 2008; VALLI et al., 2013; CARVALHO et al., 2014).

Conhecida popularmente como “capa-homem”, “amansa-senhor”, “mulungu”, dentre outros nomes, esta planta é utilizada na prática caseira/popular e em preparações fitoterápicas industriais (Passaneuro®-Bunker e Calmapax®-Figura 1B) devido às suas propriedades calmante, antidepressiva, ansiolítica, anticonvulsivante, sedativa, hipotensora e hepatoprotetora, estando algumas destas atividades farmacológicas validadas por diferentes modelos e arranjos experimentais (DURIGAN et al., 2004; LORENZI e MATOS, 2008; RODRIGUES et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2012). Vale lembrar e, dada a sua importância etnofarmacológica, que a espécie *E. verna* encontra-se catalogada na lista do RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS) desde 2009 (PORTAL SAÚDE-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Figura 1 - *Erythrina verna*



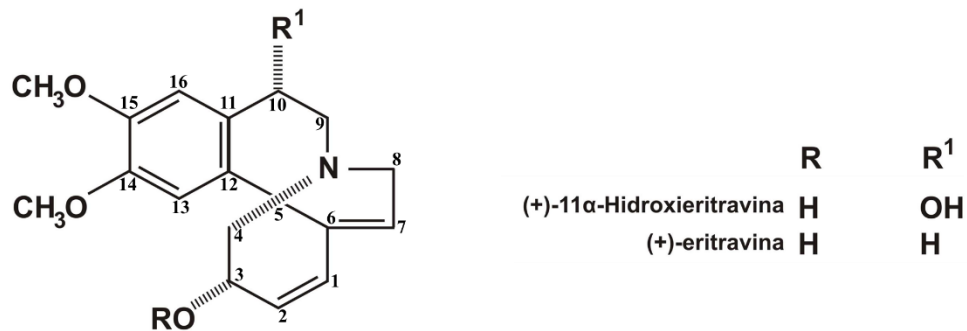
Fonte: Figura A: Arquivo da Prof^a. Dr^a Ana Maria Soares Pereira. Figura B: www.mundodosuplemento.com.br

A atividade anticonvulsivante do extrato hidroalcoólico das flores da *E. verna* foi relatada por meio dos estudos de Vasconcelos e colaboradores, que após a administração intraperitoneal na dose de 400mg/kg verificaram o aumento da latência para início de crises convulsivas induzidas por estriçnina (VASCONCELOS et al., 2007). Anteriormente, estudos com o mesmo tipo de extrato evidenciaram seu efeito ansiolítico em tratamentos agudo e crônico nos modelos animais de labirinto em cruz elevado, transição claro/escuro e odor do

gato, pelo uso da via oral em doses ativas que variaram do 50 mg/kg até 400 mg/Kg (ONUSIC et al., 2002; 2003).

Os estudos de Flausino e colaboradores, autores do isolamento e da identificação estrutural dos alcaloides (+)-eritravina e (+)-11 α -hidroxieritravina (Figura 2), apontaram um conjunto natural de alcaloides eritrínicos análogos entre si como sendo os responsáveis pela atividade ansiolítica apresentada pelas inflorescências da planta *E. verna* (FLAUSINO et al., 2007a). Além dos alcaloides (+)-eritravina e (+)-11 α -hidroxieritravina, são também ansiolíticos em modelos animais e presentes nas inflorescências os alcaloides eritartina e (+)- α -hidroxierisotrina (FLAUSINO et al., 2007b).

Figura 2 - Estrutura química dos alcaloides de interesse: (+)-eritravina e (+)-11 α -hidroxieritravina



Fonte: modificado de Flausino et al (2007b).

Com base na hipótese fundamentada pela neurobiologia da ansiedade/epilepsia e prática terapêutica destas desordens, em que se assume, que normalmente fármacos/ativos que sejam ansiolíticos, em geral, sejam também anticonvulsivantes, nosso grupo de pesquisa vem avaliando as atividades anticonvulsivantes de diferentes alcaloides eritrínicos desde o final da década passada.

De fato, a atividade anticonvulsivante dos alcaloides (+)-eritravina, (+)-11 α -hidroxieritravina, eritartina e erisotrina, foi plenamente demonstrada frente a crises tônico-clônicas generalizadas induzidas por diferentes convulsivantes (bicuculina, PTZ, ácido caínico e NMDA), utilizando-se a via intracerebroventricular (i.c.v.) em ratos Wistar. Nestes modelos agudos de convulsão, os alcaloides protegem os animais em diferentes magnitudes diminuindo a incidência e duração das crises e ao mesmo tempo diminuem as chances dos animais evoluírem para morte e aumentam a latência para as crises, quando ainda ocorrentes (FAGGION et al., 2011; ROSA et al., 2012; DOS REIS, 2015).

Dado interessante e também apresentado pelo nosso grupo foi o de que a erisotrina diferentemente dos demais alcaloides estudados, ((+)-eritravina, (+)-11 α -hidroxieritravina e eritartina) apresentou apenas a atividade anticonvulsivante, mas não aquela ansiolítica determinada pelos testes de labirinto em cruz, campo aberto e teste claro-escuro (ROSA et al., 2012). Considerando cada alcaloide como um análogo estrutural natural um do outro, isso significa que pequenas alterações estruturais no conjunto de radicais químicos no derredor do núcleo eritrínico apresentado na Figura 2 podem causar diferentes efeitos farmacológicos (ROSA et al., 2012).

Assim, os trabalhos de nosso grupo de pesquisa e de outros tem trazido informações químico-farmacêuticas (relação estrutura-atividade) de relevância, o que é importante no desenvolvimento moderno de novos fármacos (FLAUSINO et al., 2007b; FAGGION et al., 2011; ROSA et al., 2012). Além disso, os alcaloides em estudo se mostram como entidades atraentes dos pontos de vista toxicológico, farmacodinâmico e farmacocinético, o que justifica o continuado esforço de investigação.

De fato e conforme demonstrado por diferentes experimentos, os alcaloides eritrínicos, incluindo a (+)-eritravina e a (+)-11 α -hidroxieritravina, são capazes de atravessar a barreira trato-gastrointestinal e hematoencefálica. São relativamente bem tolerados pelos animais, o que mostra relativa segurança de uso, além de demonstrarem 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).

Apesar dos esforços e avanços alcançados até o momento, muito ainda precisa ser investigado para que um conhecimento mais pronunciado dos alcaloides eritrínicos e, pois, do emprego etnofarmacológico da planta *E. verna*, tome maior robustez. Assim e por exemplo, é natural esperar que o uso de um modelo crônico de epilepsia para o estudo 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, tão bem como promover 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.

OBJETIVOS



Vincent van Gogh, 1889

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anticonvulsivante, o efeito na memória/aprendizado e o potencial efeito citoprotetor/neuroprotetor dos alcaloides de interesse por meio do uso de um modelo animal crônico de epilepsia. Ademais, investigar os efeitos destes alcaloides em diferentes isoformas de canais de sódio e potássio e em diferentes isoformas de receptores colinérgicos nicotínicos através de estudos de eletrofisiologia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

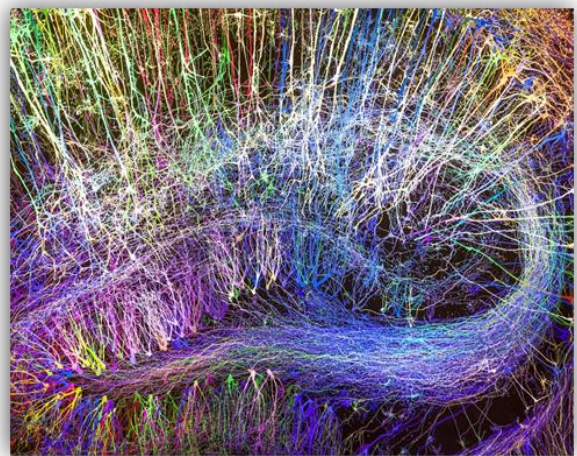
- ♦ Investigar a potencial atividade moduladora dos alcaloides (+)-eritravina e (+)-11 α -hidroxieritravina em diferentes isoformas de canais iônicos de sódio e potássio e em diferentes isoformas de receptores colinérgicos nicotínicos usando da técnica de “Voltage-Clamp”.

- ♦ Verificar o efeito anticonvulsivante/antiepiléptico dos alcaloides (+)-eritravina e (+)-11 α -hidroxieritravina durante a fase silenciosa da epileptogênese através do monitoramento por vídeo-eletroencefalografia utilizando o modelo de pilocarpina;

- ♦ Avaliar a memória espacial em animais submetidos ao SE durante a fase latente da ELT na presença e ausência de diferentes doses dos alcaloides (+)-eritravina, (+)-11 α -hidroxieritravina e comparar ao desempenho dos fármacos comerciais carbamazepina, diazepam, cetamina e fenitoína;

- ♦ Quantificar o dano neural e a gliose reativa causados à formação hipocampal nas regiões CA1, CA3 e HGD na presença e ausência de diferentes doses dos alcaloides eritrínicos e comparar ao desempenho dos fármacos comerciais carbamazepina, diazepam, cetamina e fenitoína;

METODOLOGIA



Greg Dunn & Brian Edwards, 2014

3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 OBTENÇÕES DOS ALCALOIDES DE INTERESSE

Durante a estação de inverno as flores de *E. verna* foram coletadas na região de Rifaina (SP) e os dados da coleta foram georeferenciados (GPS - Sistema de Posicionamento Global): latitude 20°07'41,7''; longitude 47°28'54,5''; 1037 metros. A coleta de material vegetal para obtenção dos alcaloides respeitou a legislação brasileira vigente, estando disposta a autorização do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético – CGE sob número de registro: 02001.005109/2011-10. Ramos floridos foram herborizados de acordo com as normas usuais do procedimento, e depositados no Herbário de Plantas Medicinais da UNAERP sob número de registro HPMU – 1330.

Os processos cromatográficos para isolamento dos alcaloides foram conduzidos segundo a metodologia descrita por Flausino e colaboradores, sendo realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais (Unidade de Biotecnologia-UNAERP) pela Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria Soares Pereira (FLAUSINO et al., 2007b). Depois do devido isolamento, a identidade química e pureza dos alcaloides foram confirmadas por ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas, de acordo com o procedimento regular de nossa Unidade na obtenção de ativos farmacológicos de diferentes tipos.

3.2 FÁRMACOS E REAGENTES

Dentre os consumíveis de maior relevância, adquiriu-se brometo de metil escopolamina (Sigma Aldrich), carbamazepina (Tegretol[®] - Novartis Biociências), carbonato de sódio (Sigma Chemical, EUA), cetamina (Ketalar[®] – Agner), cloridrato de lidocaína (Xylestesin[®] - Cristália), cloridrato de oxitetraciclina (Terramicina[®] - Pfizer), diazepam (Germed), fenitoína (Hidantal[®] - Hoechst Marion Roussel), hidrocloreto de pilocarpina (Sigma Aldrich), mesilato de tricaína (Sigma Chemical, EUA), sulfato de gentamicina (Sigma Chemical, EUA), tiopental sódico (Tiopentax[®] - Cristália), teofilina (Sigma Chemical, EUA), xilazina (Hertape Calier), solução cristal violeta (Imbralab), anticorpos primários: Anti-NeuN (Abcam) e Anti-GFAP (Abcam) e Polímero Histofine HRP (Nichirei).

3.3 ENSAIOS *IN VITRO*

3.3.1 Eletrofisiologia (“voltage-clamp”)

Os ensaios de eletrofisiologia foram realizados por meio da técnica de *voltage-clamp* com dois eletrodos e oócitos da espécie *Xenopus laevis* (Figura 3). Tais experimentos estiveram sob supervisão do Prof. Dr. Jan Tytgat no Laboratório de Toxicologia da Katholieke Universiteit Leuven (KU Leuven – Bélgica) durante o período de doutorado sanduíche (06 meses).

Figura 3 - Foto da espécie *Xenopus laevis* (esquerda) e coleção de oócitos (direita)



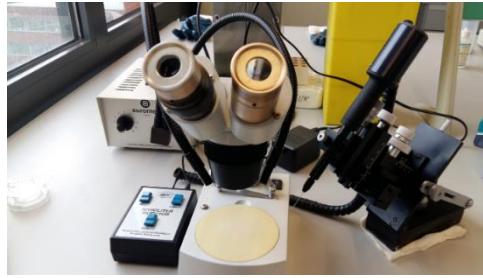
Fonte: Arquivo pessoal.

3.3.1.1 Obtenção dos oócitos e expressão dos diferentes canais iônicos (Na^+ e K^+) ou receptores de acetilcolina

Para obtenção dos oócitos, rãs foram submersas em uma solução contendo mesilato de tricaína e carbonato de sódio (1 g/L) permanecendo submersas por 15 minutos. Após sua completa sedação, realizou-se a cirurgia de ovariectomia parcial sendo os oócitos imersos em uma solução de solução ND-96 livre de cálcio contendo colagenase (1,5 mg/mL) pelo período de 2 horas a 15°C.

Em seguida, os oócitos que se encontravam nos estágios V e VI da maturação foram selecionados/coletados. Oócitos foram injetados com cRNA correspondente à isoforma do canal iônico ou receptor escolhido pelo uso do microinjetor (*Drummond Scientific*, EUA) e através de ponteiros de vidro de 1,14 milímetros de diâmetro estiradas em um estirador manual da WPI (Word Precision Instruments®) (Figura 4).

Figura 4 – Microinjetor de cRNA



Fonte: Arquivo pessoal.

Os cRNAs utilizados foram obtidos por meio da transcrição e síntese em plasmídios linearizados sendo para tanto utilizado o kit de transcrição T7 ou SP6 (mMESSAGE mMACHINE, Ambion®, EUA). Após a injeção de cada cRNA de escolha, os oócitos foram incubados em solução ND-96 contendo: 5,61 g de NaCl, 0,149 g de KCl, 0,265 g de CaCl₂.2H₂O, 0,203 g de MgCl₂.6H₂O e 1,191 g de HEPES para 1L de água Milli-Q (pH 7,5 ajustado com NaOH), suplementada com 50 mg/L de sulfato de gentamicina.

Na Tabela 1 estão apresentadas as isoformas dos canais de sódio ou potássio e das isoformas dos receptores nicotínicos de acetilcolina estudados, assim como o volume injetado de cRNA (faixa de concentração de 300-500ng/μl) e o tempo necessário para a expressão proteica. Especificamente e para os oócitos injetados com cRNA das isoformas do canal de sódio adicionou-se à solução descrita anteriormente 90 mg/L de teofilina.

Tabela 1 - Canais estudados por meio de voltage-clamp na presença e ausência dos alcaloides de interesse

Isoforma do canal	cRNA (300-500ng/ μ l)	Tempo para expressão
Na _v 1.2	20 – 50 nl	2 – 3 dias
Na _v 1.3	30 nl	2 – 3 dias
Na _v 1.4	30 nl	2 – 3 dias
Na _v 1.6	20 nl	2 – 3 dias
K _v 1.1	20 nl	1 dia
K _v 1.2	20 nl	1 dia
K _v 1.4	20 nl	1 dia
K _v 4.2	50 nl	2 dias
K _v 11.1 - hERG	50 nl	1-2 dias
nAChR $\alpha_1\beta_1\delta\gamma$	70 nl	1 dia
nAChR $\alpha_1\beta_1\delta\epsilon$	70 nl	1 dia
nAChR α_7	50 nl	1-2 dias
nAChR $\alpha_3\beta_4$	70 nl	3-4 dias
nAChR $\alpha_4\beta_2$	70 nl	3-4 dias
nAChR $\alpha_4\beta_4$	70 nl	3-4 dias

3.3.1.2 Medidas eletrofisiológicas

As micropipetas utilizadas foram produzidas através de capilares de vidro de 1,2 milímetros de diâmetro (borossilicato WPI 1B120-6) e estiradas em um estirador manual da WPI (Word Precision Instruments®). Estas foram preenchidas com KCl 3M e apresentavam resistência entre 0,6 a 2,0 M Ω . A solução de banho e perfusão utilizada foi a ND-96 pH 7,4 ajustado com hidróxido de sódio.

Para os ensaios, inicialmente foi utilizada a concentração final de 10 μ M para cada um dos alcaloides previamente diluídos em ND-96. Essa concentração foi adicionada na câmara contendo o oócito e imediatamente homogeneizada. Em caso de ação na isoforma para o canal ou receptor testado, foram realizadas novas medidas com concentrações adicionais e seriadas de 1 μ M e 100 nM, sendo todos os experimentos realizados em triplicata.

Com relação aos dados, estes foram obtidos através de um amplificador GeneClamp 500 (Axon Instruments®, USA) conectado a um computador munido com sistema Windows XP (Microsoft®, USA) e *softwares* Complex 10.4 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, WA, EUA, 2010) e OriginPro 9.0 (OriginLab Corp.,

Northampton, MA, EUA, 2012). Todos os dados foram obtidos em uma sala com temperatura controlada de 18 °C a 22°C.

3.3.1.3 Protocolo de Pulsos de Voltagem

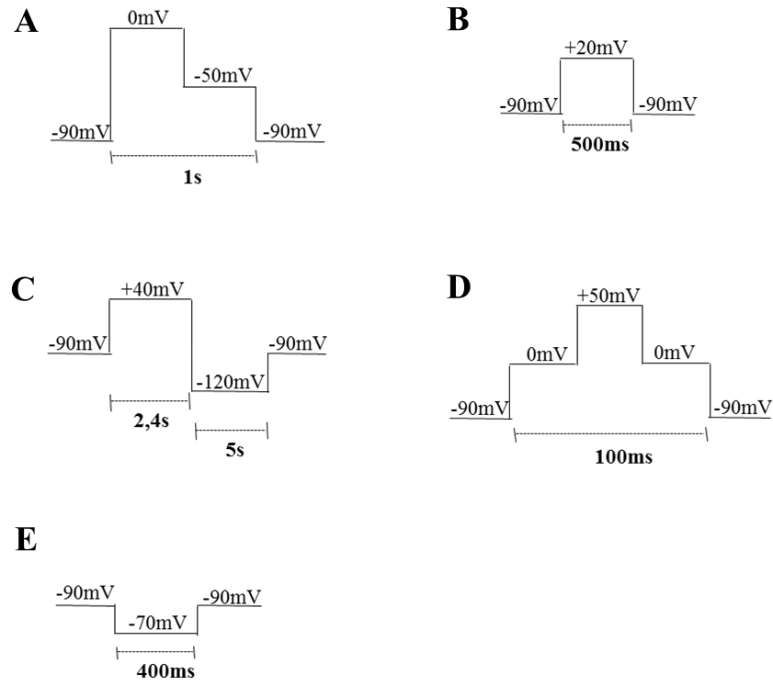
Os protocolos de pulsos de voltagem utilizados para os registros das correntes variaram de acordo com o canal ou receptor e suas respectivas isoformas analisadas. Com relação aos canais de potássio, nas isoformas K_v 1.1, K_v 1.2 e K_v 1.4 os potenciais de membrana dos oócitos foram mantidos a -90 mV, despolarizados durante 500 milissegundos (ms) para 0 mV, seguidos de uma repolarização para -50 mV com duração de 500 ms e, posteriormente, retornados para o potencial de -90 mV (Figura 5A).

Os oócitos que expressavam a isoforma K_v 4.2, foram despolarizados a +20 mV durante 500 ms e, em seguida, repolarizados a -90 mV (Figura 5B). Para a isoforma do canal hERG (K_v 11.1), utilizou-se o protocolo no qual as membranas dos oócitos eram mantidas a -90 mV, posteriormente despolarizadas para +40 mV, repolarizadas para -120 mV e novamente mantidas a -90 mV com duração total de 7,4 segundos (Figura 5C).

Com relação aos canais para sódio, o protocolo utilizado para todas as isoformas consistiu em inicialmente manter os oócitos a um potencial de -90 mV, despolarizando para 0 mV, mantidos em uma voltagem de +50 mV e, posteriormente, mantidos a 0 mV, perdurando por 100 ms todo o processo descrito (Figura 5D).

Para todas as isoformas dos receptores colinérgicos (nAChRs - Nicotínicos) o protocolo utilizado consistiu em partir do potencial de -90 mV para -70 mV durante 400 segundos e novamente retornar para -90 mV (Figura 5E), sendo o receptor ativado pela adição de 300 μ M de acetilcolina no meio celular.

Figura 5 - Protocolo de pulso de voltagem utilizados para os registros da corrente de oócitos de *Xenopus laevis* conforme a isoforma de canal ou receptor estudado na presença ou ausência dos alcaloides de interesse.



Protocolo de pulsos, sendo A para as isoformas K_v 1.1 a K_v 1.4; B – para a isoforma K_v 4.2; C – para a isoforma K_v 11.1 - hERG; D – para as isoformas de Na_v 1.1 a Na_v 1.6; E – para as isoformas nAChRs.

3.4 RATOS

Todos os procedimentos experimentais 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 (SBNEC), evitando o sofrimento e o sacrifício desnecessários de animais. Sob título de sua forma de projeto, este trabalho obteve a aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade de Ribeirão Preto sob o número de registro 02/2014 (Anexo A).

Provenientes da empresa Anilab (Paulínia-SP) os ratos Wistar pesando entre 200 e 220g foram acondicionados em gaiolas a cada cinco animais e mantidos no biotério de manutenção da Universidade de Ribeirão Preto, com água e alimentação *ad libitum*, ciclo claro/escuro de 12/12 horas, temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade (55%) controladas.

3.5 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

3.5.1 Procedimento Cirúrgico para Implantação de Cânula-Guia para a Administração i.c.v. dos Alcaloides de Interesse

Os ratos (n=6, por grupo) foram anestesiados com cloridrato de cetamina 10% em associação com xilazina nas doses 60 mg/kg e 8 mg/kg, respectivamente (via intraperitoneal - i.p.). Posteriormente, estes animais foram posicionados em um dispositivo estereotáxico (Insight[®]) e aplicou-se cloridrato de lidocaína 2% via subcutânea para efeito de anestesia local.

Em seguida, prosseguiu-se 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 a partir da superfície do crânio (0,9 mm posterior ao Bregma; 1,6 mm lateral à linha mediana e 3,4 mm dorsoventral) (PAXINOS e WATSON, 1998).

Uma segunda perfuração, paralelamente à primeira, foi realizada 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 (Figura 6). Posteriormente à cirurgia, os animais receberam preventivamente o antibiótico cloridrato de oxitetraciclina (Terramicina[®]) na dose 10 mg/kg via intramuscular de modo a permitir a mais completa e pronta recuperação dos mesmos.

Figura 6 - Implantação da cânula-guia no ventrículo lateral



Fonte: Arquivo pessoal. Implantação da cânula/parafuso e cobertura da região exposta com resina acrílica.

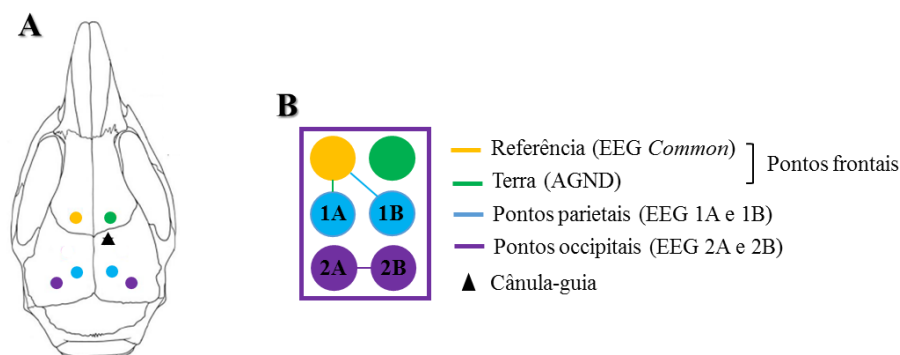
3.5.2 Procedimento Cirúrgico para Implantação dos Eletrodos para Video-EEG

Os experimentos realizados desde às cirurgias para implante dos eletrodos até os ensaios de monitoramento eletroencefalográfico (EEG) se deram no Laboratório de Neurofarmacologia da Universidade de Brasília (UnB) com auxílio da Ms. Flávia Maria Medeiros Gomes e supervisão da Prof^a. Dr^a. Márcia Renata Mortari.

Assim sendo, os animais foram submetidos aos mesmos procedimentos para implantação da cânula-guia descritos acima (item 3.5.1) seguido da implantação dos eletrodos. Pares de três eletrodos, formados por parafusos estéreis com fios condutores de 5 cm, foram implantados nos córtices cerebrais. Em seguida, os fios dos parafusos foram acoplados a um conector fixado acima do crânio do animal com resina acrílica.

As coordenadas de inserção dos eletrodos foram denominadas de pontos frontais, parietais e occipitais e a representação esquemática para seu posicionamento juntamente com o padrão de configuração do conector estão representados na Figura 7. Os pontos frontais são aqueles posicionados no córtex motor primário onde o eletrodo localizado no hemisfério esquerdo foi denominado como referência (*Shared/EEG Common*). O eletrodo do hemisfério direito foi denominado eletrodo terra (AGND). Este último eletrodo presta na minimização de ruídos externos e perturbações de diferentes ordens causadas pela movimentação do animal. Os pontos parietais foram inseridos um em cada hemisfério no córtex somatossensorial e os pontos occipitais localizados um por hemisfério no córtex visual primário. Todas as medidas de referência estão descritas na Tabela 2.

Figura 7 - Representação esquemática do posicionamento dos eletrodos, da cânula-guia e do conector para os registros eletroencefalográficos



(A) Superfície dorsal do crânio de um rato com os locais de implante dos eletrodos e da cânula-guia indicados. (B) Padrão de configuração do conector acoplado ao sistema de registros eletroencefalográficos.

Tabela 2 - Medidas de referência para o implante dos eletrodos corticais

	Dorsoventral	Mesolateral	Anteroposterior
Frontais	-	± 1,5mm	+ 1mm
Parietais	-	± 2mm	- 1mm
Occipitais		± 3mm	- 3mm

Coordenadas descritas por Paxinos e Watson (1998) a partir da superfície do crânio, utilizando-se como ponto de início o Bregma.

3.6 BIOENSAIOS

3.6.1 Indução ao *Status Epilepticus* (SE)

Após a recuperação da cirurgia estereotáxica e recuperação dos animais (5 dias), foi administrado brometo de metil escopolamina em salina estéril (1 mg/kg; via i.p.) para inibir a ação colinérgica da pilocarpina em nível periférico. Após 30 minutos estes animais receberam hidrocloreto de pilocarpina também em salina estéril (320 mg/kg; via i.p.) 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 (25 mg/kg). Para critério de definição do SE, utilizou-se a tabela de classificação de crises límbicas segundo Racine (RACINE, 1972) (Tabela 3), 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 o SE dentro do período de 3 horas.

Tabela 3 - 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, 1972.

3.6.2 Avaliação dos Padrões Epileptiformes por Vídeo-Eletroencefalografia (Video-EEG)

3.6.2.1 Registros eletroencefalográficos

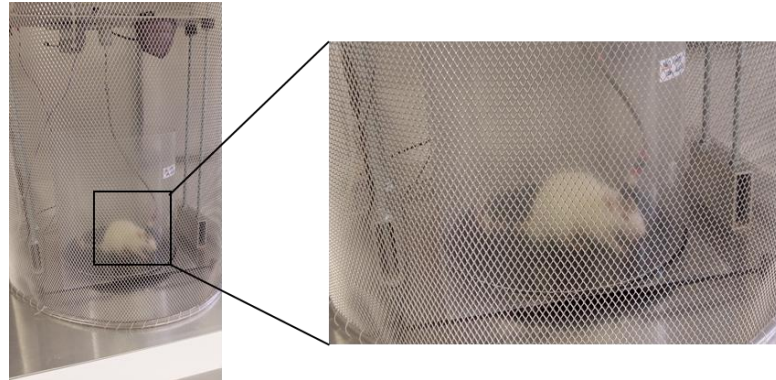
Antes da indução do SE, cada animal controle ou experimental foi submetido a um monitoramento basal por 30 minutos através de um sistema de registros por vídeo-eletroencefalografia (*Pinnacle Technologies*, EUA).

Posteriormente à indução ao SE, os animais foram divididos em grupos ($n=4$) cujo os tratamentos se seguem 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de (+)-eritrovina, 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de (+)-11 α -hidroxieritrovina ou salina, via i.c.v., por um período/esquemática de tratamento similar aos experimentos realizados quando do Labirinto Aquático de Morris. Após 10 dias da indução ao SE os animais foram monitorados durante o período de 5 dias consecutivos por 60 minutos/dia através de registros Video-EEG.

O registro eletroencefalográfico foi adquirido através de um conector associado a um cabo blindado (8413-M, *Pinnacle Technologies*, EUA) que por sua vez é conectado a um comutador elétrico (Swivel 8408, *Pinnacle Technologies*, EUA) capaz de manter o contato elétrico mesmo quando o animal efetue giros de 360°, garantindo, pois, a liberdade de movimentos e a confiabilidade dos resultados.

Os sinais foram amplificados 100 vezes e filtrados no conector com três canais (8406-SE4, *Pinnacle Technologies*, EUA) na cabeça do animal garantindo a entrega de dados livres de artefatos em uma taxa de amostragem para cada canal de 200-200 Hz. O sistema de acondicionamento e aquisição de dados 8401-HS amplificou novamente e filtrou tais dados antes da entrega do pacote de registros ao *software Sirenia*[®] (*Pinnacle Technologies*, EUA).

Além disso, foi desenvolvida e utilizada uma gaiola Faraday, devidamente posicionada no derredor do sistema de cabos onde cada animal permaneceu acoplado no intuito de bloquear ruídos eletromagnéticos externos (principalmente aqueles de frequência de 60 Hz). Isto minimiza interferências diversas na aquisição/compilação dos dados (Figura 8).

