



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA  
NÍVEL DOUTORADO**

**EDITH TELES VENÂNCIO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICONVULSIVANTE DO EXTRATO  
PADRONIZADO DE *JUSTICIA PECTORALIS* (CHAMBÁ): ESTUDO DE  
NEUROPROTEÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO**

**FORTALEZA – CE  
2015**

**EDITH TELES VENÂNCIO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICONVULSIVANTE DO EXTRATO  
PADRONIZADO DE *JUSTICIA PECTORALIS* (CHAMBÁ): ESTUDO DE  
NEUROPROTEÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador (a):  
Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles

**FORTALEZA – CEARÁ  
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

---

V561a      Venâncio, Edith Teles.

Avaliação do potencial anticonvulsivante do extrato padronizado de *Justicia pectoralis* (chambá): estudo de neuroproteção e mecanismo de ação / Edith Teles Venâncio. – Fortaleza, 2015.

184 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2015.

Orientação: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles.

1. Medicamentos Fitoterápicos. 2. Epilepsia. 3. Antioxidantes. 4. Fármacos Neuroprotetores. I. Fonteles, Marta Maria de França (Orient.). II. Título.

---

CDD 615.1

**EDITH TELES VENÂNCIO**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTICONVULSIVANTE DO EXTRATO  
PADRONIZADO DE *Justicia pectoralis* (CHAMBÁ) ESTUDO DE  
NEUROPROTEÇÃO E MECANISMO DE AÇÃO**

Tese apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

**Aprovada em 30/01/2015**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal  
Universidade Federal do Ceará

---

Profa. Dra. Edna Maria Camelo Chaves  
Universidade Estadual do Ceará

---

Profa. Dra. Rita Neuma Dantas Cavalcante de Abreu  
Universidade de Fortaleza

---

Prof. Dr. Francisco Washington Araújo Barros Nepomuceno  
UNILAB

*Dedico este trabalho à Maria Zilda, minha mãe, e  
Joana Victória, minha sobrinha.*

*Minha mãe (Zizi), meu maior exemplo de força,  
garra, perseverança, determinação, otimismo e  
amor.*

*Minha sobrinha (Juju, Juanita), minha maior  
motivação para ser uma pessoa melhor!*

## AGRADECIMENTOS

À **Nossa Senhora de Fátima**, minha madrinha, por me proteger, guiar e colocar as pessoas certas na minha vida e jornada acadêmica.

À minha família (Família Buscapé), **Zilda** (mãe), **Cláudio** (pai), **Claudinho** (irmão), **Gilmária** (cunhada) e sobrinhos **Joana, João Lucas e João Henrique**, que, apesar de tudo, permanece unida e forte, sendo o meu pilar de sustentação na vida.

Ao **Diego Lehder**, meu namorado, amigo e confidente. Meu príncipe e meu porto seguro que sempre esteve ao meu lado me erguendo nos momentos difíceis e vibrando nas conquistas. Que soube ser paciente com minha dedicação nesse estudo e entendendo que eu somente relaxaria depois da tese concluída.

**D.Mazé** e **Sr. Dinaldo**, meus sogros, minha segunda família que me recebeu de braços abertos em sua casa onde sempre tem comida gostosa (algumas feitas especialmente pra mim) e muita música (samba e maracatu). Sei que sempre torceram por mim!!

Meus filhos de quatro patas, **Jerry Lee, Cuquinha, Kira e Shitara**. Aprendemos a ser mais responsáveis quando somos responsáveis por outra vida.

À Profa. Dra. **Marta Maria de Franças Fonteles**, minha orientadora de mestrado, de doutorado, futura supervisora do 2º pós doutorado e, sem dúvida, eterna orientadora. Um exemplo de pessoa e profissional que sempre tem a palavra certa na hora certa. Obrigada por sempre me incentivar, por todos os conselhos e pela paciência (que às vezes faltava!).

À profa. **Dra. Kalyne Almeida Moreira Leal**, pelo seu exemplo e dedicação à carreira científica, por fornecer o material de estudo, ajudar nas metodologias, esclarecer dúvidas, participar da banca de defesa e, enfim, estar sempre presente quando solicitada.

Às profas. **Dras. Francisca Cléa Florenço de Sousa e Silvania Maria Mendes Vasconcelos**, por serem de forma indireta minhas co-orientadoras devido a presença sempre constante e os conselhos dados durante meus estudos.

À profa. **Dra. Rita Neuma** (Ritinha), por dividir comigo, inúmeras vezes, suas experiências enquanto pesávamos nossas substâncias na balança e, neste momento, por participar de minhas bancas de qualificação e de defesa, enriquecendo meu estudo com suas considerações.

À profa. **Dra. Edna Maria**, por aceitar participar da banca de avaliação e contribuir com seus ensinamentos.

Ao prof. Dr. **Washington Barros**, que conheci ainda na graduação, fui monitora e pude acompanhar todo o crescimento pessoal e profissional. Sinto-me extremamente feliz em tê-lo em minha banca examinadora e receber seus valiosos conselhos.

Às profas. **Geanne Matos** e **Danielle Macedo** pelas ideias e auxílios prestados quando solicitadas.

À **Mariana Lima Feitosa**, minha amiga e irmã que a vida deu de presente. Que apesar de ter seu doutorado para realizar assumiu esse trabalho como dela e me ajudou em todos os momentos de forma física e psicológica. Amiga sem você minha vida seria menos em tudo, exceto quando me liga às 6 da manhã só pra dar bom dia....isso eu vivo sem! Te amo!

À **Isabel Linhares** (Belzinha), minha loira, minha amiga, irmã que a vida deu de presente. Esteve comigo durante todo o mestrado, me abandonou no doutorado voltando a morar em Sobral mas sempre esteve perto (via fone, Skype, whatsapp). Conhece-me no olhar e sabe o quanto é importante na minha vida. Te amo!

À amiga **Camila Nayanne** que chegou para integrar o grupo da profa. Marta e soube ser mais. Soube ser amiga e conselheira. Soube passar noites e noites conversando sobre estudos e questões pessoais. Obrigada por esses momentos e pelas dicas valiosas!

Aos bolsistas, **Klistenes** e **Alana**, meus dois tesouros, meus dois presentes, meus braços e pernas e, na reta final quando as informações eram muitas, souberam ser meus guias.

À bolsista **Sarah Queiroz**, pelas inúmeras ajudas nos últimos meses e pela ajuda imprescindível nos últimos dias organizando e me acalmado dizendo que tudo daria certo. Mais uma vez, muito obrigada!

Ao grupo da profa. Marta: **Emiliano** (Mimi), **Michele**, **Adriano**, **Camila**, **Sarah**, **Klistenes**, **Alana** e agregada **Mariana**.

À amiga **Juliana Catarina**, que me ajudou em inúmeras metodologias, principalmente análise histopatológica, mas que cobrou e cobrará muito caro exigindo até que eu chore ao mencionar seu nome por onde for. Sua ajuda foi valiosa!!!

À querida bolsista **Nayara** que ensinou a dissecar medula e me fez jurar acrescentá-la aos agradecimentos por isso. Ainda não tinha ideia que eu agradeceria somente pela sua presença e alegria durante os dias de experimento.

Aos inúmeros colegas do Laboratório de Neurofarmacologia: **Cacá, Luciana, Rafaelly Siqueira, Helvira, Nayrton, Adriana, Fernanda, Gersilene, Patrícia Xavier, Márcia Calheiros, Eduardo, Sarah, Eduardo, Dr. Clayton.**

Às queridas **Vilani e Lena**, técnicas do Laboratório de Neurofarmacologia pela inestimável ajuda e alegria durante os dias de trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Neuropsicofarmacologia, lugar que passei tanto tempo que até cobraram taxa pra ajudar na compra da geladeira nova. **Ana Paula, Juliana Pereira, Analu, Patrícia, Arnaldo e Diego Fernandes** vocês foram maravilhosos, exceto a Analu que não era tão gentil como deveria.

À **Iara** “amante”, por nossa amizade construída ao longo do tempo e de muitos episódios do seriado Being Erica e que, apesar de ser engenheira de pesca, me ajudou algumas vezes nos experimentos.

Ao amigo **Felipe Fernandes** (peste), melhor amigo desde a faculdade e que, apesar de ter ido embora para São Paulo ainda temos muito contato e me encoraja a ser cada vez melhor como pesquisadora.

À amiga **Kamilla Alves** que me deu exemplo e coragem para mudar meus hábitos alimentares e de vida. Hoje me sinto mais leve e mais feliz em participar da causa de proteção animal.

Ao prof. Dr. **Thales Tréz**, biólogo, referência no Brasil e do Brasil no exterior para métodos alternativos ao uso de animais na pesquisa. Um exemplo de profissional que me abriu os olhos de que é possível continuar no mundo da pesquisa sem causar sofrimento aos animais.

Aos amigos da dança de salão que fizeram e fazem meus sábados mais felizes: **Natália, Danilo, Roberto, Hannah, Thales, Luís Paulo, Isadora, Felipe, Priscila, Belquior, Neto, D. Vládia, Lúcia, Jéssica, Thiciane e Dedé.**

Aos **animais**, que tanto amo e me fizeram superar as metodologias propostas, ter força para concluir essa etapa e iniciar um caminho de métodos alternativos na pesquisa. Sei que não será fácil, mas será necessário. Por eles e pela ciência.

À CAPES pelo apoio financeiro.

## RESUMO

**Avaliação do potencial anticonvulsivante do extrato padronizado de *Justicia pectoralis* (Chambá): estudo de neuroproteção e mecanismo de ação.** EDITH TELES VENÂNCIO. Orientadora: Marta Maria de França Fonteles. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2015.

A epilepsia acomete cerca de 50 milhões de pessoas e 30 % destas apresentam crises refratárias ao tratamento disponível no mercado. O mecanismo da convulsão envolve alteração de neurotransmissores e aminoácidos, estresse oxidativo, excitotoxicidade e lesão neuronal. O extrato padronizado de chambá (CH), preparado a partir das partes aéreas da *Justicia pectoralis*, apresentou em estudos prévios, efeito ansiolítico relacionado à modulação positiva dos receptores GABA<sub>A</sub>/benzodiazepínicos. Dessa forma, objetivando investigar o potencial anticonvulsivante do chambá, bem como o mecanismo de ação, foram realizados modelos de convulsão induzida por picrotoxina, estricnina, eletrochoque e pilocarpina. Para avaliar a atividade antioxidante através do envolvimento do estresse oxidativo foram mensurados os níveis de peroxidação lipídica, nitrito e a atividade da catalase em hipocampo, corpo estriado e medula (modelo de estricnina) nos modelos de convulsão mencionados acima. Em seguida, foram determinados os níveis de aminoácidos inibitórios (GABA, glicina e taurina) e excitatórios (glutamato e aspartato) no hipocampo após convulsão por pilocarpina e, para verificar a atividade neuroprotetora foram avaliadas a porcentagem de danos neuronais nas áreas CA1 e CA3 do hipocampo após *status epilepticus* induzido por pilocarpina. Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, tratados por via oral (gavage) e divididos em grupos de acordo com estudo realizado, dentre eles: atividade anticonvulsivante [6 grupos (n=10): controle (água destilada); CH (25, 50 e 100 mg/Kg); Fenobarbital (10 mg/Kg) ou Oxcarbazepina (60 mg/Kg)], atividade antioxidante [4 grupos (n=10): controle (água destilada), CH (50 mg/Kg), fenobarbital (10 mg/Kg) ou Oxcarbazepina (60 mg/Kg)], determinação da atividade sobre os níveis de aminoácidos [3 grupos (n=8): controle (água destilada), CH (50 mg/Kg) ou fenobarbital (10 mg/Kg)] e para verificação dos danos neuronais [3 grupos (n=4): controle (água destilada), CH (50 mg/Kg) ou pilocarpina (400 mg/Kg, via intraperitoneal)]. Os resultados mostraram que o chambá apresentou efeito anticonvulsivante, pois aumentou os parâmetros latência para 1º convulsão e latência para morte em todos os modelos e nas doses utilizadas, exceto a dose de 25 mg/Kg que não foi significativa no modelo de picrotoxina. A avaliação da atividade antioxidante mostrou que o chambá reduziu os níveis de peroxidação lipídica e nitrito, e aumentou a atividade da catalase no hipocampo e corpo estriado em todos os modelos utilizados. A determinação dos níveis de aminoácidos mostrou que o chambá aumentou os níveis dos aminoácidos inibitórios e reduziu os níveis dos aminoácidos excitatórios e, por fim, a avaliação da atividade neuroprotetora através da porcentagem de danos neuronais mostrou que o chambá reduziu as lesões neuronais nas áreas CA1 e CA3 do hipocampo. Em conclusão, o estudo sugere uma ação moduladora, exercida pelo extrato padronizado de *Justicia pectoralis*, sobre a convulsão através da alteração dos níveis de neurotransmissores, aminoácidos, estresse oxidativo e danos neuronais, sendo estes, mecanismos envolvidos na patologia.

**Palavras-chave:** Chambá, epilepsia, convulsão, antioxidante, neuroproteção

## ABSTRACT

**Assessment of anticonvulsant's potential of standardized extract of *Justicia pectoralis* (Chamba): neuroprotection study and mechanism of action. EDITH TELES VENÂNCIO. Supervisor: Marta Maria de France Fonteles. Doctoral Thesis. Graduate Program in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, UFC 2015.**

Epilepsy affects about 50 million people and 30% of these people have refractory seizures to the treatment available. The mechanism of seizure involves alteration in neurotransmitters and amino acids, oxidative stress, excitotoxicity and neuronal injury. The standardized extract of Chamba (CH), prepared from the aerial parts of *Justicia pectoralis*, presented in previous studies anxiolytic effect related to the upregulation of GABA/benzodiazepine receptors. Thus, with the aim to investigate the anticonvulsant potential of Chamba and its mechanism of action, we performed seizure models induced by picrotoxin, strychnine, electroshock and pilocarpine. To evaluate the antioxidant activity, we measured levels of lipid peroxidation, nitrite and catalase activity in hippocampus, striatum and marrow (strychnine model) in the seizure models mentioned above. Next, we determined the levels of inhibitory amino acid (GABA, glycine, and taurine) and excitatory amino acid (glutamate and aspartate) in the hippocampus after pilocarpine seizure and, to verify neuroprotective activity, we also evaluated the percentage of neuronal damage in the CA1 and CA3 fields of hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine. Swiss female mice were treated orally (gavage) and divided into groups according to the study, among them: anticonvulsant activity [6 groups (n = 10): control (distilled water); CH (25, 50 and 100 mg/kg); Phenobarbital (10 mg/kg) or oxcarbazepine (60 mg/kg)], antioxidant activity [4 groups (n = 10): control (distilled water), CH (50 mg/kg), phenobarbital (10 mg/kg) or oxcarbazepine (60 mg/kg)], determination of the amino acid levels [3 groups (n = 8): control (distilled water), CH (50 mg/kg) and phenobarbital (10 mg/kg)] and verification of neuronal damage [3 groups (n = 4): control (distilled water), CH (50 mg/kg) or pilocarpine (400mg/kg, intraperitoneally)]. The results showed that CHAMBA presented a anticonvulsant effect because it increased latency of first convulsion and latency to death parameters in all models and doses used, except the dose of 25 mg/kg, that was not significant in picrotoxin model. The evaluation of the antioxidant activity showed that Chamba reduced levels of lipid peroxidation and nitrite, and increased catalase activity in hippocampus and striatum in all models used. The determination of amino acid levels showed that Chamba increased levels of inhibitory amino acids, and reduced levels of excitatory amino acids and, finally, the evaluation of the neuroprotective activity by the percentage of neuronal damage, Chamba showed a reduced neuronal damage in the CA1 and CA3 areas of the hippocampus. In conclusion, the study suggests a modulating action carried out by the standardized extract of *Justicia pectoralis* on seizures by altering levels of neurotransmitters, amino acids, oxidative stress and neuronal damage, which are the mechanisms involved in the pathology.

**Keywords:** Chamba, epilepsy, seizure, antioxidant, neuroprotection

## LISTA DE FIGURAS

1	Estrutura química da cumarina (A) e umbeliferona (B).....	40
2	Chambá.....	41
3	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a latência para 1º convulsão (A) e latência para morte (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por picrotoxina (10 mg/Kg).....	57
4	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a latência para 1º convulsão (A) e latência para morte (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por estricnina (3 mg/Kg).....	59
5	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a latência para 1º convulsão (A) e latência para morte (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por eletrochoque.....	61
6	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a latência para 1º convulsão (A) e latência para morte (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina.....	63
7	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de MDA em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por picrotoxina .....	81
8	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de nitrito em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por picrotoxina.....	83
9	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a atividade da catalase em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por picrotoxina .....	85
10	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de MDA em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão induzida por estricnina.....	87
11	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de MDA em corpo estriado de camundongos submetidos à convulsão induzida por estricnina .....	88
12	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de MDA na medula de camundongos submetidos à convulsão induzida por estricnina.....	89
13	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de nitrito em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão induzida por estricnina .....	91

14	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de nitrito em corpo estriado de camundongos submetidos à convulsão induzida por estriocnina .....	92
15	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de nitrito na medula de camundongos submetidos à convulsão induzida por estriocnina.....	93
16	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a atividade da catalase em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão induzida por estriocnina.....	95
17	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a atividade da catalase em corpo estriado de camundongos submetidos à convulsão induzida por estriocnina .....	96
18	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a atividade da catalase na medula de camundongos submetidos à convulsão induzida por estriocnina .....	97
19	Efeito do chambá e oxcarbazepina sobre a concentração de MDA em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por eletrochoque .....	99
20	Efeito do chambá e oxcarbazepina sobre a concentração de em nitrito em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por eletrochoque.....	101
21	Efeito do chambá e oxcarbazepina sobre a atividade da catalase em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por eletrochoque .....	103
22	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de MDA em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina .....	105
23	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de nitrito em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina .....	107
24	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a atividade da catalase em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina .....	109
25	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração do aminoácido GABA em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina.....	121
26	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração do aminoácido Glicina em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina.....	123

27	Efeito do chambá e fenobarbital sobre aconcentração do aminoácido Taurina em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina .....	125
28	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração do aminoácido Glutamato em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina .....	127
29	Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração do aminoácido Aspartato em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina .....	129
30	Imagens representativas do efeito do chambá sobre os danos neuronais (coloração Cresila violeta) em área CA1 hipocampal de camundongos submetidos ao <i>status epilepticus</i> induzido por pilocarpina .....	142
31	Efeito do chambá sobre a porcentagem de danos neuronais em área CA1 hipocampal de camundongos submetidos ao <i>status epilepticus</i> induzido por pilocarpina .....	143
32	Imagens representativas do efeito do chambá sobre os danos neuronais (coloração Cresila violeta) em área CA3 hipocampal de camundongos submetidos ao <i>status epilepticus</i> induzido por pilocarpina .....	145
33	Efeito do chambá sobre a porcentagem de danos neuronais em área CA1 hipocampal de camundongos submetidos ao <i>status epilepticus</i> induzido por pilocarpina .....	146

## **LISTA DE QUADROS**

1	Principais materiais utilizados.....	<b>46</b>
2	Principais drogas utilizadas .....	<b>47</b>
3	Distribuição de albumina e água destilada para curva padrão de Bradford	<b>79</b>
4	Escores de danos neuronais .....	<b>140</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

a.C.	Antes de Cristo
ACh	Acetilcolina
ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina sérica bovina
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
DAE	Drogas antiepilepticas
ELETRO	Eletrochoque
ERN	Espécies reativas do nitrogênio
ERO	Espécies reativas do oxigênio
ESTRIC	Estricnina
Et al.	E colaboradores
EUA	Estados Unidos
FENO	Fenobarbital
GABA	Ácido gama amino butírico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
i.p.	Intraperitoneal
MDA	Malondialdeído
NO	Óxido nítrico
NUFITO	Núcleo de Fitoterapia
OX	Oxcarbazepina
PICRO	Picrotoxina
PILO	Pilocarpina
SESA	Secretaria de Saúde do Estado do Ceará
SNC	Sistema nervoso central
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias ácidas reativas ao ácido tiobarbitúrico

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>1.1</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE EPILEPSIA .....</b>	<b>20</b>
1.1.1	Sistemas de Neurotransmissão envolvidos .....	23
1.1.1.1	Ácido gama-aminobutírico.....	23
1.1.1.2	Glicina.....	25
1.1.1.3	Canais de sódio ativados por voltagem.....	26
1.1.1.4	Colinérgico.....	28
<b>1.2</b>	<b>ESTRESSE OXIDATIVO EPILEPSIA .....</b>	<b>29</b>
<b>1.3</b>	<b>AMINOÁCIDOS .....</b>	<b>32</b>
1.3.1	GABA.....	32
1.3.2	Glicina .....	33
1.3.3	Taurina.....	33
1.3.4	Glutamato.....	34
1.3.5	Aspartato.....	35
<b>1.4</b>	<b>Áreas cerebrais estudadas: hipocampo e corpo estriado.....</b>	<b>35</b>
<b>1.5</b>	<b>Detecção de dano neuronal .....</b>	<b>37</b>
<b>1.6</b>	<b>Plantas Medicinas .....</b>	<b>38</b>
1.6.1	Cumarinas .....	39
1.6.2	Família Acanthaceae .....	40
1.6.3	Justicia pectoralis Jacq. Var. stenophylla Leonard.....	40
<b>2</b>	<b>RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>42</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS GERAIS .....</b>	<b>44</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1</b>	<b>MATERIAL BOTÂNICO .....</b>	<b>45</b>