Figura 8 – Sistema de registros eletroencefalográficos

Fonte: Arquivo pessoal. Gaiola de Faraday desenvolvida pela Profª Drª Márcia Renata Mortari

O conector da cabeça de cada animal foi acoplado ao cabo cuidadosamente, e em seguida o *software* disponibilizou os dados dos três canais de aquisição. O registro de cada canal do eletroencefalograma foi realizado por meio da diferença entre dois eletrodos (derivação). Portanto, os canais 1 e 2 apresentam as derivações dos pinos EEG1A e EEG1B conectados ao eletrodo parietal esquerdo e direito da montagem do referencial e o pino EEG *Common* conectado ao eletrodo de referência. O canal 3 é resultante da derivação dos lados direito e esquerdo da montagem bipolar (Tabela 4).

Tabela 4 - Relação entre os eletrodos, os pinos conectores e os canais de registro do sistema de eletroencefalografia

Ponto do eletrodo	Pino do conector	Canal
Parietal direito	EEG 1A	1
Parietal esquerdo	EEG 1B	2
Occipitais direito e esquerdo	EEG 2A e 2B	3

Na busca por realçar ou eliminar atividades de frequências mais altas foi utilizado um filtro de alta frequência sem que o mesmo afetasse a atividade de frequências mais baixas (de 10 Hz). Da mesma forma, utilizou-se um filtro de baixa frequência no intuito de eliminar atividades de frequências mais baixas sem afetar as frequências mais altas (de 500 Hz).

Para análise do padrão epileptiforme desconsiderou-se os primeiros 300 segundos de registro, período onde frequentemente os animais se encontram mais agitados em decorrência da manipulação recente executada pelo experimentador. Durante o período experimental, considerou-se como crise epiléptica a ocorrência de um padrão ictal sincronizado com ondas de amplitude dez vezes maior do que aquelas observadas na monitoração basal. Desta forma, contabilizou-se a quantidade e o tempo das crises, se a crise era de origem focal ou generalizada

e sua região de origem, além da análise descritiva do perfil das crises indicando o provável aumento de amplitude e frequência das crises.

Um grupo extra de animais tratados com salina, mas sem a indução do SE ($n=4$) foram usados como prova ou padrão paralelo de atividade cerebral normal.

3.6.3 Tratamento Subcrônico dos Animais para Realização do Teste Labirinto Aquático de Morris e Ensaio de Histologia/Imunohistoquímica

Após 1 hora da administração do tiopental sódico, os animais foram divididos em grupos independentes ($n=6$). Cada grupo recebeu um dos seguintes tratamentos dispostos abaixo após 1, 25, 49 e 73 horas, completando o quadro válido e subcrônico de tratamento de 04 dias, após a atenuação do SE: 1) Grupo controle negativo SE – salina (0,9%, via i.c.v.), 2) Grupo SE + carbamazepina (120 mg/kg, via i.p.) (CAPELLA e LEMOS, 2002), 3) Grupo SE + cetamina (60 mg/kg, via i.p.) (BORRIS et al., 2000), 4) Grupo SE + diazepam (2 mg/kg, via i.p.) (CUNHA et al., 2009), 5) Grupo SE + fenitoína (60 mg/kg, via i.p.) (CUNHA et al., 2009), 6) Grupo SE + (+)-eritavina (concentrações independentes: 1 μg , 2 μg ou 3 μg em 1 μL , administradas via intracerebroventricular (i.c.v.)), 7) Grupo SE + (+)-11 α -hidroxieritavina (concentrações independentes: 1 μg , 2 μg ou 3 μg em 1 μL , administradas via i.c.v.). As doses escolhidas dos alcaloides em teste foram aquelas que apresentaram efeitos anticonvulsivantes quando avaliadas anteriormente em ratos submetidos aos modelos agudos de indução química de crises (FAGGION et al., 2011).

Além destes grupos, outros três grupos de animais também receberam tratamentos diários e ao longo de quatro dias, entretanto, estes animais não foram submetidos à indução de SE. Destes, um grupo de animais foi tratado com salina, via i.c.v, denominado “Sadio”, o segundo grupo tratado com 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ via i.c.v. do alcaloide (+)-eritavina e o terceiro grupo foi o de animais tratados com 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ via i.c.v. de (+)-11 α -hidroxieritavina.

A razão do volume de cada microinjeção/velocidade via i.c.v. foi de 1 $\mu\text{L}/\text{minuto}$, sendo a administração realizada através de um sistema de injeção manual por meio de uma seringa Hamilton (10 μL) conectada a um tubo de polietileno (PE-10). Para cada injeção via i.p. o volume utilizado foi de 0,2 mL através do uso de uma seringa insulínica comum (1 mL).

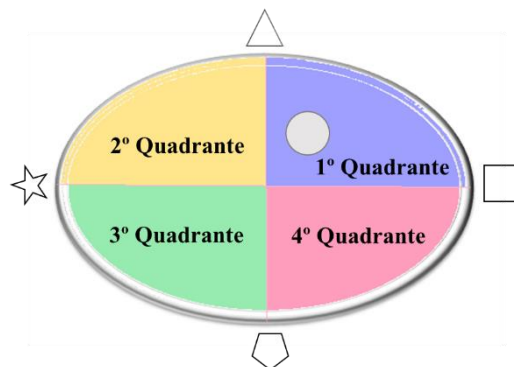
3.6.4 Teste do Labirinto Aquático de Morris (Navegação Espacial)

Sete dias após a indução do SE, todos os animais dos grupos citados no subitem anterior, Grupo SE + salina, Grupo SE + carbamazepina, Grupo SE + cetamina, Grupo SE + diazepam,

Grupo SE + fenitoína, Grupo SE + (+)-eritavina (Grupos independentes: 1 µg; 2 µg; 3 µg/µL, i.c.v), Grupo SE + (+)-11α-hidroxieritavina (Grupos independentes: 1 µg; 2 µg; 3 µg/µL, i.c.v), Grupo sadio + salina, Grupo (+)-eritavina sem indução ao SE e Grupo (+)-11α-hidroxieritavina sem indução ao SE foram submetidos aos experimentos do Labirinto Aquático de Morris descrito por Morris e coautores (MORRIS et al., 1972).

O teste baseou-se no uso de uma piscina circular em polietileno (115 cm de diâmetro e 47 cm de profundidade) contendo água (23°C) até uma altura de 30 cm. Neste reservatório foram adicionados 2 L de leite de modo a turvar a água e impedir que os animais visualizassem a plataforma branca de 13 cm de diâmetro e 30 cm de altura devidamente posicionada no assoalho da piscina. A plataforma permaneceu localizada no quadrante da região sudeste denominado como 1º quadrante. Referências/Pistas visuais foram dispostas nas áreas externas e laterais do labirinto aquático como forma de auxílio para aprendizagem da correta localização da plataforma. (Figura 9).

Figura 9 - Esquema do Labirinto Aquático de Morris



Piscina circular dividida em quadrantes, com a plataforma no primeiro quadrante (círculo branco) e pistas visuais nas paredes da sala (representados por triângulo, quadrado, losango e estrela).

O experimento consistiu em realizar seis treinos por dia, por quatro dias consecutivos, sendo registradas as latências de escape de cada animal até a plataforma. Os animais foram colocados em posições diferentes nas laterais da piscina para cada sessão de treino (Tabela 5), de costas para a plataforma e deixados livres por 90 segundos, ou até o encontro da mesma. Após este período, cada animal foi colocado e mantido na plataforma por 30 segundos e, em seguida, foi novamente colocado na água, na posição subsequente. Ao final das seis tentativas, o animal foi retirado da piscina, limpo e colocado em ambiente aquecido (30°C).

Tabela 5 - Protocolo de treinamento dos animais no Labirinto Aquático de Morris

Ordem das Tentativas						
Dias	1º	2º	3º	4º	5º	6º
1	2	4	3	4	2	3
2	4	2	3	4	2	3
3	4	3	2	4	3	2
4	3	2	4	2	3	4

Número do quadrante do labirinto para o posicionamento dos animais de acordo com cada tentativa.

No quarto dia, ao final do treino, a plataforma foi retirada da água para realização do *probe trial*. Este teste consiste em verificar a ocupação do labirinto e determinar o tempo gasto em cada quadrante por cada animal na ausência da plataforma em um total de 90 segundos. Para tanto, os percursos dos animais foram traçados manualmente.

3.6.5 Preparo de Material para Histoquímica e Imunohistoquímica

Após o término do teste do Labirinto Aquático de Morris, conforme descrito acima, os animais de diferentes grupos foram sacrificados em câmara de gás carbônico e submetidos a uma perfusão por via intra-cardíaca (ventrículo esquerdo) de solução Tampão Millonig 0,12M (25 mL), seguida de solução sulfeto de sódio 0,1% (50 mL), glutaraldeído 3% (100 mL) e solução sulfeto de sódio 0,1% (200 mL). A seguir, os cérebros foram removidos e fixados em solução de formol tamponado 4% por 15 horas.

Os procedimentos que envolveram o preparo do material até a confecção das lâminas foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica na UNAERP, contando com colaboração da Técnica Responsável do Laboratório Marilena Heredia.

Brevemente, os cérebros coletados foram submetidos a uma bateria de desidratação (banhos sucessivos em álcool etílico em diluições decrescentes até o álcool absoluto), a uma diafanização (três banhos com xilol + álcool absoluto, seguido de três banhos em xilol puro) e aos banhos de parafina (sendo dois deles a temperatura de 58°C) para inclusão do material em blocos de parafina. Em seguida, os cérebros foram emblocados e os cortes realizados em um micrótomo. Foram confeccionadas 8 lâminas com 2 secções dos hipocampus por lâmina para cada indivíduo dos diferentes grupos controles e experimentais. Os cortes histológicos referentes às colorações Hematoxilina-Eosina (HE) e Nissl apresentaram 5 µm de espessura,

enquanto que os cortes destinados aos ensaios de imunohistoquímica a espessura média de 3 μm .

A silanização das lâminas para o procedimento de imunohistoquímica foi realizada segundo o protocolo a seguir: Um total de quatrocentas lâminas foram deixadas submersas em extran P.A. por 24 horas. Posteriormente as mesmas foram lavadas uma a uma em água corrente por três vezes e uma quarta vez em água destilada, após o que, deixadas em molho novamente. Em seguida, cada uma destas lâminas foi seca por meio de flanelas limpas. Depois foram colocadas em caixas de vidro e banhadas em uma solução de silano 2% com acetona P.A. e em três recipientes contendo água destilada seguidamente. Finalmente, as lâminas foram acondicionadas em estufa por 12 horas a 37-42°C para observação/avaliação posterior.

3.6.5.1 Histoquímica de Hematoxilina-Eosina (HE)

Para coloração com Hematoxilina-Eosina as lâminas foram submetidas aos banhos sequenciais em xilol I, II e III, permanecendo em cada um deles por 10 minutos. Em seguida, foram hidratadas gradativamente permanecendo no álcool absoluto I, II, 90%, 80%, 70% e 50% por 2 minutos em cada e por 5 minutos em água destilada.

Após esta bateria, as lâminas permaneceram submersas em hematoxilina por 7 minutos, posteriormente em água por 10 minutos e, em seguida, banhadas no álcool 80% e na solução de eosina por 60 segundos. Depois as lâminas foram desidratadas passando rapidamente por álcool 80%, 90%, 95%, absoluto I e II, álcool + xilol, e por 5 minutos nas soluções xilol I, II e III. Finalmente, as lâminas foram cobertas com Entellan.

A contagem do número de “grids” para a dispersão/organização das células hipocâmpais hilares e a densidade da camada granular (*stratum granulosum*), de acordo com a estimativa por área de superfície, foi realizada utilizando-se o valor da área por ponto de 65 pixels². Isso corresponde a um diâmetro de 12,08 μm utilizando imagens de tamanho 2048 x 1536 pixels com uma objetiva de 40x de aumento avaliadas sempre por um único avaliador e sem identificação do grupo correspondente à cada lâmina analisada (WEIBEL et al., 1966).

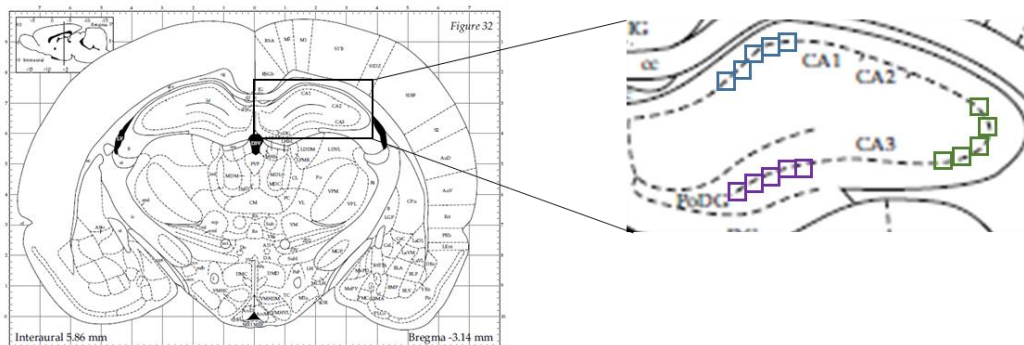
3.6.5.2 Histoquímica de Nissl – Coloração por Cristal Violeta

As lâminas submetidas à coloração por cristal-violeta foram submersas em xilol I, II e III permanecendo em cada solução pelo tempo de 10 minutos. Em seguida foram hidratadas gradativamente, permanecendo no álcool absoluto I, II, álcool 90%, 80%, 70% e 50% por 2 minutos em cada e por 5 minutos em água destilada.

Subsequentemente, as lâminas permaneceram submersas em corante cristal-violeta por 20 minutos, sendo então lavadas em água destilada e submetidas ao mesmo tratamento de desidratação e finalização citados na coloração de HE. Selecionou-se para contagem dos perfis de células: imagens de tamanho 2048 x 1536 pixels utilizando uma objetiva de 400x, sendo fotografados 5 campos subsequentes para cada região hipocampal estudada.

O número estimado de perfis de células foi determinado manualmente, sempre por um único avaliador sem identificação do grupo correspondente à cada lâmina, e pela média dos valores obtidos da área de superfície dos campos selecionados. Para a seleção dos campos buscou-se, por meio do contato visual, padronizar o início das fotografias (Figura 10). Do ponto de vista quantitativo, realizou-se a contagem diferencial das células neuronais viáveis das camadas piramidais da CA1 e CA3 e da camada granulosa do giro denteado constantes dos diferentes grupos controles e experimentais.

Figura 10 - Representação esquemática das áreas selecionadas para análise do dano neuronal



Fonte: Modificada do Atlas Estereotáxico de Paxinos e Watson, 1998. O extrato piramidal de CA1 está delimitado pelos quadrados azuis, CA3 pelos verdes e a camada de células do HGD está no quadrado roxo.

3.6.5.3 Imunohistoquímica de NeuN e GFAP

Brevemente, as proteínas NeuN (Proteína Nuclear Específica de Neurônios) e GFAP (Proteína Glial Fibrilar Ácida) são marcadores bioquímicos respectivamente de neurônios e de células gliais. Assim, o primeiro marcador está relacionado com a quantificação neuronal, enquanto o segundo com a gliose reativa que aumenta nas áreas de esclerose hipocampal.

O procedimento adotado para coloração por imunohistoquímica foi o mesmo para ambos anticorpos (Contra NeuN e contra GFAP). Os cortes hipocampais de animais controles e experimentais foram desparafinados e hidratados de acordo com o seguinte protocolo: as lâminas foram submersas em xilol I, II e III permanecendo em cada banho por 10 minutos. Em

seguida, os cortes foram hidratados gradativamente permanecendo no álcool absoluto e álcool 95% por 2 minutos em cada um deles e em água destilada por 5 minutos.

Posteriormente à hidratação dos cortes, foi realizada a recuperação antigênica em tampão citrato (pH 6) por 30 minutos a 95°C. Novamente as lâminas foram mergulhadas em soluções de álcool 95%, 70% e 50% e os cortes foram lavados com água destilada seguida de lavagem com tampão PBS por 5 minutos cada.

Após tal procedimento realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena (H₂O₂ 3% v/v) por 30 minutos. Após esta etapa, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário anti-NeuN com diluição de 1/500 ou anti-GFAP com diluição de 1/5000 (ambos anticorpos policlonais de coelho) e mantidas *overnight* em uma câmara úmida a 4°C. Nesta etapa, para cada grupo de lâminas incubadas com o anticorpo primário, em uma lâmina substituiu-se o anticorpo por PBS caracterizando-a como uma lâmina controle para a checagem/avaliação de interações/ligações inespecíficas.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com PBS três vezes por 5 minutos cada e incubadas com o polímero Histofine (Polímero HRP para tecido de rato e uso com anticorpo primário de coelho) por 30 minutos. Novamente as lâminas foram lavadas com PBS três vezes por 5 minutos cada.

Depois, revelou-se as lâminas com DAB por 10 minutos, sendo em seguida lavadas em água destilada e contra-coradas com hematoxilina por 1 minuto. Finalmente, as lâminas foram desidratadas passando rapidamente por álcool 80%, 90%, 95%, absoluto I e II, álcool + xilol, e por 5 minutos nas soluções xilol I, II e III.

Por fim, as lâminas foram cobertas com Entellan. A intensidade de coloração por meio do anticorpo GFAP foi mensurada utilizando-se o programa Image J (ImageJ 1.50i, National Institutes of Health, USA – arquivo de domínio público disponível em: <http://imagej.nih.gov/ij>). As lâminas foram fotografadas sob a mesma intensidade de luz e as imagens salvas por escala de cinza de tamanho 2048x1536 pixels por meio de objetiva microscópica de 100x. Novamente, todo este procedimento foi executado sempre por um único avaliador sem identificação do grupo correspondente à cada lâmina.

Da mesma forma ao procedimento realizado para os cortes submetidos à coloração por cristal-violeta, selecionou-se para contagem dos perfis de células coradas com o anticorpo NeuN, imagens de tamanho 2048 x 1536 pixels por meio de objetiva de 400x. Foram fotografados 5 campos subsequentes para cada região estudada, onde buscou-se padronizar o início das fotografias através do contato visual do experimentador (Figura 10). O número estimado de perfis de células foi determinado manualmente por um único avaliador sem

identificação do grupo correspondente à cada lâmina, e pela média dos valores obtidos da área de superfície dos campos selecionados com o auxílio do programa Image J citado anteriormente.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Com relação aos dados provenientes do Labirinto Aquático de Morris foi utilizado o teste ANOVA de medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Bonferroni com $p < 0,05$, assim como o ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$). As contagens de células para cada área hipocampal das análises histoquímicas e imunohistoquímicas, intensidade e espessura das camadas celulares foram avaliadas por meio de teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Newman-Keuls ($p < 0,05$), assim como para caracterização do tempo para início das crises recorrentes. O cálculo da dose efetiva 50% dos ensaios eletrofisiológicos foi calculada através da regressão não linear com resposta normalizada. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.1 (GraphPad Software), considerando $p < 0,05$, como estatisticamente significante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



Charles Altamont Doyle, século XIX

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ELETROFISIOLOGIA

Os dados de eletrofisiologia obtidos neste trabalho se prestaram na melhor compreensão do mecanismo de ação anticonvulsivante e, mesmo ansiolítico, dos alcaloides em nível molecular. De fato, e guardados os devidos limites de interpretação, a epilepsia e a ansiedade podem ser explicadas por meio de bases neurobiológicas/neuropatológicas comuns, sobretudo acerca da maior atividade Glutamatérgica e/ou menor atividade GABAérgica em diferentes áreas cerebrais (MORTARI et al., 2007; BRIGGS e GALANOPOULOU, 2011). Além disso, muitos fármacos comerciais que sejam antiepilépticos são também ansiolíticos, como por exemplo para o caso midazolam e pregabalina (KASPER et al., 2014; DIVINEY et al., 2015; CHEN et al., 2015; QURESHI et al., 2017). Assim, uma vez explicado o mecanismo de ação ansiolítico de um determinado ativo este pode também, mas não em todos os casos, explicar o mecanismo antiepiléptico e vice-versa.

Brevemente e para dados, dentre os fármacos utilizados, a cetamina é um antagonista não competitivo dos receptores glutamatérgicos NMDA, também podendo agir em menor grau em receptores dopaminérgicos, serotoninérgicos, colinérgicos e opioides e canais de sódio; a fenitoína delonga o tempo de recuperação dos canais de sódio ativados por voltagem e a carbamazepina possui múltiplos mecanismos de ação, entretanto os mais importantes são a alteração na condutância de canais de sódio e a ação em receptores para acetilcolina, glutamato, moaminas e purinas; e o diazepam age potencializando a ação inibidora dos receptores GABA_A em um sítio específico (benzodiazepínico) que controla os canais iônicos permeáveis a íons de Cl⁻ acoplados ao receptor (KWAN et al., 2001; SILVA e CABRAL, 2008; BIALER e WHITE, 2010; RAJ et al., 2011).

No que tange aos alcaloides (+)-eritravina e (+)-11 α -hidroxieritravina, nosso grupo tem provido esforços em testes de neuroquímica que investiguem a ação dos referidos alcaloides nos eventos de recaptção e ligação a receptores (“Binding”) de [³H]-GABA e [³H]-Glutamato. Os testes de recaptção e “binding” de [³H]-GABA e [³H]-Glutamato na presença e ausência de diferentes concentrações de (+)-eritravina e (+)-11 α -hidroxieritravina (0,001-10 μ g/mL) não mostraram qualquer modificação de resposta dos referidos eventos em relação ao controle negativo (FAGGION et al., 2011). Isto mostra a necessidade de novos estudos para que se explique a ação ansiolítica e anticonvulsivantes dos alcaloides. Em que pese a ausência de

atividade em tais eventos sinápticos, o estudo da ação destes alcaloides nestes sistemas, sobretudo por meio de novos arranjos experimentais e que sejam mais específicos/sofisticados, é de relevância. Isto se dá, sobretudo, pela importância do GABA e Glutamato na epilepsia e mesmo ansiedade, assim como pelo fato de os alcaloides inibirem crises convulsivas disparadas por antagonistas GABAérgicos e agonistas Glutamatérgicos nos modelos agudos de convulsão ainda que sem predileção de eficiência para cada sistema (FAGGION et al., 2011).

Apesar da importância dos sistemas glutamatérgicos e gabaérgicos na fisiopatologia e tratamento da epilepsia e ansiedade, outras entidades estruturais também são relevantes, sobretudo, e por exemplo, os canais iônicos de sódio e os de potássio para o caso de ambas as desordens e receptores nicotínicos colinérgicos especialmente para o caso da ansiedade (KUTLU e GOULD, 2015; NAVIDHAMIDI, GHASEMI e MEHRANFARD, 2017).

De fato, e com relação à hiperexcitabilidade do hipocampo, os gradientes eletroquímicos são determinantes cruciais para a excitabilidade de um neurônio sendo que a atividade dos canais iônicos está intimamente relacionada com a mesma (NAVIDHAMIDI, GHASEMI e MEHRANFARD, 2017).

Os canais de sódio são responsáveis pela despolarização da membrana e pela condução dos potenciais de ação (SILLS, 2011). A inibição de canais de sódio já é alvo de fármacos antiepilépticos e/ou ansiolíticos no mercado, como a carbamazepina, lamotrigina e fenitoína (MIZIELINSKA, 2007; CATTERALL, 2012). Dentre as isoformas de canais de sódio relacionadas com a epilepsia estão descritas $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.4$, $Na_v1.5$, $Na_v1.6$, $Na_v1.7$ (ERRINGTON et al., 2005; EIJKELKAMP et al., 2012).

Contrariamente, o aumento na condutância de íons K^+ resulta na hiperpolarização neuronal exercendo, pois, função inibitória (BARRESE et al., 2010). Desta forma, estudos com isoformas de canais de potássio se fazem de grande valia e, principalmente, aquelas em que mutações nos genes responsáveis pela sua expressão já são descritas na literatura por estarem relacionadas com a epilepsia, como $K_v1.1$ (gene *KCNA1*/ gene *LGI1*), $K_v1.2$ (*KCNA2*) e $K_v4.2$ (gene *KCND2*) (ERRINGTON et al., 2005; MELDRUM e ROGAWSKI, 2007; BARRESE et al., 2010).

Ainda neste contexto, estudo com receptores nicotínicos, que são ligados a canais iônicos, são importantes no estudo de compostos com atividade anticonvulsivante, mas sobretudo, ansiolítica (BRIONI et al., 1993). Os receptores colinérgicos nicotínicos podem modular a liberação de neurotransmissores, estando ativado via influxo de Ca^{2+} . O influxo de Ca^{2+} direto e indireto resultante da ativação de receptores de acetilcolina nicotínicos neuronais

pode modular a liberação de neurotransmissor pré-sináptico (VENTURA et al., 2010; KHAZIEV et al., 2016).

Particularmente, os subtipos $\alpha_4\beta_2$, α_7 e $\alpha_3\beta_4$ também podem participar na regulação da excitabilidade no nível pós-sináptico (POSADAS et al., 2013), sendo os subtipos mais comumente expressos no SNC os $\alpha_4\beta_2$ e α_7 (POSADAS et al., 2013). Os receptores $\alpha_3\beta_4$ são responsáveis pela regulação da transmissão ganglionar (VENTURA et al., 2010). Já outros subtipos dos receptores nicotínicos, como $\alpha_1\beta_1\gamma\delta$, estabelecem participações funcionais nas junções neuromusculares (PALMA et al., 2016). Além disso, os receptores nicotínicos são descritos com importância em diversos processos como o aprendizado e memória, controle motor, recompensa, excitação, ansiedade e processamento central da dor (VENTURA et al., 2010; POSADAS et al., 2013; DANI e BERTRAND, 2015).

Com base nos dados expostos e na necessidade de melhor entender o mecanismo antiepiléptico e ansiolítico dos alcaloides em estudo, realizou-se o estudo da potencial ação dos alcaloides separadamente em diferentes isoformas de canais iônicos particularmente de Na^+ e K^+ , assim como em receptores nicotínicos por meio da técnica de voltage-clamp.

Inicialmente, o potencial efeito citotóxico de cada alcaloide foi investigado em oócitos desprovidos da expressão para qualquer canal iônico ou receptor em estudo (oócitos nus) na presença ou ausência de cada alcaloide na concentração de 10 μM . Como observado na Figura 11 ((+)-11 α -hidroxieritravina) e Figura 12 ((+)-eritravina), nenhum efeito citotóxico relevante fora apresentado pelos alcaloides ao menos na concentração avaliada.

Figura 11 – Ensaio de citotoxicidade em oócitos nus para o alcaloide (+)-11 α -hidroxieritravina

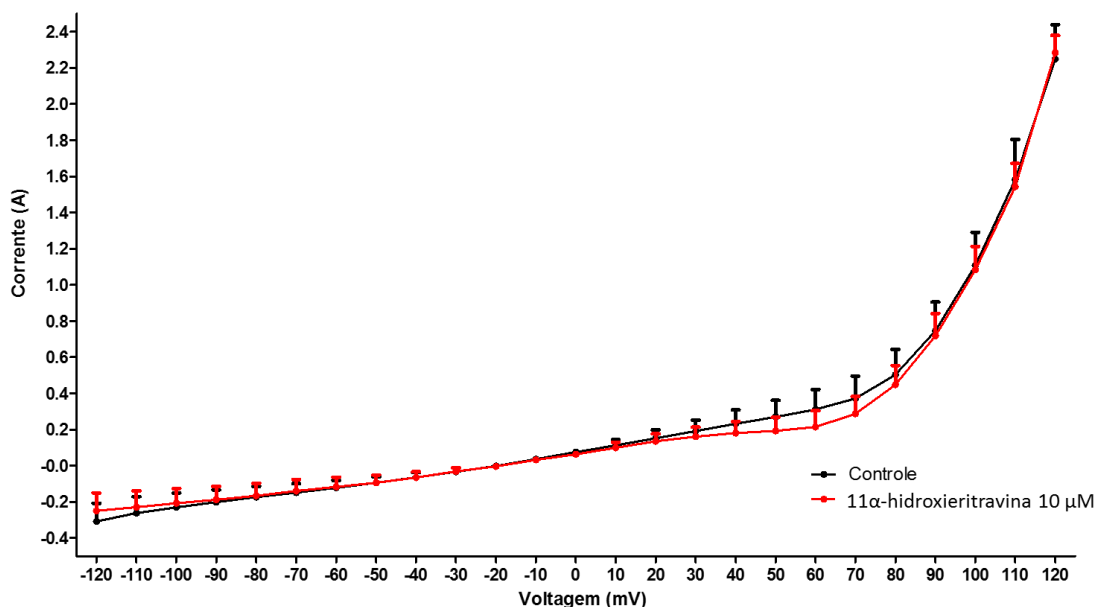
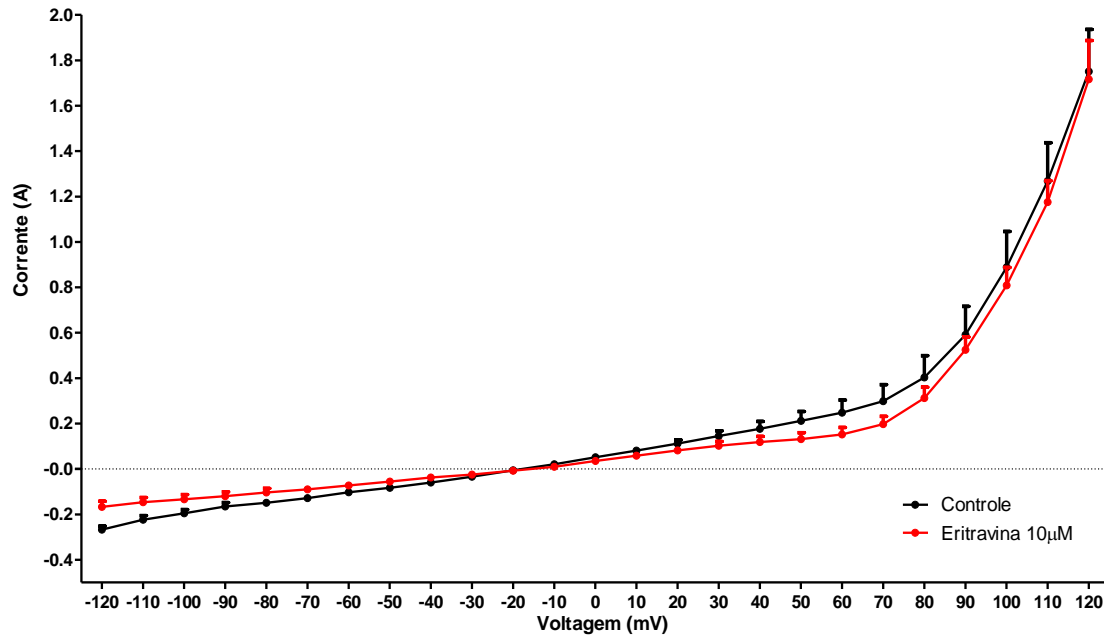
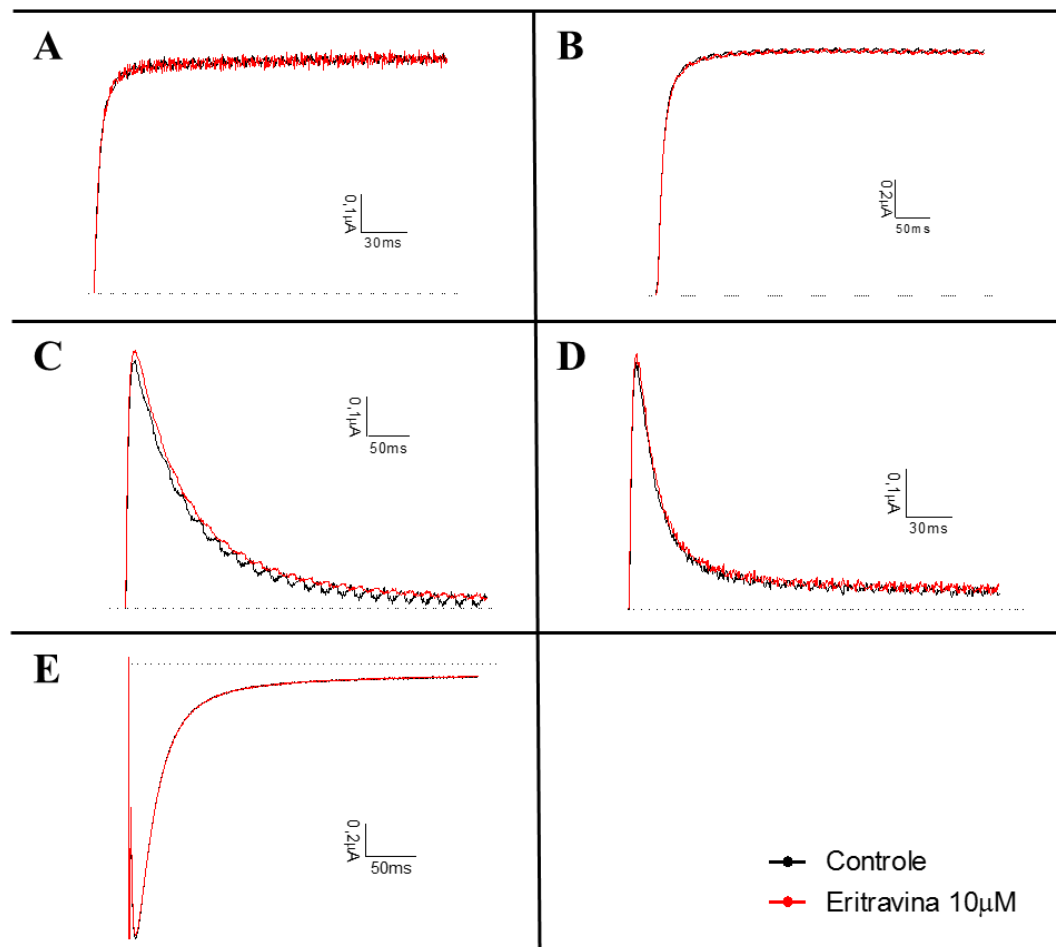


Figura 12 - Ensaio de citotoxicidade em oócitos nus para o alcaloide (+)-eritravina



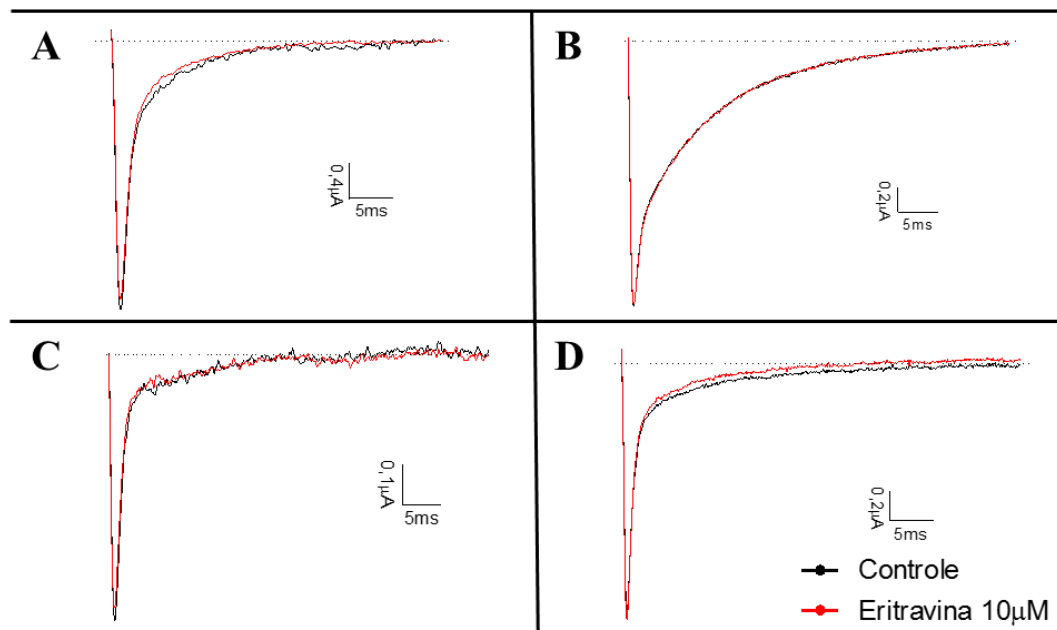
Os dados obtidos para o alcaloide (+)-11 α -hidroxieritravina na concentração de 10 μ M demonstraram que não houveram modificações importantes na ativação e/ou inativação das seguintes isoformas de canais de potássio estudadas K_v 1.1 (Figura 13A), K_v 1.2 (Figura 13B), K_v 1.4 (Figura 13C), K_v 4.2 (Figura 13D) e K_v 11.1 (Figura 13E) e para as isoformas de canais de sódio Na_v 1.2 (Figura 14A), Na_v 1.3 (Figura 14B), Na_v 1.4 (Figura 14C) e Na_v 1.6 (Figura 14D).

Figura 13 – Estudo da interação do alcaloide (+)-11 α -hidroxieritravina com as diferentes isoformas de canais de K⁺ estudadas



Tracejados na cor preta são resultados de registros sem a adição do alcaloide e tracejados na cor vermelha são registros após a adição do alcaloide (10 μ M). A) Isoforma K_v 1.1; B) Isoforma K_v 1.2; C) Isoforma K_v 1.4; D) Isoforma K_v 4.2; E) Isoforma K_v 11.1.

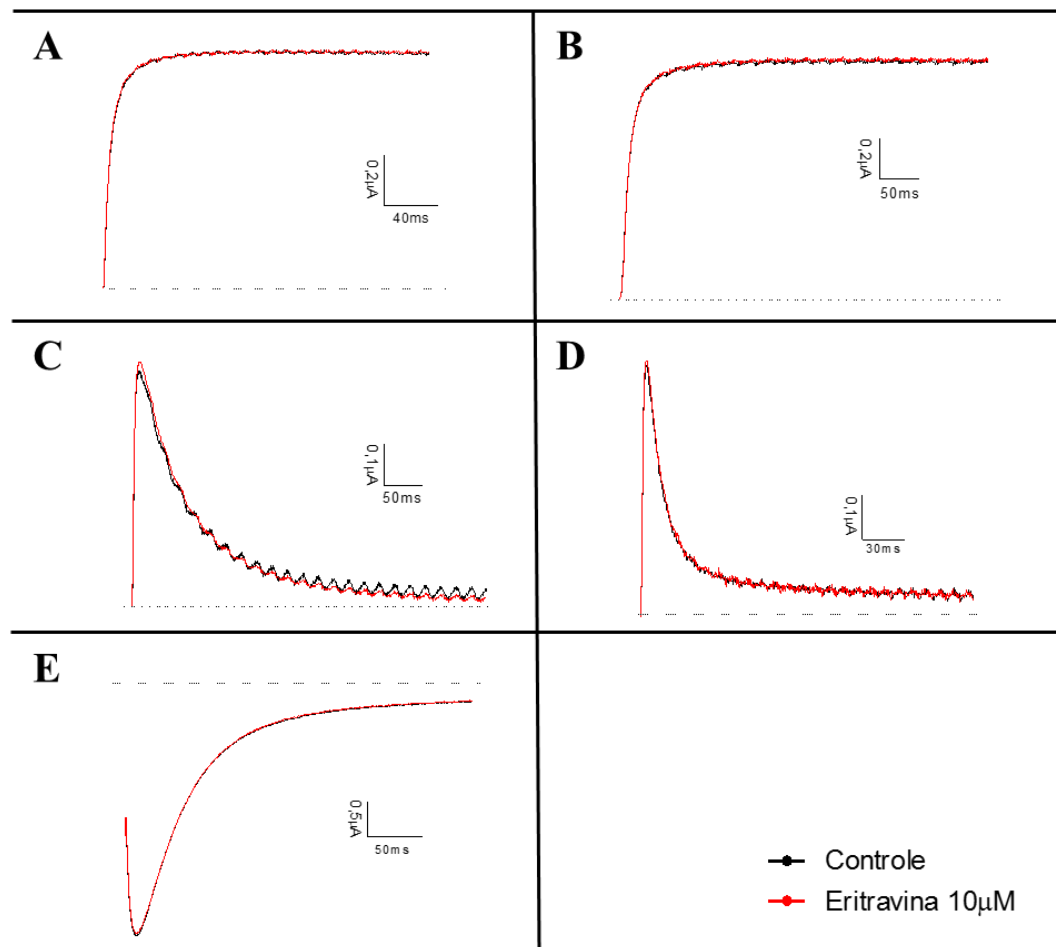
Figura 14 – Estudo da interação do alcaloide (+)-11 α -hidroxieritravina com as diferentes isoformas de canais de Na⁺ estudadas



Tracejados na cor preta são resultados de registros sem a adição do alcaloide e tracejados na cor vermelha são registros após a adição do alcaloide. A) Isoforma Na_v 1.2; B) Isoforma Na_v 1.3; C) Isoforma Na_v 1.4; D) Isoforma Na_v 1.6.

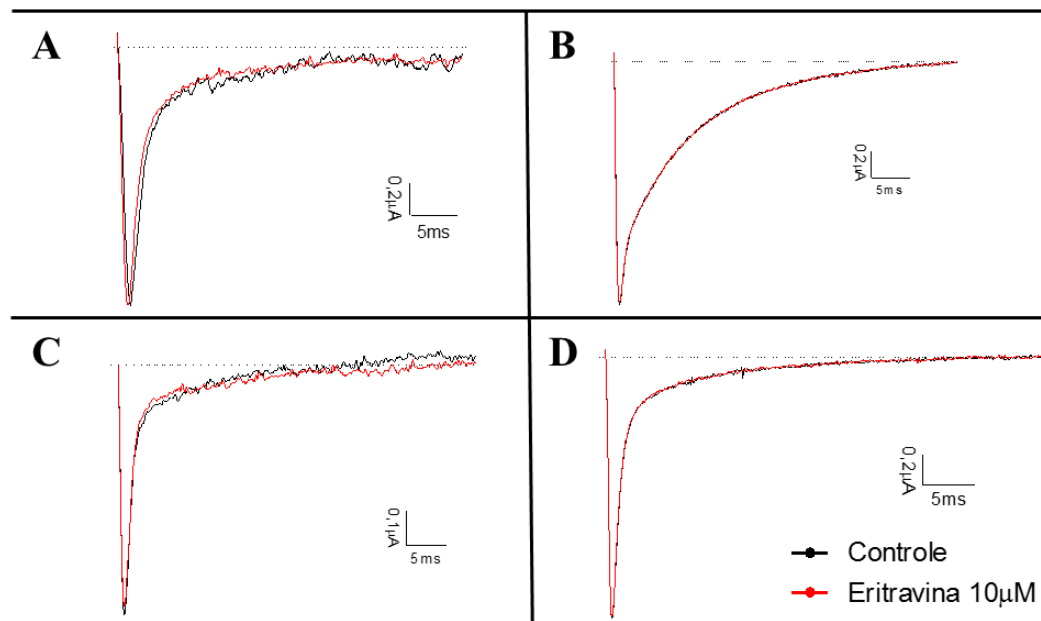
Da mesma maneira, não foram observadas alterações na ativação e/ou inativação quando utilizou-se o alcaloide (+)-eritavina na concentração de 10 μ M, para as isoformas de canais de potássio K_v 1.1 (Figura 15A), K_v 1.2 (Figura 15B), K_v 1.4 (Figura 15C), K_v 4.2 (Figura 15D) e K_v 11.1 (Figura 15E), assim como para as isoformas de canal de sódio Na_v 1.2 (Figura 16A), Na_v 1.3 (Figura 16B), Na_v 1.4 (Figura 16C) e Na_v 1.6 (Figura 16D).

Figura 15 – Estudo da interação do alcaloide (+)-eritravina com diferentes isoformas de canais de K^+ estudadas



Tracejados na cor preta são resultados de registros sem a adição do alcaloide e tracejados na cor vermelha são registros após a adição do alcaloide. A) Isoforma K_v 1.1; B) Isoforma K_v 1.2; C) Isoforma K_v 1.4; D) Isoforma K_v 4.2; E) Isoforma K_v 11.1.

Figura 16 – Estudo da interação do alcaloide (+)-eritavina com diferentes isoformas de canais de Na⁺ estudadas



Tracejados na cor preta são resultados de registros sem a adição do alcaloide e tracejados na cor vermelha são registros após a adição do alcaloide. A) Isoforma Na_v 1.2; B) Isoforma Na_v 1.3; C) Isoforma Na_v 1.4; D) Isoforma Na_v 1.6.

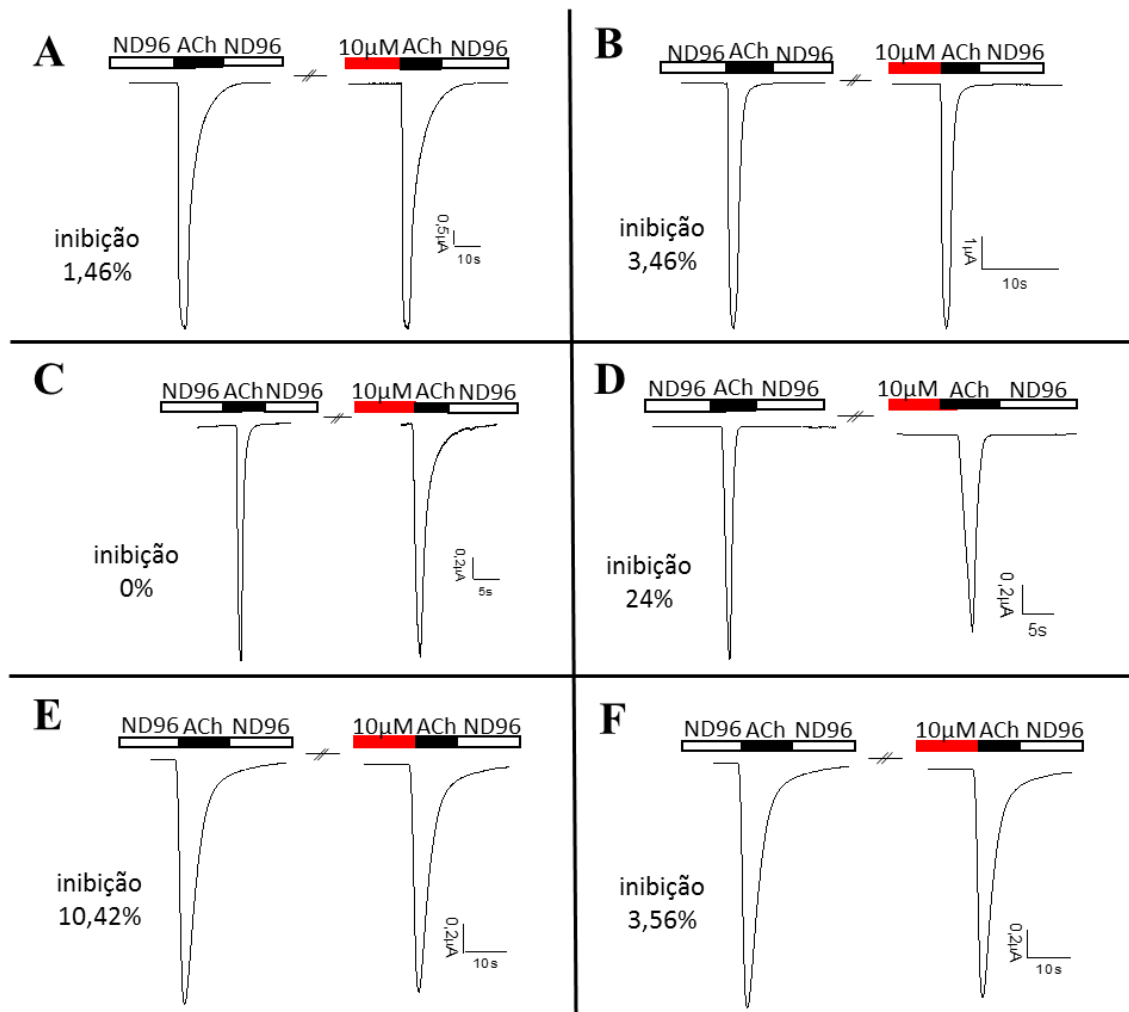
A concentração de 10 μM de cada alcaloide nos testes de “voltage-clamp” é considerada relativamente alta do ponto de vista farmacológico e, é usada para ensaios prospectivos de caráter eliminatório. Desde que nenhum efeito fora observado para ambos alcaloides para esta concentração em canais de sódio ou potássio, nenhuma outra concentração (maior ou menor) foi estudada. Ainda que limitados ao teste em uma única concentração, os dados são suficientes para o descarte da ação dos alcaloides nas referidas isoformas de canais de sódio ou potássio ensaiadas. Assim, é possível concluir que as ações anticonvulsivantes/ansiolíticas dos referidos alcaloides não se deem pela modulação negativa ou positiva, respectivamente, de canais de sódio ou potássio, ao menos para as isoformas e concentrações de alcaloides estudadas.

Adicionalmente, averiguou-se no presente estudo a potencial interação entre os alcaloides com diferentes isoformas de receptores nicotínicos. Os resultados obtidos foram variáveis a depender da isoforma e alcaloide estudado. Nestes experimentos, foi constatado que ambos alcaloides (+)-11α-hidroxi-eritavina e (+)-eritavina na concentração de 10 μM não alteraram significativamente a ativação e/ou inativação das isoformas nicotínicas α₁β₁δγ (respectivamente, Figura 17A e Figura 18A) e α₁β₁δε (Figura 17B e Figura 18B, respectivamente). Para a isoforma α₃β₄ não fora constatada modulação por parte do o alcaloide

(+)-11 α -hidroxieritravina (Figura 17C), enquanto o alcaloide (+)-eritravina inativa discretamente esta mesma isoforma em torno de 13,33% (Figura 18F).

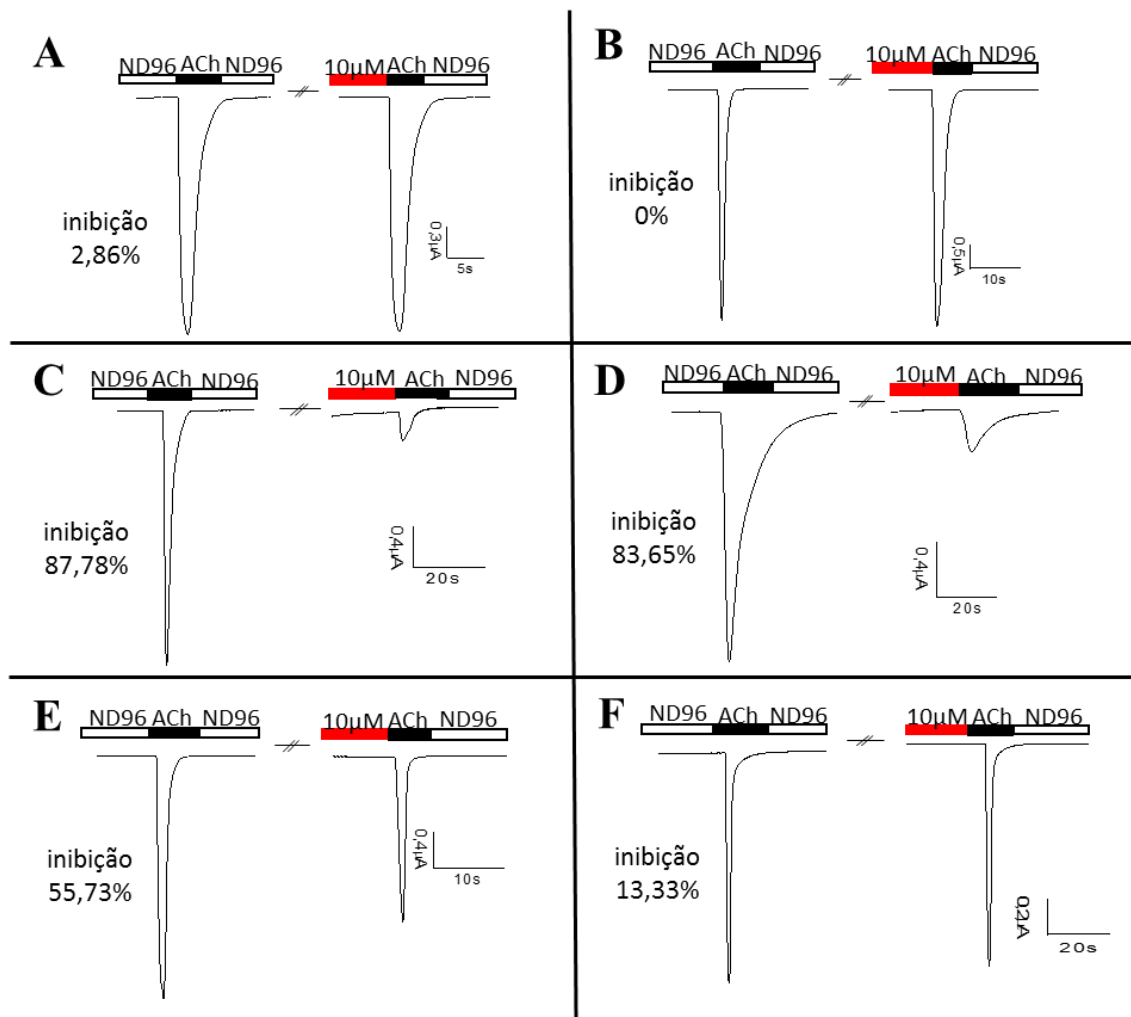
Para outras isoformas estudadas, o alcaloide (+)-11 α -hidroxieritravina, ainda na concentração de 10 μ M, promoveu pequena inativação das isoformas $\alpha_4\beta_4$ na ordem de 24% (Figura 17D), $\alpha_4\beta_2$ na ordem de 10% (Figura 17E) e α_7 na ordem de 3,5% (Figura 17F). Por outro lado e em contraste, o alcaloide (+)-eritravina promoveu forte inativação da corrente elétrica para algumas destas isoformas, a saber: inativação de α_7 em 87,8% (Figura 18C), $\alpha_4\beta_2$ em 83,7% (Figura 18D), $\alpha_4\beta_4$ com 55% (Figura 18E) e $\alpha_3\beta_4$ com 13,33%, este último inativado em menor magnitude (Figura 18F).

Figura 17 – Estudo da interação do alcaloide (+)-11 α -hidroxieritravina com as diferentes isoformas de receptores nicotínicos



A) Isoforma $\alpha_1\beta_1\delta\gamma$; B) Isoforma $\alpha_1\beta_1\delta\epsilon$; C) Isoforma $\alpha_3\beta_4$; D) Isoforma $\alpha_4\beta_4$; E) Isoforma $\alpha_4\beta_2$; F) Isoforma α_7 .

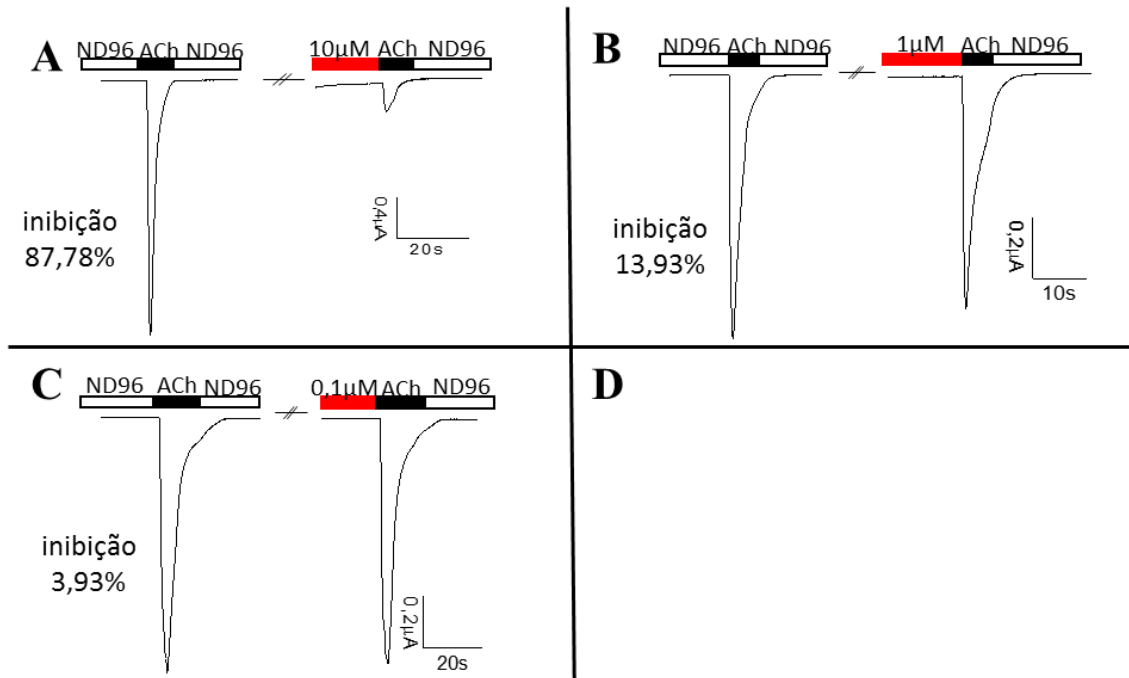
Figura 18 - Estudo da interação do alcaloide (+)-eritrovina com as diferentes isoformas de receptores nicotínicos



A) Isoforma $\alpha_1\beta_1\delta\gamma$; B) Isoforma $\alpha_1\beta_1\delta\epsilon$; C) Isoforma α_7 ; D) Isoforma $\alpha_4\beta_2$; E) Isoforma $\alpha_4\beta_4$; F) Isoforma $\alpha_3\beta_4$.

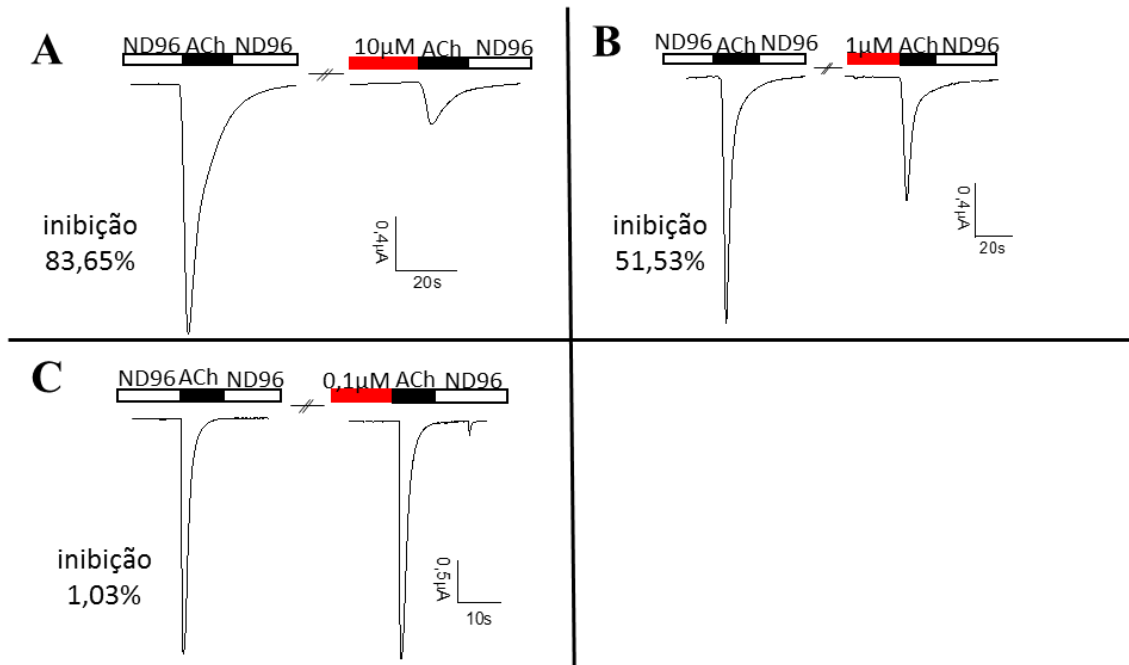
Considerando o maior desempenho de inativação de (+)-eritrovina para as isoformas nicotínicas α_7 , $\alpha_4\beta_2$, $\alpha_4\beta_4$, as concentrações ensaiadas foram estendidas para 1 e 0,1 μM em adição ao 10 μM , permitindo o cálculo do EC_{50} . Desta forma, estes experimentos estão mostrados como se seguem: para a isoforma α_7 na Figura 19, $\alpha_4\beta_2$ na Figura 20 e $\alpha_4\beta_4$ na figura 21, estando dispostos os valores de EC_{50} para cada caso na Tabela 6, que mostram maior seletividade de inibição/inativação da (+)-eritrovina para as isoformas $\alpha_4\beta_2$ e α_7 , nos quais os menores valores de EC_{50} foram encontrados.