4.1.1	Extração da droga vegetal .....	45
4.1.2	Análise Cromatográfica .....	45
<b>4.2</b>	<b>PRINCIPAIS MATERIAIS E DROGAS UTILIZADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>4.3</b>	<b>PREPARO DAS DROGAS .....</b>	<b>48</b>
<b>4.4</b>	<b>ANIMAIS .....</b>	<b>48</b>
4.4.1	Tratamento de grupos experimentais .....	49
<b>4.5</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>CAPÍTULOS .....</b>	<b>50</b>
<b>CAPÍTULO I</b>		
<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>50</b>
<b>2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>52</b>
<b>3</b>	<b>Materiais e métodos.....</b>	<b>53</b>
3.1	Tratamento dos grupos experimentais .....	53
3.2	Modelos comportamentais de convulsão .....	53
3.2.1	Convulsão induzida por Picrotoxina .....	53
3.2.2	Convulsão induzida por Estricnina .....	54
3.2.3	Convulsão induzida por Eletrochoque .....	54
3.2.4	Convulsão induzida por Pilocarpina .....	54
<b>4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>56</b>
4.1	Efeito do chambá sobre a avaliação comportamental de camundongos submetidos à convulsão induzida por picrotoxina.....	56
4.2	Efeito do chambá sobre a avaliação comportamental de camundongos submetidos à convulsão induzida por estricnina .....	58

4.3	Efeito do chambá sobre a avaliação comportamental de camundongos submetidos à convulsão induzida por eletrochoque .....	60
4.4	Efeito do chambá sobre a avaliação comportamental de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina .....	62
5	<b>Discussão .....</b>	64
<b>CAPÍTULO II- Avaliação da Atividade Antioxidante</b>		
1	<b>Introdução .....</b>	71
2	<b>Objetivos específicos .....</b>	73
3	<b>Materiais e Métodos .....</b>	74
3.1	Testes Neuroquímicos .....	74
3.1.1	Determinação da peroxidação lipídica através da produção de substâncias ácidas reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) .....	74
3.1.2	Determinação da produção de nitrito-nitrato .....	75
3.1.3	Determinação da atividade da catalase .....	77
3.1.4	Dosagem de proteínas .....	78
4	<b>Resultados .....</b>	80
4.1	<b>Efeito do chambá sobre o estresse oxidativo em camundongos submetidos à convulsão induzida por picrotoxina .....</b>	80
4.1.1	Efeito do chambá sobre a concentração de malondialdeído (MDA) em homogenatos cerebrais de hipocampo e corpo estriado .....	80
4.1.2	Efeito do chambá sobre a concentração de nitrito em homogenatos cerebrais de hipocampo e corpo estriado .....	82
4.1.3	Efeito do chambá sobre a atividade da catalase em homogenatos cerebrais de hipocampo e corpo estriado .....	84

<b>4.2</b>	<b>Efeito do chambá sobre o estresse oxidativo em camundongos submetidos à convulsão induzida por estricnina.....</b>	<b>86</b>
4.2.1	Efeito do chambá sobre a concentração de malondialdeído (MDA) em homogenatos cerebrais de hipocampo, corpo estriado e medula .....	86
4.2.2	Efeito do chambá sobre a concentração de nitrito em homogenatos cerebrais de hipocampo, corpo estriado e medula .....	90
4.2.3	Efeito do chambá sobre a atividade da catalase em homogenatos cerebrais de hipocampo, corpo estriado e medula .....	94
<b>4.3</b>	<b>Efeito do chambá sobre o estresse oxidativo em camundongos submetidos à convulsão induzida por eletrochoque .....</b>	<b>98</b>
4.3.1	Efeito do chambá sobre os níveis de malondialdeído (MDA) em homogenatos cerebrais de hipocampo e corpo estriado .....	98
4.3.2	Efeito do chambá sobre a concentração de nitrito em homogenatos cerebrais de hipocampo e corpo estriado .....	100
4.3.3	Efeito do chambá sobre a atividade da catalase em homogenatos cerebrais de hipocampo e corpo estriado .....	102
<b>4.4</b>	<b>Efeito do chambá sobre o estresse oxidativo em camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina.....</b>	<b>104</b>
4.4.1	Efeito do chambá sobre a concentração de malondialdeído (MDA) em homogenatos cerebrais de hipocampo e corpo estriado .....	104
4.4.2	Efeito do chambá sobre a concentração de nitrito em homogenatos cerebrais de hipocampo e corpo estriado .....	106
4.4.3	Efeito do chambá sobre a atividade da catalase em homogenatos cerebrais de hipocampo e corpo estriado .....	108
<b>5</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>110</b>

<b>CAPÍTULO III - Determinação da concentração de aminoácidos</b>		
<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>115</b>
<b>2</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>117</b>
<b>3</b>	<b>Materiais e métodos .....</b>	<b>118</b>
<b>3.1</b>	<b>Procedimento experimental .....</b>	<b>118</b>
<b>4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>120</b>
<b>4.1</b>	<b>Efeito do chambá sobre a concentração de aminoácidos em camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina .....</b>	<b>120</b>
4.1.1	Efeito do chambá sobre a concentração de GABA em homogenatos cerebrais de hipocampo .....	120
4.1.2	Efeito do chambá sobre a concentração de Glicina em homogenatos cerebrais de hipocampo .....	122
4.1.3	Efeito do chambá sobre a concentração de Taurina em homogenatos cerebrais de hipocampo .....	124
4.1.4	Efeito do chambá sobre a concentração de Glutamato em homogenatos cerebrais de hipocampo .....	126
4.1.5	Efeito do chambá sobre a concentração de Aspartato em homogenatos cerebrais de hipocampo .....	128
<b>5</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>130</b>
<b>CAPÍTULO IV - Análise Histopatológica</b>		
<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>135</b>
<b>2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>137</b>
<b>3</b>	<b>Materiais e métodos .....</b>	<b>138</b>
<b>4</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>141</b>

<b>4.1</b>	<b>Efeito do chambá sobre a porcentagem de danos neuronais em área CA1 hipocampal de camundongos submetidos ao <i>status epilepticus</i> induzido por convulsão por pilocarpina .....</b>	<b>141</b>
<b>4.2</b>	<b>Efeito do chambá sobre danos neuronais em área CA3 hipocampal de camundongos submetidos ao <i>status epilepticus</i> induzidos por convulsão por pilocarpina .....</b>	<b>144</b>
<b>5</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>147</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>149</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>150</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE EPILEPSIA

A palavra “epilepsia” vem do grego e tem a mesma raiz do verbo “epilambanein” que significa ser invadido, dominado ou tomado (Reynolds & Rodin, 2009). A epilepsia não é uma doença moderna. Os relatos mais antigos sobre a epilepsia são manuscritos babilônicos, datados por volta de 2000 a.C., que registram diferentes tipos de ataques que são reconhecidos até os dias atuais, sempre os associando a espíritos e enfatizando a natureza sobrenatural. Embora Hipócrates, há 400 anos a.C. tenha descrito que a epilepsia não era sagrada e nem divina, mas um distúrbio do cérebro, com suspeita de que sua origem fosse hereditária, ainda acreditava-se que a doença estava associada a aspectos místicos (CHAUDHARY; DUNCAN; LEMIEUX, 2011).

Entre os autores de relevância, durante o século XIX, é de considerar a importância do neurologista e autor inglês Hughlings Jackson (1835-1911), que estabeleceu as bases da moderna epileptologia ao descrever as crises chamadas de psicomotoras e descrever sobre o papel das descargas elétricas cerebrais na origem dos fenômenos epilépticos (HUGHLINGS-JACKSON, 1880; CHAUDHARY; DUNCAN; LEMIEUX, 2011).

Muitos avanços no que se refere ao diagnóstico da epilepsia ocorreram no século XIX, com a descoberta do eletroencefalograma, por Hans Berger em 1933, representando um marco significativo no conhecimento da fisiologia do encéfalo humano e possibilitando um enorme volume de pesquisa de valor inestimável para o diagnóstico das epilepsias.

A epilepsia é o transtorno mais comum na clínica neurológica. Cerca de 50 milhões de pessoas sofrem de epilepsia com crises ativas necessitando de tratamentos, e 30 % desses pacientes apresentam crises refratárias (sem resposta) ao tratamento medicamentoso disponível no mercado (WHO, 2010). Aproximadamente 90 % dos casos de epilepsia ocorrem em países em desenvolvimento. Na Índia, por exemplo, estima-se um custo de 0.5% do PIB para tratar pacientes com epilepsia (~5 milhões); na Europa esse valor é de 20 milhões de euros (WHO, 2010). No Brasil, embora os estudos epidemiológicos sejam escassos,

estima-se que a prevalência da epilepsia atinja 1,4% da população em geral, porém somente 10 % a 40 % recebem algum tratamento medicamentoso ou tratamento cirúrgico. Foram registrados 32.655 óbitos decorrentes de epilepsia no Brasil, no período de 1980 a 2003. (FERREIRA; SILVA, 2009).

A disfunção neurológica na sua fase aguda é chamada de crise epiléptica, a qual, dependendo da área cerebral envolvida pode manifestar-se através de distúrbios de cognição ou consciência, movimentos involuntários, automatismos de comportamento ou manifestações autonômicas, sensoriais e psíquicas (CHAUDHARY; DUNCAN; LEMIEUX, 2011).

O evento mais dramático de alguns quadros de epilepsia é a convulsão. Convulsão e epilepsia são termos geralmente confundidos. De acordo com a *International League Against Epilepsy* (ILAE), convulsão é definida como uma ocorrência transitória de sinais e/ou sintomas devido à atividade hipersincrônica e repetitiva de um grupamento neuronal do córtex cerebral, cuja distribuição anatômica e duração de sua atividade determinam a natureza da crise; enquanto a epilepsia é um distúrbio do cérebro caracterizado pela predisposição persistente em gerar crises convulsivas, provocando consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais (FISHER et al., 2005; STEFAN et al., 2009).

A incidência de crise epiléptica é bem maior na infância e adolescência, quando se compara com a vida adulta (TRAVÉ; PETRI; VICTORIANO, 2007). Estudos epidemiológicos populacionais demonstram uma prevalência de transtornos mentais em adultos e crianças portadores de epilepsia. A presença de ansiedade, depressão, psicose, déficits de atenção e fobias são algumas das variáveis mais importantes no que diz respeito à qualidade de vida dos pacientes, tendo inclusive maior impacto do que a frequência e gravidade das crises epilépticas nos pacientes (BOER et al., 2008; COTTERMAN-HART et al., 2010).

Apesar dos inúmeros trabalhos científicos dedicados a elucidação dos fenômenos envolvidos na epilepsia e dos importantes avanços no estudo da epileptogênese, milhares de pessoas são acometidas de epilepsia refratária aos atuais fármacos antiepilepticos (ASCONAPÉ, 2010).

Embora os mecanismos de ação da maioria das drogas antiepilepticas (DAE) não sejam totalmente elucidados, geralmente envolvem a alteração do equilíbrio entre os mecanismos excitatórios e inibitórios neuronais. Três mecanismos básicos, em nível celular, são reconhecidos: modulação dos canais iônicos dependentes de voltagem; aumento da neurotransmissão inibitória mediada pelo GABA e atenuação da neurotransmissão excitatória, em particular mediada pelo glutamato (DECKERS et al., 2003).

A descoberta do fenobarbital, 1912, marcou o início da moderna farmacoterapia da epilepsia. Além deste, drogas como fenitoína, carbamazepina, diazepam e valproato de sódio figuram na categoria das DAE de primeira geração.

Os diversos fármacos benzodiazepínicos comercializados como o diazepam, lorazepam, clobazam e clonazepam são os mais comumente utilizados como antiepilepticos e possuem um amplo espectro de atividade clínica, sendo eficazes no tratamento de crises epilépticas parciais e generalizadas, bem como no tratamento agudo do estado epiléptico. Esses fármacos ligam-se a um sítio específico do receptor GABA<sub>A</sub>, facilitando a ligação do GABA ao seu receptor e consequentemente exacerbando a transmissão inibitória através da abertura de canais de cloreto (BRODIE et al., 2011). Fármacos como fenitoína, carbamazepina e valproato bloqueiam a descarga de alta frequência repetitiva através da inibição de canais de sódio, sendo eficazes inclusive contra convulsões tônico-clínicas (BRODIE et al., 2011).

Estas DAE de primeira geração apresentam, em geral, um significativo número de efeitos adversos tais como sedação, retenção hídrica, hepatotoxicidade, depressão, bradicardia, acidose respiratória, anemia megaloblástica e tolerância (ALMEIDA, 2006; HUNG, SHIH, 2011).

Nas últimas décadas, com o surgimento das DAE de segunda geração (lamotrigina, vigabatrina, tiagabina, topiramato, gabapentina e levitiracetam), o tratamento da epilepsia têm acrescentado muitos avanços e várias outras substâncias têm sido propostas como novos agentes antiepilepticos. As novas DAE, em geral, causam menos efeitos adversos e possuem um menor potencial para o desenvolvimento de toxicidade. Contudo o percentual de pacientes que não tem um controle apropriado continua sem modificações significativas (HUNG; SHIH, 2011).

Inúmeras pesquisas visam descobrir novas estratégias farmacológicas antiepilepticas por meio de novos compostos eficazes para a epilepsia de difícil controle ou de compostos com menor toxicidade para aquelas já tratadas pelo arsenal terapêutico atualmente disponível (FAGGION et al., 2011).

Pesquisas mais recente com possíveis anticonvulsivantes estão inseridas em novos conceitos, como drogas que atuem sobre a própria epileptogênese inibindo o desenvolvimento e progressão da epilepsia e abandonando um pouco o enfoque das DAE tradicionais que agem, de maneira geral, suprimindo a propagação inicial das convulsões, ou seja, tratando apenas os sintomas (ROBERTSON et al., 2011).

### 1.1.1 Sistemas de Neurotransmissão envolvidos

#### 1.1.1.1 Ácido gama-aminobutírico

O ácido gama-aminobutírico (aminoácido GABA), identificado por Florey e McLennan (1955) e por Basemore e colaboradores (1956), é formado a partir do glutamato pela ação da enzima ácido glutâmico descarboxilase e da coenzima piridoxina (vitamina B6) (MILLS et al., 2005). Apresenta uma ampla distribuição e é responsável por cerca de 30% de todas as sinapses, sendo o principal neurotransmissor inibitório no SNC, ativando receptores pré e pós-sinápticos (MARTIN; OLSEN, 2000).

A identificação da relação entre a deficiência do GABA e o aparecimento de crises convulsivas deu-se pela primeira vez em 1954, quando bebês foram alimentados com uma dieta pobre em vitamina B6 (piridoxina) (COURSIN, 1954).

Estudos posteriores confirmaram esta ideia de que o controle da excitabilidade neuronal e a inibição da epileptogênese sejam mediados pelo receptor do GABA e a falha neste receptor esteja intimamente relacionada a geração de ataques epilépticos (HAWKINS-JR; SARET, 1957).

O GABA apresenta receptores subdivididos em três classes: GABA<sub>A</sub>, GABA<sub>B</sub> e GABA<sub>C</sub>. GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>C</sub> são receptores ionotrópicos, enquanto que o GABA<sub>B</sub> é um receptor metabotrópico acoplado à proteína G (BARNARD et al., 1998; CHEBIB; JOHNSTON, 1999; AVOLI; CURTIS, 2011).

Os receptores GABA<sub>A</sub> são canais para cloreto operados por ligantes, compostos por cinco subunidades, onde estas subunidades podem se apresentar em diferentes isoformas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$  e  $\theta$ ), contendo 16 subtipos no total ( $\alpha 1-6$ ,  $\beta 1-3$ ,  $\gamma 1-3$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\pi$  e  $\theta$ ). Há seis tipos de subunidades alfa ( $\alpha 1$  a  $\alpha 6$ ), onde os receptores que compreendem as subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  ou  $\alpha 5$  são sensíveis aos benzodiazepínicos, enquanto aqueles que compreendem  $\alpha 4$  e  $\alpha 6$  levam a receptores insensíveis aos benzodiazepínicos (BONNERT et al., 1999; HAN et al., 2009).

Essa heterogeneidade estrutural dos receptores GABA<sub>A</sub> faz com que estes possuam sítios de ligação distintos para uma variedade de drogas, como barbitúricos, benzodiazepínicos, pentilenotetrazol e picrotoxina que podem modular a atividade do GABA (BATESON, 2004). Este é um importante diferencial para se determinar alvos seletivos para novas drogas.

Os benzodiazepínicos, por exemplo, se ligam ao GABA<sub>A</sub> em um sítio diferente do sítio de ligação do GABA e o modulam alostericamente, facilitando a ligação do GABA ao receptor e aumentando a frequência de abertura do canal. São usados para tratar uma variedade de sinais e sintomas clínicos, incluindo ansiedade e convulsões (WHITING, 1999; HAN et al., 2009).

Desde que o receptor GABA<sub>B</sub> foi primeiramente descrito em tecidos de mamíferos (BORMANN, 1998), muitas informações tem surgido sobre o seu papel fisiológico no sistema nervoso central de mamíferos e sua relação com outros receptores de neurotransmissores (BOWERY, 2010).

Trata-se de um receptor metabotrópico acoplado à proteína G<sub>i</sub>, ligado à hiperpolarização de membrana. Podem ser encontrados em neurônios pré e pós-sinápticos, onde sua ativação modula a condutância da membrana para os íons Ca<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, ocasionando inibição dos canais para cálcio dependentes de voltagem (PADGETT; SLESINGER, 2010).

O principal agonista para este receptor é o baclofeno e continua a ser usado terapeuticamente como um relaxante muscular de ação central (PARKAS; TARAWA; BERZSENYL, 1989). Outras potenciais aplicações para agonistas e moduladores alostéricos positivos são sugeridos, tendo como alvos receptores no SNC e fora dele, como por exemplo, na doença do refluxo gastroesofágico (FROESTL, 2010).

Antagonistas do receptor GABA<sub>B</sub> também podem ter importantes aplicações terapêuticas, como em déficits de memória, transtornos afetivos e crises de ausência (BOWERY, 2010).

Um terceiro tipo de receptor GABA, denominado GABA<sub>C</sub>, distinto dos receptores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>B</sub>, foi pela primeira vez descrito em interneurônios da medula espinhal (JOHNSTON et al., 1975), mas tem sido caracterizados mais extensivamente na retina de vertebrados (FEIGENSPAN; BORMANN, 1994; LUKASIEWICZ et al., 2004).

Apesar de também serem canais para cloreto operados por ligantes, mostram propriedades, eletrofisiológicas distintas, quando comparados com os receptores GABA<sub>A</sub>, já que possuem uma maior sensibilidade para o GABA, suas correntes são menores e não dessensibilizam. Estes canais são caracterizados por permanecerem em média um maior tempo em estado aberto e possuírem uma menor condutância aos íons cloreto (ENZ; CUTTING, 1998).

#### 1.1.1.2 Glicina

A glicina é um aminoácido não essencial com uma estrutura bastante simples (NELSON; COX, 2000) e que desempenha dois papéis fundamentais no sistema nervoso central: um deles é como neurotransmissor químico, particularmente importante nas sinapses inibitórias da espinha medula e tronco cerebral (SIEGEL et al., 1989) e o outro é como co-agonista da transmissão excitatória no cérebro através da ativação dos receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), pertencentes à família dos receptores de glutamato, que apresentam uma resposta extremamente potenciada pela glicina (JOHNSON; ASCHER, 1987).

A glicina pode participar em diversos processos metabólicos e é sintetizada a partir da glucose, apesar do seu precursor imediato ser a serina. Vários estudos usando precursores radioativos sugerem que a grande maioria da glicina encontrada no cérebro é originada pela síntese de novo a partir da serina e não pelo transporte através do sangue (SIEGEL et al., 1989).

Para a glicina são conhecidos, até ao momento, dois tipos de transportadores, o GlyT1 (glycine transporter 1), localizado na membrana dos astrócitos, (GUASTELLA et al., 1992) e o GlyT2 (glycine transporter 2) que existe na membrana dos terminais pré-sinápticos (LIU et al., 1993). Ambos promovem a entrada da glicina nas células acompanhada do co-transporte de íons sódio (Na<sup>+</sup>) e Cl<sup>-</sup> (ROUX; SUPPLISSON, 2000).

#### 1.1.1.3 Canais de sódio ativados por voltagem

Na maioria das células excitáveis, a corrente de entrada que é responsável pela fase ascendente do potencial de ação nos neurônios e em outras células excitáveis é resultante da ativação dos canais para sódio regulados por voltagem (Nav), sendo tais canais um dos alvos mais comuns para as Drogas Antiepilepticas (MEISLER. KEARNEY, 2005).