Figura 19 – Ensaio com diferentes concentrações do alcaloide (+)-eritravina em α_7



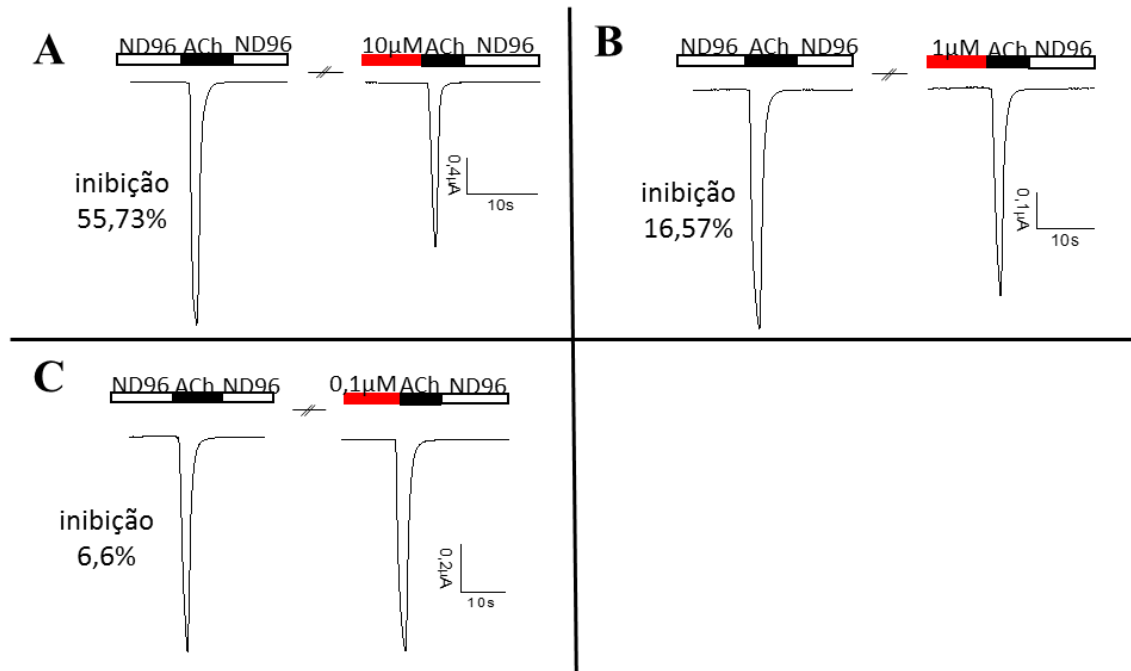
A) Concentração utilizada de 10 μM ; B) Concentração utilizada de 1 μM ; C) Concentração utilizada de 0,1 μM .

Figura 20 - Ensaio com diferentes concentrações do alcaloide (+)-eritavina em $\alpha_4\beta_2$



A) Concentração utilizada de 10 μM ; B) Concentração utilizada de 1 μM ; C) Concentração utilizada de 0,1 μM .

Figura 21 - Ensaio com diferentes concentrações do alcaloide (+)-eritrovina em $\alpha_4\beta_4$



A) Concentração utilizada de 10 μ M; B) Concentração utilizada de 1 μ M; C) Concentração utilizada de 0,1 μ M.

Tabela 6 - Concentração efetiva do alcaloide (+)-eritrovina para inibição de 50% em diferentes isoformas de receptores nicotínicos

Isoforma do receptor	Valor para inibição de 50%
α_7	2,84 μ M
$\alpha_4\beta_2$	1,04 μ M
$\alpha_4\beta_4$	9,98 μ M

Como dito, os resultados da eletrofisiologia mostram que o mecanismo de ação antiepiléptico e mesmo ansiolítico dos alcaloides em nível molecular não envolve ações nos principais canais de sódio ou potássio, como acontece para várias drogas de referência no tratamento da ELT e ansiedade.

Este dado é importante, pois se assume mais modernamente na farmacologia, que o descarte/rejeição de alvos moleculares prováveis de ativos farmacológicos é tão ou mais importante que o apontamento de seus alvos específicos de ação em derradeiro (LEE e DWORETZKY, 2010; NAVIDHAMIDI, GHASEMI e MEHRANFARD, 2017). Isto contribui para o entendimento da farmacologia e toxicologia envolvida no desenvolvimento de novos fármacos ou ferramentas biotecnológicas (NAVIDHAMIDI, GHASEMI e MEHRANFARD, 2017).

A apresentação e ausência de modulação inibitória respectivamente da (+)-eritrovina e a da (+)-11 α -hidroxieritrovina sobre receptores nicotínicos também trazem informações importantes.

Os dados mostram que pequenas alterações estruturais no conjunto de radicais químicos no redor do núcleo eritrínico causam grandes alterações de atividade farmacológica. Estas informações em nível molecular se somam aos dados anteriores do grupo que mostraram a presença ou ausência de efeito ansiolítico para alcaloides eritrínicos com base nestas diferenças estruturais (FAGGION et al., 2011; ROSA et al., 2012). Assim, o trabalho do grupo traz informação químico-farmacêutica (relação estrutura-atividade) bastante importante no desenvolvimento racional de novos fármacos com ação no SNC (FEITOSA et al., 2012).

Os dados deste trabalho também demonstram ação seletiva da (+)-eritrovina para as isoformas dos receptores nicotínicos $\alpha_4\beta_2$ e α_7 em detrimento de outras avaliadas neste trabalho. A ação da (+)-eritrovina em receptores nicotínicos, pode ao menos parcialmente, explicar sua ação ansiolítica demonstrada por nosso grupo no passado para este mesmo alcaloide (FAGGION et al., 2011; ROSA et al., 2012), ainda que novos experimentos se façam necessários, sobretudo, para o explicar do mesmo efeito ansiolítico exercido por (+)-11 α -hidroxieritrovina sem contudo apresentar modulação inibitória para tais receptores.

Finalmente, os resultados obtidos através do voltage-clamp estão de acordo com os estudos de Setti-Perdigão e coautores obtidos por patch-clamp que propõem como mecanismo de ação ansiolítica de diferentes alcaloides eritrínicos, a capacidade de inibir receptores nicotínicos.

Os resultados deste estudo, somam-se àqueles obtidos por Setti-Perdigão quanto mostram a maior seletividade de (+)-eritrovina para os receptores nicotínicos especificamente expressos no SNC ($\alpha_4\beta_2$ e α_7) (SETTI-PERDIGÃO et al., 2013) em detrimento das outras isoformas estudadas que possam ser expressas nas junções neuromusculares esqueléticas ($\alpha_1\beta_1\delta\epsilon$) ou ainda que sejam receptores nicotínicos ganglionares (α_7 , $\alpha_3\beta_4$) (MOURA JÚNIOR, 2012; LEBBE et al., 2014; FAGERLUND et al., 2016). Isto reforça a provável participação do mecanismo de inibição de receptores nicotínicos específicos ($\alpha_4\beta_2$ e α_7) na ação ansiolítica da (+)-eritrovina.

A partir dos dados adquiridos, acredita-se que os alcaloides estudados, ao menos em partes, apresentem mecanismos diferentes cujo resultado final seja o bloqueio da despolarização celular resultando na interrupção de crises epiléticas, proteção neural e melhora na aprendizagem e memória dos animais epiléticos. Além disso, a interação dos alcaloides com receptores nicotínicos compostos pelas subunidades α_4 , α_7 , β_2 , β_3 e β_4 , podem explicar a

atividade ansiolítica apontada em estudos anteriores (TUCCI et al., 2003; FLAUSINO et al., 2007a; SETTI-PERDIGÃO et al., 2013).

4.2 *STATUS EPILEPTICUS*

Neste trabalho, a indução do SE por meio da pilocarpina foi realizada anteriormente aos diferentes tratamentos em animais controles ou experimentais. O estabelecimento e operação do protocolo aconteceram com elevada taxa de sucesso, garantindo que 100% dos animais do quadro experimental válido apresentassem crises de escore adequado (4-5) sem reversão espontânea da crise.

Apenas 8% dos animais evoluíram para óbito durante as 3 primeiras horas de observação (Dados não apresentados). Brevemente, os comportamentos observados inicialmente consistiram de automatismos orofaciais e mioclonias localizadas, evoluindo mais tarde para hipersalivação, elevação e queda límbica e crises tônico-clônica generalizadas, com a ocorrência de vocalização para alguns dos animais, mostrando, pois, a correta evolução para o score de crises de nível 4/5.

Ademais, durante todo o protocolo experimental foi analisada a incidência de mortes nos grupos de animais submetidos ao SE e aos diferentes tratamentos. Com relação a estes dados, os grupos de animais tratados com as três doses do alcaloide (+)-eritavina e as duas menores doses do (+)-11 α -hidroxieritavina apresentaram apenas uma morte em cada grupo experimental.

Esses resultados são iguais aos apresentados pelos grupos de animais tratados com os fármacos de escolha fenitoína e cetamina. Com relação aos grupos de animais tratados com a maior dose do alcaloide (+)-11 α -hidroxieritavina, ou com as doses únicas de diazepam e carbamazepina, não foi constatada nenhuma morte. Por outro lado, quatro animais induzidos de SE e tratados apenas com salina foram a óbito, mostrando maior taxa de morte neste grupo (Dados não apresentados).

A indução do SE é parte fundamental no modelo de pilocarpina, que presta, por sua vez como um modelo de epilepsia. São evidenciadas em modelos animais e em humanos, lesões características envolvendo morte neuronal no giro dentado, nas CA1-CA3, e gliose reativa no hipocampo como dito anteriormente.

Isto se dá em decorrência do SE, que por sua vez se confunde com o aparecimento e manutenção da ELT (SIMMONS et al., 1997; ZHANG et al., 2010). Outras alterações são as de natureza bioquímica e fisiológica no hipocampo e ao final da fase silenciosa da

epileptogênese induzida por pilocarpina, como o aumento da densidade populacional de receptores para L-Glu e diminuição de receptores GABA_A. Além disso, se observa aumento da excitabilidade por L-Glu na via perforante que liga o córtex entorrinal às regiões de CA1 e CA3, a qual representa a maior via de entrada excitatória no hipocampo (SCIMEMI et al., 2006; CUNHA et al., 2007).

Existe correlação positiva entre o aumento das lesões hipocâmpais e a maior incidência, severidade e duração das crises epilépticas e vice-versa na ELT (TILELLI et al., 2005), com subsequente prejuízo cognitivo e de memória, dentre outras alterações conhecidas (PEDROSO, 2005). Com efeito, a ILAE tem proposto que o maior entendimento das lesões, pode definir melhor a etiologia, o prognóstico e o controle de crises nos pacientes afetados, no que se refere a uma categorização mais estratificada da esclerose hipocâmpal (CENDES et al., 2014).

De fato, as variadas manifestações clínicas e os diferentes tipos de epilepsia, bem como as respostas variadas apresentadas por diferentes pacientes aos tratamentos convencionais podem ser explicados, ao menos em parte, pelas diferenças características das lesões hipocâmpais. A classificação da esclerose teria por fundamento as alterações celulares (morte diferencial de neurônios em diferentes áreas do hipocampo e gliose reativa), mas também aquelas de natureza molecular, particularmente definidas em termos de canais iônicos, principalmente os de sódio voltagem-dependentes e aqueles associados aos receptores de GABA e Glutamato (CENDES et al., 2014).

O SE e a decorrente esclerose hipocâmpal levam a grande morbidade e mortalidade de pacientes, estabelecendo-se, pois, como entidades médicas importantes. Parcela significativa dos pacientes morrem por conta do SE, enquanto os sobreviventes experimentam diferentes magnitudes de lesão hipocâmpal com diferentes níveis de sequelas, incluindo a ELT em maior ou menor gravidade (ROSSETTI e LOWENSTEIN, 2011; LOSCHER, 2015).

Apesar das controvérsias, o SE tem sido definido como um contínuo inicial e intermitente de convulsões por mais de 5 minutos ou mais de uma convulsão em 5 minutos sem recuperação de consciência entre elas ao longo de um período variável de frações de hora ou horas inteira(s) entre os pacientes (LOWENSTEIN et al., 1999; TRINKA et al., 2015).

O SE é difícil de tratar, sendo seu correto tratamento crucial na prevenção da morte e mesmo das diferentes sequelas nos casos de sobrevida (ZEILIER, 2015). Já durante o início do SE, ocorre diminuição da função inibitória do GABA via receptores GABA_A, em decorrência da hipofunção/diminuição do número deste tipo de receptor. Nas fases mais tardias, ocorre um aumento da expressão e da função de receptores NMDA, o que associado a perda adicional da função GABAérgica nestas fases, implica em estabelecimento e manutenção do SE que

progride para as crises autossustentadas da ELT (FUJIKAWA, 2005; FENG et al., 2008; DEEB et al., 2012). Os estudos de Wasterlain et al (2013), tem demonstrado em modelos animais (lítio/pilocarpina) e de SE após a injeção de neuroquina B, a realocação de subunidades NR1 de receptores NMDA para a superfície de neurônios no GD do hipocampo (WASTERLAIN et al., 2013), o que está em consonância com o aumento de receptores NMDA funcionais e aumento dos disparos neuronais nesta região cerebral (WASTERLAIN et al., 2013).

O modelo de pilocarpina e a indução do SE se misturam, de modo que a correta indução deste último evento em nível de severidade adequado, por exemplo, é fundamental para o sucesso do método (LEITE et al., 2002). A escolha do estudo durante a fase silenciosa no modelo crônico de ELT para este trabalho foi devido ao fato de a plasticidade funcional e estrutural e a reorganização do circuito sináptico no hipocampo ocorrerem durante o período silencioso, tanto para humanos quanto para animais, resultando no desenvolvimento de uma condição epiléptica (PITKÄNEN e SUTULA, 2002; REDDY e KURUBA, 2013).

Finalmente, é preciso considerar que o modelo transpassa os limites da epilepsia em si. Muito embora associado firmemente a síndrome, o prejuízo de memória e aprendizado causado pela esclerose hipocampal é outra vertente a ser explorada no modelo, na medida em que medições deste prejuízo podem ser postas em prática na presença ou ausência de um dado fármaco em desenvolvimento/investigação (HICKS et al., 1993; D'HOOGHE e DE DEYN, 2001; VORHEES e WILLIAMS, 2006).

Os modelos agudos de convulsão alcançados normalmente pelo uso de convulsivantes químicos são de valia e tem suas vantagens, como a prospecção mais rápida, ainda que preliminar, de novos agentes anticonvulsivantes (LÖSCHER, 2011). Entretanto, estes modelos fidelizam pouco com o que acontece de fato na epilepsia humana e em seu tratamento (LÖSCHER, 2011; CASTRO et al., 2011), fato socorrido pelo modelo da pilocarpina usado neste trabalho e de acordo com diferentes estudos prévios (REDDY e KURUBA, 2013).

Considerando a complexa fisiopatologia/alterações morfológicas e funcionais da ELT, é lógico assumir que estudos baseados nas diferentes vertentes molecular e celular, como aqui proposto, permitam novas abordagens terapêuticas acerca da problemática, ao mesmo tempo em que se dá o maior entendimento das bases neuromoleculares da epilepsia e, ainda, o melhor entender dos modelos animais, como o da pilocarpina.

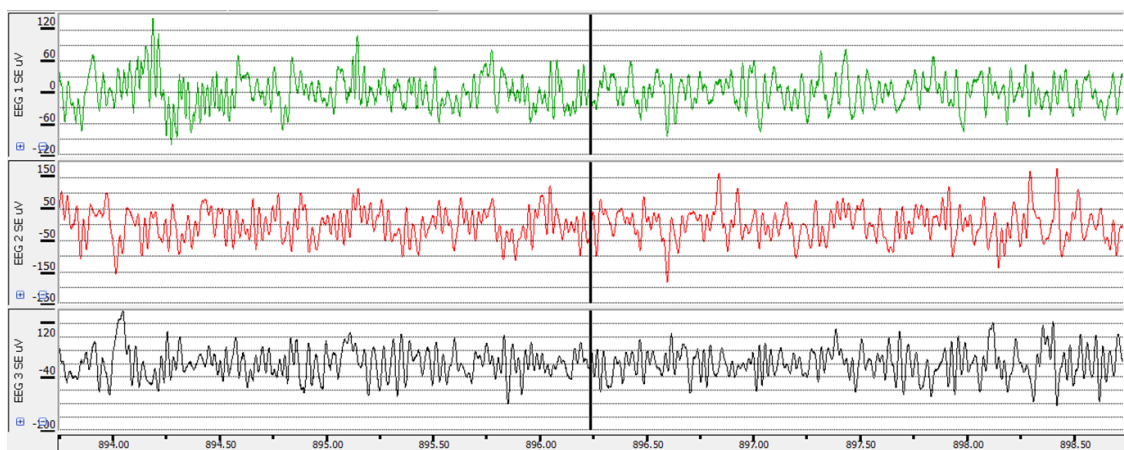
Com efeito, o melhor entendimento de modelos animais pode resgatar conhecimentos de experimentos do passado, estimular o aparecimento de novas ideias e abordagens experimentais, bem como permitir um melhor aprimoramento dos mesmos, aumentando o alcance das descobertas futuras (MARTÍN e POZO, 2006; KOVACS e HEINEMANN, 2014).

4.3 ELETROENCEFALOGRAFIA

Independente do modelo animal utilizado, a análise e registro vídeo-eletroencefalográfico das crises e seus desenvolvimentos trazem informações relevantes e complementares às observações comportamentais simples, ampliando o conhecimento da atividade antiepiléptica dos ativos em teste contra crises recorrentes (KHARATISHVILI et al., 2013). O registro da atividade eletrofisiológica auxilia distinguir se e quais áreas participam da zona epileptogênica, sendo as oscilações eletroencefalográficas de valor diagnóstico para o início das crises epiléticas (SANABRIA et al., 2000). A propósito e geralmente, animais submetidos ao SE no modelo de pilocarpina apresentam registros ictais com ondas altamente sincronizadas de amplitude e frequência elevada e de maneira generalizada, que podem ser avaliadas na presença ou ausência de um ativo em teste (LEVESQUE et al., 2015).

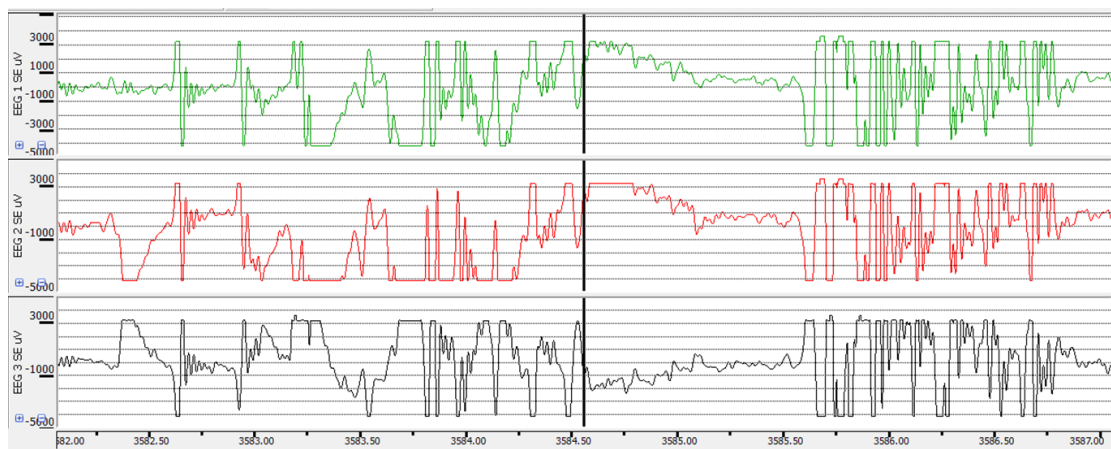
Neste trabalho e após 10 dias da indução ao SE, realizou-se o monitoramento videoeletroencefalográfico dos diferentes grupos de animais para observação das descargas epileptiformes sincronizadas marcadoras de crises recorrentes, sobretudo, quanto aos quesitos de frequência, amplitude e duração. Nas Figuras 22 e 23 encontram-se representações esquemáticas observadas durante os dias de observação após 10 dias da indução ao SE. Assim sendo, na Figura 22 encontra-se um registro eletroencefalográfico de um animal sadio onde observa-se descargas epileptiformes sincronizadas e de amplitude baixa. Em contrapartida, na figura seguinte pode-se observar registros de um animal com crises generalizadas na qual observamos a presença de espículas agudizadas com intensidade máxima de sua amplitude de maneira sincronizada em todos os canais de registro.

Figura 22 - Representação ilustrativa do perfil eletroencefalográfico de um animal sadio



Fonte: Arquivo pessoal.

Figura 23 - Representação ilustrativa do perfil eletroencefalográfico de um animal com crise generalizada



Fonte: Arquivo pessoal.

Durante o desenvolvimento experimental deste trabalho, as crises eletroencefalográficas detectadas nos animais induzidos ao SE e tratados com salina foram do tipo generalizadas, ou seja, aquelas em que há descargas epiletiformes nas regiões parietal e occipital. O mesmo é verdadeiro para o grupo de animais tratados com os alcaloides na dose de $3\mu\text{g}/\mu\text{L}$, quando das muito poucas crises observadas.

As crises eletroencefalográficas foram detectadas em média de 6 por dia de análise (totalizando 30 ao longo do período de observação) para cada animal induzido ao SE e tratado com salina, iniciadas na região parietal com duração média de 600ms e com amplitude 35 vezes maior em relação ao traçado de EEG registrado antes da indução ao SE. Os animais tratados com (+)-eritrovina apresentaram cada um deles apenas duas crises eletroencefalográficas em todo o tempo analisado (1 hora/dia em 5 dias), sendo a duração de 200ms e com uma amplitude de apenas 10 vezes maior em relação ao traçado de EEG registrado quando sadios.

Com relação aos animais tratados com (+)-11 α -hidroxieritrovina apenas dois deles apresentaram crises eletroencefalográficas generalizadas iniciadas na região parietal, detectadas uma única vez para cada animal durante todo o desenvolvimento experimental, com duração de 200 ms e com amplitude dez vezes maior que a atividade basal.

Desta forma, observou-se que a incidência de crises eletroencefalográficas foi diminuída em até 93,33% após o tratamento com (+)-eritrovina e de 97-100% após o SE e tratamento dos animais com (+)-11 α -hidroxieritrovina quando comparados ao grupos de animais induzido ao SE e tratados com salina. Com relação à amplitude das crises eletroencefalográficas detectadas nos animais tratados com os alcaloides (+)-eritrovina e (+)-11 α -hidroxieritrovina estas foram cerca de 3,5 vezes menores àquelas comparadas aos animais tratados com salina e induzidos de

SE. Além disso, os animais tratados com os alcaloides na dose de $3\mu\text{g}/\mu\text{L}$ apresentaram crises eletroencefalográficas com duração média menor, cerca de 3 vezes, comparada aos animais tratados com salina induzidos de SE.

Estes resultados em conjunto atestam a atividade antiepiléptica dos alcaloides em estudo e corroboram resultados prévios da literatura, onde as atividades anticonvulsivantes de tais agentes e mesmo do extrato hidroalcoólico das inflorescências de *E. verna* foram investigadas por meio de modelos de convulsão (FLAUSINO, 2006; FAGGION et al., 2011; ROSA et al., 2012).

4.4 LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS

Não obstante e como dito anteriormente, alterações na plasticidade de componentes neurais no hipocampo e, conseqüentemente, a acessão das alterações na comunicação das regiões hipocampais, resultam em déficit no aprendizado e memória (HICKS et al., 1993; D'HOOGHE e DE DEYN, 2001; VORHEES e WILLIAMS, 2006). Os déficits de cognição e memória são parte importantes do quadro clínico das diferentes epilepsias, incluindo a ELT (VORHEES e WILLIAMS, 2006).

Além disso, grande parte dos medicamentos usados no tratamento da desordem, como os benzodiazepínicos, causam enormes prejuízos para estes mesmos processos, o que é importante, sobretudo, para crianças em idade escolar e mesmo adultos nas suas diferentes esferas laborais (RAJ et al., 2011).

Assim sendo, alterações na plasticidade de componentes neurais no hipocampo e, conseqüentemente, a acessão das alterações na comunicação das regiões hipocampais, resultam em déficit no aprendizado e memória (HICKS et al., 1993; D'HOOGHE e DE DEYN, 2001; VORHEES e WILLIAMS, 2006).

Acredita-se que a memória é codificada por modificação da força sináptica, sendo, desta forma, a LTP considerada como um dos principais mecanismos celulares da aprendizagem e memória (MORRIS et al., 1986). A LTP é resultante de uma série de eventos intracelulares iniciados após o influxo de cálcio, que age como um segundo mensageiro, por meio da ativação do receptor de NMDA quando em um ambiente em que o neurônio já está despolarizado e há uma nova liberação de glutamato (BLISS e COLLINGRIDGE, 1993). Contudo, um aumento excessivo dos níveis de cálcio intracelular causa a morte neuronal (PEREIRA e SANTOS, 2014).

Além disso, tem sido demonstrado que a informação da “memória” é transmitida pelos córtices entorrinal e peririnal que fazem sinapse no giro denteado e, em seguida, transmitida para a CA3, CA1 e subiculum. O subiculum transmite tal informação para o hipotálamo que retorna ao córtex entorrinal repassando a mesma ao córtex sensorial (TOY et al. 2016). Além do envolvimento dos córtices entorrinal e peririnal, na consolidação da memória, acredita-se que também há o envolvimento do córtex pré-frontal, córtex cingulado, neostriatum e talvez até do cerebelo de forma mais limitada (VORHEES e WILLIAMS, 2006).

Neste sentido, estudou-se a atividade funcional do hipocampo por meio da observação comportamental dos animais utilizando o Labirinto Aquático de Morris, na presença ou ausência dos alcaloides em teste. O desempenho no LAM dos animais tem sido associado à potencialização a longo prazo (LTP) e à função do receptor glutamatérgico do tipo NMDA.

Os receptores de NMDA são necessários para aquisição da aprendizagem da memória espacial refletindo em um bom desempenho no LAM, tornando-a uma técnica chave na investigação dos circuitos hipocampais dedicados ao aprendizado/memória (BANNERMAN et al., 1995; VORHEES e WILLIAMS, 2006).

O resultado da performance dos animais tratados com os alcaloides (+) -eritrovina e (+) -11 α -hidroxieritrovina foram semelhantes aos apresentados pelos animais tratados com os fármacos de escolha e, mesmo aos animais que não foram induzidos ao SE e tratados com salina (grupo sadio). Em síntese, os animais tratados com as diferentes doses dos alcaloides e fármacos comerciais apresentaram melhor retenção de memória, o que significa diretamente menor prejuízo cognitivo, do que animais induzidos ao SE e tratados apenas com salina, no quesito que considera seus desempenhos sobre a memória/déficit cognitivo (Figura 11 e Tabela 06).

De fato, através do Labirinto Aquático de Morris, após 7 dias da indução ao SE, estudou-se neste trabalho o desempenho dos alcaloides quanto à memória e aprendizagem. Os resultados globais do teste demonstraram que os animais induzidos ao SE e tratados apenas com salina apresentaram dificuldade em encontrar a plataforma de escape com aumento do tempo despendido ao longo dos 04 dias de acompanhamento [$F(3,19) = 15,70$; $p < 0,05$] (Figura 24).

Durante o período experimental no Labirinto Aquático de Morris, a análise pela ANOVA de medidas repetidas indicou influência positiva e significativa das sessões de treino ao longo dos dias [$F(3,180) = 33,23$; $p < 0,05$] e do tratamento para os animais não induzidos ao SE e tratados com salina e/ou com os alcaloides ou animais induzidos ao SE e tratados com as diferentes doses dos alcaloides e/ou fármacos de escolha [$F(13,180) = 5,75$; $p < 0,05$]. Para estes últimos grupos, o tempo para encontrar a plataforma de escape foi diminuído, demonstrando melhor desempenho de memória/cognição.

Os dados apresentados para o primeiro dia de treinamento demonstraram que os animais não induzidos ao SE e tratados com os alcaloides (+)-eritavina, (+)-11 α -hidroxieritavina ou com salina e os animais induzidos ao SE e tratados com a maior dose dos alcaloides em estudo apresentaram menor latência para encontrar a plataforma. Da mesma forma, os animais tratados com os diferentes fármacos de escolha quando comparados aos animais que foram induzidos ao SE e tratados apenas com salina apresentaram tempo de latência menor (Figura 24A).

Quando comparados os grupos de animais tratados com os alcaloides (+)-eritavina e (+)-11 α -hidroxieritavina nas mesmas doses não houve diferença entre o tempo para encontrar a plataforma. Da mesma forma, os grupos de animais sadios (salina ou alcaloides sem SE) e os animais induzidos ao SE e tratados com os alcaloides apresentaram tempo de escape similares [F(13,485) = 8,606; p<0,05] (Figura 24A).

No segundo dia de treinamento observou-se que os grupos de animais induzidos ao SE e tratados com diazepam, fenitoína, carbamazepina, a menor dose do alcaloide (+)-eritavina ou todas as doses do alcaloide (+)-11 α -hidroxieritavina diminuíram o tempo de escape para encontrar plataforma. Os grupos de animais induzidos ao SE e tratados com as duas maiores doses de (+)-eritavina, os animais tratados com cetamina e os animais tratados com salina mantiveram o tempo do dia anterior (Figura 24B).

Contudo, embora os animais epiléticos tratados com cetamina ou as duas maiores doses de (+)-eritavina não tenham reduzido o tempo de escape, este valor foi ainda menor e significativamente diferente do que aquele apresentado pelos animais induzidos ao SE e tratados apenas com salina (Figura 24B). Quando comparados os grupos de animais tratados com os diferentes alcaloides na mesma dose ou ainda os grupos de animais sadios (salina ou alcaloides sem SE) entre si não foram constatadas diferenças estatísticas [F(13,485) = 14,93; p<0,05] (Figura 24B).

A latência de escape observada para os diferentes animais no terceiro dia de treinamento demonstra nova redução de tempo para a grande maioria dos grupos. Somente o tempo registrado para os grupos fenitoína e (+)-eritavina 2 μ g/ μ L permaneceu o mesmo do segundo dia de treinamento. O tempo para todos os grupos de animais tratados com diferentes doses dos alcaloides em estudo e/ou fármacos de escolha com SE foram diferentes estatisticamente quando comparados aos animais tratados com salina e induzidos ao SE, apresentando diminuição de tempo em relação a este último [F(13,485) = 21,35; p<0,05] (Figura 24C).

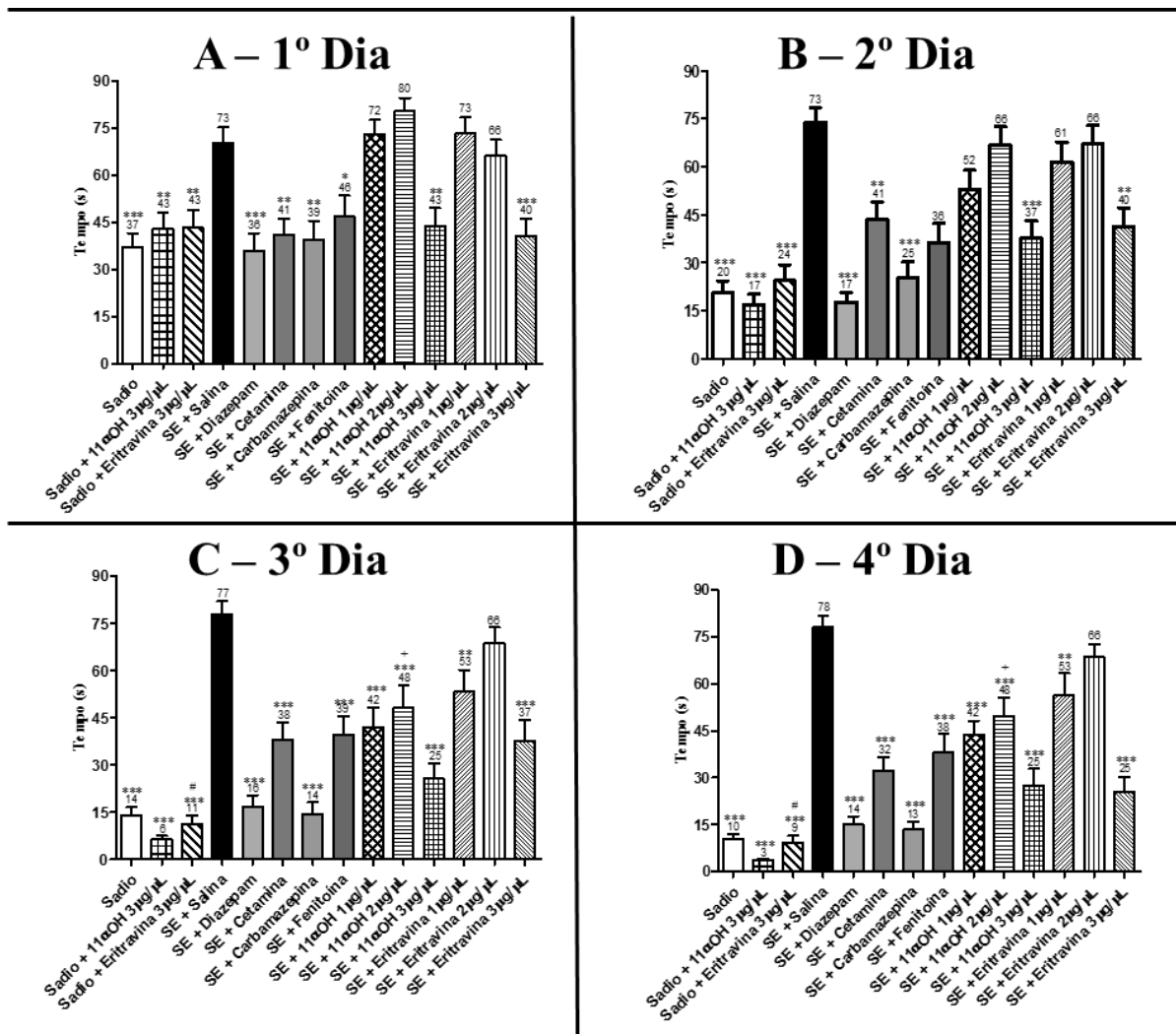
Com relação aos alcaloides de estudo, constatou-se diferenças significativas apenas entre os grupos de animais tratados na dose 2 μ g/ μ L e induzidos de SE, com tempo menor para (+)-11 α -hidroxieritavina. Os grupos de animais que não foram induzidos ao SE e tratados com

os alcaloides em estudo também apresentaram diferença estatística, com tempo menor para (+)-11 α -hidroxieritravina [$F(13,485) = 21,35$; $p < 0,05$]. Para os animais sadios tratados com salina (sem SE) e aqueles tratados com os alcaloides (sem SE) não houve diferença significativa (Figura 24C).

No quarto, e último dia de treinamento, novamente observamos que os animais tratados com os fármacos comerciais, (+)-eritravina 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ e os grupos de animais que não foram induzidos ao SE continuaram a diminuir o tempo de latência de escape quando comparados aos dias anteriores. Os animais induzidos ao SE e tratados com salina registraram o maior tempo dos quatro dias de treinamento e os animais tratados com as diferentes doses de (+)-11 α -hidroxieritravina e as menores doses de (+)-eritravina permaneceram com a mesma latência do dia anterior (Figura 24D).

Quando comparado o tempo para encontrar a plataforma de todos os grupos de animais este demonstrou-se menor àquele registrado pelo grupo de animais induzidos ao SE e tratados com salina. Os grupos de animais que não foram induzidos ao SE e tratados com os alcaloides em estudo também apresentaram diferença estatística, com tempo menor para (+)-11 α -hidroxieritravina [$F(13,485) = 31,94$; $p < 0,05$]. Para os animais sadios tratados com salina (sem SE) e aqueles tratados com os alcaloides (sem SE) não houve diferença significativa (Figura 24D).

Figura 24 - Média das latências de escape para encontrar a plataforma durante os dias de treinamento



Dados analisados pelo teste de Anova de uma via, seguido pelo pós-teste de Newman-keuls, sendo * para diferença estatística contra animais submetidos ao SE e tratados com salina com $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$; *** para $p < 0,001$; + para diferença estatística contra animais submetidos ao SE e tratados com (+)-eritravina 2 μ g/ μ L com $p < 0,05$; e # para diferença estatística contra animais sadios tratados com (+)-11 α -hidroxieritravina 3 μ g/ μ L com $p < 0,05$.

Como uma avaliação final obtida no teste do Labirinto Aquático de Morris foi realizado o *probe trial* onde a plataforma é retirada para verificar a retenção de memória/aprendizagem. Os dados apresentados demonstram que todos os grupos de animais não induzidos ao SE e aqueles que foram induzidos ao SE e tratados com os diferentes fármacos comerciais e/ou diferentes doses dos alcaloides em estudo permaneceram por mais tempo no quadrante onde se encontrava a plataforma quando comparado ao grupo de animais induzidos ao SE e tratados com salina (Tabela 7).

Muito embora tenham sido usadas vias de administração diferentes, os resultados dos animais induzidos ao SE e tratados com as diferentes doses dos alcaloides ou induzidos ao SE

e tratados com as diferentes drogas de escolha foram bastante similares entre si, assim como para os animais sadios tratados com salina (sem SE). Não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os animais induzidos ao SE e tratados com as mesmas doses dos alcaloides estudados, assim como entre os animais que não foram induzidos ao SE (sadios) e tratados com os alcaloides [$F(13,80) = 7,706$, $p < 0,05$] (Tabela 7).

Tabela 7 - Média do tempo nos quadrantes durante o *probe trial*

Quadrante (Q) / Grupos dos animais	Q alvo	Q2	Q3	Q4
Sadios + salina	33±6 ^{***}	21±1	18±3	18±3
Sadios + (+)-11 α -hidroxieritravina 3 μ g/ μ L	45±1 ^{***}	17±1	13±2	15±2
Sadios + (+)-eritravina 3 μ g/ μ L	43±2 ^{***}	18±1	15±1	14±1
SE + Salina	18±2	29±10	20±6	23±7
SE + Diazepam	38±5 ^{***}	20±1	14±4	18±1
SE + Cetamina	29±5 [*]	24±6	17±2	20±4
SE + Carbamazepina	33±4 ^{**}	18±2	18±2	21±2
SE + Fenitoína	35±5 ^{***}	18±4	20±7	17±5
SE + (+)-11 α -hidroxieritravina 1 μ g/ μ L	32±5 [*]	24±6	16±3	18±3
SE + (+)-11 α -hidroxieritravina 2 μ g/ μ L	30±3 [*]	22±1	20±3	18±1
SE + (+)-11 α -hidroxieritravina 3 μ g/ μ L	30±4 [*]	20±1	19±2	21±1
SE + (+)-eritravina 1 μ g/ μ L	29±3 [*]	24±2	18±4	19±2
SE + (+)-eritravina 2 μ g/ μ L	27±1 [*]	22±1	19±1	21±1
SE + (+)-eritravina 3 μ g/ μ L	28±1 [*]	19±1	19±3	24±2

Dados analisados pelo teste de Anova de uma via, seguido pelo pós-teste de Newman-keuls, sendo * para diferença estatística contra animais submetidos ao SE e tratados com salina com $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

Em conclusão, os resultados obtidos no teste do labirinto aquático de Morris mostram originalmente que os alcaloides estudados, além da já conhecida atividade ansiolítica e anticonvulsivante, esta última reforçada neste trabalho, apresentam também efeito positivo e progressivo no desempenho de aprendizagem/memória e na retenção de memória dos animais tratados em relação a grupos controles. Dito de outro modo, diferentes doses dos alcaloides em estudo apresentam efeito protetor da memória/cognição. Este último achado é de marcado interesse no contexto da epilepsia e de seu tratamento (D'HOOGHE e DE DEYN, 2001).

4.5 ENSAIOS HISTOLOGICOS

As técnicas de histologia e imunohistoquímica usadas neste trabalho e para as regiões hipocâmpais da CA1, CA3 e HGD são significativamente úteis para a qualificação e quantificação do grau de lesão hipocâmpal, medido através da viabilidade neuronal, organização celular e gliose reativa. Isso implica em editar uma correlação, ao menos em nível celular, com os comportamentos observados para os animais pertencentes a diferentes grupos controles e experimentais (CAVARSAN et al., 2013; ARAUJO et al., 2014). A escolha do hipocampo e de suas regiões CA1, CA3 e HGD em específico se deve ao fato de serem as áreas mais sensíveis e afetadas em decorrência da ação epileptiforme (CAVARSAN et al., 2013; ARAUJO et al., 2014). De fato, após a indução ao SE e durante o período em que não são observadas crises recorrentes espontâneas, as células granulares do Giro Denteado e da CA1 estão hiperexcitadas conforme descrito para diversos modelos animais, incluindo o de pilocarpina. Esta hiperexcitabilidade é decorrente da perda de neurônios hilares do Giro Denteado, induzindo o brotamento de axônios de células granulares sendo estes axônios projetados para o Giro Denteado e, conseqüentemente, contribuindo para a hiperexcitabilidade do hipocampo na ELT (NAVIDHAMIDI, GHASEMI e MEHRANFARD, 2017).

Além da perda desses neurônios, ocorre também a degeneração de neurônios piramidais da região da CA3 e com maior proporção na região da CA1 (NAVIDHAMIDI, GHASEMI e MEHRANFARD, 2017). Ademais, as células gliais são rapidamente ativadas após convulsões induzidas por pilocarpina e aparecem acumuladas na região de esclerose hipocâmpal, no que é conhecido por gliose reativa (NAVIDHAMIDI, GHASEMI e MEHRANFARD, 2017). A gliose reativa pode desencadear a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como e principalmente interleucinas (ILs) e quimiocinas, que podem promover a hiperexcitabilidade adicional das células granulares (NAVIDHAMIDI, GHASEMI e MEHRANFARD, 2017).

As alterações celulares e moleculares descritas podem se tratar a princípio de uma tentativa biológica de recuperação/defesa frente à gravidade das lesões hipocâmpais. Contudo, essa reorganização pode ser também e simultaneamente a responsável pela manutenção e progressão ELT, bem como explicar a alta refratariedade frente ao tratamento da ELT (PITKÄNEN e SUTULA, 2002; ANDRADE-VALENÇA et al., 2006). Estudos em humanos e animais mostram que o insulto que inicia a epilepsia, como a febre descontrolada, o trauma e as doenças cerebrovasculares induzem a epileptogênese. A epileptogênese repercute nas lesões hipocâmpais, caracterizadas pela esclerose desta estrutura, com o aparecimento subsequente das crises recorrentes em escala crônica (CENDES et al., 2014).

4.5.1 Histologia com coloração hematoxilina-eosina

Neste trabalho e em referência às análises de neuroproteção em nível celular foram observadas a dispersão das células hipocampais hilares e a densidade das células da camada granular por meio da coloração de Hematoxilina e Eosina (HE). Sendo assim, para os animais saudáveis que não foram induzidos ao SE e tratados com salina ou com a dose de $3\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de cada alcaloide do estudo, observou-se que as células hilares se mostraram bem organizadas conforme demonstrado na Figura 25A-C. O mesmo é verdadeiro para os animais doentes induzidos ao SE e tratados com diazepam, cetamina, fenitoína, carbamazepina e/ou com as três doses de cada alcaloide (Figura 25E-N).

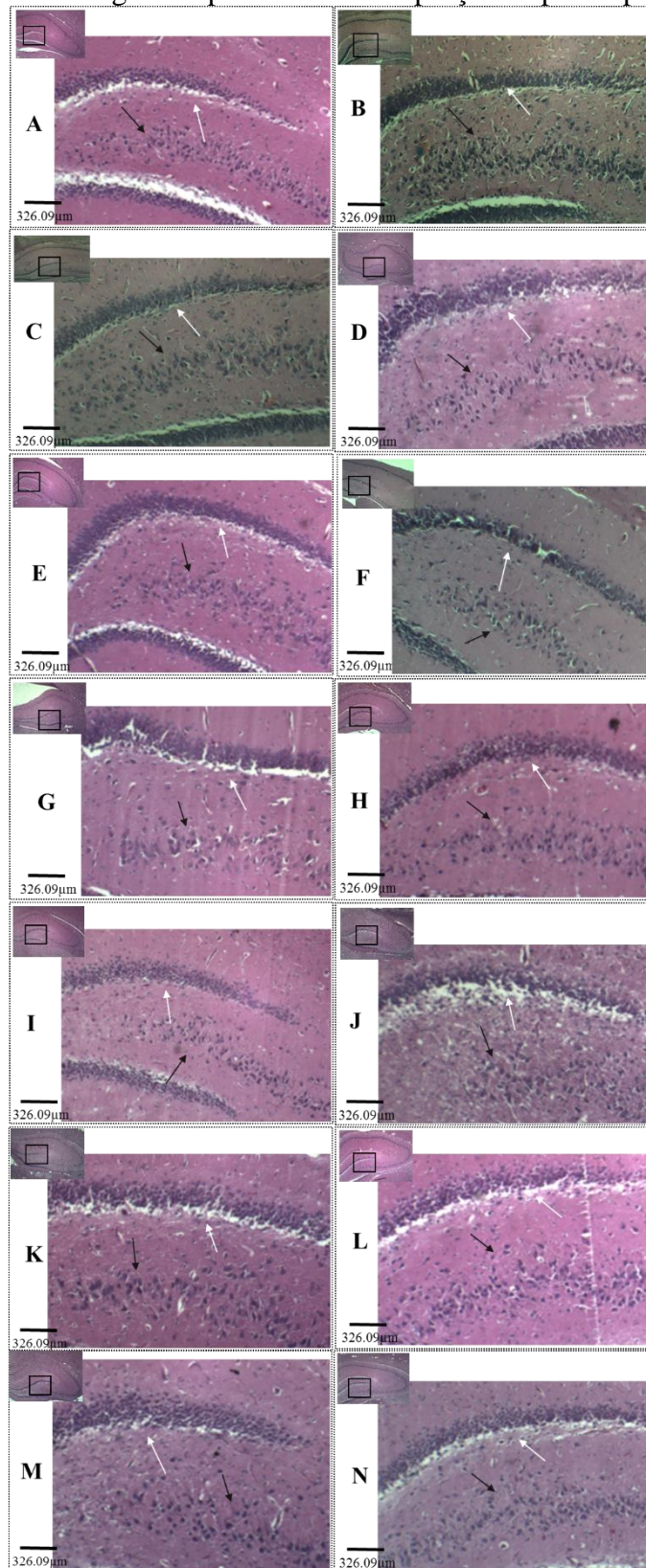
Em contrapartida, os animais doentes (grupo controle negativo - animais induzidos ao SE e tratados apenas com salina) apresentaram a camada das células hilares dispersas e desorganizadas (Figura 25D), demonstrando maior nível de dano hipocampal. As medições quantitativas por meio da metodologia por Cavalieri confirmaram estas observações, sendo todos os grupos de animais significativamente diferentes dos animais induzidos ao SE e tratados com salina [$F(12,72) = 19,22, p < 0,05$].

Os resultados demonstraram que os grupos de animais não induzidos de SE e tratados com salina e/ou com os alcaloides dispunham de camada granular preservada, bem organizada e compactada quando avaliada para o quesito morfológico de densidade/espessura (Figura 25A-C). O mesmo também foi verdadeiro para os grupos de animais induzidos ao SE e tratados com os fármacos de escolha (diazepam, carbamazepina, fenitoína e cetamina) e/ou todas as doses de ambos os alcaloides (Figura 25E-N).

Todavia, no grupo controle negativo (SE + salina), a camada granular se apresentou mais espessa, em virtude da maior dispersão e desorganização das células, refletindo maior desarranjo morfológico desta estrutura, e, pois, maior dano hipocampal (Figura 25D). Estas observações foram também confirmadas por meio da metodologia por Cavalieri indicando diferença estatística com relação à espessura da camada granular entre os diferentes grupos comparados ao de animais induzidos de SE e tratados apenas com salina [$F(12,72) = 8,088, p < 0,05$].

Para ambos as avaliações, dispersão das células hipocampais hilares e densidade das células da camada granular, não foram observadas diferenças significativas entre os animais tratados com as mesmas doses dos alcaloides (+)-eritavina e (+)-11 α -hidroxieritavina tanto na ausência quanto presença do SE.

Figura 25 - Cortes histológicos representativos de porções hipocâmpais (Coloração HE)



Animais não submetidos ao SE tratados com: A) salina (0,9%); B) (+)-11 α -hidroxieritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); C) (+)-eritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Animais pós-indução do SE tratados com: D) salina (0,9%); E) Cetamina (60 mg/kg); F) Carbamazepina (120 mg/kg); G) Fenitoína (60 mg/kg); H) Diazepam (2 mg/kg); I) (+)-eritravina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); J) (+)-eritravina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); K) (+)-eritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); L) (+)-11 α -hidroxieritravina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); M) (+)-11 α -hidroxieritravina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); N) (+)-11 α -hidroxieritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Secções de 5 μm , visualizadas em aumento de 50x. As setas brancas indicam a camada granular e as setas pretas indicam as células hipocâmpais hilares.

4.5.2 Histologia com coloração de Nissl

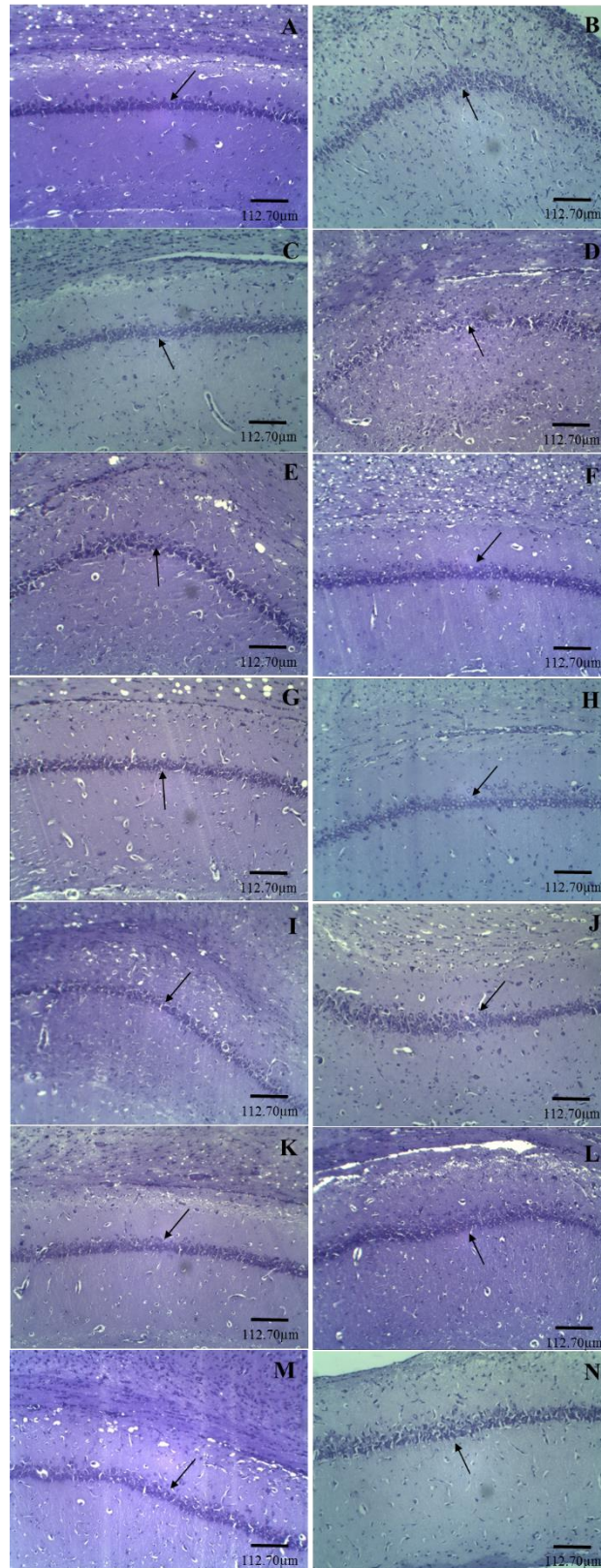
No que tange a Coloração Nissl aplicada a este trabalho: após submeter os animais ao SE ou não, tratá-los por 4 dias consecutivos, as análises quantitativas da viabilidade neuronal para cada região hipocampal analisada estão representadas na figura 27 para a região da CA1, figura 29 para a região da CA3 e na figura 31 para a região HDG. Imagens representativas de cada um dos grupos controles ou experimentais submetidos ou não ao SE estão apresentadas na figura 26 para a região CA1, na figura 28 para a região CA3 e na figura 30 para a região HGD.

Os resultados obtidos para a região CA1 comprovaram um número maior de perfis de células viáveis em todos grupos de animais submetidos ao SE e tratados com os fármacos comerciais ou quaisquer doses dos alcaloides em estudo quando comparados aos animais do grupo controle negativo (SE + salina) [F(13,91) = 5,276, $p < 0,05$ -hipocampo direito] [F(13,87) = 4,750, $p < 0,05$ - hipocampo esquerdo] (Figura 27A e B).

Quando se confrontou o número de perfis de células dos grupos de animais sadios que não foram induzidos ao SE e tratados com salina, (+)-eritrovina ou (+)-11 α -hidroxieritrovina, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre eles (Figura 27A e B).

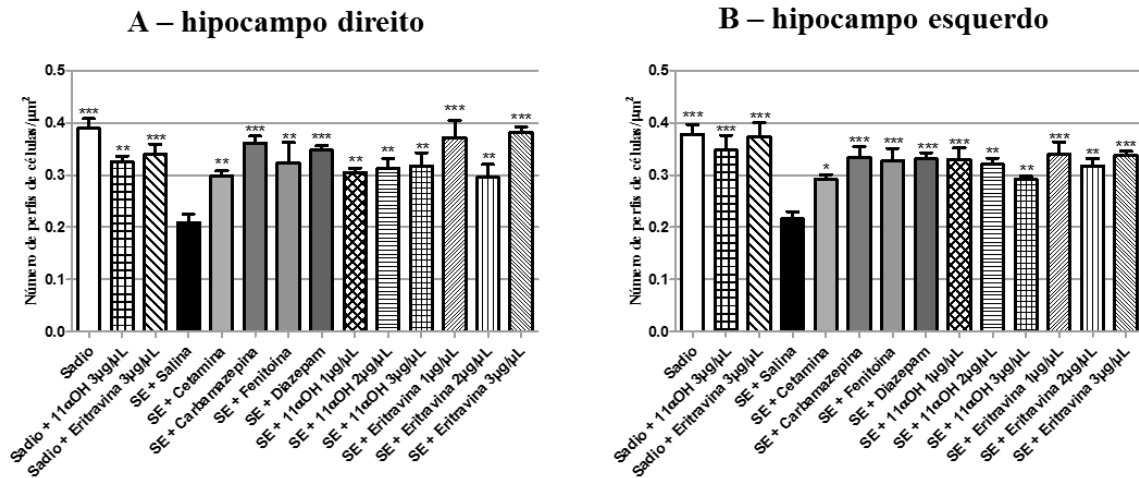
Da mesma forma, os resultados foram semelhantes quando analisou-se os grupos de animais induzidos ao SE e que receberam as mesmas doses de (+)-eritrovina ou (+)-11 α -hidroxieritrovina [F(13,91) = 5,276, $p < 0,05$ - hipocampo direito] [F(13,87) = 4,750, $p < 0,05$ -hipocampo esquerdo] (Figura 27A e B). Ademais, a comparação entre o número de perfis viáveis entre os lados ipsilateral e contralateral para região CA1 também não mostra diferenças significativas para cada um dos grupos controles ou experimentais analisados [F(27,251) = 0,8513, $p < 0,05$] (Figura 27A e B).

Figura 26 – Cortes histológicos representativos da região hipocampal CA1 (Coloração Nissl)



Animais não submetidos ao SE tratados com: A) salina (0,9%); B) (+)-11 α -hidroxieritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); C) (+)-eritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Animais pós-indução do SE tratados com: D) salina (0,9%); E) Cetamina (60 mg/kg); F) Carbamazepina (120 mg/kg); G) Fenitoína (60 mg/kg); H) Diazepam (2 mg/kg); I) (+)-eritravina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); J) (+)-eritravina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); K) (+)-eritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); L) (+)-11 α -hidroxieritravina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); M) (+)-11 α -hidroxieritravina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); N) (+)-11 α -hidroxieritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Secções de 5 μm , visualizadas em aumento de 100x. As setas pretas indicam a região CA1.

Figura 27 – Quantidade de perfis celulares viáveis na região hipocampal CA1 (Coloração Nissl)



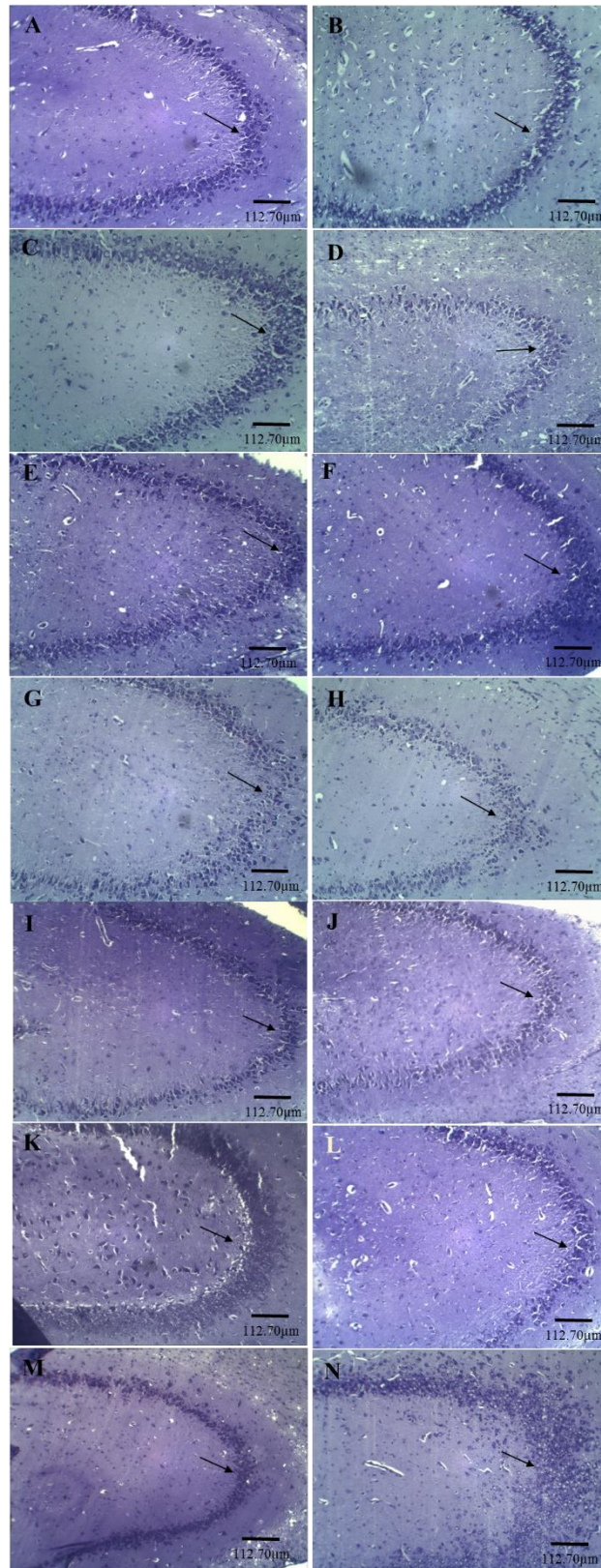
Dados analisados pelo teste de Anova de uma via, seguido pelo pós-teste de Newman-keuls, diferença estatística contra animais submetidos ao SE e tratados com salina sendo: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

Os resultados para a região CA3 apresentaram diferenças significativas entre o grupo controle negativo (SE + salina) e todos os grupos de animais que foram induzidos ao SE e tratados com as diferentes doses de ambos os alcaloides ou fármacos comerciais de escolha, quando comparada a viabilidade celular entre os mesmos [$F(13,88) = 4,575$, $p < 0,05$ -hipocampo direito] [$F(13,87) = 14,450$, $p < 0,05$ -hipocampo esquerdo] (Figura 29A e B).