Os Nav são geralmente classificados em dois grandes grupos: os sensíveis à tetrodotoxina (TTX-S), que estão presentes nas fibras A<sub>δ</sub>, em todo sistema nervoso e nos gânglios da raiz dorsal, e os resistentes à tetrodotoxina (TTX-R), que são encontrados especialmente nas fibras C do gânglio da raiz dorsal (LAI; HUNTER; PORRECA, 2003).

Dentre as nove isoformas de Nav (1.1-1.9) identificados até o momento, no cérebro de mamíferos, a maioria dos canais para sódio expressos pertence a quatro subtipos (BRODIE et al., 2011). Mutações genéticas em dois desses, Nav1.1 e Nav1.2, estão associados com o aparecimento de epilepsia (CATTERALL; KALUME; OAKLEY, 2010).

Mutações em Nav1.1, principal canal de sódio em interneurônios inibitórios, causa a perda de sua função e consequente hiperexcitabilidade. O bloqueio desses canais

geneticamente modificados por drogas como a lamotrigina, por exemplo, pode agravar crises epilépticas nesses pacientes (GUERRINI et al., 1998; YU et al., 2006; OGAWA et al., 2007).

Em contraste, mutações em Nav1.2, expressos em segmentos iniciais de axônios das vias excitatórias principais no hipocampo e córtex, causam uma síndrome epiléptica benigna em recém-nascidos e crianças, através de uma hiperfunção desses canais (VACHER; MOHAPATRA; TRIMMER, 2008; LIAO et al., 2010).

O bloqueio dos canais de sódio dependente é um mecanismo comum para várias drogas antiepilepticas. Fenitoína, carbamazepina, lamotrigina e oxcarbazepina, por exemplo, bloqueiam este canal por estabilizar o seu estado de inativação rápida, enquanto que a lacosamida causa o bloqueio pela estabilização do seu estado de inativação lenta.

Esses diferentes subtipos, expressos em populações neuronais específicas, possuem propriedades de condutância distintas. Portanto, bloqueadores seletivos podem apresentar vantagens em relação as DAE existentes.

É verdade que nas duas últimas décadas, com o surgimento das DAE de segunda e terceira geração, o tratamento da epilepsia tem apresentado muitos avanços e várias outras substâncias tem sido propostas como novos agentes antiepilepticos (HUNG, SHIH, 2011).

O desenvolvimento de novos medicamentos encontra-se profundamente alicerçado na história da descoberta da atividade farmacológica exibida por fonte de origens naturais. Convém salientar que plantas indicadas para o tratamento de doenças com manifestações neurológicas e distúrbios psiquiátricos tem apresentado uma grande procura, porém, muitas não apresentam nenhum respaldo científico e, às vezes, nem sequer tem ação do SNC.

#### 1.1.1.4 Colinérgico

A acetilcolina (ACh) é um mediador químico de sinapses no sistema nervoso central (SNC), no sistema nervoso periférico e também na junção neuromuscular. A Ach, seus receptores e o aparato enzimático responsável por sua síntese e degradação constituem o sistema de neurotransmissão colinérgica (BRUNEAU, AKAABOUNE, 2006).

A administração periférica de altas doses do agonista muscarínico colinérgico pilocarpina produz convulsões em roedores (MARINHO *et al.*, 1997). O início dessas convulsões pode ser bloqueado pela atropina e atenuado pela inibição da atividade colinérgica endógena (JOPE *et al.*, 1986; 1992; MORRISETT *et al.*, 1987a; MARINHO *et al.*, 1997). Assim, o processo convulsivo, decorrente do tratamento de ratos com pilocarpina em doses convulsivas, parece depender da ativação dos receptores muscarínicos, podendo envolver o metabolismo dos fosfoinosítídios e sendo capaz de produzir lesões cerebrais e alterações comportamentais (MARINHO *et al.*, 1997; 1998).

O sistema colinérgico tem como neurotransmissor a acetilcolina (ACh). A ACh é um importante neurotransmissor excitatório no cérebro (OLNEY *et al.*, 1983 e 1986; NATHANSON *et al.*, 1999). A estimulação cerebral induzida pela ACh ocorre através da ativação dos receptores colinérgicos cerebrais, onde cerca de 99% destes são muscarínicos, e 1% são nicotínicos (PEPEU, 1983; ELGOYHEN *et al.*, 2000). Assim, a maioria dos efeitos de ativação colinérgica no cérebro é provavelmente devido à estimulação dos receptores colinérgicos muscarínicos (RCM).

A clonagem gênica revelou a existência de cinco tipos de receptores muscarínicos (M1, M2, M3, M4, e M5) (BONNER *et al.*, 1987; LIAO *et al.*, 1989; NATHANSON *et al.*, 1999), sendo todos eles receptores acoplados à proteína G, onde os membros com numeração (M1, M3, e M5), atuam através da via do fosfato de inositol, enquanto os de numeração par (M2 e M4) operam inibindo a adenilato ciclase, portanto, reduzindo o AMPc intracelular (PERALTA *et al.*, 1987 e 1988; HULME *et al.*, 1990; WESS *et al.*, 1990).

Diversos estudos anatomo-patológicos do modelo colinérgico têm evidenciado importantes alterações do tecido nervoso similares ao que se observa em humanos, sendo que

diferentes estruturas neurais são atingidas, tais como hipocampo, complexo amígdalóide, córtex entorrinal e neocôrtex. Tais alterações correspondem a anormalidades dendríticas e axonais, acompanhadas da perda de neurônios e de reação gliótica ((TURSKI *et al.*, 1983a; CLIFFORD *et al.*, 1987). A perda neuronal é principalmente evidente na região hipocampal CA1 e CA3 e no hilo do giro denteado, embora também ocorra em outras regiões encefálicas (TURSKI *et al.*, 1983).

As inervações colinérgicas hipocampais originam-se principalmente de corpos celulares neuronais localizados no núcleo septal medial e núcleo da borda vertical da banda diagonal de Broca (AZNAVOUR *et al.*, 2002).

## 1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E EPILEPSIA

O estresse oxidativo é a condição que ocorre quando o estado de equilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes é alterado em prol do primeiro, criando um potencial de dano orgânico. Pró-oxidantes são, por definição, radicais livres, átomos ou grupos de átomos com um único elétron desemparelhado (STAMLER *et al.*, 1992).

Inicialmente, o estresse oxidativo era descrito com um desequilíbrio entre a geração e a eliminação de espécies reativas do oxigênio (ERO) e espécies reativas do nitrogênio (ERN). Essas espécies reativas eram inicialmente consideradas como sendo exclusivamente prejudiciais às células. Porém, agora se considera que a regulação redox envolvendo ERO é essencial para a modulação de funções celulares cruciais (principalmente em astrócitos e micrôglia), tais como a ativação da cascata de proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAP), ativação de cascata quinase, transporte de íons, mobilização de cálcio e ativação do programa de apoptose (EMERIT, 2004).

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre oxidantes (radicais livres); o estresse nitrosativo se refere a processos nos quais os fluxos de óxido nítrico se tornam altos o suficiente para resultar na nitrosação de aminas, tióis e antioxidantes, o que resulta, por sua vez, em excesso relativo ou real de espécies oxidativas. Isso leva a uma

interrupção da sinalização, controle de redox e/ou dano celular (BARNHAM et al., 2004). Os radicais livres (RL) consistem de estruturas químicas que contém um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada mais externa. Essa propriedade está associada a um estado altamente reativo e a uma propensão a reações químicas.

O termo estresse foi empregado pela primeira vez por Hans Selye (1936) para descrever uma ameaça real ou potencial à homeostasia. Em 1956 Harman propôs a “teoria dos radicais livres” para o processo de envelhecimento. Ele sugeriu que os radicais livres produzidos durante a respiração aeróbica possuíam efeitos deletérios sobre os componentes celulares e tecidos conjuntivos, causando danos cumulativos que resultam no processo de envelhecimento e, eventualmente, morte. Esse autor especulou, inicialmente, que os radicais livres eram produzidos por reações envolvendo oxigênio molecular e catalisados nas células por enzimas oxidativas (HARMAN, 1956).

Em 1972 Harman incluiu o envolvimento das mitocôndrias no processo fisiológico de envelhecimento. Aproximadamente 90 % de todo o oxigênio na célula é consumido na mitocôndria, especialmente na membrana interna onde ocorre a fosforilação oxidativa (HARMAN, 1972). O oxigênio está envolvido na oxidação de compostos orgânicos e na produção de energia para o metabolismo celular. Entretanto, somente uma pequena quantidade de oxigênio consumido (entre 2 e 5 %) é reduzido, o que deixa várias substâncias químicas altamente reativas conhecidas como radicais livres de oxigênio ou ERO (KONG, LIN, 2010).

O estresse oxidativo mostrou estar associado em espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e vias de sinalização do óxido nítrico (NO), através das quais o NO biodisponível diminui e a produção de ERO e ERN aumenta (SZABO et al., 2007). As vias de estresse oxidativo e nitrosativo são induzidas por respostas inflamatórias e processos metabólicos mitocondriais subsequentes geram moléculas de radicais livres altamente reativas. ERO é um termo bastante amplo que abrange não somente radicais de oxigênio como radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidroxila ( $\cdot OH$ ), óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), mas também derivado do oxigênio que não é radical, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006). Exemplo de ERN é o óxido nítrico. Em condições fisiológicas as vias de defesa compensam a produção de ERO e ERN, portanto nessas condições as espécies reativas possuem papéis fisiológicos que incluem a sinalização. Em

condições de produção excessiva ou se as defesas do organismo estiverem comprometidas, as ERO e ERN poderão reagir com ácidos graxos, proteínas e DNA, causando dano a esses substratos. (MAES et al., 2011).

Alguns dos mais destrutivos radicais livres gerados no organismo derivam do oxigênio ( $O_2$ ). Então, a molécula mais importante para a manutenção da vida pode também provocar danos celulares, podendo levar a destruição de órgãos e do próprio organismo. O acúmulo dos danos ao longo da vida causados por moléculas vitais em órgãos está relacionado ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças relacionadas com a idade (NICHOLLS, 2008).

O radical superóxido ( $O_2\cdot^-$ ) é o produto da adição de um elétron a molécula de oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Muitas moléculas biológicas como, por exemplo, a hemoglobina, mioglobina, catecolaminas e alguns constituintes dos sistemas de transporte de elétrons mitocondriais (TURRENS et al., 1985) reagem com o  $O_2$  convertendo-o em  $O_2\cdot^-$ . Adicionalmente, fagócitos ativados (neutrófilos, monócitos, macrófagos e eosinófilos) geram  $O_2\cdot^-$  em grande quantidade, com a finalidade de destruir microorganismos estranhos ao organismo. Esse mecanismo de proteção natural pode tornar-se nocivo nos processos de inflamação crônica (MOSLEY et al., 2006; LU et al., 2010).

O radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) é a espécie de oxigênio mais reativa em sistemas biológicos; age rapidamente no local em que é produzido, sendo potencialmente capaz de causar alterações nas bases purínicas e pirimidínicas, levando a inativação ou mutação do DNA, inibir diversas proteínas (constituintes das membranas celulares e enzimas) através da oxidação dos seus grupamentos sulfidrila (-SH) a pontes de dissulfeto (-SS) e iniciar a peroxidação de lipídios, especialmente ácidos graxos poli-insaturados de membranas e lipoproteínas (VALKO et al., 2006; TANG, et al., 2012).

O  $H_2O_2$  não é especialmente tóxico, a menos que esteja em altas concentrações nas células. Outra característica dessa molécula é que ela possui a capacidade de se difundir rapidamente através das membranas celulares podendo então se distribuir por sítios distantes dos quais ela foi gerada. Além disso, na presença de metais de transição, mais comumente o  $Fe^{2+}$ , mas também o  $Cu^{1+}$ , o  $H_2O_2$  é reduzido à radical hidroxil ( $OH\cdot$ ) via reação de Fenton

(NICHOLLS, 2008). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> possui meia-vida longa e é capaz de atravessar várias camadas lipídicas e de reagir com metais de transição e algumas hemoproteínas.

O óxido nítrico (NO) funciona como um mensageiro intracelular de produção endógena que desempenha um importante papel em praticamente todos os sistemas do organismo (EISERICH et al., 1998), embora exerça diversas funções fisiológicas úteis, em excesso pode ser nocivo.

Evolutivamente, foram selecionadas várias estratégias antioxidantes para as células lidarem com a toxicidade do oxigênio que e, dentre estas, a catalase que reage de forma muito eficiente com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar água e oxigênio molecular e reage com doadores de H (metanol, etanol) com atividade de peroxidase. A catalase protege as células contra o peróxido de hidrogênio gerado dentro das mesmas e, apesar da catalase não ser essencial para alguns tipos de células em condições normais, ela possui papel importante na aquisição de tolerância ao estresse oxidativo e nitrosativo na resposta celular adaptativa (MATES, SANCHEZ-JIMENEZ, 1999; USUI et al., 2009).

### 1.3 AMINOÁCIDOS

#### 1.3.1 GABA

Durante a fase aguda das convulsões límbicas induzidas pela pilocarpina podem ocorrer mudanças neuronais adaptativas em relação à expressão e/ou sensibilidade dos receptores GABAérgicos, resultando na quebra do equilíbrio entre os efeitos inibitórios e os excitatórios (mediados pelo glutamato) (FREITAS et al., 2004). O estado epiléptico induzido por pilocarpina em diferentes áreas cerebrais de ratos adultos e nos neurônios hipocampais de humanos com epilepsia refratária do lobo temporal (BROOKS-KAYAL et al., 1999; BRENNEKE et al., 2004) demonstra inúmeras alterações nas propriedades dos receptores GABA.

A ativação dos receptores muscarínicos do tipo M1 no hipocampo durante bloqueio dos receptores GABAérgicos pode aumentar as descargas no SNC e facilitar a instalação e propagação do quadro convulsivo (PSARROPOULOU et al., 1999). Freitas e colaboradores (2004a) observaram redução da densidade dos receptores GABAérgicos no cérebro de ratos adultos submetidos à convulsão por pilocarpina e essas mudanças podem aumentar a incidência e a frequência das descargas epilptiformes.

### 1.3.2 Glicina

Em condições de elevada degradação de proteínas e lipídios pelo estresse oxidativo a glicina pode atuar como um regulador metabólico reduzindo os danos neuronais durante a fase aguda das convulsões (LOBLEY et al., 2001). Baixos níveis de glicina foram verificados através da técnica de microdiálise no modelo de epilepsia pós-traumática induzida pelo ferro, enquanto a administração de removedores de radicais livres aumenta os níveis de glicina (SAMUELSSON et al., 2003). Cavalheiro e colaboradores (1994) observaram aumento da concentração de glicina hipocampal durante a primeira hora da fase aguda da convulsão induzida por pilocarpina.

### 1.3.3 Taurina

A taurina ou ácido 2-aminoetano sulfônico é um dos aminoácidos livres mais abundantes em diferentes tecidos, sendo essencial para o funcionamento do sistema nervoso central dos mamíferos, atuando na osmorregulação, estabilização e manutenção da integridade da membrana neuronal, na neuroproteção e no controle da homeostasia do cálcio (SARANSAARI, OJA, 2007). Este aminoácido pode ser encontrado em neurônios e células gliais, sendo armazenado em terminais sinápticos, evidenciando possível ação neurotransmissora inibitória via receptores GABA<sub>A</sub> e de glicina (JUNYENT et al., 2009). Além disso, é capaz de modular a atividade de diversas enzimas que podem estar relacionadas com insultos cerebrais causados por drogas de abuso, como o etanol (GERLAI et al., 2006). EDNA

As maiores concentrações intracelulares de taurina são encontradas no coração, leucócitos, músculo esquelético, retina e SNC, sendo o fígado o local de maior variação nas concentrações de taurina, em que estas são dependentes da dieta ingerida. Dentre as funções da taurina no cérebro estão as de neurorregulação, neurodesenvolvimento, modulação da excitabilidade neuronal, manutenção da função cerebelar, modulação da liberação hormonal e anticonvulsivante (KONTRO; OJA, 1983). Um dos papéis importantes da taurina está relacionado à excitotoxicidade glutamatérgica (WU; PRENTICE, 2010).

#### 1.3.4 Glutamato

O glutamato é um dos mais importantes neurotransmissores excitatórios do sistema nervoso central e está envolvida em inúmeros eventos fisiológicos, incluindo desenvolvimento neural, aprendizado, integração fisiológica entre as diferentes estruturas cerebrais e os processos de memória (OZAWA et al., 1998). Entretanto, o aumento da estimulação do sistema glutamatérgico está implicado em muitas disfunções cerebrais agudas e crônicas e pode contribuir para anormalidades associadas com a epilepsia, isquemia cerebral e doenças neurodegenerativas (HAYES et al., 1992; LANCASTER et al., 1992; MELDRUM et al., 2003; CAROBÉZ et al., 2003).

É armazenado em vesículas sinápticas e liberado por exocitose cálcio dependente. Sua ação é concluída, principalmente, pela sua receptação por transportadores para as terminações nervosas e neuroglia. Este transporte em algumas circunstâncias pode ocorrer de forma inversa (despolarização por aumento do potássio extracelular) e constituir uma fonte de liberação de glutamato (ATTWELL et al., 1993), um processo que pode ocorrer em diversas patologias neurológicas, como isquemia cerebral e convulsão. Acredita-se que o neurotransmissor glutamatérgico pode ter crucial importância no desenvolvimento e manutenção das convulsões, que ocorrem no fenômeno epiléptico (DANBOLT, 2000).

O glutamato exerce seu papel por ativação dos receptores glutamatérgicos localizados nas membranas pré e pós-sinápticas, bem como nas membranas das células gliais (MELDRUM et al., 1999). Desta forma, a concentração de glutamato no fluido extracelular é que determina a extensão da estimulação dos receptores (DANBOLT et al., 2000). Os

receptores glutamatérgicos podem ser ionotrópicos (ativados pelo NMDA, AMPA ou cainato) e metabotrópicos e, portanto, acoplados à proteína G (COTMANN, 1995; DUVOISIN, 1995). Os receptores NMDA, AMPA e cainato são canais iônicos que abrem após serem ativados aumentando o influxo de  $\text{Na}^+$  ou de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$  (DANBOLT, 2000), portanto causa uma despolarização da membrana sináptica desencadeando uma resposta excitatória.

A participação do sistema glutamatérgico na epileptogênese tem sido exaustivamente estudada, pois a ativação de receptores glutamatérgicos induz convulsões e dano cerebral em ratos (GRIFFITH et al., 2004). Naffah-Mazzacoratti e colaboradores (2004) observaram aumento na liberação de glutamato no hipocampo de ratos em estado epiléptico induzido por pilocarpina.

### 1.3.5 Aspartato

O aspartato é um dos aminoácidos excitatórios mais abundante e extremamente potente sobre neurônios, pois suas altas concentrações e larga distribuição influenciam todas as funções do SNC. O aumento em seu conteúdo hipocampal, bem como cortical pode ser devido ao aumento da síntese e/ou liberação, bem como pela redução da degradação enzimática, sugerindo que este aminoácido participa da manutenção e/ou propagação do foco epiléptico instalado no hipocampo pela acetilcolina (WATKINS, OLVERMAN, 1987). Uma e colaboradores (2006) também verificaram um aumento nos níveis de aspartato cerebral e plasmático associado ao estresse oxidativo

## 1.4 ÁREAS CEREBRAIS ESTUDADAS: HIPOCAMPO E CORPO ESTRIDIADO

O termo “hipocampo” costuma ser utilizado para descrever o conjunto formado por duas regiões interligadas: giro denteado e hipocampo propriamente dito (“corno de Amon”, CA). Ambos apresentam organização interna trilaminada, composta por dois tipos de células principais: as células granulares do giro denteado e as células piramidais do CA, sendo estas

divididas nos setores CA1, CA2 e CA3. O hipocampo apresenta como funções principais o armazenamento da memória recente, a formação da memória de longo prazo e a orientação espacial (BRANDÃO, 2000; BALDAÇARA, ARCHER, JACKOWSKI, 2011).

O hipocampo possui importantes conexões com o tálamo, hipotálamo e córtex entorrinal. Estas conexões lhe permitem atuar como conferidor das informações sensoriais provenientes do córtex entorrinal e confrontá-las com as previsões geradas no sistema límbico (SOARES; CORDEIRO; CAMELO FILHO, 2012) que, por sua vez, integra informações de outras partes do cérebro, incluindo o córtex pré-frontal. As principais funções do sistema límbico são de regular os processos emocionais, regular o Sistema Nervo Autônomo, regular os processos motivacionais. Alguns componentes do sistema límbico (constituído pelo giro do cíngulo, giro para-hipocampal, hipocampo, corpo amigdaloide, área septal, núcleos mamilares, núcleos anteriores do tálamo e núcleos habenulares) se relacionam ao mecanismo e memória (VIANA, 2012). Quando há incompatibilidade entre os eventos ambientais e o que está armazenado, o hipocampo passa a funcionar como modalidade controle, que gera inibição comportamental, acompanhada por aumento de atenção ao meio e do aumento da vigilância aos estímulos potencialmente perigosos (BRANDAO, 2000).