Quando comparados os lados ipsilateral e contralateral não foi constatada diferença estatística significativa para cada um dos grupos analisados [$F(27,176) = 6,515$, $p < 0,05$] (Figura 29A e B), assim como, entre os grupos de animais sadios que não foram induzidos ao SE e tratados com salina com os grupos de animais de mesma condição e tratados com ambos os alcaloides [$F(13,88) = 4,575$, $p < 0,05$ -hipocampo direito] [$F(13,87) = 14,450$, $p < 0,05$ -hipocampo esquerdo] (Figura 29A e B).

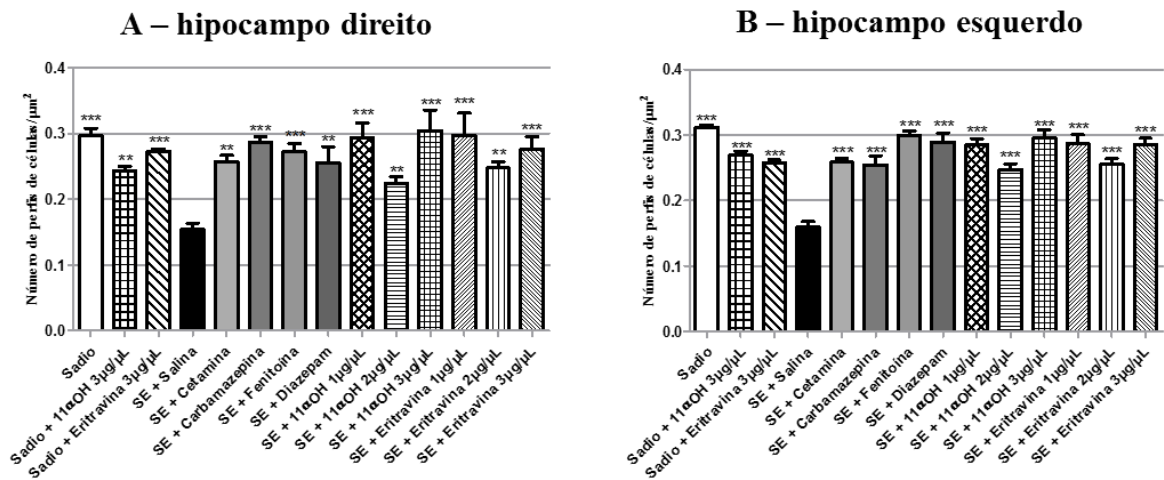
Da mesma maneira, os animais induzidos ao SE e tratados com as mesmas doses de ambos os alcaloides não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si [$F(13,88) = 4,575$, $p < 0,05$ -hipocampo direito] [$F(13,87) = 14,450$, $p < 0,05$ -hipocampo esquerdo] (Figura 29A e B).

Figura 28 - Cortes histológicos representativos da região hipocampal CA3 (Coloração Nissl)



Animais não submetidos ao SE tratados com: A) salina (0,9%); B) (+)-11 α -hidroxieritavina (3 μ g/ μ L); C) (+)-eritavina (3 μ g/ μ L). Animais pós-indução do SE tratados com: D) salina (0,9%); E) Cetamina (60 mg/kg); F) Carbamazepina (120 mg/kg); G) Fenitoína (60 mg/kg); H) Diazepam (2 mg/kg); I) (+)-eritavina (1 μ g/ μ L); J) (+)-eritavina (2 μ g/ μ L); K) (+)-eritavina (3 μ g/ μ L); L) (+)-11 α -hidroxieritavina (1 μ g/ μ L); M) (+)-11 α -hidroxieritavina (2 μ g/ μ L); N) (+)-11 α -hidroxieritavina (3 μ g/ μ L). Secções de 5 μ m, visualizadas em aumento de 100x. As setas pretas indicam a região CA3.

Figura 29 - Quantidade de perfis celulares viáveis na região hipocampal CA3 (Coloração Nissl)

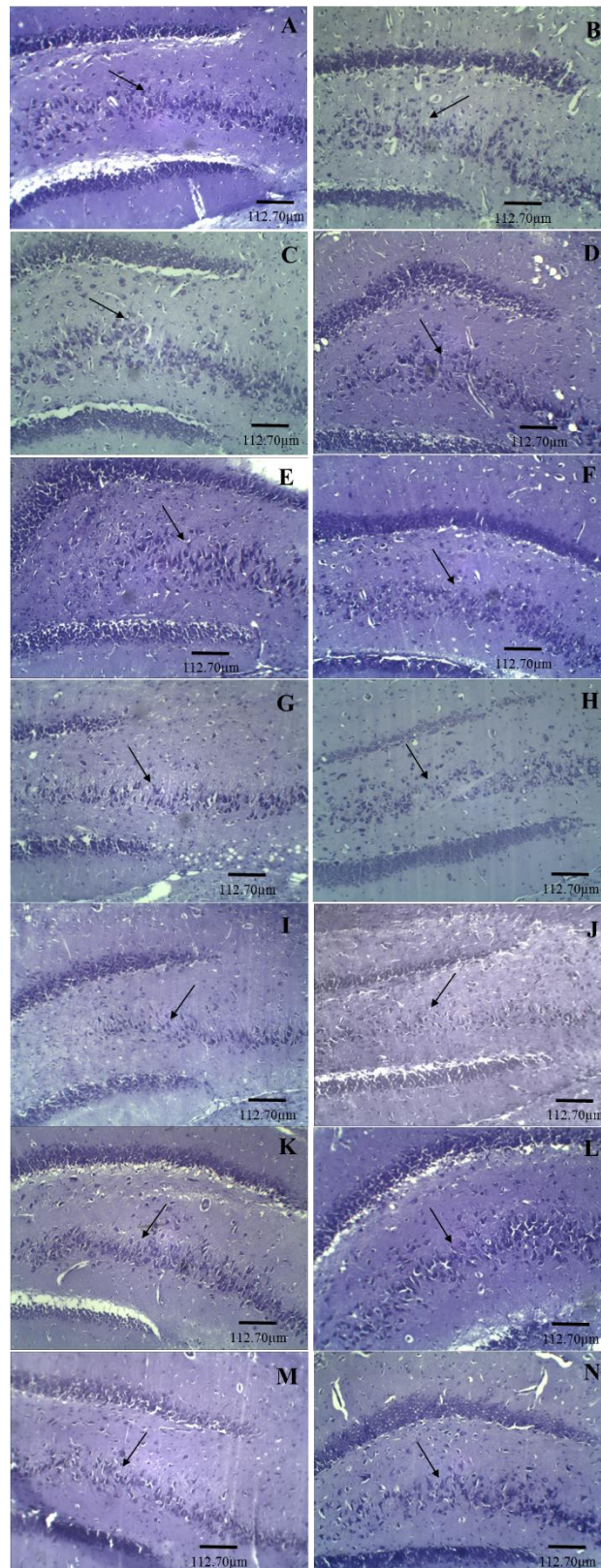


Dados analisados pelo teste de Anova de uma via, seguido pelo pós-teste de Newman-keuls, diferença estatística contra animais submetidos ao SE e tratados com salina sendo: ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

Da mesma maneira que para as regiões CA1 e CA3, os resultados apresentados para a região HGD apontaram uma quantidade de perfis de células viáveis significativamente menor para os animais do grupo controle negativo (SE + salina) quando comparados aos grupos de animais SE tratados com as diferentes doses de cada alcaloide ou fármacos de escolha [$F(13,91) = 2,827$, $p < 0,05$ - hipocampo direito] [$F(13,88) = 6,235$, $p < 0,05$ - hipocampo esquerdo] (Figura 31A e B).

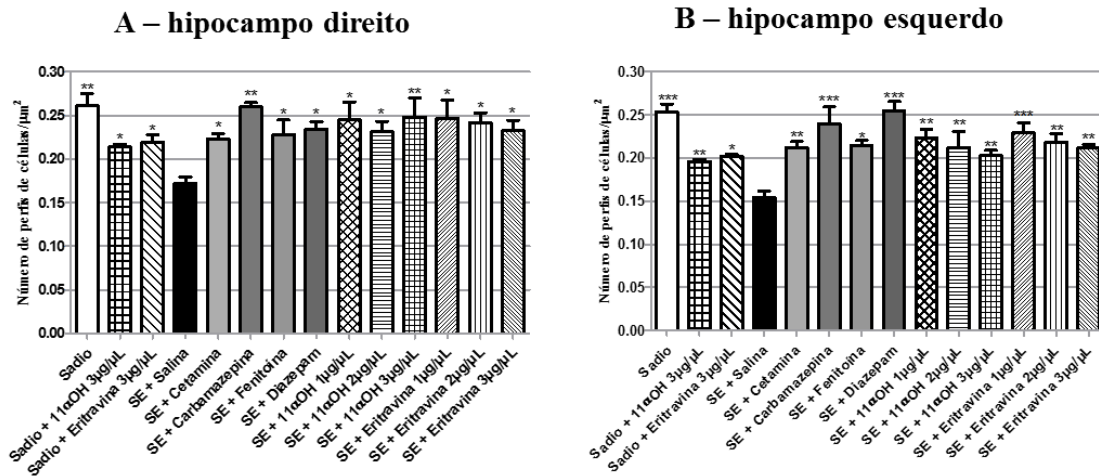
Mais uma vez, quando o desempenho dos alcaloides foi comparado para doses iguais, nenhuma diferença estatística foi notada tanto na condição de SE quanto na ausência deste último. Nenhuma diferença também é notada entre os grupos tratados com alcaloides ou salina na ausência de SE (animais sadios) [$F(13,91) = 2,827$, $p < 0,05$ - hipocampo direito] [$F(13,88) = 6,235$, $p < 0,05$ - hipocampo esquerdo] (Figura 31A e B). Finalmente, defrontando-se os resultados dos lados ipsilateral e contralateral não foram observadas diferenças estatísticas significativas para qualquer um dos grupos controles ou experimentais analisados [$F(27,177) = 4,659$, $p < 0,05$] (Figura 31A e B).

Figura 30 - Cortes histológicos representativos da região hipocampal HGD (Coloração Nissl)



Animais não submetidos ao SE tratados com: A) salina (0,9%); B) (+)-11 α -hidroxieritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); C) (+)-eritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Animais pós-indução do SE tratados com: D) salina (0,9%); E) Cetamina (60 mg/kg); F) Carbamazepina (120 mg/kg); G) Fenitoína (60 mg/kg); H) Diazepam (2 mg/kg); I) (+)-eritravina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); J) (+)-eritravina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); K) (+)-eritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); L) (+)-11 α -hidroxieritravina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); M) (+)-11 α -hidroxieritravina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); N) (+)-11 α -hidroxieritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Secções de 5 μm , visualizadas em aumento de 100x. As setas pretas indicam a região HGD.

Figura 31 - Quantidade de perfis celulares viáveis na região hipocampal HGD (Coloração Nissl)



Dados analisados pelo teste de Anova de uma via, seguido pelo pós-teste de Newman-keuls, diferença estatística contra animais submetidos ao SE e tratados com salina sendo: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

4.5.3 Imunohistoquímica com anticorpo NeuN

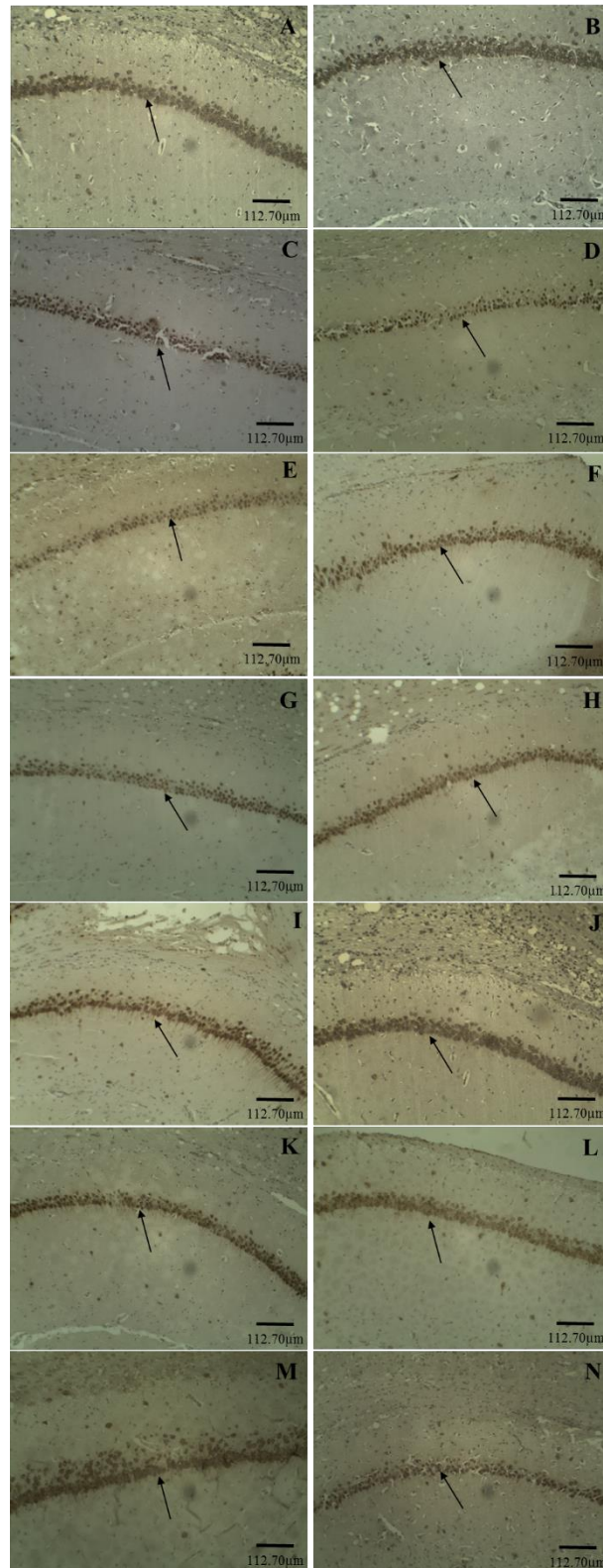
No intuito de completar os estudos histológicos utilizou-se o anticorpo NeuN para a coloração por Imunohistoquímica. O anticorpo NeuN é uma proteína de ligação específica no DNA neuronal apresentando a vantagem de identificar e ligar-se ao núcleo celular mesmo antes do término da diferenciação da célula em neurônio (GUSEL'NIKOVA e KORZHEVSKIY, 2015).

No que tange a imunohistoquímica por NeuN, imagens representativas de cada um dos grupos controles ou experimentais submetidos ou não ao SE estão apresentadas na Figura 32 para a região CA1, na Figura 34 para a região CA3 e na Figura 36 para a região HGD. Os resultados quantitativos obtidos na análise dos perfis de células viáveis das regiões hipocampais CA1, CA3 e HGD dos animais submetidos ou não ao SE e tratados subcronicamente com salina, diferentes doses de cada alcaloide ou diferentes fármacos de escolha estão representados na figura 33 para a região da CA1, figura 35 para a região da CA3 e na figura 37 para a região do HDG.

Após a análise dos dados, observou-se um maior número de corpos celulares neuronais na região CA1 agora marcada com o anticorpo NeuN em todos os grupos de animais que receberam tratamento com as diferentes doses de cada alcaloide ou fármacos de escolha, assim como os animais sadios (salina ou alcaloides sem SE) quando comparados ao grupo controle negativo (SE + salina) tanto para o lado ipsilateral [$F(13,84) = 5,945$; $p < 0,05$] quanto para o lado contralateral [$F(13,77) = 6,504$; $p < 0,05$] (Figura 33).

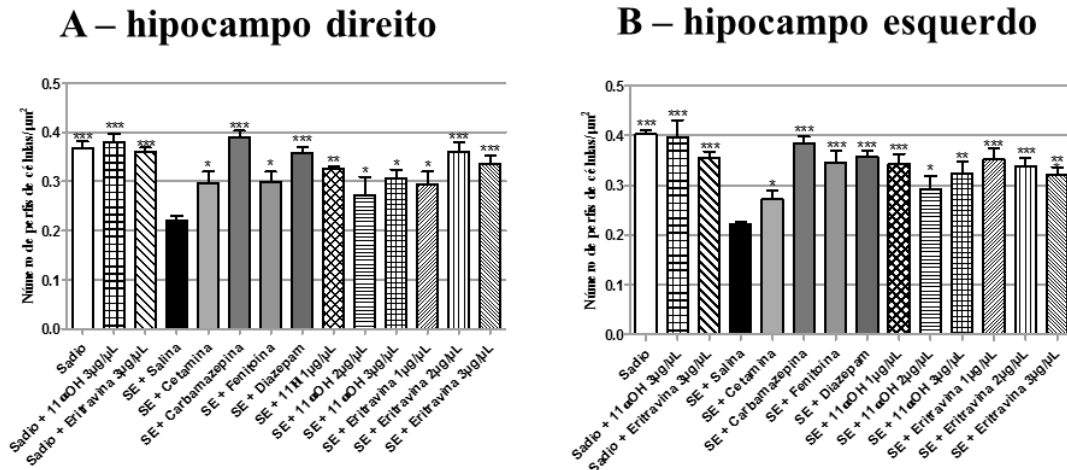
Assim e semelhante aos dados obtidos com a coloração por cristal violeta (Nissl), quando comparou-se os lados hipocâmpais não houve diferença significativa entre o número de corpos celulares neuronais para nenhum dos grupos controles ou experimentais analisados [$F(27,164) = 6,159$; $p < 0,05$], assim como, quando confrontou-se os dados obtidos dos grupos experimentais tratados com a mesma dose dos diferentes alcaloides submetidos ou não ao SE (Figura 33A e B).

Figura 32 - Cortes histológicos representativos da região hipocampal CA1 (Imunohistoquímica NeuN)



Animais não submetidos ao SE tratados com: A) salina (0,9%); B) (+)-11 α -hidroxieritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); C) (+)-eritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Animais pós-indução do SE tratados com: D) salina (0,9%); E) Cetamina (60 mg/kg); F) Carbamazepina (120 mg/kg); G) Fenitoína (60 mg/kg); H) Diazepam (2 mg/kg); I) (+)-eritravina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); J) (+)-eritravina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); K) (+)-eritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); L) (+)-11 α -hidroxieritravina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); M) (+)-11 α -hidroxieritravina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); N) (+)-11 α -hidroxieritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Secções de 5 μm , visualizadas em aumento de 100x. As setas pretas indicam a região CA1.

Figura 33 - Quantidade de perfis celulares da região hipocampal CA1 (Imunohistoquímica NeuN)

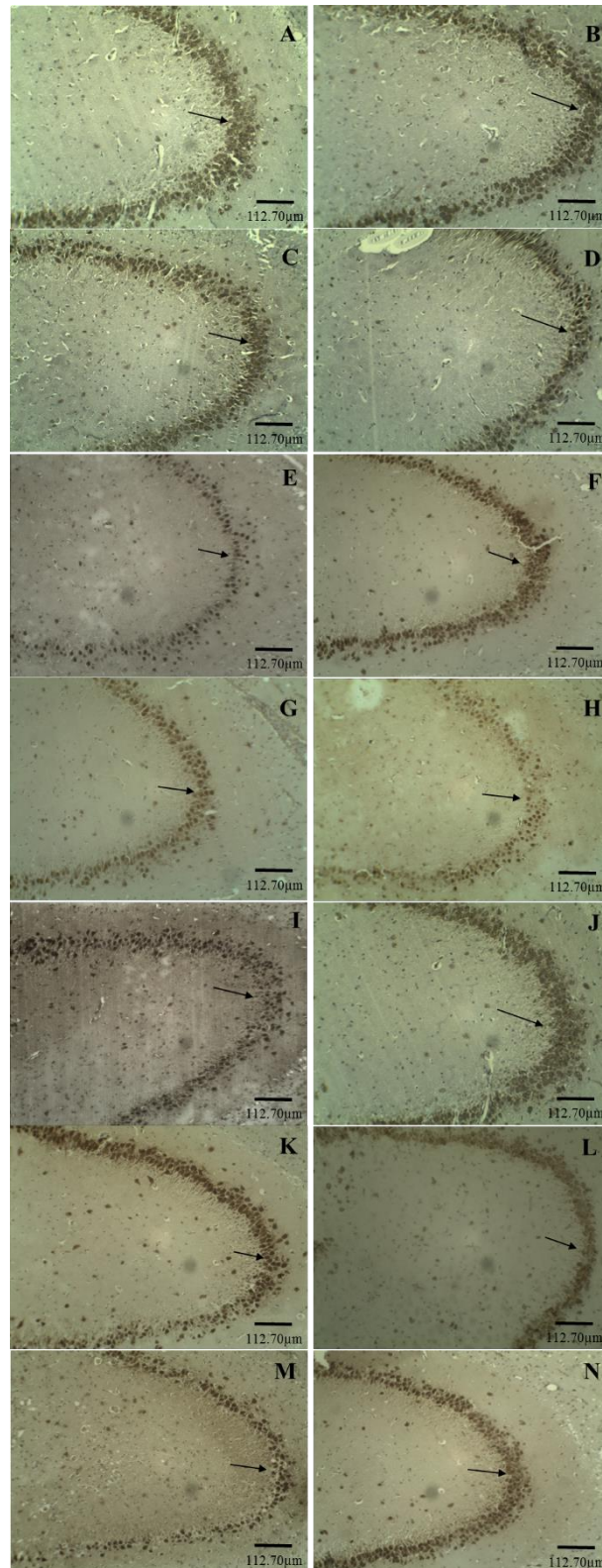


Dados analisados pelo teste de Anova de uma via, seguido pelo pós-teste de Newman-keuls, diferença estatística contra animais submetidos ao SE e tratados com salina sendo: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

Da mesma forma, para a região da CA3 os grupos de animais induzidos ao SE e tratados com as diferentes doses dos alcaloides, fármacos de escolha e mesmo o grupo de animais sadios (salina ou alcaloides sem SE) apresentaram uma maior marcação (maior número de corpos celulares neuronais) quando comparados ao grupo controle negativo (SE + salina) (Figura 34A-N).

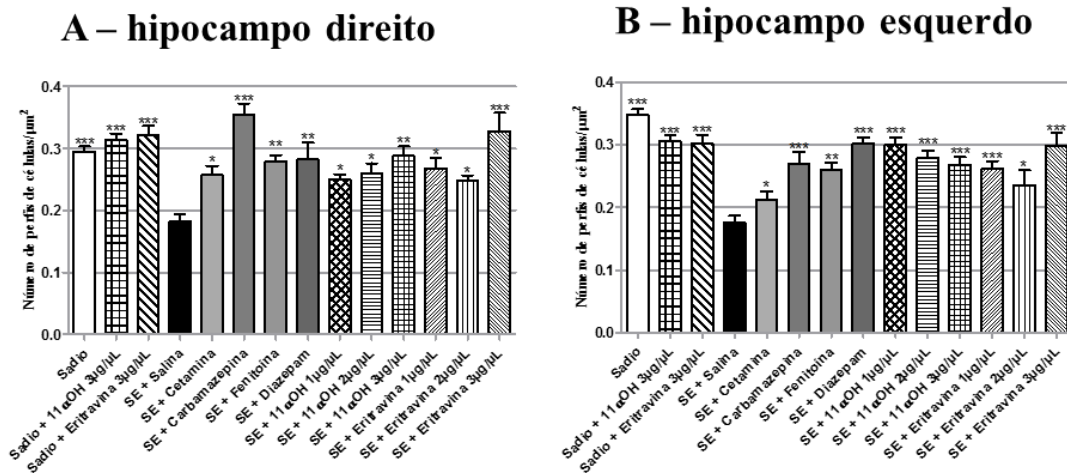
Sendo assim, foram apontadas diferenças significativas para o grupo controle negativo quando comparado aos demais grupos de animais [$F(13,76) = 6,655$; $p < 0,05$] e [$F(13,77) = 8,872$; $p < 0,05$], respectivamente para hipocampo direito e hipocampo esquerdo (Figura 35A e B), confirmando novamente a neuroproteção indicada pela técnica histológica de Nissl. Novamente não foram observadas diferenças estatísticas significativas quando comparados os grupos de animais tratados com a mesma dose dos alcaloides induzidos ou não de SE e os resultados de ambos os lados hipocampais para cada um dos grupos analisados no tocante a região CA3 [$F(27,156) = 6,767$; $p < 0,05$].

Figura 34 - Cortes histológicos representativos da região hipocampal CA3 (Imunohistoquímica NeuN)



Animais não submetidos ao SE tratados com: A) salina (0,9%); B) (+)-11 α -hidroxieritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); C) (+)-eritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Animais pós-indução do SE tratados com: D) salina (0,9%); E) Cetamina (60 mg/kg); F) Carbamazepina (120 mg/kg); G) Fenitoína (60 mg/kg); H) Diazepam (2 mg/kg); I) (+)-eritravina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); J) (+)-eritravina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); K) (+)-eritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); L) (+)-11 α -hidroxieritravina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); M) (+)-11 α -hidroxieritravina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); N) (+)-11 α -hidroxieritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Secções de 5 μm , visualizadas em aumento de 100x. As setas pretas indicam a região CA3.

Figura 35 - Quantidade de perfis celulares da região hipocampal CA3 (Imunohistoquímica NeuN)



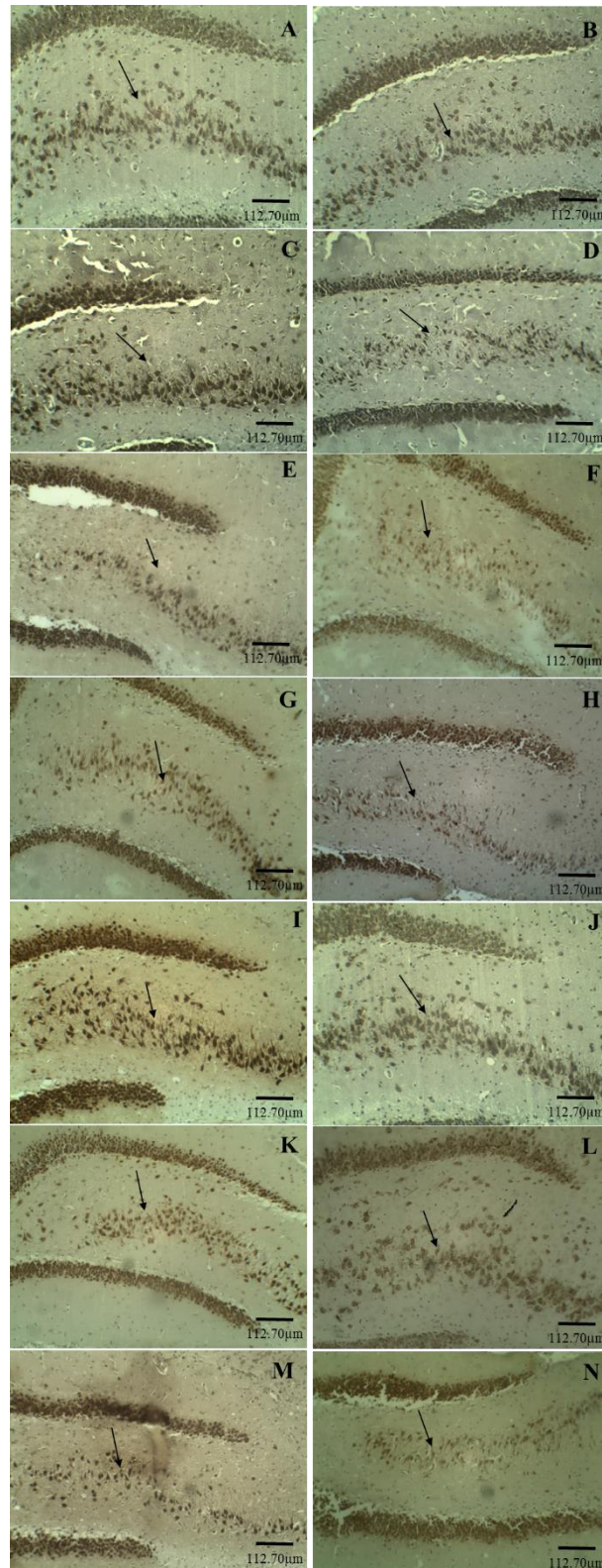
Dados analisados pelo teste de Anova de uma via, seguido pelo pós-teste de Newman-keuls, diferença estatística contra animais submetidos ao SE e tratados com salina sendo: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

Com relação ao número de perfis de células na região do HGD, os dados obtidos foram semelhantes àqueles encontrados para a coloração de Nissl e mesmo para quando avaliada a marcação por NeuN em CA1 e CA3 (Figura 364A-N).

Repetidamente, o número de perfis de células viáveis foi significativamente menor no grupo dos animais induzidos ao SE e tratados apenas com salina quando comparado à todos os outros grupos analisados, incluindo aqueles com as diferentes doses dos alcaloides na presença ou ausência de SE [$F(13,78) = 3,332$; $p < 0,05$ - hipocampo direito] e [$F(13,77) = 4,028$; $p < 0,05$ - hipocampo esquerdo], mostrando assim maior proteção neuronal para estes últimos grupos.

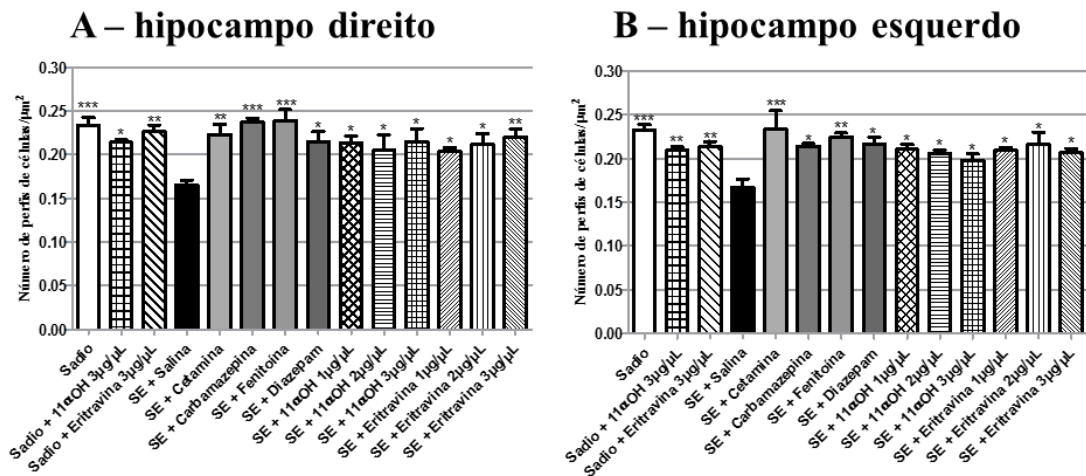
Após a análise para esta região, novamente não foram constatadas diferenças estatísticas significativas quando comparou-se os grupos de animais tratados com a mesma dose dos alcaloides em estudo na presença ou ausência de SE, assim como para os resultados de ambos os lados hipocampais analisados para cada um dos grupos estudados [$F(27,416) = 7,183$; $p < 0,05$] (Figura 37A e B).

Figura 36 - Cortes histológicos representativos da região hipocampal HGD (Imunohistoquímica NeuN)



Animais não submetidos ao SE tratados com: A) salina (0,9%); B) (+)-11 α -hidroxieritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); C) (+)-eritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Animais pós-indução do SE tratados com: D) salina (0,9%); E) Cetamina (60 mg/kg); F) Carbamazepina (120 mg/kg); G) Fenitoína (60 mg/kg); H) Diazepam (2 mg/kg); I) (+)-eritravina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); J) (+)-eritravina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); K) (+)-eritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); L) (+)-11 α -hidroxieritravina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); M) (+)-11 α -hidroxieritravina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); N) (+)-11 α -hidroxieritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Secções de 5 μm , visualizadas em aumento de 100x. As setas pretas indicam a região HGD.

Figura 37 - Quantidade de perfis celulares da região hipocampal HGD (Imunohistoquímica NeuN)



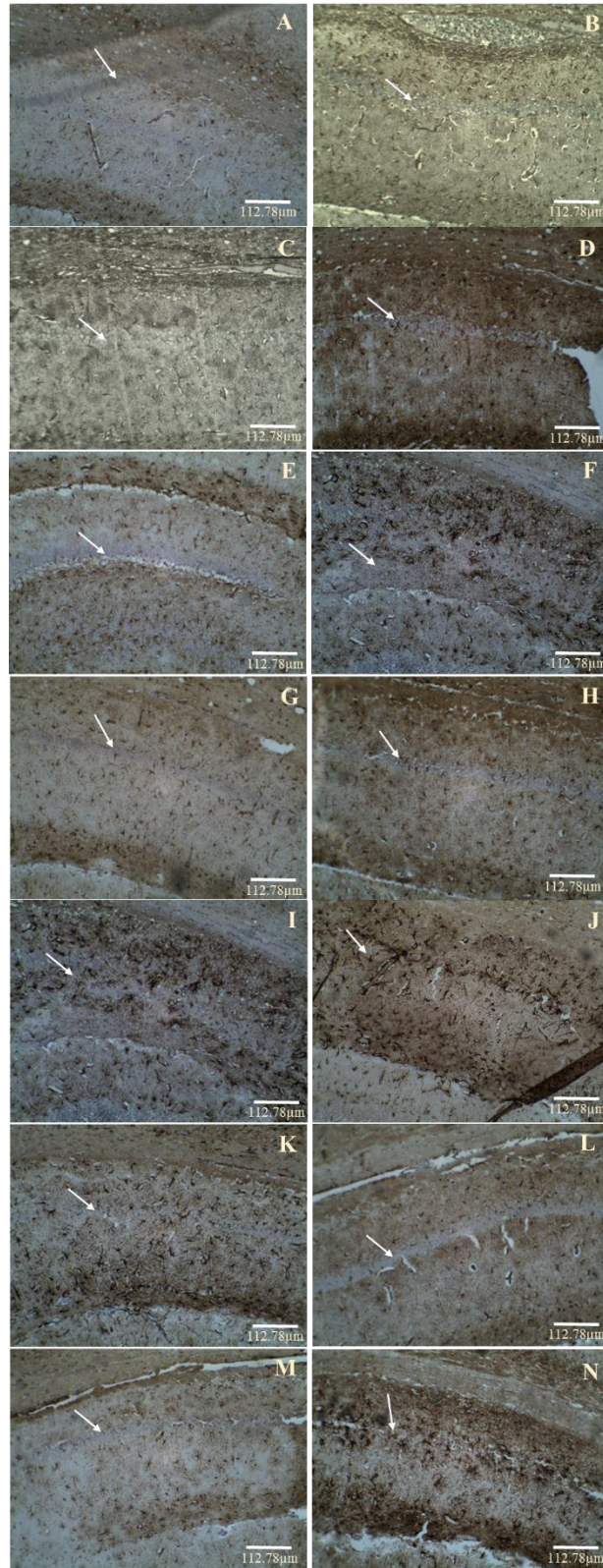
Dados analisados pelo teste de Anova de uma via, seguido pelo pós-teste de Newman-keuls, diferença estatística contra animais submetidos ao SE e tratados com salina sendo: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

4.5.4 Imunohistoquímica com anticorpo GFAP

Neste trabalho a gliose reativa foi medida através da imunohistoquímica usando o marcador bioquímico GFAP. O GFAP é comumente utilizado no intuito de identificar acúmulo de astrócitos, estando estes em maior quantidade na presença de lesões no SNC (LEMONS e ALESSI, 1999). Neste contexto, imagens representativas de cada um dos grupos controles ou experimentais submetidos ou não ao SE estão apresentadas na figura 38 para a região CA1, na Figura 40 para a região CA3 e na Figura 42 para a região HGD. Os resultados quantitativos para células glias obtidos na análise dos cortes histológicos das regiões hipocampais CA1, CA3 e HGD dos animais submetidos ou não ao SE e tratados por 4 dias consecutivos com salina, diferentes doses de cada alcaloide ou diferentes fármacos de escolha estão representados na figura 39 para a região da CA1, figura 41 para a região da CA3 e na figura 43 para a região do HDG.

Com relação à região CA1, podemos observar a diferença na tonalidade da coloração na região do *stratum oriens* (localizado acima das células neuronais da CA1) (mais escura e com mais células glias) e *stratum lacunosum moleculare* (localizado entre as células da região CA1 e HGD) (mais clara e com menos células glias) quando comparamos os animais induzidos ao SE e tratados com salina (Figura 38D) com todos os animais dos outros grupos induzidos ou não de SE e tratados com as diferentes sendo eles induzidos ao SE e tratados com salina, diferentes doses de cada alcaloide e os diferentes fármacos de escolha (Figura 38E-H) ou com diferentes doses dos alcaloides (Figura 38I-N).

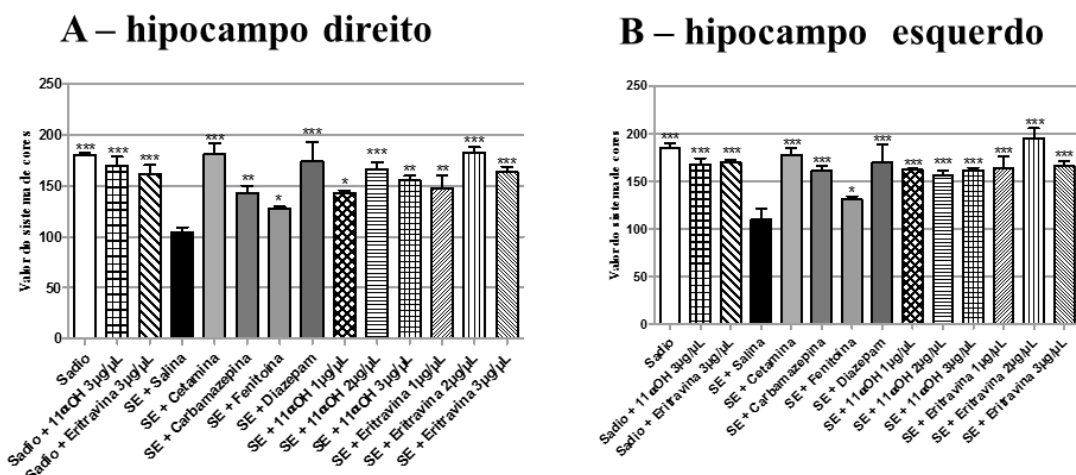
Figura 38 - Cortes histológicos representativos da região da CA1 no hipocampo (Imunohistoquímica GFAP)



Animais não submetidos ao SE tratados com: A) salina (0,9%); B) (+)-11 α -hidroxieritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); C) (+)-eritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Animais pós-indução do SE tratados com: D) salina (0,9%); E) Cetamina (60 mg/kg); F) Carbamazepina (120 mg/kg); G) Fenitoína (60 mg/kg); H) Diazepam (2 mg/kg); I) (+)-eritravina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); J) (+)-eritravina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); K) (+)-eritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); L) (+)-11 α -hidroxieritravina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); M) (+)-11 α -hidroxieritravina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); N) (+)-11 α -hidroxieritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Secções de 5 μm , visualizadas em aumento de 100x. As setas brancas indicam a região CA1.

A análise quantitativa por meio da distribuição da intensidade de cor demonstrou diferenças significativas para todos os grupos de animais induzidos ou não de SE e tratados salina, diferentes doses de alcaloides e fármacos comerciais contra o grupo controle negativo (SE + salina) nos lados hipocampais direito [F(13,64) = 8,399; p<0,05] e esquerdo [F(13,64) = 6,531; p<0,05] (Figura 39A e B). Com efeito, para o grupo controle negativo (SE + salina) o número de células gliais presentes é sempre maior. Todavia, não foram constatadas diferenças significativas entre os grupos de animais tratados com a mesma dose dos alcaloides quando comparados entre si na presença ou ausência de SE, assim como quanto aos lados hipocampais para cada um dos grupos analisados [F(27,126) = 7,433; p<0,05].

Figura 39 - Distribuição de glia através da intensidade da cor cinza na região da CA1 (Imunohistoquímica GFAP)

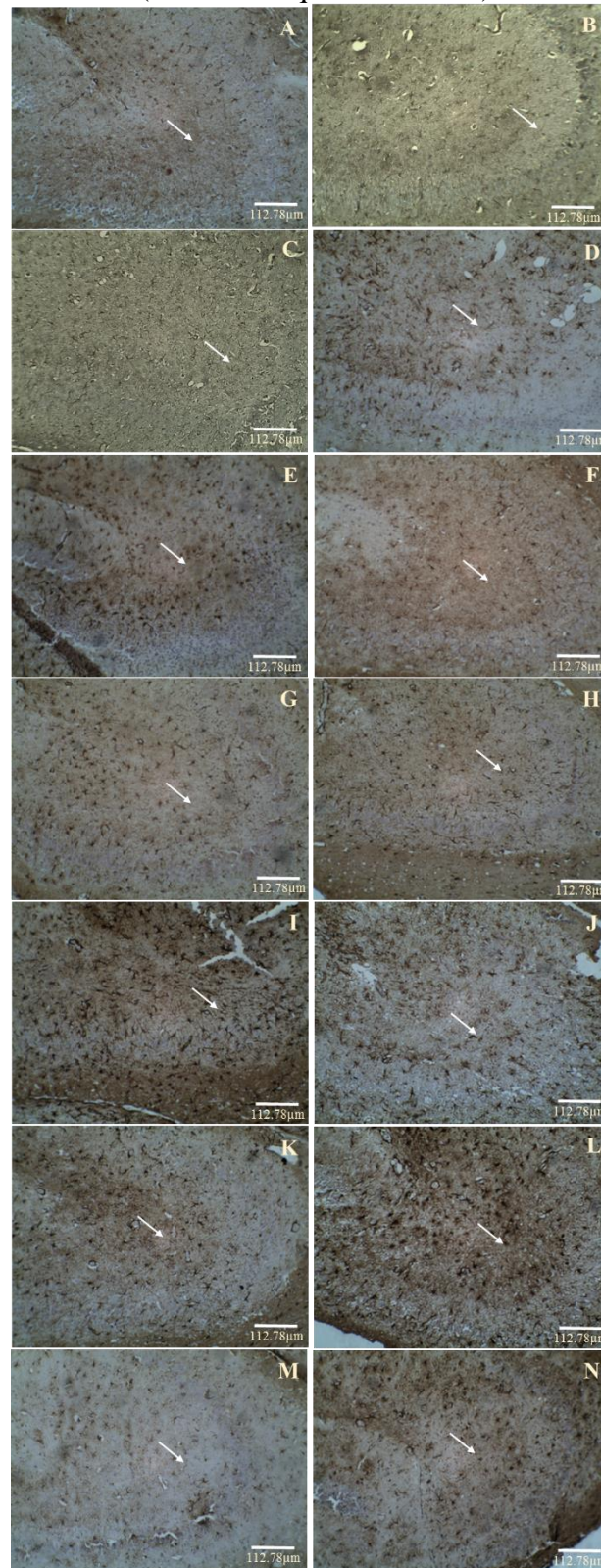


Dados analisados pelo teste de Anova de uma via, seguido pelo pós-teste de Newman-keuls, diferença estatística contra animais submetidos ao SE e tratados com salina sendo: * para p<0,05; ** para p<0,01 e *** para p<0,001.

Semelhante à observação para região anterior, é possível observar para os animais induzidos ou não de SE e que receberam, salina, as diferentes doses dos alcaloides ou mesmo os fármacos de escolha, colorações menos intensas na região da CA3 quando comparados aos animais do grupo controle negativo (SE + salina), indicando, pois, maior presença de células gliais para este último grupo (Figura 40A-N) [F(13,65) = 4,873; p<0,05] e [F(13,67) = 7,561; p<0,05], respectivamente para o lado direito e esquerdo (Figura 41A e B).

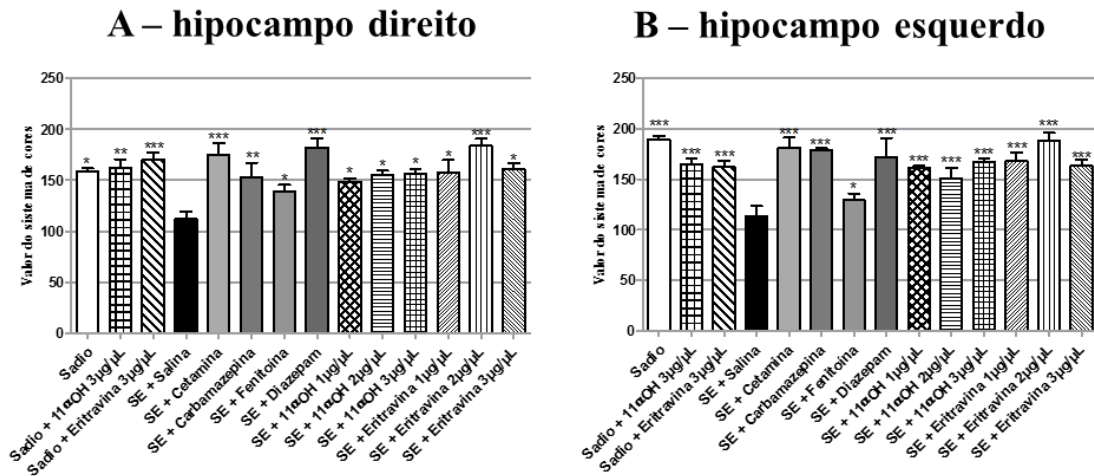
Assim como para a região CA1, não foram constatadas diferenças significativas entre as mesmas doses dos alcaloides (+)-eritravina e (+)-11 α -hidroxieritravina para animais submetidos ou não ao SE e nem mesmo entre os lados hipocampais para cada um dos grupos analisados [F(27,133) = 6,048; p<0,05].

Figura 40 - Cortes histológicos representativos da região da CA3 no hipocampo (Imunohistoquímica GFAP)



Animais não submetidos ao SE tratados com: A) salina (0,9%); B) (+)-11 α -hidroxieritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); C) (+)-eritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Animais pós-indução do SE tratados com: D) salina (0,9%); E) Cetamina (60 mg/kg); F) Carbamazepina (120 mg/kg); G) Fenitoína (60 mg/kg); H) Diazepam (2 mg/kg); I) (+)-eritravina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); J) (+)-eritravina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); K) (+)-eritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); L) (+)-11 α -hidroxieritravina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); M) (+)-11 α -hidroxieritravina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); N) (+)-11 α -hidroxieritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Secções de 5 μm , visualizadas em aumento de 100x. As setas brancas indicam a região CA3.

Figura 41 - Distribuição de glia através da intensidade da cor cinza na região da CA3 (Imunohistoquímica GFAP)

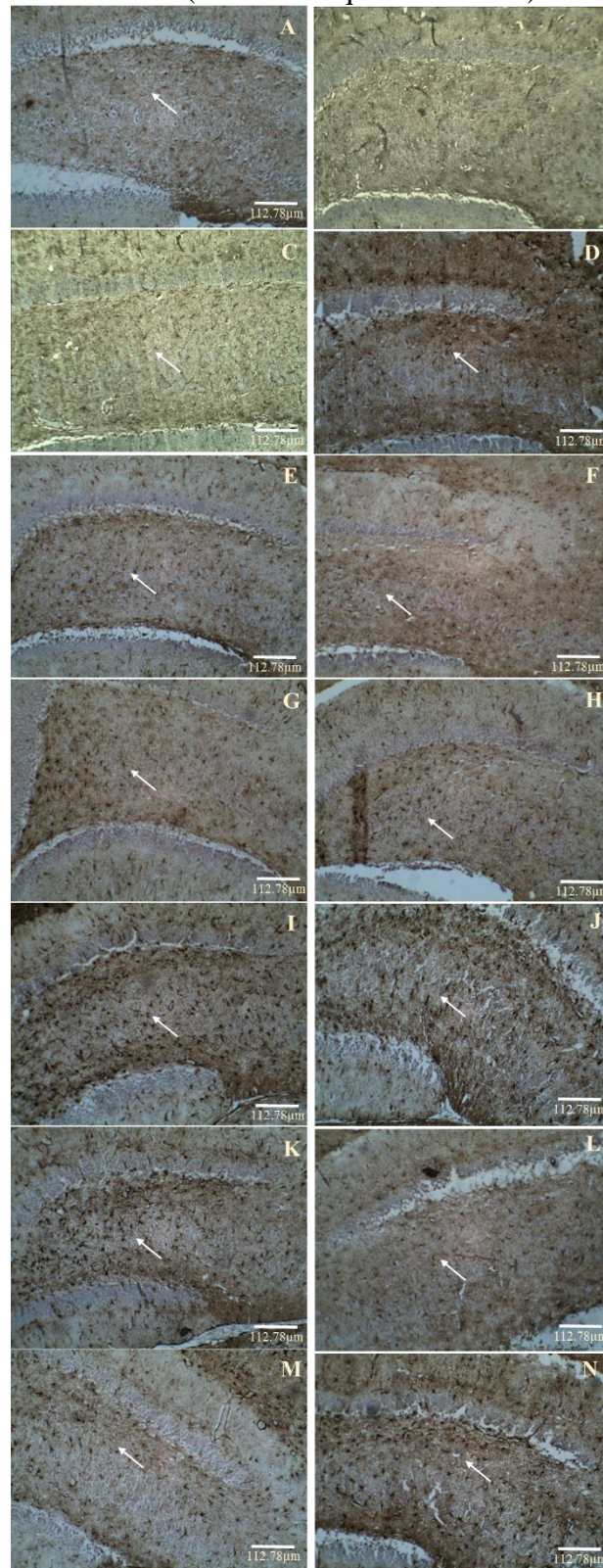


Dados analisados pelo teste de Anova de uma via, seguido pelo pós-teste de Newman-keuls, diferença estatística contra animais submetidos ao SE e tratados com salina sendo: * para $p < 0,05$ e *** para $p < 0,001$.

Quando visualizada a região do *Hilus* do Giro Denteado (Figura 42A-N) de animais do grupo controle negativo (SE + salina), a distribuição de intensidade nesta área foi significativamente maior que aquela notada em todos os grupos de animais induzidos de SE e tratados com os fármacos e/ou alcaloides nas diferentes doses e os animais sadios (salina ou alcaloides sem SE), sendo estes dados confirmados estatisticamente em ambos lados hipocampais direito e esquerdo [$F(13,69) = 5,689$; $p < 0,05$] e [$F(13,66) = 6,050$; $p < 0,05$] (Figura 43A e B).

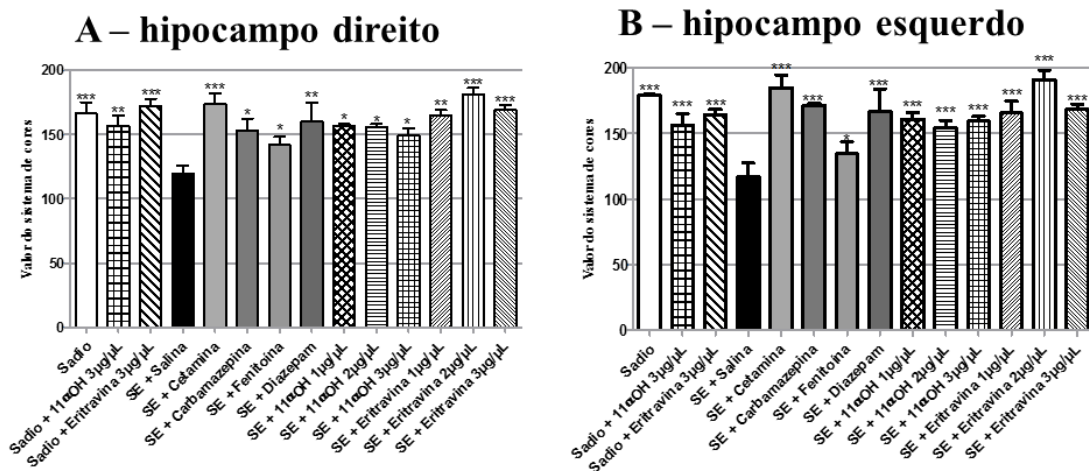
Isso mostra a maior presença de células da glia na área HGD de animais controles negativos (salina + SE) quando comparados a qualquer outro grupo de animais. Novamente não foram observadas diferenças significativas entre os animais tratados com a mesma dose dos diferentes alcaloides para animais induzidos ou não de SE, e mesmo para os diferentes lados para cada grupo de animal analisado [$F(27,311) = 9,324$; $p < 0,05$].

Figura 42 - Cortes histológicos representativos da região do HGD no hipocampo (Imunohistoquímica GFAP)



Animais não submetidos ao SE tratados com: A) salina (0,9%); B) (+)-11 α -hidroxieritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); C) (+)-eritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Animais pós-indução do SE tratados com: D) salina (0,9%); E) Cetamina (60 mg/kg); F) Carbamazepina (120 mg/kg); G) Fenitoína (60 mg/kg); H) Diazepam (2 mg/kg); I) (+)-eritravina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); J) (+)-eritravina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); K) (+)-eritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); L) (+)-11 α -hidroxieritravina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); M) (+)-11 α -hidroxieritravina (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$); N) (+)-11 α -hidroxieritravina (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Secções de 5 μm , visualizadas em aumento de 100x. As setas brancas indicam a região HGD.

Figura 43 - Distribuição de glia através da intensidade da cor cinza na região do HGD (Imunohistoquímica GFAP)



Dados analisados pelo teste de Anova de uma via, seguido pelo pós-teste de Newman-keuls, diferença estatística contra animais submetidos ao SE e tratados com salina sendo: * para $p < 0,05$; ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$.

Os dados elencados a partir dos ensaios de histologia (Colorações de HE e Nissl) e de imunohistoquímica (NeuN e GFAP) permitem considerar resumidamente que:

Ambos os alcaloides, nas suas diferentes concentrações e em níveis similares de ação, são capazes de proteger neurônios hipocâmpais das áreas CA1, CA3 e Giro Denteado contra a morte, reduzir a gliose reativa nestas mesmas áreas e oferecer maior preservação estrutural-morfológica de camadas hipocâmpais em ambos os hemisférios indistintamente. Isto pode explicar, ao menos parcialmente, o efeito anticonvulsivante/antiepiléptico observado neste trabalho, e, sobretudo, os efeitos positivos destes alcaloides para memória/cognição. Isto explica, ainda que não integralmente, o mecanismo de ação farmacológico de tais alcaloides ao menos em nível celular. Neste contexto, os dados são convergentes e concordantes, na medida e por exemplo, que os dados elencados pela coloração de Nissl são corroborados e complementados principalmente pela imunohistoquímica de NeuN e, ao menos parcialmente, pela coloração de HE e mesmo dados do GFAP.

O fato de ambos os alcaloides protegerem de maneira similar os hipocâmpos de ambos os hemisférios cerebrais é interessante. Isto porque se presume que exista lateralização hemisférica na ELT, sendo o hemisfério esquerdo e, pois, hipocampo esquerdo, mais sensíveis a ocorrência e estabelecimento da esclerose, o que explica limiar mais baixo para ocorrência de crises a partir deste hemisfério (SADEGHI et al, 2017). Assim, as diferentes doses dos alcaloides protegem extensivamente o hipocampo mesmo que este se situe no lado de maior severidade das lesões.

4.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No computo de todos os resultados em conjunto, o trabalho atual apresenta marcada valia etnofarmacológica, farmacêutica e biotecnológica. Baseando-se em dados etnofarmacológicos estes tipos de estudo vêm aumentando gradativamente, sendo impulsionados pela procura das ditas fontes medicamentosas ditas alternativas. De fato e 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 et al., 2011).

Até recentemente, a comunidade científica brasileira deu relativamente pouca atenção para os benefícios da medicina popular e as propriedades medicinais dos produtos naturais. Todavia, este cenário vem mudando e o estudo sobre plantas medicinais tem sido amplamente desenvolvido, uma vez que o Brasil representa uma fonte rica de diversidade biológica e química, representada por sua exuberante natureza (BARBOSA-FILHO et al., 2006a).

As novas descobertas envolvem investigações de natureza multidisciplinar envolvendo a etnobotânica, a química de produtos naturais e a farmacologia, direcionadas, sobretudo, para a busca de segurança e eficácia farmacológica de produtos desenvolvidos a partir de fontes naturais seja pelo isolamento de ativos ou uso de extratos padronizados na fitoterapia (MACIEL et al., 2002).

Novas drogas foram formuladas a partir de plantas mais recentemente e a estimativa vem sendo progressivamente aumentada a cada ano, de acordo com o FDA. Isto acontece pelas indústrias farmacêuticas devotarem agora maior atenção, e disporem de maior critério e novas estratégias técnicas na busca e transformação de produtos *in natura* em medicamentos importantes seguindo o corolário da medicina translacional (MCCHESENEY et al., 2007).

Seguindo esta tendência, e no Brasil, o Ministério da Saúde aprovou em 2006 a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) e o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas (2007). Isto incentiva o descobrimento/aproveitamento de novos fitoterápicos e ativos isolados, de forma sustentável, e garante o uso seguro e racional de plantas medicinais, inserindo o país em uma tendência moderna de aproveitamento de seus recursos e validando a importância de trabalhos como este ora apresentado.