Estudos mostram que esta estrutura também está profundamente envolvida no surgimento e na disseminação de episódios convulsivos. Estudos revelam que os animais com epilepsia apresentaram intensa morte neuronal predominando em regiões do hipocampo propriamente dito (SCORZA et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2012). O mecanismo exato através do qual uma crise epiléptica conduziria a morte celular ainda não foi completamente esclarecido. Acredita-se que a liberação de substâncias excitotóxicas em grande quantidade na fenda sináptica, como o glutamato, ocasionaria hiperexcitabilidade neuronal com consequente morte celular. Baseado nesta teoria é possível explicar a susceptibilidade variável de determinadas regiões cerebrais à lesão, como o hipocampo e o neocôrtex temporal, os quais possuem maior quantidade de terminações nervosas excitatórias (BRIELLMANN et al., 2001; NASCIMENTO et al., 2012).

Os Núcleos da Base consistem em núcleos subcorticais que desempenham grande papel no controle da motricidade voluntária. Eles recebem aferência do córtex cerebral e enviam eferências ao tronco encefálico e, via tálamo, aos córtices pré-frontal, pré-motor e motor primário. As funções motoras dos gânglios da base são mediadas, em grande parte,

pelas áreas motoras do lobo frontal (GONDIM, 2009; BRANDÃO, 2000). Os núcleos da base correspondem às substâncias cinzentas situadas profundamente aos hemisférios cerebrais. São eles: núcleo caudado, núcleo lenticiforme, claustrum, núcleo accumbens e o núcleo basal de Meynert. O núcleo caudado e o núcleo lenticiforme constituem o corpo estriado (BRANDÃO, 2000; VIANA; CAMELO FILHO; SOARES, 2012). O corpo estriado é uma estrutura cujos estímulos com valores afetivos e emocionais interagem com áreas motoras (PENNARTZ, 1994). O corpo estriado é considerado importante área de produção de respostas emocionais, contudo mudanças no seu conteúdo monoaminérgico podem implicar em várias desordens cerebrais, incluindo a ansiedade (SESACK, 1992; ESPERIDÃO-ANTÔNIO, 20008).

## 1.5 DETECÇÃO DE DANO NEURONAL

A detecção de neurônios em degeneração é um passo importante para a compreensão dos fenômenos associados aos insultos mecânicos ou provenientes de diversos tipos de eventos patológicos tais como isquemia, hipoglicemia e *status epilepticus* (NASCIMENTO et al., 2012).

A violeta de cresila é um corante básico utilizado para evidenciar o citoplasma e o nucléolo de neurônios (SANTOS, 1995; ONISH, 1999). O retículo endoplasmático rugoso é muito abundante nas células nervosas e forma agregados de cisternas paralelas, entre as quais ocorrem numerosos poliribossomas livres. Esses conjuntos de cisternas e ribossomas, quando corados pelo violeta de cresila, apresentam-se ao microscópio óptico como manchas basófilas espalhadas pelo citoplasma, os corpúsculos de Nissl (JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1995a). Os nucléolos são estruturas basófilas, localizadas no interior do núcleo celular, constituídas por cromatina e grandes quantidades de RNA, nas quais ocorrem a síntese de RNA e a formação dos ribossomas. Os núcleos contêm um ou mais nucléolos que podem ter tamanhos variáveis (DE ROBERTIS, DE ROBERTIS JÚNIOR, 1993; JUNQUEIRA, CARNEIRO, 1995b).

## 1.6 PLANTAS MEDICINAIS

O Brasil possui a maior diversidade de plantas do mundo, estimando-se ser possuidor de cerca de 20% do número total de espécies vegetais do planeta (LIMA et al., 2010). A rica diversidade étnica e cultural que detém um valioso conhecimento tradicional em relação ao uso de plantas medicinais, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no desenvolvimento de novos medicamentos onde reside uma das maiores potencialidades. Os produtos naturais têm sido alvo de muitas pesquisas e demonstrado uma enorme fonte para a obtenção de compostos de interesse farmacológico (HONG, 2011).

Há um crescente interesse da comunidade científica em elucidar os mecanismos responsáveis pelos efeitos de plantas medicinais, tão utilizadas empiricamente, bem como de seus constituintes químicos, a fim de tornar o seu uso mais eficaz e livre de efeitos adversos (QI; WANG; YUAN, 2011).

No intuito de estabelecer as diretrizes para a atuação do governo na área de plantas medicinais e fitoterápicos, elaborou-se a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio de Decreto N° 5.813, de 22 de junho de 2006, que se constitui parte essencial das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social. Trata-se de um dos elementos fundamentais na implementação de ações capazes de promover melhorias na qualidade de vida da população brasileira (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

A procura por novos compostos de plantas com ação no Sistema Nervoso Central tem aumentado nas últimas décadas. Várias formulações com extratos de plantas usados como ansiolíticos, antidepressivos ou na melhoria da cognição, como erva de São João (*Hypericum perforatum*), ginseng (*Panax ginseng*), kava (*Piper methysticum*), gingko (*Ginkgo biloba*), valeriana (*Valeriana officinalis*) foram introduzidas na prática médica, depois de estudos comprovando sua eficácia e segurança e, para os quais, já existem numerosos ensaios clínicos randomizados e controlados (LINDE et al., 2011).

Apesar dos avanços científicos e do desenvolvimento constante de novos tratamentos, um percentual significativo de pacientes são acometidos de epilepsia de difícil

controle (ASCONAPÉ, 2010; HUNG; SHIH, 2011). Uma expressiva quantidade de pesquisas visa descobrir estratégias farmacológicas antiepilépticas por meio de novos compostos eficazes para esses casos ou de compostos com menor toxicidade para aquelas já tratadas pelo arsenal terapêutico atualmente disponível (RATHOR et al., 2013; KHAN et al., 2013; MANTE et al., 2013; AKINDELE et al., 2013; BAKRE et al., 2013; HOLZMANN et al., 2013; CHINDO et al., 2014; GU et al., 2014)

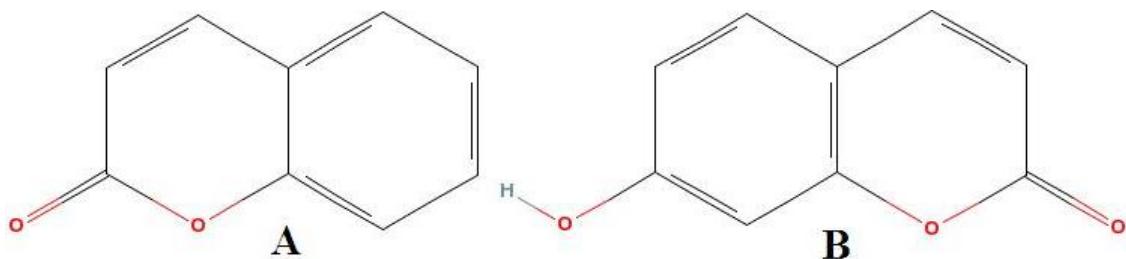
### 1.6.1 Cumarinas

As cumarinas são amplamente distribuídas nos vegetais, normalmente encontradas nas raízes, frutos e semente, e freqüentemente como misturas. Representada pela cumarina (1,2-benzopirona), cujo nome teve origem no vernáculo caribenho *cumaru*, nome popular da planta *Amburana cearensis*, de onde foi extraída, em 1820.

Excetuando-se a 1,2-benzopirona, todas as cumarinas são substituídas por um grupo hidroxila na posição 7. A 7-hidróxi-cumarina, também conhecida como umbeliferona, é a precursora das cumarinas di e tri hidroxiladas (**Figura 1**).

A pesquisa sobre a atividade das cumarinas foi, em alguns casos, o ponto de partida para a descoberta de novos medicamentos. O dicumarol, por exemplo, ainda hoje utilizado como raticida devido sua atividade sobre a inibição da coagulação do sangue, foi descoberto durante a investigação sobre uma doença hemorrágica no gado alimentado com melioto [*Melilotus officinalis* (L.) Pallas] (trevo-de-cheiro-amarelo) fermentado. Esta atividade guiou a pesquisa que desenvolveu a varfarina, um anticoagulante oral (CAMPOS, CUNHA, 2005).

Muitas atividades farmacológicas são associadas às cumarinas, como anti-inflamatória (PAYA et al., 1992), antimicrobiana (MICHAELI et al., 1970; HIGGINS et al., 1978), antitumoral (THORNES, SHEEHAN, 1983; GAWRON, GLOWNIAK, 1987; MARSHALL et al., 1987), mas algumas exercem, também, efeito central, como as diidropiranocumarinas, que exercem efeito neuroprotetor e furanocurarinás, que mostraram possuir efeito antidepressivo (PEREIRA et al., 2009).



**FIGURA 1** Estrutura química da cumarina (A) e umbeliferona (B).

### 1.6.2 Família Acanthaceae

As plantas da família Acanthaceae tem distribuição pantropical, sendo bem representadas no Brasil, apresentando o maior número de espécies na Mata Atlântica e nas formações florestais mesófilas das regiões Sudeste e Centro-Oeste, ocorrendo também em outras formações vegetais. Possuem cerca de 2.500 espécies subordinadas a 250 gêneros.

*Justicia* é um gênero que compreende cerca de 600 espécies de subarbustos e arbustos que podem ser cultivadas ou encontradas espontaneamente no México, Venezuela, Trindad, Cuba, Jamaica, Oeste do Equador, e Norte e Nordeste do Brasil (OLIVEIRA, ANDRADE, 2000).

### 1.6.3 *Justicia pectoralis* Jacq var. *stenophylla* Leonard

*Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonard é uma pequena erva sempre verde, perene, suberecta, com até 40 cm de altura. Folhas simples, membranáceas, estreitas e longas, medindo 3 a 10 cm de comprimento. Flores de coloração mariscada, muito pequenas. Fruto do tipo cápsula deiscente. Toda a planta desprende um forte cheiro característico do cumaru algum tempo depois de coletada. Multiplica-se facilmente por estacas ou pequenas porções dos ramos já enraizadas; cresce bem em canteiros formando conjuntos aglomerados globóides, com até 40 cm de altura. Essa forma de crescimento serve para distinguir esta erva

de outras que recebem o mesmo nome popular, mas que crescem como grama (SOUSA et al., 1991). É distribuída em regiões quentes e úmidas e conhecida popularmente como “son curia” (Porto Rico), “sana herida” (Jamaica) ou “tilo, carpintero ou té criollo” (Cuba). Dentre os seus vários epítetos, “chambá” é o mais conhecido no nordeste brasileiro (RIZZINI, 1948; CHAGNON et al., 1971; BARROS, 1992; OLIVEIRA et al, 2000) (**Figura 2**).



Fonte: <http://picasaweb.google.com/lh/photo/uz7CsamRRms4n8lOVvHQyQ>

**FIGURA 2 - *Justicia pectoralis* Jacq. var *stenophylla* Leonard**

O estudo químico do extrato das partes aéreas da *Justicia pectoralis* Jacq. var *stenophylla* Leonard revelou a presença de vários constituintes, cujos principais são: 1,2-benzopirona e umbeliferona nas folhas, e cumarinas nas folhas e caule (OLIVEIRA et al, 2000). A presença de cumarinas é sugerida como a responsável pelas atividades fitoterápicas do chambá (MACRAE, TOWERS, 1984; MILLS et al., 1986; DE VRIES et al., 1988; BARROS, 1992; LINO et al., 1997).

*Justicia pectoralis* foi descrita como tendo um largo número de ações, como exemplo, antiinflamatória (MILLS et al., 1986; LINO et al., 1997), antimicrobiana (CHARIANDY et al., 1999), broncodilatadora e expectorante (LEAL et al., 2000) e sedativa (PARRA et al., 2001; MONTERO et al., 2008). Também se verificou a sua utilização na ansiedade, como tranqüilizante (CHANFRAU et al., 2008; VENÂNCIO et al., 2014).

## 2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

Sabe-se que a epilepsia, apesar dos avanços científicos e do desenvolvimento de novos tratamentos, ainda é cercada por muitos mitos e preconceitos. Isso muitas vezes acarreta comportamentos inadequados em relação aos portadores da doença, culminando em diminuição da qualidade de vida, exclusão social, diminuição de oportunidades de emprego e da escolaridade. As crises convulsivas, principalmente as de caráter crônico e repetitivo, levam os pacientes acometidos a uma condição associada com significativas consequências psicossociais e o fator central e sua natureza estigmatizante. (FERREIRA, SILVA, 2009).

O uso de plantas medicinais no tratamento de diversas enfermidades tem sido relatado desde os primórdios da humanidade. A utilização das substâncias isoladas de plantas e de seus extratos vegetais como protótipos para a obtenção de fármacos, de adjuvantes, ou ainda, de medicamentos fitoterápicos, tem despertado crescente interesse da indústria farmacêutica na produção de agentes terapêuticos de origem natural para o tratamento de várias enfermidades, inclusive desordens afetivas (SILVA et al., 2009; MELO et al., 2011; RATHOR et al., 2013; CHINDO et al., 2014).

Foram descritas várias ações do chambá, como anti-inflamatório (LINO et al., 1997), antimicrobiana (CHARIANDY et al., 1999), broncodilatadora e expectorante (LEAL et al., 2000). Apesar do uso popular, em Cuba, do chá das folhas do chambá para “acalmar os nervos” não havia estudos relacionados à atividade no sistema nervoso central (CHANFRAU et al., 2008). A avaliação de seus efeitos na ansiedade foi desenvolvida durante o mestrado e apresentou efeito ansiolítico, provavelmente relacionado ao sistema GABA<sub>A</sub>/benzodiazepínico (VENÂNCIO et al., 2011). Considerando a participação do neurotransmissor GABA em processos convulsivos e que estes efeitos foram pouco estudados, aliado ao fato de que pesquisas pré-clínicas são essenciais para o desenvolvimento de novas terapias e para o estudo da neurobiologia dos transtornos mentais, a presente tese intitulada “Avaliação do potencial anticonvulsivante do extrato padronizado de *Justicia pectoralis* (Chambá): estudo de neuroproteção e mecanismo de ação” pretendeu investigar o chambá nos processos convulsivos de maneira a fornecer subsídios para seu possível uso, a posteriori, na epilepsia ou em processos relacionados à propagação e manutenção de convulsões que tanto afligem a saúde de animais humanos e não humanos.

Para tanto, em um contexto experimental com animais, uma abordagem comportamental, neuroquímica e histopatológica foi realizada para, a partir dos nossos achados, avaliar e discutir a possibilidade de uso do chambá, na perspectiva de inovação e desenvolvimento de fármacos a partir de plantas medicinais.

### **3 OBJETIVOS GERAIS**

Tendo como objetivo geral avaliar o potencial anticonvulsivante do extrato padronizado de *Justicia pectoralis* (chambá), bem como mecanismo de ação e neuroproteção. Para facilitar a leitura e compreensão o estudo foi dividido em quatro capítulos:

#### **Capítulo I:**

Verificar a ação anticonvulsivante do Chambá através de alterações comportamentais dos animais, tratados de forma aguda, submetidos aos modelos de convulsão induzida por picrotoxina, estricnina, eletrochoque e pilocarpina;

#### **Capítulo II:**

Analizar o efeito do pré-tratamento com Chambá sobre o estresse oxidativo neuronal induzido pelos modelos de convulsão por picrotoxina, estricnina, eletrochoque e pilocarpina nas áreas cerebrais, hipocampo, corpo estriado e medula (somente modelo de estricnina);

#### **Capítulo III:**

Descrever as alterações neuroquímicas produzidas em hipocampo após pré-tratamento com Chambá em modelo de convulsão induzida por pilocarpina, através da determinação dos níveis de aminoácidos GABA, glicina (GLI), taurina (TAU), glutamato (GLU) e aspartato (ASP);

#### **Capítulo IV:**

Avaliar a atividade neuroprotetora e, possíveis danos neuronais, através da análise histopatológica de hipocampo de animais tratados por 7 dias com Chambá e submetidos ao *status epilepticus* por pilocarpina.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BOTÂNICO

Partes aéreas de *Justicia pectoralis* foram coletadas do Horto de Plantas Medicinais do Núcleo de Fitoterapia (NUFITO), pertencente ao Núcleo de Assistência Farmacêutica (NUASF) da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (SESA). Exsicatas (número 16079) da espécie estão depositadas no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará. A retirada do material foi feita manualmente, sendo, então, lavada em água corrente, seguida de água destilada. Após a procura de materiais estranhos, a matéria-prima vegetal foi posta para secar no Laboratório de Farmacognosia coordenado pela Profa. Dra. Luzia Kalyne de Almeida Moreira Leal.

#### 4.1.1 Extração da droga vegetal

O material vegetal fresco seco (50 g) foi adicionado a 750 mL de solução hidroalcoólica (20% de etanol) e extraiu-se à temperatura ambiente por maceração durante 24h. O extrato foi, em seguida, filtrado e secado em *spray-dryer* (LAWES, Brasil) por meio de método desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia, sob a coordenação da Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal.

#### 4.1.2 Análise Cromatográfica

A amostra foi diluída em fase móvel na proporção 1:5 e filtrada em unidade filtrante 0,45 $\mu$ m (Millipore, EUA). Para o doseamento, empregou-se um sistema cromatográfico Alliance (Waters, EUA) acoplado a um detector de arranjo de diodos (CLAE – DAD), sob as seguintes condições: coluna C18, fase móvel (A: AcN/MeOH/THF; B: H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Et<sub>3</sub>N, pH 3), eluição gradiente, fluxo 1,8mL/min e  $\lambda$ =323nm (FONSECA et al., 2007).

A quantificação dos dois principais constituintes (cumarina e umbeliferona) foi realizada por meio de curvas de calibração obtidas por meio de injeção de padrão externo. A análise cromatográfica foi realizada em triplicata. A análise cromatográfica permitiu detectar e quantificar a cumarina e umbeliferona. Em 100 mg do extrato seco padronizado de Chambá contém 0,402 e 1,834 mg dos principais constituintes, umbeliferona e cumarina, respectivamente.

## 4.2 PRINCIPAIS MATERIAIS E DROGAS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS

**QUADRO 1** - Materiais utilizados

Material	Marca/Modelo
- Balança analítica	Modelo H5, Mettler, Suíça
- Balança para animais	Filizola, Brasil
- Banho Maria	Modelo 102/1, FANEN, SP, Brasil
- Bomba para HPLC	LC- 10AD Shimadzu Corp., Japan
- Centrífuga refrigerada (eppendorf)	Marathon 26 KMR, Fisher Scientific
- Cubetas de plástico para leitura em espectrofotômetro	Sarstedt, Alemanha Oriental
- Degaseificador	DGU-2A Shimadzu Corp., Japan
- Detector eletroquímico	L-ECD-6A, Shimadzu Corp., Japan
- Equipamento de Millipore para filtração à vácuo	Millipore Apparatus, Bedford, MA, USA
- Espectrofotômetro	Beckman DU 640B, Fullerton, CA, USA
- Estufa para secagem	Modelo 315 SE FANEM, SP, Brasil
- Freezer a – 70°C	ULT 2586-3D14, Revco Scientific, Inc. Asheville, N.C., USA
- Homogeneizadores automáticos	Shimadzu Corp., Japan
- Medidor de pH, modelo B374	Micronal, SP, Brasil
- Micropipetas	H.E., Pedersen, Dinamarca
- Sonicador	Modelo PT 10-35. Brinkmann Instruments Inc. NY, USA

QUADRO 2 – Drogas utilizadas

	<b>Droga</b>	<b>Dose/Concentração</b>	<b>Via</b>
<b>Capítulo 1</b>	Fenobarbital	10 mg/Kg	v.o.
	Oxcarbazepina	60 mg/Kg	v.o.
	Picrotoxina	10 mg/Kg	i.p.
	Estricnina	3 mg/Kg	i.p.
	Pilocarpina	400 mg/Kg	i.p.
	Extrato padronizado <i>Justicia pectoralis</i>	25, 50 e 100 mg/Kg	v.o.
<b>Capítulo 2</b>	Fenobarbital	10 mg/Kg	v.o.
	Oxcarbazepina	60 mg/Kg	v.o.
	Pilocarpina	400 mg/Kg	i.p.
	Extrato padronizado <i>Justicia pectoralis</i>	50 mg/Kg	v.o.
<b>Capítulo 3</b>	Fenobarbital	10 mg/Kg	v.o.
	Pilocarpina	400 mg/Kg	i. p.
	Extrato padronizado <i>Justicia pectoralis</i>	50 mg/Kg	v.o.
<b>Capítulo 4</b>	Fenobarbital	10 mg/Kg	v.o.
	Pilocarpina	200 mg/Kg	i.p.
	Xilazina	10 mg/Kg	i.m.
	Ketamina	90 mg/Kg	i.p.
	Metilescopolamina 0,01 %	1 mg/Kg	s.c.
	Extrato padronizado <i>Justicia pectoralis</i>	50 mg/Kg	v.o.