CONCLUSÃO



Vincent van Gogh, 1888

5 CONCLUSÃO

As principais conclusões deste trabalho dão conta de que:

- Diferentes doses dos alcaloides (+)-eritrovina e (+)-11 α -hidroxieritrovina, isolados do extrato hidroalcoólico de flores de *E. verna*, apresentam marcado efeito anticonvulsivante/antiepiléptico. Este efeito se estabelece na medida em que os alcaloides reduzem significativamente a incidência em níveis conjuntos superiores à 90%, diminuem a amplitude na ordem conjunta de até 3,5 vezes e reduzem em até 3 vezes a duração das crises epiléticas induzidas no modelo de pilocarpina (*score* 4/5) em relação ao grupo controle via monitoramento vídeo-eletroencefalográfico. Ademais, os mesmos alcaloides oferecem algum grau de proteção, ainda que discreto, contra a evolução para morte de animais submetidos ao modelo após a indução de SE;

- Além da já conhecida atividade ansiolítica e anticonvulsivante, esta última reforçada neste trabalho, os dados atuais mostram originalmente o efeito positivo e progressivo destes alcaloides no desempenho de aprendizagem/memória e na retenção de memória dos animais submetidos ao SE e ao teste do labirinto aquático. Dito de outro modo, diferentes doses dos alcaloides em estudo apresentam efeito protetor da memória/cognição. Este último achado é de marcado interesse no contexto da epilepsia e de seu tratamento;

- A proteção aos neurônios hipocâmpais das áreas CA1, CA3 e Giro Denteado, a redução da gliose reativa nestas mesmas áreas e a maior preservação estrutural-morfológica de camadas hipocâmpais oferecida por diferentes doses dos alcaloides em ambos os hemisférios pode explicar, ao menos parcialmente, o efeito anticonvulsivante/antiepiléptico observado neste trabalho, e, sobretudo, os efeitos positivos destes alcaloides para memória/cognição. Isto explica, ainda que não integralmente, o mecanismo de ação farmacológico de tais alcaloides ao menos em nível celular;

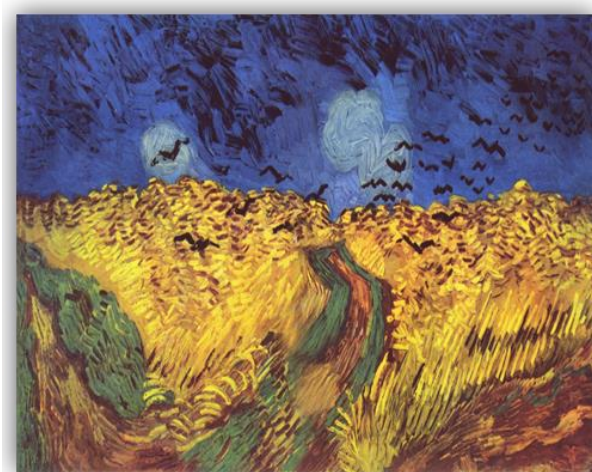
- O mecanismo de ação anticonvulsivante/antiepiléptico dos alcaloides em nível molecular não envolve ações nos principais canais de sódio ou potássio, como acontece para várias drogas de referência no tratamento da ELT. Este dado se soma a dados anteriores do grupo que demonstraram a ausência de modulação por parte de diferentes concentrações dos alcaloides nos eventos de receptação e ligação a receptores gabaérgicos ou glutamatérgicos. Com efeito, o trabalho apresenta importante contribuição farmacodinâmica. Isto se dá, pois se assume mais modernamente, que o descarte/rejeição de alvos moleculares prováveis de ativos farmacológicos é tão ou mais importante que o apontamento de seus alvos específicos de ação

em derradeiro. Isto contribui para o entendimento da farmacologia e toxicologia envolvida no desenvolvimento de novos fármacos ou ferramentas biotecnológicas;

- A apresentação e ausência de modulação inibitória respectivamente da (+)-eritravina e a da (+)-11 α -hidroxieritravina sobre receptores nicotínicos trazem informações importantes. Primeiro, isso mostra que pequenas alterações estruturais no conjunto de radicais químicos no derredor do núcleo eritrínico causam grandes alterações de atividade farmacológica. Estas informações em nível molecular se somam aos dados anteriores do grupo que mostraram a presença ou ausência de efeito ansiolítico para alcaloides eritrínicos com base nestas diferenças estruturais. Assim, o trabalho traz informação químico-farmacêutica (relação estrutura-atividade) bastante importante no desenvolvimento racional de novos fármacos com ação no SNC. Segundo, os dados deste trabalho demonstram ação seletiva da (+)-eritravina para as isoformas dos receptores nicotínicos $\alpha_4\beta_2$ e α_7 em detrimento de outras avaliadas neste trabalho por meio de voltage-clamp. Terceiro, a ação da (+)-eritravina em receptores nicotínicos, pode ao menos parcialmente, explicar sua ação ansiolítica demonstrada por nosso grupo no passado, ainda que novos experimentos se façam necessários, sobretudo, para o explicar do mesmo efeito ansiolítico exercido por (+)-11 α -hidroxieritravina sem contudo apresentar modulação inibitória para tais receptores;

- Finalmente, o presente trabalho é de valia etnofarmacológica e biotecnológica. Com efeito, contribui na validação e no melhor entender do uso fitoterápico popular e industrial da planta *E. verna*, o que é imperativo para o uso medicamentoso seguro e eficaz. Além disso, o trabalho traz informações farmacológicas importantes para o desenvolvimento biotecnológico e racional de novos fármacos protetores de memória/cognição, ansiolíticos e, sobretudo, anticonvulsivantes/antiepiléticos. Tais classes de medicamentos e, sobretudo, a terapêutica da ansiedade e epilepsia, são conhecidamente carentes de inovação ao longo das últimas três décadas, havendo, pois, a necessidade crescente de novas investigações neste mister, como apresentado no presente trabalho.

REFERÊNCIAS



Vincent van Gogh, 1890

REFERÊNCIAS

ANDRADE-VALENÇA, L. P. A. et al. Epilepsia do Lobo Temporal Mesial Associada à Esclerose Hipocampal. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 12, n. 1, p. 31-36, 2006.

ARAÚJO, B. et al. Decreased expression of proteins involved in energy metabolism in the hippocampal granular layer of rats submitted to the pilocarpine epilepsy model. **Neuroscience Letters**, v. 561, p. 46-51, 2014.

BANNERMAN, D. M. et al. Distinct componentes of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade. **Nature**, v. 378, n. 6553, p. 182-186, 1995.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 258-285, 2006a.

BARRESE, V. et al. Neuronal potassium channel openers in the management of epilepsy: role and potential of retigabine. **Journal of Clinical Pharmacology**, n. 2, p. 225-236, 2010.

BIALER, M.; WHITE, H. S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 1, p. 68-82, 2010.

BLISS, T. V. P.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, p. 31-39, 1993.

BORGES, K. K. et al. Issues that affect people with epilepsy quality of life. **Revista Brasileira de Terapias Cognitivas**, v. 5, n. 2, p. 28-44, 2010.

BORRIS, D. et al. Ketamine controls prolonged *status epilepticus*. **Epilepsy Research**, v. 42, n. 2-3, p. 117-122, 2000.

BRIGGS, S. W.; GALANOPOULOU, A. S. Altered GABA Signaling in Early Life Epilepsies. **Neural Plasticity**, v. 2011, p. 1-16, 2011.

BRIONI, J. D. et al. Nicotinic receptor agonists exhibit anxiolytic-like effects on the elevated plus-maze test. **European Journal of Pharmacology**, v. 238, n. 1, p. 1-8, 1993.

CAPELLA, H. M.; LEMOS, T. Effect on epileptogenesis of carbamazepine treatment during the silent period of the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsia**, v. 43, n. suppl. 5), p. 110-111, 2002.

CARVALHO, A. C. B. et al. Regulation of herbal medicines in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, p. 503-506, 2014.

CASTRO, O. W. et al. Comparative neuroanatomical and temporal characterization of FluoroJade-positive neurodegeneration after *status epilepticus* induced by systemic and intrahippocampal pilocarpine in Wistar rats. **Brain Research**, v. 1374, n. 49, p. 43-55, 2011.

CATTERALL, W. A. Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology. **Journal of Physiology**, n. 590, v. 11, p. 2577–2589, 2012.

CAVARSAN, C. F. et al. Reduced hippocampal dentate cell proliferation and impaired spatial memory performance in aged-epileptic rats. **Frontiers in Neurology**, v. 4, n. 106, 2013.

CENDES, F.; et al. Epilepsies associated with hippocampal sclerosis. **Acta Neuropathologica, Campinas**, v. 128, n. 1, p.21-37, 2014.

CAVAZOS, J. E. et al. Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: time course of development, progression, and permanence. **Journal Neuroscience**, v. 11, n. 9, p. 2795-2803, 1991.

CHEN, Y. et al. A novel mutation of the nicotinic acetylcholine receptor gene CHRNA4 in sporadic nocturnal frontal lobe epilepsy. **Epilepsy research**, n. 83, v. 2-3, p.152-156, 2009.

CUNHA, A. O. S. et al. Glutamate binding is altered in hippocampus and cortex of Wistar rats after pilocarpine-induced *Status Epilepticus*. **Neuroscience Letters**, [s.l.], v. 424, n. 1, p.51-54, 2007.

CUNHA, A. O. et al. 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. et al. The pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 172, n. 2, p. 143-157, 2008.

D'HOOGE, R.; DE DEYN, P. P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. **Brain Research Reviews**, v. 36, n. 1, p. 60-90, 2001.

DALKARA, S.; KARAKURT, A. Recent progress in anticonvulsant drug research: strategies for anticonvulsant drug development and applications of antiepileptic drugs for non-epileptic central nervous system disorders. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 9, p. 1033-1071, 2012.

DANI, J. A.; BERTRAND, D. Nicotinic Acetylcholine Receptors and Nicotinic Cholinergic Mechanisms of the Central Nervous System. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, p. 699-729, 2015.

D'AVILA, B. F. et al. Effect of green tea (*Camellia sinensis*) on epileptic seizures induced by pentylentetrazol (PTA) in rats. **Pharmacologia**, v. 2, n. 12, p. 362-368, 2011.

DEEB, T. Z. et al. Possible alterations in GABA A receptor signaling that underlie benzodiazepine-resistant seizures. **Epilepsia**, [s.l.], v. 53, p.79-88, 2012.

DI MAIO, R. et al. Post-*status epilepticus* treatment with the cannabinoid agonist WIN 55,212-2 prevents chronic epileptic hippocampal damage in rats. **Neurobiology of Disease**, v. 73, 356-365, 2015.

DIVINEY et al. Comparison of short-term effects of midazolam and lorazepam in the intramygdala kainic acid model of status epilepticus in mice. **Epilepsy Behaviour**, v. 51, p. 191-198, 2015.

DO NASCIMENTO, A. L. et al. Neuronal degeneration and gliosis time-course in the mouse hippocampal formation after pilocarpine-induced *status epilepticus*. **Brain Research**, v. 1470, p. 98-110, 2012.

DOS REIS, S. L. **Atividades anticonvulsivante e neuroprotetora do alcaloide Eritrartina isolado do extrato hidroalcoólico de flores de *Erythrina verna* Mart. ex Benth.** 2016. 62 f. Dissertação (Mestrado). Universidade de Ribeirão Preto, 2016.

DUA, T. et al. Epilepsy Care in the World: Results of an ILAE/IBE/WHO Global Campaign Against Epilepsy Survey. **Epilepsia**, v. 47, n. 7, p. 1225-1231, 2006.

DURIGAN, G. et al. **Plantas do cerrado paulista: imagens de uma paisagem ameaçada.** São Paulo: Paginas & Letras Editora Gráfica, 2004. 474.

EIJKELKAMPN, N. et al. Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels. **Brain: a journal of neurology**, n. 135, v. 9, p.2585-2612, 2012.

ERRINGTON, A. C. et al. Voltage Gated ion Channels: Targets for Anticonvulsant Drugs. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, n. 5, v. 1, p. 15-30, 2005.

FAGERLUND, M. J. et al. Propofol and AZD3043 Inhibit Adult Muscle and Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors Expressed in *Xenopus* Oocytes. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 9, n. 1, 2016.

FAGGION, S. A. et al. Anticonvulsant profile of the alkaloids (+) -erythravine and (+) -11- α -hydroxy-erythravine isolated from the flowers of *Erythrina mulungu* Mart ex Benth (Leguminosae-Papilionaceae). **Epilepsy Behavior**, v. 20, n. 3, p. 441-446, 2011.

FAURE, J.-B. et al. A comprehensive behavioral evaluation in the lithium–pilocarpine model in rats: Effects of carisbamate administration during *status epilepticus*. **Epilepsia**, v. 54, n. 7, p. 1203-1214, 2013.

FEITOSA, L. G. P. et al. Aplicação de espectrometria de massas com ionização por elétron na análise de alcaloides do mulungu. **Química nova**, v. 35, n. 11, p. 2177-2180, 2012.

FENG, H. et al. Alterations of GABAA-Receptor Function and Allosteric Modulation During Development of *Status Epilepticus*. **Journal Neurophysiology**, [s.l.], v. 1, n. 99, p.1285-1293, 2008.

FERNANDES, P. T. et al. Relatório do VI Encontro Nacional de Associações e Grupos de Pacientes com Epilepsia. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 14, n. 2, p. 85-88, 2008.

FISHER, R. S. et al. ILAE Official Report: A practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 4, p.475-482, 2014.

FISHER, R. S. Redefining epilepsy. **Current Opinion in Neurology**, v. 28, n. 2, p. 130-135, 2015.

FLAUSINO, O. A. JR. "Análise fitoquímica e estudo biomonitorado da atividade ansiolítica de *Erythrina mulungu* (Leguminosae-Papilionaceae) em camundongos

submetidos a diferentes modelos animais de ansiedade. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. P. 83. 2006.

FLAUSINO, O. A. JR. et al. 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, 2007a.

FLAUSINO, O. A. JR. et al. Anxiolytic effects of erythrinian alkaloids from *Erythrina mulungu*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 1, p. 48-53, 2007b.

FONG, G. C. Y.; FONG, J. K. Y. Diagnosis and management of epilepsy. **Hong Kong Medical Journal**, v. 7, n. 1, p. 73-84, 2001.

FUJIKAWA, D.G. Prolonged seizures and cellular injury: Understanding the connection. **Epilepsy Behavior**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.3-11, dez. 2005.

FURMAN, M. et al. Seizure Initiation and Propagation in the Pilocarpine Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy. **Journal of Neuroscience**, [s.l.], v. 33, n. 42, p.16409-16411, 2013.

FURTADO, M. A. et al. 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.

GILLING, K. E. et al. Impaired maturation of serotonergic function in the dentate gyrus associated with epilepsy. **Neurobiology of Disease**, v. 50, p. 86-95, 2013.

GOLDBERG, E. M.; COULTER, D.A.. Mechanisms of epileptogenesis: a convergence on neural circuit dysfunction. **Nature Reviews Neuroscience**, [s.l.], v. 14, n. 5, p.337-349, 2013.

GOMES, M. DA M. Mortality from epilepsy. Brazil (capitals), 1980-2007. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 69, n. 2A, p. 166-169, 2011.

GUEDES, F.A. et al. Plasticidade Neuronal Associada à Epilepsia do Lobo Temporal Mesial: Insights a partir de Estudos em Humanos e em Modelos Animais. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, v. 12, n. 1, p.10-17, 2006.

GUSEL'NIKOVA, V. V.; KORZHEVSKIY, D. E. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker, **Acta Naturae**, v. 7, n. 2, p. 42-47, 2015.

HICKS, R. R. et al. Mild experimental brain injury in the rat induces cognitive deficits associated with regional neuronal loss in the hippocampus. **Journal Neurotrauma**, v. 10, n. 4, p. 405-414, 1993.

ILAE-International League Against Epilepsy. GLOSSARY OF DESCRIPTIVE TERMINOLOGY FOR ICTAL SEMIOLOGY a) Epileptic Disorder: A chronic neurological condition characterised by recurrent epileptic seizures. b) Epilepsies: Those conditions involving chronic recurrent epileptic seizures that can be considered epileptic disorders. 2010.

JALLON, P. Epilepsy in Developing Countries. **Epilepsia**, v. 38, n. 10, p. 1143-1141, 1997.

KASPER, S. et al. Pregabalin long-term treatment and assessment of discontinuation in patients with generalized anxiety disorder, **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 17, n. 5, p. 685-695, 2014.

KHARATISHVILI, I. et al. MRI changes and complement activation correlate with epileptogenicity in a mouse model of temporal lobe epilepsy. **Brain Structure and Function**, v. 219, n. 2, p. 683-706, 2013.

KHAZIEV, E. et al. Acetylcholine-Induced Inhibition of Presynaptic Calcium Signals and Transmitter Release in the Frog Neuromuscular Junction. **Frontiers in Physiology**, v. 12, n. 7, p. 621, 2016.

KOVACS, R.; HEINEMANN, U. Models in Research of Pharmacoresistant Epilepsy: Present and Future in Development of Antiepileptic Drugs. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 21, n. 6, p.689-703, 2014.

KUTLU, M. G.; GOULD, T. J. Nicotine Modulation of Fear Memories and Anxiety: Implications for Learning and Anxiety Disorders. **Biochemical Pharmacology**, v. 97, n. 4, p. 498-511, 2015.

KWAN, P. et al. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, n. 1, p. 21-34, 2001.

LEBBE, E. K. M. et al. Structure-Function Elucidation of a New -Conotoxin, Lo1a, from *Conus longurionis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 14, p. 9573-9583, 2014.

LEE, J. W.; DWORETZKY, B. Rational Polytherapy with Antiepileptic Drugs. **Pharmaceuticals**, v. 3, p. 2362-2379, 2010.

LEITE, J. P.; CAVALHEIRO, E. A. Effects of conventional antiepileptic drugs in a model of spontaneous recurrent seizures in rats. **Epilepsy Research**, v. 20, n. 2, p. 93-104, 1995.

LEITE, J. P. et al. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. **Epilepsy Research**, v. 50, n. 1-2, p. 93-103, 2002.

LEMOS, K. R.; ALESSI, A.C. Astrócitos imunorreativos à proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em sistema nervoso central de equinos normais e de equinos com leucoencefalomalácia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 19, n. 3-4, p. 104-108, 1999.

LEVESQUE, M. et al. The anti-ictogenic effects of levetiracetam are mirrored by interictal spiking and high-frequency oscillation changes in a model of temporal lobe epilepsy. **Seizure**, v. 25, p. 18-25, 2015.

LOPES, M. W. et al. 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**, v. 22, n. 6, p. 153-163, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. D. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2ª. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008. 544 ISBN 85-86714-28-3.

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**, [s.l.], v. 50, n. 1-2, 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**, v. 20, n. 5, p.359-368, 2011.

LÖSCHER, W. Single versus combinatorial therapies in *status epilepticus*: Novel data from preclinical models. **Epilepsy Behavior**, [s.l.], v. 49, p.20-25, 2015.

LOWENSTEIN, D.H. et al. It's Time to Revise the Definition of *Status Epilepticus*. **Epilepsia**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.120-122, 1999.

LUKASIUK, K.; PITKANEN, A. Molecular basis of acquired epileptogenesis. **Handbook Clinical Neurology**, v.107, p.3-12, 2012.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARTÍN, E. D.; POZO, M. A. Animal Models for the Development of New Neuropharmacological Therapeutics in the Status Epilepticus. **Current Neuropharmacology**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.33-40, 2006.

MAZZUFERI, M. et al. Rapid epileptogenesis in the mouse pilocarpine model: Video-EEG, pharmacokinetic and histopathological characterization. **Experimental Neurology**, v. 238, n. 2, p. 156-167, 2012.

MCCHESENEY, J. D. et al. Plant natural products: back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, v. 68, n. 14, p. 2015-2022, 2007.

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

MELDRUM, B. S.; ROGAWSKI, M. A. Molecular targets for antiepileptic drug development. **Neurotherapeutics**, n. 4, v. 1, p. 18-61, 2007.

MIZIELINSKA, S. M. Ion channels in epilepsy. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1077-1079, 2007.

MOURA JÚNIOR, N. B. Estudo anátomo-funcional de gânglios da cadeia simpática torácica na hiperidrose primária. 2012. 67 f. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo, 2012.

MORRIS, R. G. et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, v. 297, n. 5668, p. 681-683, 1972.

MORTARI, M. R. et al. Neurotoxins from invertebrates as anticonvulsants: From basic research to therapeutic application. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 114, n. 2, p. 171-183, 2007.

NAVIDHAMIDI, M.; GHASEMI, M.; MEHRANFARD, N. Epilepsy-associated alterations in hippocampal excitability. **Reviews in the Neurosciences**, DOI 10.1515/revneuro-2016-0059, 2017.

NORONHA, A. L. et al. Prevalence and pattern of epilepsy treatment in different socioeconomic classes in Brazil. **Epilepsia**, v. 48, n. 5, p. 880-885, 2007.

OLIVEIRA, M. S.G. de et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts and fractions from *Erythrina mulungu*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 1, p. 157-161, 2012.

ONUSIC, G. M. et al. 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**, v. 35, n. 4, p. 473-477, 2002.

ONUSIC, G. M. et al. Effects of chronic treatment with a water-alcohol extract from *Erythrina mulungu* on anxiety-related responses in rats. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 23, n. 11, p. 1538-1542, 2003.

PALMA, E. et al. Acetylcholine receptors from human muscle as pharmacological targets for ALS therapy. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 11, p. 3060-3055, 2016.

PARINEJAD, N. et al. Behavioral and histological assessment of the effect of intermittent feeding in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 86, p. 54-63, 2009.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 4 ed. San Diego: Academic Press, 1998. ISBN 0125476191.

PEARL, P. L. et al. Herbs in epilepsy: evidence for efficacy, toxicity, and interactions. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 18, n. 3, p. 203-208, 2011.

PEDROSO, M .F. **Epilepsia experimental e fármacos antiepilépticos: efeito na memória espacial e na potenciação de longa duração induzida *in vitro***. 2005. 93 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

PEREIRA, N. A. L.; SANTOS, M. M. M. Antagonistas do Receptor NMDA: três décadas de evolução no combate às doenças neurodegenerativas. **Química**. P. 55-61, 2014.

PEREZ-MENDES, P. et al. Modeling epileptogenesis and temporal lobe epilepsy in a non-human primate. **Epilepsy Research**, v. 96, n. 1-2, p. 45-54, 2011.

PITKÄNEN, A.; SUTULA, T. P. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. **Lancet Neurology**, v. 1, n. 3, p. 173-181, 2002.

PORTAL SAÚDE- MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009 Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/465-sctie-raiz/daf-raiz/ceaf-sctie/fitoterapicos-cgafb/11-fitoterapicos/12552-plantas-de-interesse-ao-sus>. Acesso em: 20/02/2017.

POSADAS, I. et al., Nicotinic Receptors in Neurodegeneration. **Current Neuropharmacology**, v. 11, p. 298-314, 2013.

QURESHI, I. H. et al. Synergistic anticonvulsant effects of pregabalin and amlodipine on acute seizure model of epilepsy in mice. **Metabolic Brain Disease**, doi: 10.1007/s11011-017-9979-2, 2017.

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

RAJ, D. et al. *Status Epilepticus* Indian. **Journal of Pediatrics**, v. 78, n. 2, p. 219-226, 2011.

REDDY, D. S.; KURUBA, R. Experimental models of *status epilepticus* and neuronal injury for evaluation of therapeutic interventions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 9, p. 18284-18318, 2013.

RODRIGUES, E. et al. Plants with possible anxiolytic and/or hypnotic effects indicated by three Brazilian cultures - indians, afro-brazilians, and river-dwellers. In: ATTA-UR-RAHMAN (Ed.). **Studies in Natural Products Chemistry**, v.35, 2008. cap. Bioactive Natural Products, p.549.

ROSA, D. et al. Erysothrine, an alkaloid extracted from flowers of *Erythrina mulungu* Mart. ex Benth: Evaluating its anticonvulsant and anxiolytic potential. **Epilepsy Behavior**, v. 23, n. 3, p. 205-212, 2012.

ROSSETTI, A.O.; LOWENSTEIN, D.H. Management of refractory *status epilepticus* in adults: still more questions than answers. **The Lancet Neurology**, [s.l.], v. 10, n. 10, p.922-930, 2011.

ROSSI, A. R. et al. Gabapentin administration reduces reactive gliosis and neurodegeneration after pilocarpine-induced *status epilepticus*. **Plos One**, v. 8, n. 11, p.e78516, 2013.

SADEGHI, L.; RIZVANOV, A. A.; SALAFUTDINOV, I. I.; DABIRMANESH, B.; SAYYAH, M.; FATHOLLAHI, Y.; KHAJEH, K. Hippocampal asymmetry: differences in the left and right hippocampus proteome in the rat model of temporal lobe epilepsy. **Journal of Proteomics**, v. 10, n. 154, p.22-29, 2017.

SANABRIA, E. R. G. et al. Abordagem Experimental do Hipocampo Humano Obtido nas Cirurgias para Tratamento de Pacientes com Epilepsia Refratária a Drogas Antiepilépticas. **Revista Neurociências**, v. 8, n. 3, p. 117-127, 2000.

SCIMEMI, A., et al. Tonic GABA A receptor-mediated currents in human brain. **European Journal of Neuroscience**, [s.l.], v. 24, n. 4, p.1157-1160, 2006.

SETTI-PERDIGÃO, P. et al. *Erythrina mulungu* alkaloids are potent inhibitors of neuronal nicotinic receptor currents in mammalian cells. **Plos One**, v. 9, n. 12, p. e82726, 2013.

SILLS, G. J. **Mechanisms of action of antiepileptic drugs**. In *Epilepsy 2011: From Science to Society. A Practical Guide to Epilepsy*, J. W. Sander, M. C. Walker, and J. E. Smalls, Eds., ILAE, National Society for Epilepsy, London, UK, 2011.

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**, v. 14, n. Suppl 2, p. 39-45, 2008.

SIMMONS, M.L.; TERMAN, G.W.; CHAVKIN, C. Spontaneous Excitatory Currents and k-Opioid Receptor Inhibition in Dentate Gyrus Are Increased in the Rat Pilocarpine Model of Temporal Lobe Epilepsy. **The American Physiological Society**, [s.l.], v. 78, n. 4, p.1860-1868, 1997.

TILELLI, C.Q., et al. Different types of *status epilepticus* lead to different levels of brain damage in rats. **Epilepsy; Behavior**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.401-410, 2005.

TOY, E. C. et al. **Casos Clínicos Em Neurociências**. 2ª. Porto Alegre: AMGH, 2016.

TOYODA, I., et al. Early Activation of Ventral Hippocampus and Subiculum during Spontaneous Seizures in a Rat Model of Temporal Lobe Epilepsy. **Journal of Neuroscience**, [s.l.], v. 33, n. 27, p.11100-11115, 2013.

TRINKA, E., et al. A definition and classification of status epilepticus - Report of the ILAE Task Force on Classification of *Status Epilepticus*. **Epilepsia**, [s.l.], v. 56, n. 10, p.1515-1523, 2015.

TUCCI, S.; GENN, R. F.; MARCO, E.; FILE, S. E. Do different mechanisms underlie two anxiogenic effects of systemic nicotine? **Behavioural Pharmacology**, v. 14, n. 4, p. 323-329, 2003.

TURSKI, W. A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, v. 9, n. 3, p. 315-335, 1983.

VALLI, M. et al. Development of a Natural Products Database from the Biodiversity of Brazil. **Journal Natural Products**, v. 76, n. 3, p. 439-444, 2013.

VASCONCELOS, S. M. et al. 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. et al. Anticonvulsant activity of hydroalcoholic extracts from *Erythrina velutina* and *Erythrina mulungu*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 271-274, 2007.

VENTURA, A. L. M. et al. Cholinergic system: revisiting receptors, regulation and the relationship with Alzheimer disease, schizophrenia, epilepsy and smoking. **Revista de Psicologia Clínica**, n. 37, v. 2, p. 66-72, 2010.

VILLETTI, G. et al. Preclinical evaluation of CHF3381 as a novel antiepileptic agent. **Neuropharmacology**, v. 40, n. 7, p. 866-878, 2001.

VORHEES, C. V.; WILLIAMS, M. T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. **Nature Protocols**, v. 1, n. 2, p. 848-858, 2006.

WASTERLAIN, C.G., et al. Trafficking of NMDA receptors during status epilepticus: Therapeutic implications. **Epilepsia**, [s.l.], v. 54, p.78-80, 2013.

WEIBEL, E. R. et al. Practical stereological methods for morphometric cytology. **The Journal of Cell Biology**, v. 30, n. 1, p. 23-38, 1966.

WHITE, H.S.; SMITH-YOCKMAN, M.; SRIVASTAVA, A.; WILCOX, K.S. Chapter 44 - Therapeutic Assays for the Identification and Characterization of Antiepileptic and Antiepileptogenic Drugs. in: A.P.A.S.L. Moshé (Ed.). **Models of Seizures and Epilepsy**. Academic Press, Burlington; p.539–549, 2006.

WHO. **Media centre. Epilepsy. Fact sheet, n. 999**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html> 2012>. Acesso em 10/12/2014.

WOLF, P. Of cabbages and kings: some considerations on classifications, diagnostic schemes, semiology, and concepts. **Epilepsia**, v. 44, n. 1, p. 4-13, 2003.

YACUBIAN, E. M. T. et al. **Tratamento medicamentoso das epilepsias**. São Paulo: Leitura Médica Ltda., 2014. 298p.

ZEILER, F. A. Early Use of the NMDA Receptor Antagonist Ketamine in Refractory and Superrefractory *Status Epilepticus*. **Critical Care Research And Practice**, [s.l.], v. 2015, p.1-5, 2015.

ZHANG, Y., et al. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Treatment Prevents Cognitive Impairment Following Status Epilepticus in Rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 33, n. 4, p.572-579, 2010.

ANEXO



Charles Altamont Doyle, século XIX

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



Ribeirão Preto, 18 de fevereiro de 2014

Prezado(a) Pesquisador (a) Rene de Oliveira Beleboni,

Vimos por meio desta informar que Comitê de Ética em Pesquisa para Seres Humanos da Universidade de Ribeirão Preto CEP/UNAERP analisou e aprovou sem restrições, o Projeto intitulado **“ALCALOIDES ERITRINICOS DA ERYTHRINA MULUNGU MART. EX BENTH. (LEGUMINOSAE - PAPILIONACEAE) NOVOS ESTUDOS NEUROETOLÓGICOS, HISTOLÓGICOS, IMUNOHISTOQUIMICOS E ELETROENCEFALOGRAFICOS EM RATOS SUBMETIDOS AO MODELO DE PILOCARPINA”** tendo como pesquisador(a) Rene de Oliveira Beleboni, registrado sobre o **ComÉt: 02/2014**

Temos ciência de que os estudos estão sendo conduzidos na Universidade de Ribeirão Preto.

Solicitamos que nos 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 no centro e novas informações sobre a segurança do estudo para que possamos fazer o devido acompanhamento.

Atenciosamente,


Profª Drª Luciana Rezende Alves Oliveira

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