#### **4.3 PREPARO DAS DROGAS**

O extrato padronizado de *Justicia pectoralis* (chambá), contido em cápsula (100 mg) foi diluído em água destilada, obtendo-se a concentração final de 2,5; 5 e 10 mg/mL para ser administrado nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, respectivamente, por via oral (v.o.). O grupo controle recebeu veículo (água destilada) por via oral. As drogas utilizadas durante os experimentos, tais como, Fenobarbital (10 mg/Kg) e Oxcarbazepina (60 mg/Kg) foram dissolvidas em água destilada e administradas por via oral. Da mesma forma, Pilocarpina (400 ou 200 mg/Kg), Picrotoxina (10 mg/Kg) e Estricnina (3 mg/Kg) foram dissolvidas em água destilada, mas administradas por via intraperitoneal (i.p.). Xilazina (10 mg/Kg) e Cetamina (90 mg/Kg) foram administradas puras por via intramuscular (i.m.) e intraperitoneal, respectivamente. O volume total de solução administrada, por via oral, intraperitoneal e intramuscular foi de 10 mL/Kg.

#### **4.4 ANIMAIS**

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*) variedade Swiss, fêmeas, adultas, pesando entre 25 – 30 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC) e mantidos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFC. Os animais foram acondicionados (no máximo 30) em caixas de propileno em condições ambientais semelhantes, sala com temperatura de  $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com ciclos claro/escuro alternado de 12h (luzes acesas às 6h) recebendo ração (Purina Chow) e água à vontade. Os animais foram postos em jejum de sólidos 4h antes da realização de cada experimento em que a via oral foi utilizada para a absorção das substâncias.

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, sob o protocolo 05/13.

#### 4.4.1 Tratamento dos grupos experimentais

Para a realização dos protocolos vários tratamentos foram utilizados, sendo detalhados no capítulo correspondente.

### 4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada através do software GraphPad Prism versão 5.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego Califórnia EUA. Copyright © 1992 – 2007.

Os resultados dos experimentos comportamentais foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) seguido pelo teste de Student Newman-Keuls (*post hoc*), sendo os valores representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM). Os demais resultados foram por Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey (*post hoc*), sendo os valores representados pela Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM).

O critério de significância utilizado foi  $p < 0,05$ . Os asteriscos ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ) caracterizam o grau de significância, assim como os demais símbolos a e b utilizados.

## 5 CAPÍTULOS

### CAPÍTULO I – Avaliação da Atividade Anticonvulsivante

#### 1 Introdução

A pesquisa para a elucidação da epilepsia ainda não foi suficiente para descobrir o tratamento eficaz. As crises convulsivas continuam a ocorrer em até 33 % das pessoas com epilepsia, apesar do tratamento (NELIGAN et al., 2011). O desenvolvimento de modelos experimentais de epilepsia tem permitido o estudo da fisiopatologia desta doença, bem como o desenvolvimento de novas drogas.

Denominamos modelo experimental de epilepsia a possibilidade de reproduzir, ou modelar, características da epilepsia da qual temos interesse de estudar. Várias espécies de roedores (ratos, camundongos, cobaia), insetos (mosca da fruta *Drosophila*), primatas (Papio, macaco, saguis), aves (*Gallus*) já foram empregadas em estudos para modelar a epilepsia. No entanto, os mais utilizados são camundongos e ratos pelo baixo custo, praticidade de se criar em laboratório e pelo conhecimento adquirido quanto às bases neuroanatômicas, neuroquímicas e comportamentais (LOSCHER et al., 2011).

Os modelos experimentais de epilepsia podem ser obtidos por meio de preparações *in vivo*, quando o animal é submetido a um protocolo de indução de crises convulsivas por agentes químicos, físicos (criogenia) ou elétricos, e é mantido vivo para acompanhamento da epileptogênese, e *in vitro*, quando se empregam fatias de tecido ou cultura de células.

Diversos estudos tem sido realizados no mundo inteiro visando a descoberta de novas alternativas terapêuticas para a epilepsia (HOLZMANN et al., 2011; RATHOR et al., 2013; CHINDO et al., 2014; ), incluindo os estudos realizados por nosso grupo (SILVA et al., 2009; AGUIAR et al., 2012).

Como referido anteriormente, o estudo químico das partes aéreas da *Justicia pectoralis* (chambá) revelou a presença de vários constituintes, cujos principais são: 1,2-

benzopirona e umbeliferona nas folhas, e cumarinas nas folhas e caule (OLIVEIRA et al, 2000). A presença de cumarinas é sugerida como a responsável pelas atividades fitoterápicas do chambá (MACRAE, TOWERS, 1984; MILLS et al., 1986; DE VRIES et al., 1988; BARROS, 1992; LINO et al., 1997; PEREIRA et al., 2009). Foi sugerido que o chambá apresenta efeito no SNC (PARRA et al., 2001; MONTERO et al., 2008; CHANFRAU et al., 2008; VENÂNCIO et al., 2011). No entanto, estudos investigando as propriedades farmacoterapêuticas do chambá em nível de SNC são escassos na literatura.

Assim, no presente capítulo é abordada a investigação dos efeitos do Extrato Padronizado de *Justicia pectoralis* (chambá) em modelos experimentais de convulsão.

## 2 Objetivos específicos

Verificar a ação anticonvulsivante do extrato de *Justicia pectoralis* por meio de alterações comportamentais dos animais, tratados de forma aguda e submetidos aos modelos de convulsão induzida por:

- Picrotoxina: avaliação da participação da via gabaérgica;
- Estricnina: avaliação da participação da via glicinérgica;
- Eletrochoque: avaliação da participação dos canais de sódio e cálcio;
- Pilocarpina: avaliação da participação da via colinérgica

### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Tratamentos dos grupos experimentais

Os animais foram divididos em grupos (n=10) e tratados, por via oral (v.o.), com:

- Controle (água destilada);
- Extrato padronizado de *Justicia pectoralis* (chambá) 25, 50 ou 100 mg/Kg
- Fenobarbital 10 mg/Kg
- Oxcarbazepina 60 mg/Kg

As drogas foram administradas aos camundongos 60 min antes da indução da convulsão.

#### 3.2 Modelos comportamentais de convulsão

##### 3.2.1 Convulsão induzida por Picrotoxina

Realizado de acordo com a metodologia descrita por Ojewole et al. (2008) com a finalidade de analisar a atividade anticonvulsivante do extrato, utilizando-se, para isso, a via GABAérgica. Uma hora após o tratamento dos grupos controle (água destilada), chambá (25, 50 ou 100 mg/Kg) ou fenobarbital (10 mg/Kg), administrou-se, por via intraperitoneal (i.p.), picrotoxina 10 mg/Kg (PICRO). Os animais foram acondicionados em caixas individuais e observados por 30 minutos. Os parâmetros avaliados foram latência da primeira convulsão e latência de morte.

### 3.2.2 Convulsão induzida por Estricnina

Realizado de acordo com a metodologia descrita por Aprison et al. (1987) com a finalidade de analisar a atividade anticonvulsivante do extrato, utilizando-se, para isso, a via glicinérgica. Uma hora após o tratamento dos grupos controle (água destilada), chambá (25, 50 ou 100 mg/Kg) ou fenobarbital (10 mg/Kg), administrou-se, por via intraperitoneal (i.p.), estricnina 3 mg/Kg (ESTRIC). Os animais foram acondicionados em caixas individuais e observados por 20 minutos. Os parâmetros avaliados foram latência da primeira convulsão e latência de morte.

### 3.2.3 Convulsão induzida por Eletrochoque

De acordo com a metodologia descrita por Mares et al. (2005a) com a finalidade de analisar a atividade anticonvulsivante do extrato, utilizando-se, para isso, a participação dos canais de sódio e cálcio. O aparelho de eletrochoque, de corrente constante, modelo 7801, da marca Ugo Basile, foi preparado com tempo de estímulo (0,2 s), intensidade da corrente (13 mA), frequência (60Hz) e amplitude de pulso de 0,5 mS. Uma hora após o tratamento dos grupos controle (água destilada), chambá (25, 50 ou 100 mg/Kg) ou oxcarbazepina (60 mg/Kg) os animais foram submetidos ao eletrochoque auricular (ELETRO). Os parâmetros avaliados foram latência da primeira convulsão e duração da convulsão (calculado pelo tempo de flexão e extensão dos membros inferiores).

### 3.2.4 Convulsão induzida por Pilocarpina

Realizado de acordo com a metodologia descrita por Turski et al. (1983) com a finalidade de analisar a atividade anticonvulsivante do extrato, utilizando-se, para isso, a via colinérgica. Uma hora após o tratamento dos grupos controle (água destilada), chambá (25, 50 ou 100 mg/Kg) ou fenobarbital (10 mg/Kg), administrou-se, por via intraperitoneal

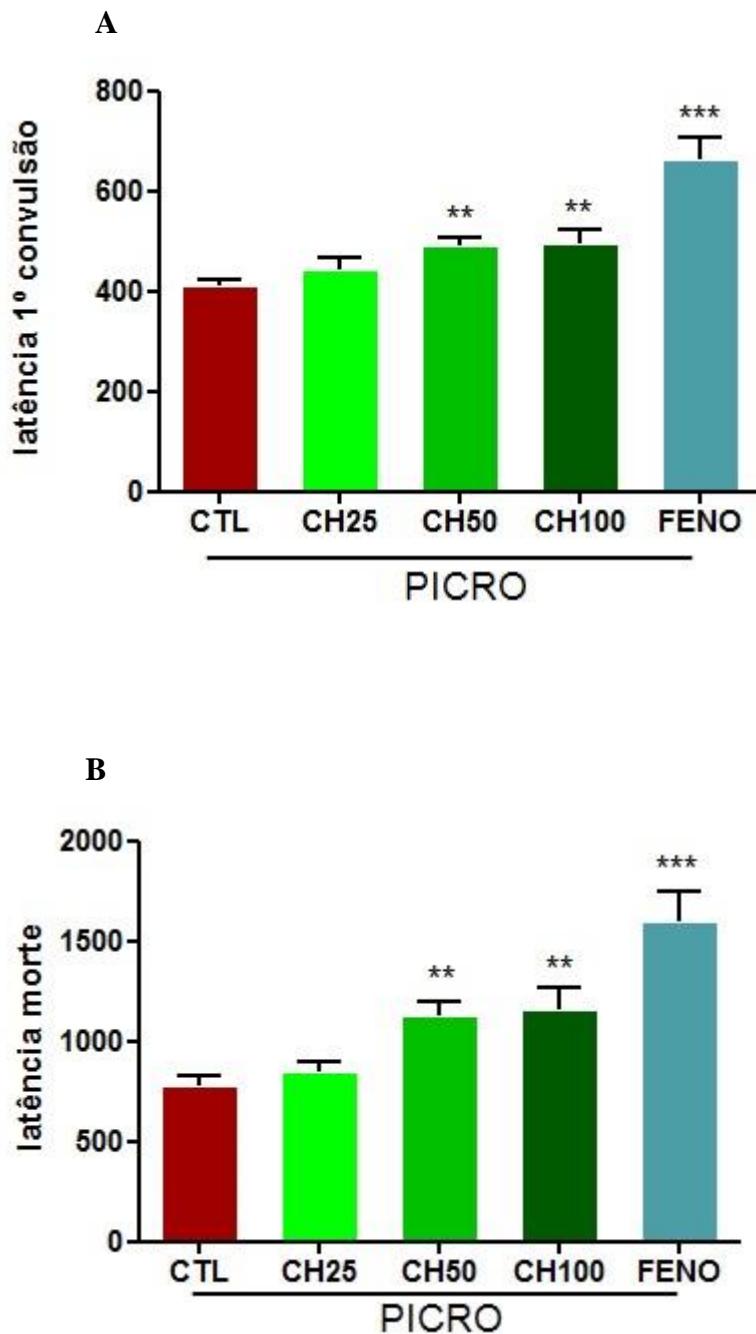
(i.p.), pilocarpina 400 mg/Kg (PILO). Os animais foram acondicionados em caixas individuais e observados por 60 minutos. Os parâmetros avaliados foram latência da primeira convulsão e latência de morte.

## 4 Resultados

### 4.1 Efeito do chambá sobre a avaliação comportamental de camundongos submetidos à convulsão induzida por picrotoxina

Neste modelo foram avaliadas latência de primeira convulsão e latência de morte, em segundos. Os animais tratados com chambá, por via oral, nas doses 50 e 100 mg/Kg apresentaram um aumento da latência para primeira convulsão [CH50:  $492,7 \pm 12,41$  (p<0,01); CH100:  $500,5 \pm 21,47$  (p<0,01)] quando comparados ao controle ( $412,8 \pm 11,53$ ), enquanto a dose de 25 mg/Kg não causou nenhuma modificação [ $448,2 \pm 16,90$  (p>0,05)]. Fenobarbital 10 mg/Kg, utilizado como padrão positivo, aumentou a latência para primeira convulsão [FENO:  $665,0 \pm 42,86$  (p<0,001)] em relação ao controle ( $412,8 \pm 11,53$ ). (**Figura 3 A**)

Com relação à latência de morte, observou-se um aumento, significativo, desse parâmetro nos grupos tratados com chambá nas doses de 50 e 100 mg/Kg [CH50:  $1138 \pm 56,06$  (p<0,01); CH100:  $1167 \pm 104,3$  (p<0,01)] quando comparados ao controle ( $790,7 \pm 35,73$ ), enquanto a dose de 25 mg/Kg não causou nenhuma modificação [ $856,6 \pm 43,61$  (p>0,05)]. Fenobarbital 10 mg/Kg aumentou a latência de morte [FENO:  $1604 \pm 139,8$  (p<0,001)] em relação ao controle ( $790,7 \pm 35,73$ ). (**Figura 3B**)



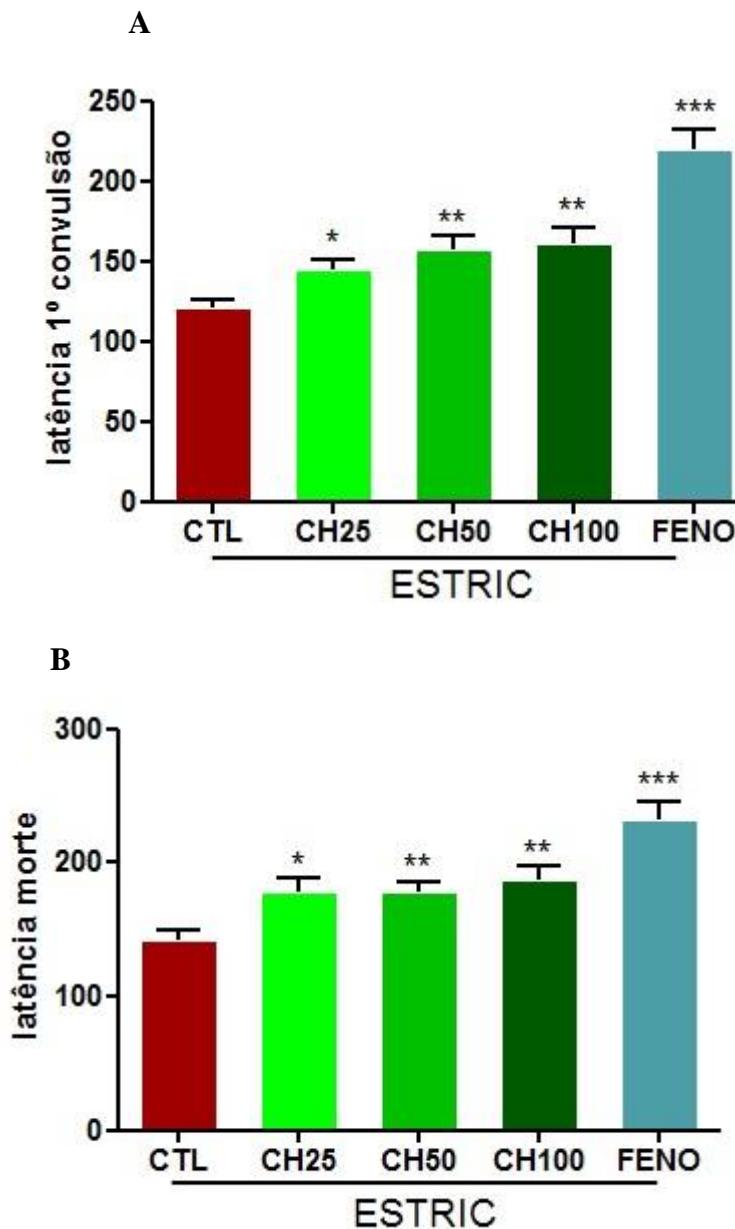
**FIGURA 3** Efeito do chambá e fenobarbital sobre a latência para 1º convulsão (A) e latência para morte (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por picrotoxina (10 mg/Kg)

Controle (água destilada, v.o.), chambá (25, 50 e 100 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg, v.o.) foram administrados 60 min antes do tratamento com picrotoxina (10mg/Kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n = 10). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Newman Keuls. Valores significativos comparados ao controle (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; PICRO: picrotoxina.

#### 4.2 Efeito do chambá sobre a avaliação comportamental de camundongos submetidos à convulsão induzida por estricnina

Neste modelo foram avaliadas latência de primeira convulsão e latência de morte, em segundos. Os animais tratados com chambá, por via oral, nas doses 25, 50 e 100 mg/Kg apresentaram um aumento da latência para primeira convulsão [CH25:  $145,6 \pm 5,38$  (p<0,05); CH50:  $158,3 \pm 7,08$  (p<0,01); CH100:  $161,8 \pm 9,57$  (p<0,01)] quando comparados ao controle ( $122,1 \pm 3,86$ ). Fenobarbital 10 mg/Kg, utilizado como padrão positivo, aumentou a latência para primeira convulsão [FENO:  $221,4 \pm 10,93$  (p<0,001)] em relação ao controle ( $122,1 \pm 3,86$ ). (**Figura 4 A**)

Com relação à latência de morte, observou-se um aumento, significativo, desse parâmetro nos grupos tratados com chambá nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg [CH25:  $179,1 \pm 9,39$  (p<0,05); CH50:  $178,8 \pm 7,01$  (p<0,01); CH100:  $189,1 \pm 7,75$  (p<0,01)] quando comparados ao controle ( $144 \pm 4,9$ ). Fenobarbital 10 mg/Kg aumentou a latência de morte [FENO:  $233,5 \pm 11,9$  (p<0,001)] em relação ao controle ( $144 \pm 4,9$ ). (**Figura 4B**)



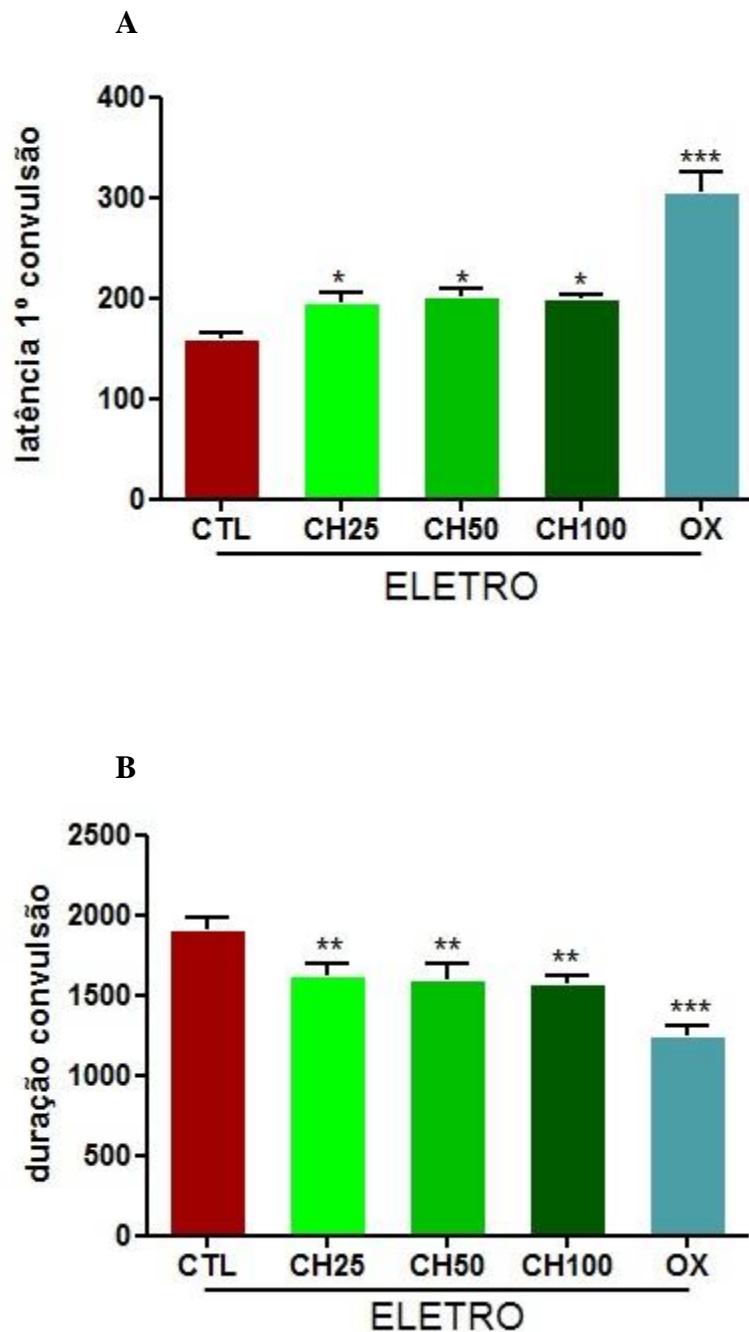
**FIGURA 4 Efeito do chambá e fenobarbital sobre a latência para 1º convulsão (A) e latência para morte (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por estricnina (3 mg/Kg)**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (25, 50 e 100 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg, v.o.) foram administrados 60 min antes do tratamento com estricnina (3 mg/Kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 10$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Newman Keuls. Valores significativos comparados ao controle (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; ESTRIC: estricnina.

#### 4.3 Efeito do chambá sobre a avaliação comportamental de camundongos submetidos à convulsão induzida por eletrochoque

Neste modelo foram avaliadas latência de primeira convulsão e duração da convulsão, em segundos. Os animais tratados com chambá, por via oral, nas doses 25, 50 e 100 mg/Kg apresentaram um aumento da latência para primeira convulsão [CH25:  $197,2 \pm 7,38$  ( $p<0,05$ ); CH50:  $203,3 \pm 6,65$  ( $p<0,05$ ); CH100:  $201 \pm 2,47$  ( $p<0,05$ )] quando comparados ao controle ( $161,4 \pm 3,16$ ). Oxcarbazepina 60 mg/Kg, utilizado como padrão positivo, aumentou a latência para primeira convulsão [OX:  $308,3 \pm 17,14$  ( $p<0,001$ )] em relação ao controle ( $161,4 \pm 3,16$ ). (**Figura 5 A**)

Com relação à duração da convulsão, observou-se uma redução, significativa, desse parâmetro nos grupos tratados com chambá nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg [CH25:  $1632 \pm 69,53$  ( $p< 0,01$ ); CH50:  $1604 \pm 89,21$  ( $p<0,01$ ); CH100:  $1582 \pm 42,71$  ( $p< 0,01$ )] quando comparados ao controle ( $1918 \pm 63,06$ ). Oxcarbazepina 60 mg/Kg reduziu a duração da convulsão [OX:  $1257 \pm 52,07$  ( $p<0,001$ )] em relação ao controle ( $1918 \pm 63,06$ ). (**Figura 5 B**)



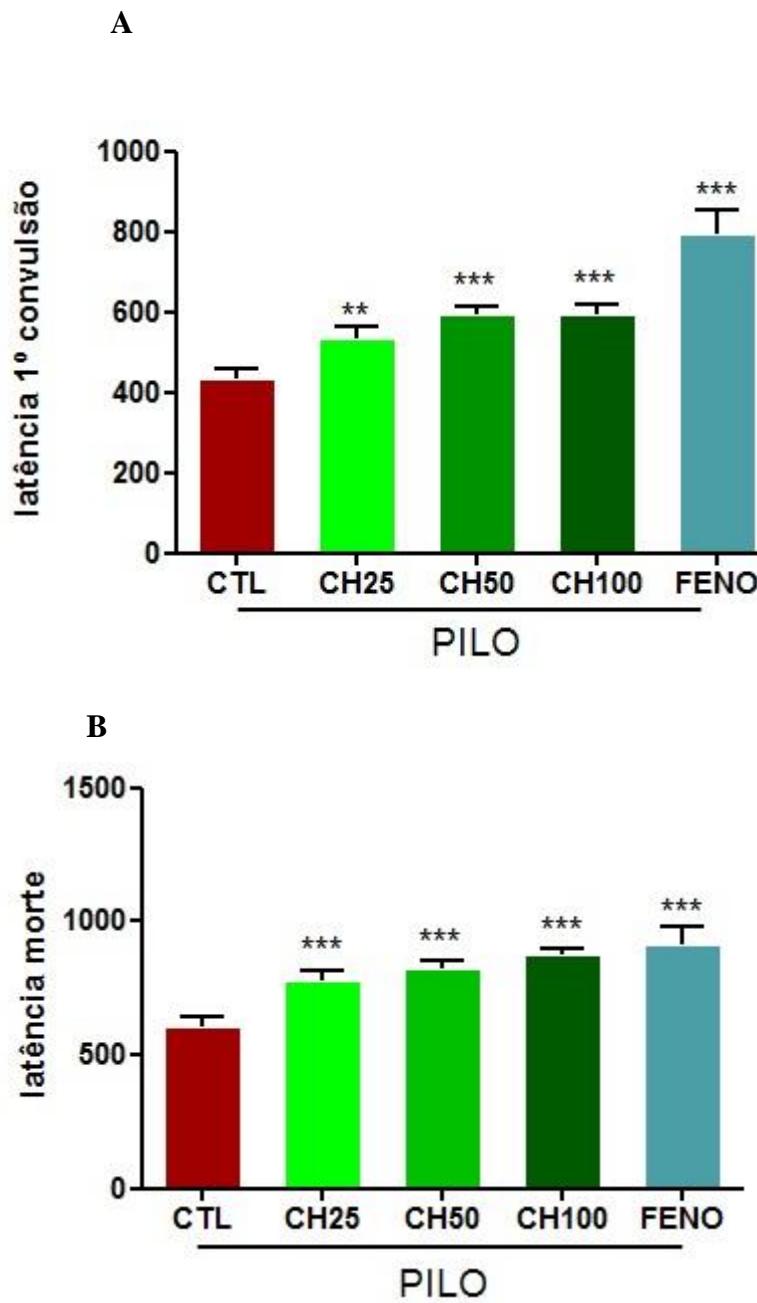
**FIGURA 5** Efeito do chambá e fenobarbital sobre a latência para 1º convulsão (A) e latência para morte (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por eletrochoque

Controle (água destilada, v.o.), chambá (25, 50 e 100 mg/Kg, v.o.) e oxcarbazepina (60 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com eletrochoque. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 10$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Newman Keuls. Valores significativos comparados ao controle (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). CTL: controle; CH: chambá; OX: Oxcarbazepina; ELETRO: eletrochoque.

#### 4.4 Efeito do chambá sobre a avaliação comportamental de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina

Neste modelo foram avaliadas latência de primeira convulsão e latência de morte, em segundos. Os animais tratados com chambá, por via oral, nas doses 25, 50 e 100 mg/Kg apresentaram um aumento da latência para primeira convulsão [CH25:  $539,8 \pm 21,49$  (p<0,01); CH50:  $596,7 \pm 15,74$  (p<0,001); CH100:  $596 \pm 21,25$  (p<0,001)] quando comparados ao controle ( $440,4 \pm 18,12$ ). Fenobarbital 10 mg/Kg, utilizado como padrão positivo, aumentou a latência para primeira convulsão [FENO:  $799,3 \pm 52,66$  (p<0,001)] em relação ao controle ( $440,4 \pm 18,12$ ). (**Figura 6 A**)

Com relação à latência de morte, observou-se um aumento, significativo, desse parâmetro nos grupos tratados com chambá nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg [CH25:  $786,6 \pm 28,80$  (p<0,001); CH50:  $827,4 \pm 26,31$  (p<0,001); CH100:  $885,3 \pm 15,05$  (p<0,001) quando comparados ao controle ( $616,1 \pm 27,79$ ). Fenobarbital 10 mg/Kg aumentou a latência de morte [FENO:  $922 \pm 58,95$  (p<0,001)] em relação ao controle ( $616,1 \pm 27,79$ ). (**Figura 6 B**)



**FIGURA 6 Efeito do chambá e fenobarbital sobre a latência para 1º convulsão (A) e latência para morte (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (25, 50 e 100 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com pilocarpina (400 mg/Kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n = 10). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Newman Keuls. Valores significativos comparados ao controle (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; PILO: pilocarpina

## 5 Discussão

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2011), a epilepsia é uma das mais comuns doenças neurológicas graves, afetando mais de 50 milhões de pessoas em todo o mundo. As convulsões são causadas por súbitas, excessivas e recorrentes descargas elétricas a partir de células do cérebro (RODRIGUES et al., 2012). Como convulsões são os principais sintomas da epilepsia, anticonvulsivantes são utilizados clinicamente no tratamento de crises epilépticas (MACKEY, 2010).

Por séculos as plantas foram a única fonte de agentes terapêuticos. No início do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas representaram a fonte principal de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos. O Brasil possui uma das mais ricas biodiversidades do planeta, com milhares de espécies em sua flora, dentre elas *Justicia pectoralis*, conhecida, popularmente no nordeste brasileiro, como chambá. Como mencionado anteriormente, o chambá possui várias atividades, como anti-inflamatória (MILLS et al., 1986; LINO et al., 1997), antimicrobiana (CHARIANDY et al., 1999), broncodilatadora e expectorante (LEAL et al., 2000) e ansiolítica (VENÂNCIO et al., 2011). Neste caso, o conhecimento científico associado ao conhecimento popular torna o presente estudo valido, visto que a literatura disponível ainda não oferece informações suficientes sobre os efeitos da *Justicia pectoralis* (Chambá) sobre o Sistema Nervoso Central.

Considerando que o tratamento da epilepsia com as drogas atuais possam controlar ou reduzir o ataque epiléptico, em certa medida, ainda um grande número de pacientes sofrem de efeitos secundários destes fármacos antiepilepticos (LÖSCHER e LEPPIK, 2006), o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito anticonvulsivante do chambá, procurando identificar os possíveis mecanismos de ação.

Neste estudo, os efeitos do extrato padronizado de *Justicia petoralis* (chambá) foram observados em vários modelos animais de convulsão, como picrotoxina, estricnina, eletrochoque e pilocarpina, para avaliar a participação do extrato nas vias gabaérgica, glicinérgica, canais de sódio e cálcio e via colinérgica, respectivamente. Esses modelos são clássicos para a avaliação da atividade anticonvulsivante de substâncias onde são observadas

prevenção da convulsão e mortalidade; redução na duração da convulsão, aumento no tempo de morte ou redução na percentagem de mortalidade nas convulsões.

Nos modelos animais de convulsão induzida por picrotoxina, estricnina e pilocarpina, o efeito do chambá foi comparado ao do Fenobarbital, droga antiepileptica padrão que produz seus efeitos por intensificar a inibição mediada pelo neurotransmissor GABA no cérebro (ROGAWASKI & PORTER, 1990; MACDONALD & KELLY, 1995). No modelo de convulsão por eletrochoque, o efeito do chambá foi comparado ao da Oxcarbazepina, cujo mecanismo de ação baseia-se, principalmente, no bloqueio de canais de sódio voltagem-dependentes, resultando na estabilização das membranas neurais hiperexcitadas, inibição da descarga neuronal repetitiva e diminuição da propagação de impulsos sinápticos. Adicionalmente, aumento na condutância de potássio e modulação de canais de cálcio voltagem-dependentes ativados pode também contribuir para os efeitos anticonvulsivantes.

As doses das drogas utilizadas neste capítulo foram determinadas após amplo levantamento bibliográfico. Estas doses não são equivalentes àquelas utilizadas por humanos, visto que os camundongos têm taxa metabólica diferente e, dessa forma, resultam em níveis sanguíneos da droga que no camundongo induzem alterações comportamentais. No modelo de pilocarpina as alterações são sinais colinérgicos periféricos, movimentos estereotipados, tremores, convulsões que progridem para o estado epiléptico em 1 ou 2 horas e morte nos animais.

Sabe-se que a atividade convulsiva está associada a mudanças bioquímicas em algumas áreas cerebrais e afeta diversos neurotransmissores, particularmente ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), glutamato, glicina e acetilcolina (CAVALHEIRO et al., 1994, GOTTESMANN, 2002; DOPP and PHILLIPS, 2008) e para a investigação de aspectos relacionados às convulsões, existem vários modelos experimentais em animais, que afetam sistemas como: Gabaérgico, Glutamatérgico e vias da glicina.

O modelo de convulsão por picrotoxina, antagonista GABA, tem sido amplamente utilizado como um modelo induzido quimicamente, produzindo convulsões tônico-clônicas generalizadas por bloquear os canais de cloreto do receptor GABA e que leva à morte na maioria dos casos (SWINYARD, 1969; HEIDARI et al., 1996; NICOLL, 2001; HEIDARI et

al., 2006). O receptor GABA<sub>A</sub> medeia a maioria das neurotransmissões inibitórias no SNC dos mamíferos e, consequentemente, consiste em um alvo para as pesquisas sobre a fisiopatogenia e terapêutica da epilepsia (GROVES et al., 2006).

Levando em consideração a grande aceitação o modelo de convulsão por picrotoxina foi escolhido para avaliar a atividade anticonvulsivante do chambá e investigar se o mecanismo de ação está relacionado com a via gabaérgica. Foram utilizadas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg do extrato, onde a dose de 25 mg/Kg não apresentou alterações com relação ao controle, mas nas doses de 50 e 100 mg/Kg chambá apresentou aumento na latência para a 1º convulsão e aumento na latência para a morte, onde entende-se por latência o tempo decorrido entre a administração da picrotoxina e os parâmetros observados (1º convulsão e morte). Neste modelo, o efeito do chambá 50 e 100 mg/Kg foi semelhante ao do fenobarbital.

A reversão dos ataques convulsivos induzidos pela administração de picrotoxina é considerada um parâmetro eficaz no estudo de drogas da classe dos anticonvulsivantes que atuam em mecanismos que envolvem o sistema GABAérgico (VELISEK, 2006; SINGH et al., 2010).

Esses resultados corroboraram com estudos anteriores realizados em nosso laboratório no qual foi evidenciado que o chambá apresenta efeitos no sistema nervoso central (SNC) como atividade ansiolítica em teste de labirinto em cruz elevada e box claro/escuro. Tal efeito foi relacionado ao sistema GABAérgico, em específico, ao sítio de ação benzodiazepínico (BZP) pois ao utilizar o flumazenil, um antagonista dos receptores GABA<sub>A</sub>/BZP, observou-se bloqueio do efeito ansiolítico do chambá.(VENÂNCIO et al., 2011).

A estricnina é um alcaloide natural obtido a partir das sementes secas de *Strychnos nux-vomica* (TILLEY et al., 2003). Em relação à dose tóxica, Nicholson (2004) cita doses de 0,25 mg/Kg a 2 mg/Kg como sendo letais para a maioria dos animais. A estricnina provoca convulsões bloqueando, principalmente na coluna vertebral, a resposta inibitória pós sináptica da glicina, que age através de um receptor semelhante ao GABA<sub>A</sub>, um canal de cloro multimérico (VAN DEN EYNDEN, 2009), sendo assim, a estricnina atua na forma de um antagonismo competitivo e reversível (ANDRADE, 2003; TILLEY et al., 2003). Spinosa et al. (2008) explica que a estricnina possui estrutura semelhante à glicina, por isso, resulta em

sinais nervosos e, ainda na diminuição do efeito inibitório pós-sináptico do arco reflexo, causando uma excitação incontrolada do reflexo, causando uma excitação incontrolada do reflexo espinhal (SORACI et al., 2001 ANDRADE, 2003).

A investigação da participação da via da glicina no mecanismo de ação do chambá foi realizado através do modelo de convulsão induzida por estricnina onde todas as doses utilizadas (25, 50 e 100 mg/Kg) protegeram os animais e, significativamente, aumentaram os parâmetros latência para 1º convulsão e tempo de morte. Os efeitos do extrato contra as convulsões induzidas por estricnina sugerem um mecanismo adicional via glicinérgica nas propriedades anticonvulsivantes do chambá. Neste modelo, o efeito do chambá foi semelhante ao do fenobarbital.

Os canais iônicos constituem um dos principais alvos para novas drogas anticonvulsivantes (LÖSCHER; SCHMIDT, 2006; HUNG; SHIH, 2011). Os canais iônicos são proteínas integrais da membrana (CATTERALL, 2010) e têm um papel muito importante na geração de potenciais de ação nas células excitáveis. A rápida despolarização da membrana neuronal presente amplamente e de forma desordenada nos processos convulsivos está intimamente relacionada com a participação dos canais de sódio ativados por voltagem (LARGE et al., 2009). Mutações nesses canais estão associadas ao desenvolvimento de alguns tipos de epilepsia (MEISLER; KEARNEY, 2005; HAWKINS et al., 2011).

Outro método de triagem para drogas com potencial anticonvulsivante através do envolvimento dos canais de sódio é o modelo de convulsão máxima por eletrochoque ou “grande mal”, no qual pulsos elétricos aplicados repetidamente são capazes de estimular o SNC e produzir convulsões tônico-clônicas, caracterizadas pela extensão tônica dos membros posteriores (SWINYARD; KUPFERBERG, 1985; BARROS; LEITE, 1986; FAINGOLD; FROMM, 1991). A capacidade de um fármaco administrado previamente em inibir a propagação deste estímulo, aumentando a latência, diminuindo a duração do ataque ou mesmo impedindo a sua ocorrência é considerada uma indicação de atividade anticonvulsivante (YA’U et al., 2008; LUSZCZKI ET AL., 2010).

A alteração comportamental observada após a administração aguda e oral do extrato padronizado de *Justicia pectoralis* no modelo de convulsão induzida por eletrochoque mostrou que o chambá, nas doses de 50 e 100 mg/Kg aumentou, significativamente, a latência

para a 1º convulsão. Sobre o parâmetro duração de convulsão observou-se que todas as doses de chambá foram eficazes e, dessa forma, reduziram o tempo de convulsão. Esses resultados evidenciaram que o extrato apresenta um perfil semelhante às drogas anticonvulsivantes utilizadas para o tratamento do grande mal epiléptico, já que promoveu proteção das convulsões induzidas pelo eletrochoque auricular nos parâmetros descritos em comparação com os animais tratados apenas com água destilada.

Neste modelo o efeito do chambá foi comparado ao da Oxcarbazepina, droga antiepiléptica que produz seus efeitos por bloqueio de canais de sódio voltagem-dependentes e modulação de canais de cálcio voltagem-dependentes. Pode-se sugerir, portanto que o efeito anticonvulsivante do chambá também se deve a mecanismos cujas ações diferenciam-se em parte do mecanismo dos compostos benzodiazepínicos, talvez com a participação de outros mecanismos subjacentes.

Dentre as drogas antiepilépticas disponíveis atualmente, podemos citar a carbamazepina, fenitoína, valproato, fenobarbital e lamotrigina, como alguns exemplos de fármacos que são clinicamente eficazes no controle de crises generalizadas tônico-clônicas e crises parciais (RHO, SANKAR, 1999; LUSZCZKI, et al., 2009). A maioria dessas exerce sua ação atuando, possivelmente, pelo bloqueio de canais de sódio dependentes de voltagem (HUNG, SHIH, 2011).

A investigação da participação da via colinérgica na atividade anticonvulsivante do chambá foi realizada através do modelo de indução por pilocarpina, um agonista muscarínico, que em doses elevadas (400 mg/Kg) induz processo convulsivo com alterações comportamentais e eletroencefalográficas, além de lesão cerebral (FREITAS et al., 2006b; YANG et al., 2012).

A ativação colinérgica é essencial para o início do processo convulsivo em modelos de epilepsia do lobo temporal, visto que estas convulsões podem ser bloqueadas pelo pré-tratamento com o antagonista muscarínico atropina (MARINHO et al., 1998; DE BRUIN et al., 2000). Este modelo é extensamente utilizado desde a década de 80 e replica características fenomenológicas das epilepsias humanas do lobo temporal.

A pilocarpina é o principal alcaloide isolado das folhas dos arbustos *Pilocarpus microphyllus* stapf, Família Rutaceae. Análises comportamentais e eletroencefalográficas demonstraram que a administração sistêmica de pilocarpina em roedores induz convulsões com foco de início no sistema límbico, principalmente no hipocampo (TURSKI et al., 1983). Essa atividade convulsiva torna-se secundariamente generalizada, sugerindo que este modelo mimetiza diversos aspectos das convulsões parciais complexas com generalização secundária em humanos e, dessa forma, constitui-se um modelo de epilepsia do lobo temporal (ONLEY et al., 1986; PERSINGER et al., 2004; VIANNA et al., 2005).

A epilepsia do lobo temporal é uma desordem crônica, frequentemente associada a um estímulo inicial precipitante como estado epiléptico, trauma e convulsões febris prolongadas (ENGEL; PEDLEY, 1997). Imediatamente após a administração de pilocarpina, os camundongos podem apresentar persistentes mudanças comportamentais, incluindo piloereção, cromodacriorréia, acinesia inicial, ataxia, tremores, automatismos mastigatórios como mioclonia dos músculos faciais que persistem de 10 a 15 minutos (TURSKI et al., 1983a).

Essas alterações comportamentais prosseguem para convulsões motoras límbicas incluindo movimentos tónicos das extremidades superiores que ocorrem em aproximadamente 30 minutos após a administração da pilocarpina e ainda pode desenvolver estado epiléptico de longa duração no animal (SEGARRA et al., 2002; FREITAS et al.; 2004a; SZYNDLER et al., 2005)

A alteração comportamental observada após a administração aguda e oral do extrato no modelo de convulsão induzida por pilocarpina mostrou que o chambá, em todas as doses utilizadas (25, 50 e 100 mg/Kg) aumentou, significativamente, a latência para a 1º convulsão, bem como o tempo de morte. Os efeitos do extrato contra as convulsões induzidas por pilocarpina sugerem um mecanismo adicional via colinérgica nas propriedades anticonvulsivantes do chambá. Neste modelo, o efeito do chambá foi semelhante ao do fenobarbital.

O modelo de pilocarpina apresenta relevância preditiva em relação aos testes de compostos com potencial atividade clínica (BARROS et al., 2007; MILITÃO; FERREIRA;

FREITAS, 2010). Além disso, o modelo de pilocarpina é assumido para identificar a eficácia de compostos anticonvulsivantes (PATEL, 2004).

O estudo químico do extrato das partes aéreas da *Justicia pectoralis* Jacq. Var. *stenophylla* Leonard revelou a presença de vários constituintes cujos principais umbeliferona e cuamrina (OLIVEIRA et al, 2000). A presença de cumarinas é sugerida como a responsável pelas atividades fitoterápicas do chambá (MACRAE; TOWERS, 1984; MILLS; PASCOE; CHAMBERS, 1986; DE VRIES; TAUSCHER; JOSHI, 1988; BARROS, 1992; LINO ET AL., 1997).

Vários trabalhos vêm demonstrando os efeitos da cumarina sobre o sistema nervoso central. De acordo com Ariza et al. (2007), a cumarina aumentou, significativamente, embora em menor grau que o diazepam (0,5 mg/Kg, ip), o tempo de sono induzido por pentobarbital (40 mg/Kg, ip); o diazepam também reduziu o período de latência. No sono induzido por éter, tanto a cumarina como o diazepam aumentaram, significativamente, o período de sono. A cumarina também produziu resultados protetores no teste de convulsão por eletrochoque, pentilenotetrazol e estricnina (AMIN et al., 2008; ARIZA et al., 2007, BHAT et al., 2011).

Estudos de nosso grupo demonstraram que a cumarina aumentou os níveis de aminoácidos inibitórios no SNC, pois aumentou os níveis de GABA, glicina e taurina em camundongos tratados, por via intraperitoneal, nas doses de 20 e 40 mg/Kg (PEREIRA et al., 2009). Venâncio et al. (2011) demonstraram que o extrato padronizado de chambá possui atividade ansiolítica relacionada com a via GABAérgica e, nas doses utilizadas, não interferiu com a atividade locomotora, tempo de sono e convulsão induzida por pentilenotetrazol.

Nossos dados nos permitem sugerir que o mecanismo anticonvulsivante do extrato padronizado de chambá pode envolver uma interação com os sistemas gabaérgico, glicinérgico, colinérgico e canais de sódio e cálcio.

## CAPÍTULO II - Avaliação da Atividade Antioxidante

### 1 Introdução

Nas últimas décadas, inúmeras pesquisas foram realizadas como objetivo de se esclarecer o papel das espécies reativas de O<sub>2</sub> e N em processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, aterosclerose, inflamação e doenças neuropsiquiátricas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; FATTAL et al., 2006). O cérebro está entre os órgãos mais vulneráveis devido ao seu elevado consumo de oxigênio e porque seus lipídios de membranas são altamente oxidáveis (GUPTA, 2004).

A produção de agentes oxidantes possui um papel na regulação da função biológica, no dano às estruturas celulares, bem como na patogênese de doenças do sistema nervoso central, tais como doença de Parkinson, demências e epilepsia (KONG et al., 2010; MALINSKA et al., 2010).

Estresse oxidativo e nitrosativo são considerados possíveis mecanismos na patogênese da epilepsia (CHANG et al., 2010). Estudos demonstram que o estado de mal epiléptico modifica o potencial redox e diminui o nível de ATP, o que pode levar a um colapso da produção e oferta energética cerebral (WASTERLAIN et al., 1993). Liang e Patel (2006) demonstraram danos oxidativos a alvos suscetíveis (proteína, lipídios e DNA) causados por convulsões persistentes (estado de mal epiléptico). Vários estudos (modelos animais e estudos genéticos) demonstraram um aumento no estresse oxidativo e nitrosativo mitocondrial e subsequente dano celular após convulsões persistentes (BRUCE et al., 1995; GLUCK et al., 2000; LIANG et al., 2000; COCK et al., 2002; LIANG et al., 2006; WALDBAUM et al., 2010; CHUANG et al., 2010).

Vários estudos já comprovaram que os agentes oxidantes podem ser causa ou consequência de doenças humanas associadas ao estresse oxidativo. Por isso, antioxidantes naturais ou sintéticos têm sido recomendados para o alívio dos sinais e sintomas destas doenças e, até mesmo, para bloquear sua evolução (NAKAMURA; LIPTON, 2009).

Para contrabalancear esses danos, existem vários mecanismos de defesa antioxidantes no cérebro que neutralizam os efeitos danosos das espécies reativas de nitrogênio e oxigênio. Contudo, a perda da eficiência dos mecanismos de defesa antioxidante resulta no aumento da formação de agentes oxidantes (KIM, KIM; 2010). Além disso, as espécies reativas podem induzir dano neuronal via depleção dos sistemas antioxidantes não-enzimático e enzimático no cérebro (LESGARDS et al.; 2011).

Assim, no presente capítulo é abordada a investigação dos efeitos antioxidantes Extrato Padronizado de *Justicia pectoralis* (chambá) em modelos experimentais de convulsão.

## 2 Objetivos específicos

Analisar o efeito do pré-tratamento com extrato padronizado de *Justicia pectoralis* sobre o estresse oxidativo neuronal induzido por modelos de convulsão (picrotoxina, estricnina, eletrochoque e pilocarpina) nas áreas cerebrais hipocampo, corpo estriado e medula (somente modelo de estricnina), por meio da:

- Determinação da taxa de peroxidação lipídica (TBARS);
- Produção de nitrito-nitrato;
- Verificação da atividade da enzima antioxidante catalase

### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Testes Neuroquímicos

Os testes neuroquímicos foram realizados em animais divididos em 4 grupos (n=10), tratados, por via oral, com chambá (50 mg/Kg), água destilada (controle), fenobarbital (10 mg/Kg) ou oxcarbazepina (60 mg/Kg). Logo após os experimentos de indução da convulsão, descrito anteriormente no Capítulo 1, os animais mortos foram decapitados e seus cérebros removidos. Os animais que sobreviveram foram sacrificados por rápida decapitação após o período de tempo determinado pelo modelo de convulsão. As regiões cerebrais hipocampo (HC), corpo estriado (CE) foram dissecadas. No modelo de estricnina foi dissecado, também, a medula espinhal. As áreas foram congeladas e armazenadas a – 70º e, em seguida, foram preparados homogenatos a 10% em solução de fosfato de sódio 150 mM pH 7,4 e centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos a 4º.

##### 3.1.1 Determinação da peroxidação lipídica através da produção de substâncias ácidas reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O grau de lipoperoxidação foi medido através da determinação da concentração de malonildialdeído, conforme o método de Huang et al (1998). A peroxidação lipídica é uma das mais importantes expressões orgânicas do estresse oxidativo induzido pela reatividade de radicais livres do oxigênio. O método mais empregado para a determinação do malonildialdeído (MDA) em amostras biológicas é baseado na sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Nesta reação, duas moléculas de TBA reagem estequiométricamente com uma molécula de MDA para formar uma solução de cor rosa, que tem absorbância máxima em pH ácido em 532 a 535 nm. O coeficiente de extinção desde cromóforo em um comprimento de onda de 535 nm e pH 1,0 é de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ .

### **- Procedimento Experimental**

Foi preparado o homogenato das áreas cerebrais a 10% em solução de fosfato de sódio 150 Mm, 63 $\mu$ L do homogenato foi adicionado a 100  $\mu$ L de ácido perclórico 35% em tubos eppendorf, sendo estas centrifugadas (10000 rpm/ 10 min/ 4°C), no qual 150  $\mu$ L do sobrenadante foram recuperados e adicionados 50  $\mu$ L de ácido tiobarbitúrico 1,2%. Em seguida, foram aquecidas em banho-maria a 95°C por 30 minutos. Adicionou-se 150  $\mu$ L da mistura em poços de placa de ELISA e, posteriormente, feita a leitura a 535nm. Os resultados foram expressos em micromol de malonildialdeído (MDA) por g de tecido.

### **- Curva-padrão de malonildialdeído**

A partir da solução padrão de MDA, foram preparadas as soluções 0,627  $\mu$ mol; 1,247  $\mu$ mol; 2,463  $\mu$ mol; 4,8  $\mu$ mol; 9,16  $\mu$ mol e 16,77  $\mu$ mol. O branco foi feito com água destilada. A leitura da absorbância foi feita a 520 e 535 nm, o valor utilizado foi a subtração da leitura em 535 da leitura em 520, para determinação da equação da curva-padrão de MDA.

### **- Soluções reagentes:**

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

#### **- Tampão fosfato**

Fosfato de sódio monobásico (1,66 g) e fosfato de sódio dibásico (4,69 g) diluídos em 300 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 7,4.

#### **- Solução de ácido tiobarbitúrico (TBA)**

TBA (Sigma, St, Louis, MO, EUA) 50 mg em 50 mL de água destilada

#### **3.1.2 Determinação da produção de nitrito-nitrito**

Baseado na utilização do reagente de Griess que mostra a presença de nitrito na amostra por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor rosa (GREEN et al., 1981).

## **- Procedimento Experimental**

Foram preparados homogenatos da área cerebral a 10% em tampão fosfato de sódio. Após a centrifugação (10000 rpm/10min/4°C), os sobrenadantes foram coletados e a produção de NO determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 50 µL do sobrenadante foi incubada com 50 µL do reagente de Griess [ácido fosfórico 5%, N-1-naftilenodiamina (NEED) 0,1%, sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% e água destilada (1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 550 nm. Os resultados foram expressos em µM/g de tecido.

### **- Soluções reagentes**

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

#### **- Ácido fosfórico 5%**

5 mL de ácido em balão volumétrico de 100 mL e dissolvido, lentamente, em água destilada.

#### **- Sulfonilamida 1 % em ácido fosfórico**

Sulfonilamida (0,1 g) e dissolvido em ácido fosfórico 5 % (10 mL)

#### **- NEED 0,1 %**

N-1-naftilenodiamina (10 mg) dissolvido em 10 mL de água destilada (Preparado no dia)

### **- Curva padrão**

Foi pesado 6,9 mg de NaNO<sub>2</sub> e dissolvido em 10 mL de água bidestilada (estoque-10mM). Em seguida foram feitas as diluições em série (10 e 20x). Foi feita uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN *et al.*, 1981).

### 3.1.3 Determinação da atividade da catalase

A atividade da catalase tem como princípio a medida da velocidade de produção de O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O à proporção que a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, utilizado como substrato é hidrolizado, de acordo com Maehly e Chance (1954) e Chance e Maehly (1955).

A atividade da enzima é medida em 230 nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, pela leitura da variação da absorbância por minuto, durante 6 minutos e os resultados expressos em  $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$  de proteína.

#### **- Procedimento Experimental**

Foi preparado o meio da reação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (27 mL) mais Tampão Tris HCl 1M, EDTA 5 mM pH 8,0 (1,5 mL) e H<sub>2</sub>O Milli Q (1,2 mL). Em seguida foi colocado na cubeta de quartzo 980  $\mu\text{L}$  do meio de reação mais 20  $\mu\text{L}$  do homogenato a 10%. E feita à leitura durante 6 min a temperatura de 37°C em espectrofotômetro a 230nm. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976).

#### **- Soluções Reagentes**

As seguintes soluções reagentes foram utilizadas na técnica:

##### **- Tampão Tris HCl 1M, EDTA 5 mM, pH 8,0**

12,1 g de Trisma Base (1M) e 0,19 g de EDTA (5mM) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e diluídos em 10 mL de água Milli Q. O pH foi ajustado com HCl 1M.

##### **- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para o meio da reação**

27 $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Sigma, St.Louis, MO, EUA) diluídos em 27 mL de água Milli Q.

### 3.1.4 Dosagem de Proteínas

O método é baseado na interação do corante Coomassie Blue G250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniónica que absorve fortemente em 595nm.

#### **- Procedimento Experimental**

Foram preparados homogenatos da área cerebral a 10% em tampão fosfato de sódio. Após a centrifugação (10000 rpm/10min/4°C), os sobrenadantes foram coletados e adicionados aos poços contendo 39 µL de tampão fosfato de sódio (utilizado no preparo da amostra). Em seguida, foram adicionados 200 µL da solução de Bradford (diluída 5 x). A absorbância foi medida, após 5 minutos, em espectrofotômetro a 595 nm (BRADFORD, 1976).

#### **- Soluções reagentes**

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

##### **- Solução de Bradford (concentrada)**

Sob agitação constante, misturou-se Coomassie (0,1 g) com etanol (50 mL), em seguida adicionou-se ácido orto-fosfórico (100mL). Adicionou-se água destilada até completar 200 mL. Após homogeneizado foi acondicionado em frasco âmbar.

##### **-Solução de Bradford (diluída 5 x)**

Em 1 mL da solução de Bradford e acrescentou-se 4 mL de água destilada

### - Curva- padrão

Foram pesados 8 mg de albumina e diluído em 40 mL de água destilada. Em seguida, foi adicionado em poços volumes crescentes de albumina associados com volumes decrescentes de água destilada, apresentado na tabela abaixo (GREEN *et al.*, 1981).

QUADRO 3 – Distribuição de albumina e água destilada para curva padrão de Bradford

	µL de solução de albumina	µL de água destilada	Concentração Final (µg/mL)
Branco	0	40	0
1	2,5	37,5	12,5
2	5	35	25
3	10	30	50
4	20	20	100
5	40	0	200

## 4 Resultados

### 4.1 Efeito do chambá sobre o estresse oxidativo em camundongos submetidos à convulsão induzida por picrotoxina

4.1.1 Efeito do chambá sobre a concentração de malondialdeído (MDA) em homogenatos cerebrais de hipocampo e corpo estriado

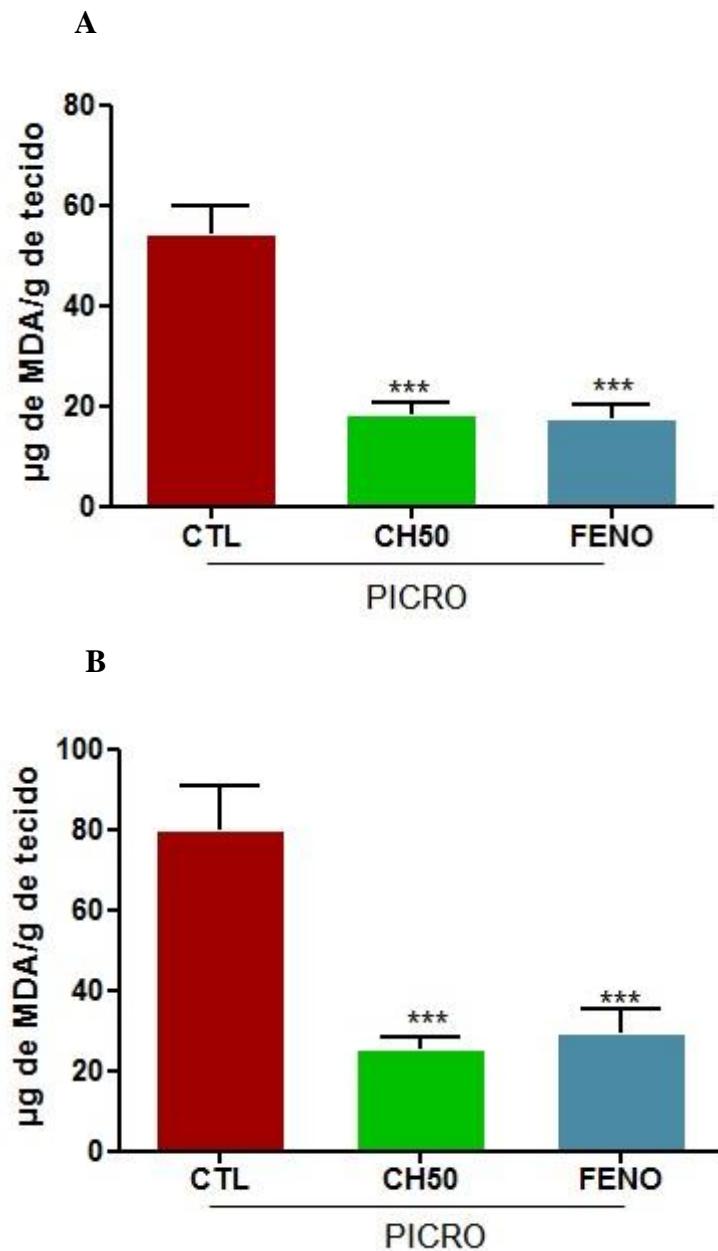
Neste protocolo foi determinada a concentração de malondialdeído (MDA), marcador de peroxidação lipídica, em animais tratados com chambá (50mg/Kg), fenobarbital (10 mg/Kg) ou água destilada que foram submetidos à convulsão por picrotoxina (10 mg/Kg).

#### HIPOCAMPO

Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de MDA [CH50:  $18,73 \pm 2,01$  ( $p<0,001$ )] quando comparado ao controle ( $54,69 \pm 5,16$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, reduziu a concentração de MDA [FENO:  $17,79 \pm 2,28$  ( $p<0,001$ )] em relação ao controle ( $54,69 \pm 5,16$ ). (Figura 7 A)

#### CORPO ESTRIADO

Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de MDA [CH50:  $25,81 \pm 2,38$  ( $p<0,001$ )] quando comparado ao controle ( $80,30 \pm 10,46$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, reduziu a concentração de MDA [FENO:  $29,65 \pm 5,92$  ( $p<0,001$ )] em relação ao controle ( $80,30 \pm 10,46$ ). (Figura 7 B)



**FIGURA 7 Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de MDA em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por picrotoxina**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com picrotoxina (10 mg/Kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 10$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle (\*\*p<0,001). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; PICRO: picrotoxina

#### 4.1.2 Efeito do chambá sobre a concentração de nitrito/nitrato em homogenatos cerebrais de hipocampo e corpo estriado

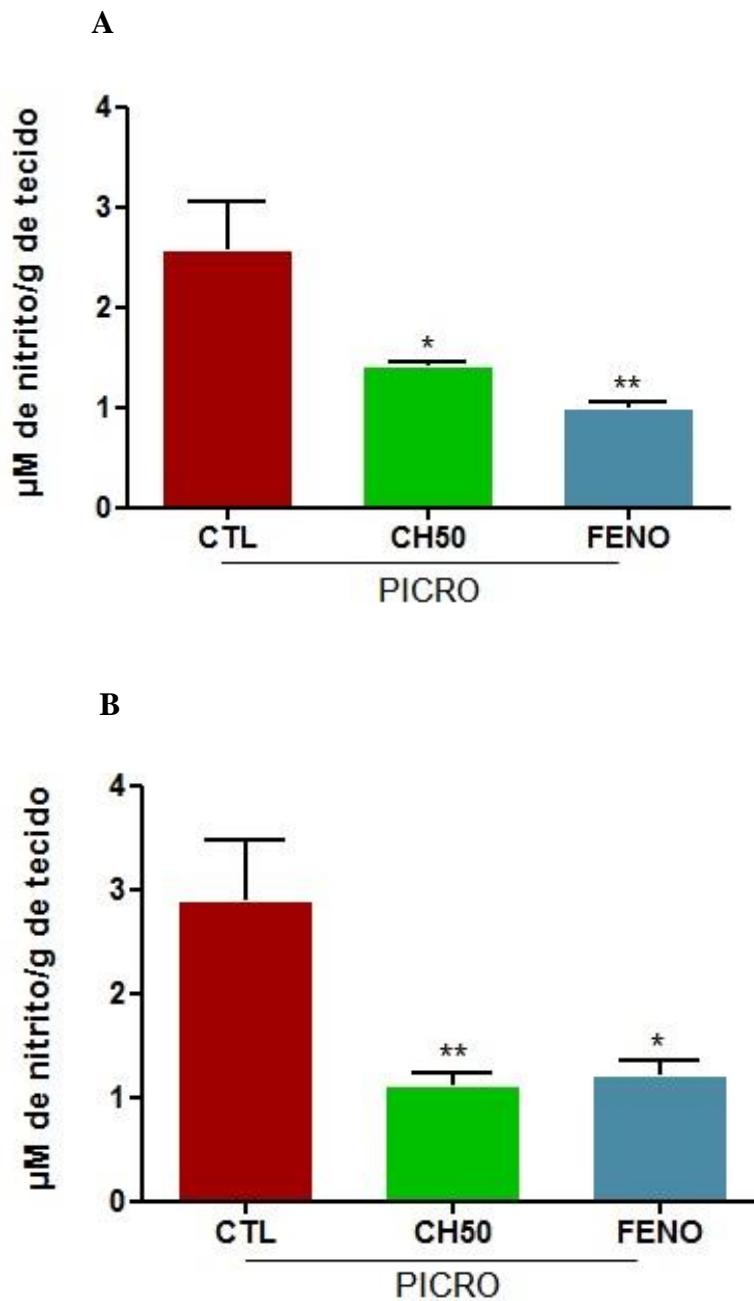
Neste protocolo foi determinada a concentração de nitrito/nitrato em animais tratados com chambá (50mg/Kg), fenobarbital (10 mg/Kg) ou água destilada que foram submetidos à convulsão por picrotoxina (10 mg/Kg).

#### HIPOCAMPO

Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de nitrito/nitrato [CH50:  $1,43 \pm 0,01$  ( $p<0,05$ )] quando comparado ao controle ( $2,59 \pm 0,46$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, reduziu a concentração de nitrito/nitrato [FENO:  $1,01 \pm 0,02$  ( $p<0,01$ )] em relação ao controle ( $2,59 \pm 0,46$ ). (**Figura 8 A**)

#### CORPO ESTRIADO

Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de nitrito/nitrato [CH50:  $1,13 \pm 0,08$  ( $p<0,01$ )] quando comparado ao controle ( $2,92 \pm 0,55$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, reduziu a concentração de nitrito/nitrato [FENO:  $1,24 \pm 0,11$  ( $p<0,05$ )] em relação ao controle ( $2,92 \pm 0,55$ ). (**Figura 8 B**)



**FIGURA 8 Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de nitrito/nitrato em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por picrotoxina**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com picrotoxina (10 mg/Kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 10$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; PICRO: picrotoxina.

#### 4.1.3 Efeito do chambá sobre a atividade da catalase em homogenatos cerebrais de hipocampo e corpo estriado

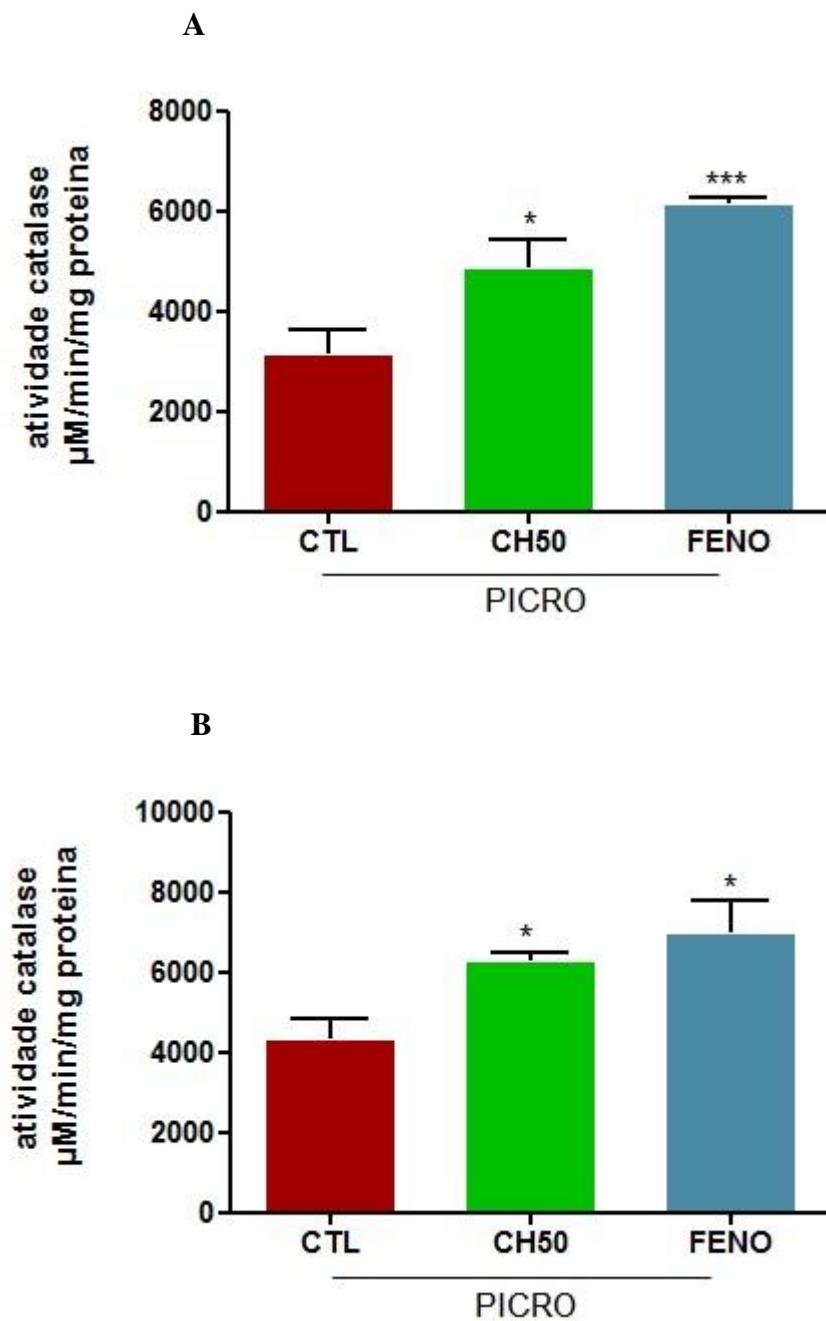
Neste protocolo foi avaliada a atividade da catalase em animais tratados com chambá (50mg/Kg), fenobarbital (10 mg/Kg) ou água destilada que foram submetidos à convulsão por picrotoxina (10 mg/Kg).

#### HIPOCAMPO

Os animais tratados com chambá apresentaram aumento da atividade da catalase [CH50:  $4911 \pm 505$  (p<0,05)] quando comparado ao controle ( $3188 \pm 449,2$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, aumentou a atividade da catalase [FENO:  $6198 \pm 80,52$  (p<0,001)] em relação ao controle ( $3188 \pm 449,2$ ). (**Figura 9 A**)

#### CORPO ESTRIADO

Os animais tratados com chambá apresentaram aumento da atividade da catalase [CH50:  $6311 \pm 182$  (p<0,05)] quando comparado ao controle ( $4408 \pm 421,8$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, aumentou a atividade da catalase [FENO:  $7032 \pm 771,3$  (p<0,05)] em relação ao controle ( $4408 \pm 421,8$ ). (**Figura 9 B**)



**FIGURA 9** Efeito do chambá e fenobarbital sobre a atividade da catalase em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por picrotoxina

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com picrotoxina (10 mg/Kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 10$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle ( $*p < 0,05$ ;  $***p < 0,001$ ). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; PICRO: picrotoxina

## 4.2 Efeito do chambá sobre o estresse oxidativo em camundongos submetidos à convulsão induzida por estricnina

4.2.1 Efeito do chambá sobre a concentração de malondialdeído (MDA) em homogenatos cerebrais de hipocampo, corpo estriado e medula.

Neste protocolo foi determinada a concentração de malondialdeído (MDA), marcador de peroxidação lipídica, em animais tratados com chambá (50mg/Kg), fenobarbital (10 mg/Kg) ou água destilada que foram submetidos à convulsão por estricnina (3 mg/Kg).

### HIPOCAMPO

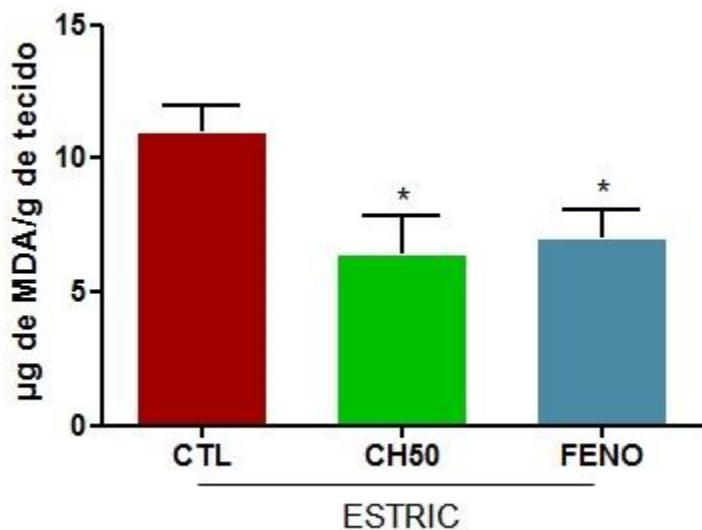
Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de MDA [CH50:  $6,50 \pm 1,33$  ( $p<0,05$ )] quando comparado ao controle ( $11,11 \pm 0,88$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, reduziu a concentração de MDA [FENO:  $7,07 \pm 0,97$  ( $p<0,05$ )] em relação ao controle ( $11,11 \pm 0,88$ ). (**Figura 10**)

### CORPO ESTRIADO

Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de MDA [CH50:  $9,94 \pm 0,80$  ( $p<0,001$ )] quando comparado ao controle ( $52,63 \pm 7,09$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, reduziu a concentração de MDA [FENO:  $4,54 \pm 0,99$  ( $p<0,001$ )] em relação ao controle ( $52,63 \pm 7,09$ ). (**Figura 11**)

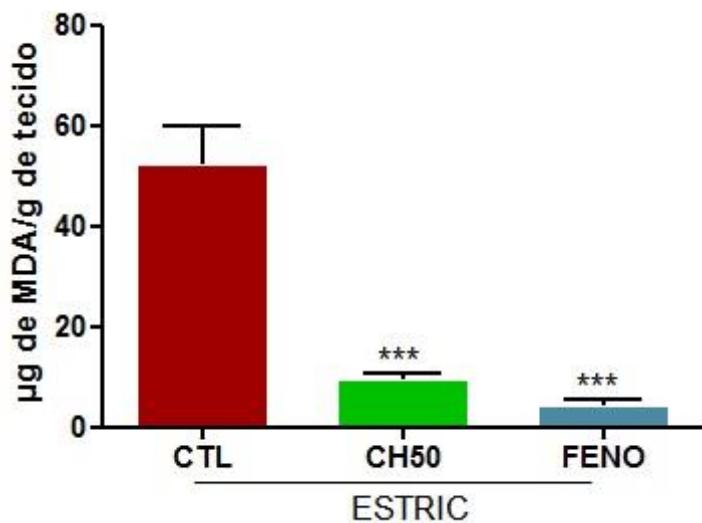
### MEDULA

Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de MDA [CH50:  $8,07 \pm 1,15$  ( $p<0,001$ )] quando comparado ao controle ( $62,01 \pm 7,54$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, reduziu a concentração de MDA [FENO:  $23,39 \pm 1,29$  ( $p<0,001$ )] em relação ao controle ( $62,01 \pm 7,54$ ). (**Figura 12**)



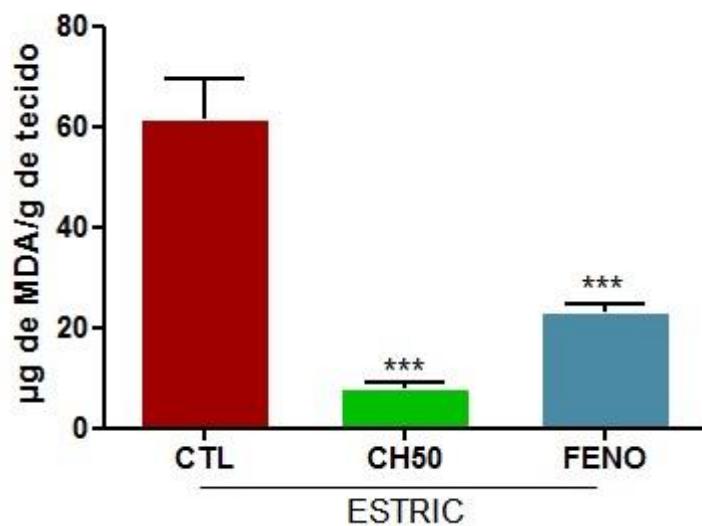
**FIGURA 10 Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de MDA em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão induzida por estricnina**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com estricnina (3 mg/Kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 10$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle ( $*p < 0,05$ ). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; ESTRIC: estricnina



**FIGURA 11 Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de MDA em corpo estriado de camundongos submetidos à convulsão induzida por estricnina**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com estricnina (3 mg/Kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n = 10). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle (\*\*p<0,001). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; ESTRIC: estricnina



**FIGURA 12 Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de MDA na medula de camundongos submetidos à convulsão induzida por estricnina**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com estricnina (3 mg/Kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n = 10). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle (\*\*p<0,001). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; ESTRIC: estricnina

#### 4.2.2 Efeito do chambá sobre a concentração de nitrito/nitrato em homogenatos cerebrais de hipocampo, corpo estriado e medula

Neste protocolo foi determinada a concentração de nitrito/nitrato em animais tratados com chambá (50mg/Kg), fenobarbital (10 mg/Kg) ou água destilada que foram submetidos à convulsão por estricnina (3 mg/Kg).

##### HIPOCAMPO

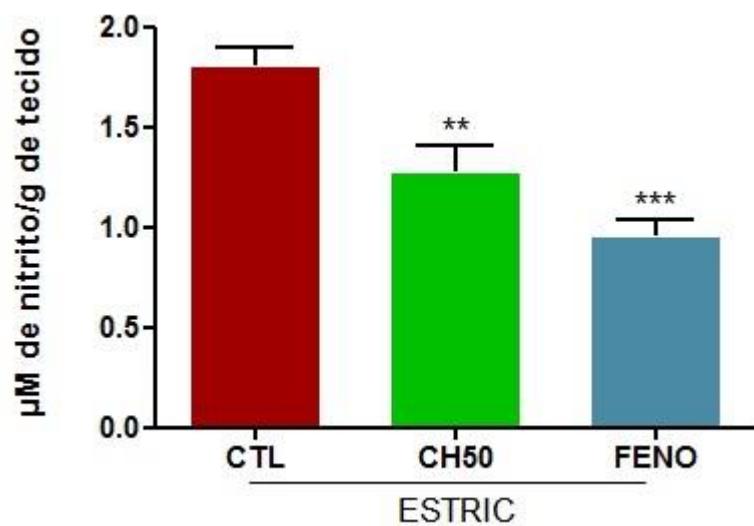
Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de nitrito/nitrato [CH50:  $1,28 \pm 0,11$  ( $p<0,01$ )] quando comparado ao controle ( $1,82 \pm 0,07$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, reduziu a concentração de nitrito/nitrato [FENO:  $0,97 \pm 0,07$  ( $p<0,001$ )] em relação ao controle ( $1,82 \pm 0,07$ ). (**Figura 13**)

##### CORPO ESTRIADO

Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de nitrito/nitrato [CH50:  $0,98 \pm 0,03$  ( $p<0,01$ )] quando comparado ao controle ( $1,32 \pm 0,07$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, reduziu a concentração de nitrito/nitrato [FENO:  $0,98 \pm 0,08$  ( $p<0,01$ )] em relação ao controle ( $1,32 \pm 0,07$ ). (**Figura 14**)

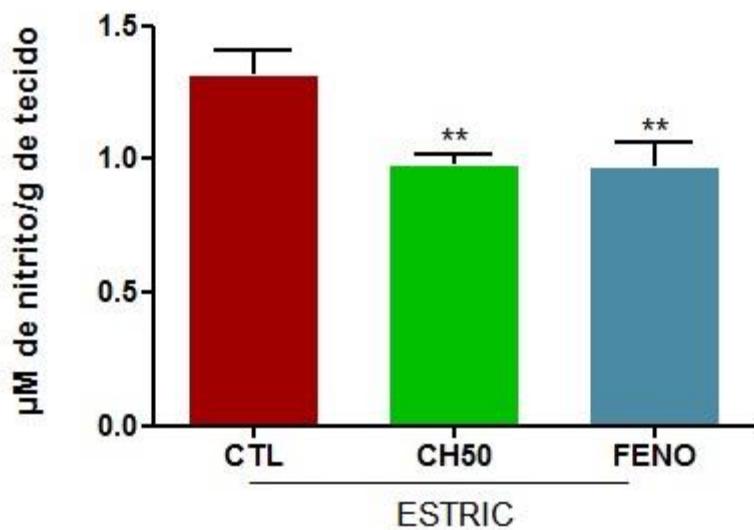
##### MEDULA

Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de nitrito/nitrato [CH50:  $1,22 \pm 0,06$  ( $p<0,001$ )] quando comparado ao controle ( $3,17 \pm 0,48$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, reduziu a concentração de nitrito/nitrato [FENO:  $0,99 \pm 0,06$  ( $p<0,001$ )] em relação ao controle ( $3,17 \pm 0,48$ ). (**Figura 15**)



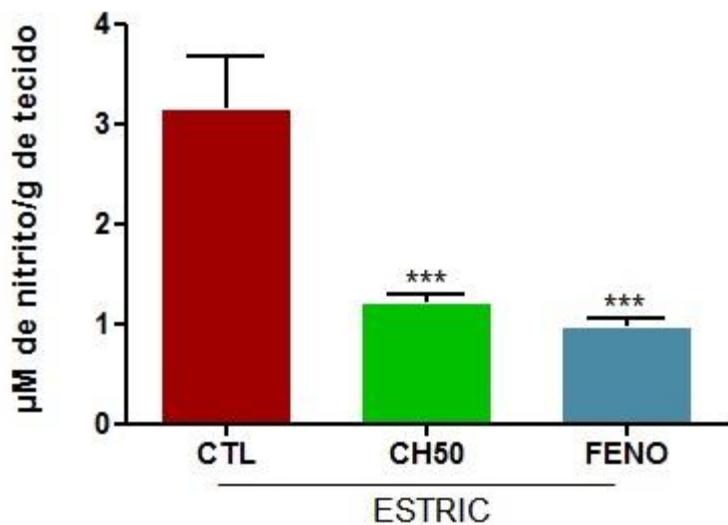
**FIGURA 13 Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de nitrito/nitrito em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão induzida por estricnina**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com estricnina (3 mg/Kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n = 10). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; ESTRIC: estricnina



**FIGURA 14 Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de nitrito/nitrato em corpo estriado de camundongos submetidos à convulsão induzida por estricnina**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com estricnina (3 mg/Kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 10$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle (\*\* $p < 0,01$ ). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; ESTRIC: estricnina



**FIGURA 15 Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de nitrito/nitrato na medula de camundongos submetidos à convulsão induzida por estricnina**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com estricnina (3 mg/Kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n = 10). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle (\*\*p<0,001). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; ESTRIC: estricnina

#### 4.2.3 Efeito do chambá sobre a atividade da catalase em homogenatos cerebrais de hipocampo, corpo estriado e medula

Neste protocolo foi avaliada a atividade da catalase em animais tratados com chambá (50mg/Kg), fenobarbital (10 mg/Kg) ou água destilada que foram submetidos à convulsão por estricnina (3 mg/Kg).

#### HIPOCAMPO

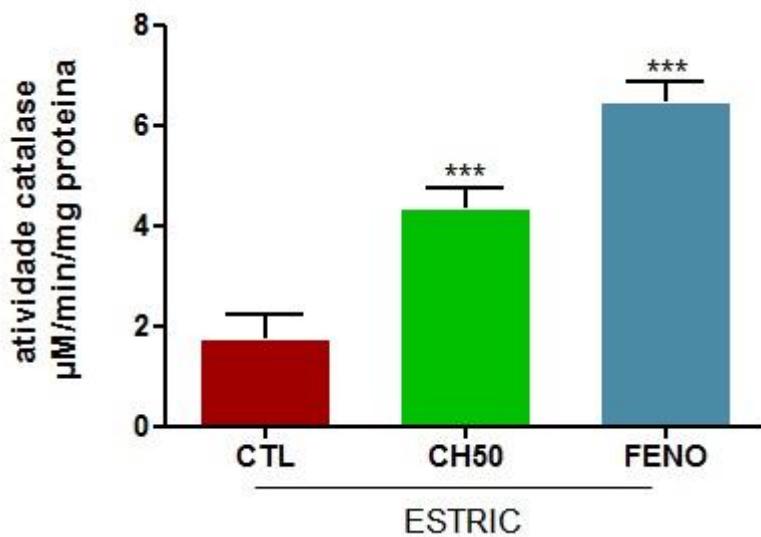
Os animais tratados com chambá apresentaram aumento da atividade da catalase [CH50:  $4,39 \pm 0,36$  ( $p<0,001$ )] quando comparado ao controle ( $1,78 \pm 0,42$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, aumentou a atividade da catalase [FENO:  $6,49 \pm 0,36$  ( $p<0,001$ )] em relação ao controle ( $1,78 \pm 0,42$ ). (**Figura 16**)

#### CORPO ESTRIADO

Os animais tratados com chambá apresentaram aumento da atividade da catalase [CH50:  $3,24 \pm 0,41$  ( $p<0,01$ )] quando comparado ao controle ( $0,63 \pm 0,14$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, aumentou a atividade da catalase [FENO:  $2,67 \pm 0,52$  ( $p<0,05$ )] em relação ao controle ( $0,63 \pm 0,14$ ). (**Figura 17**)

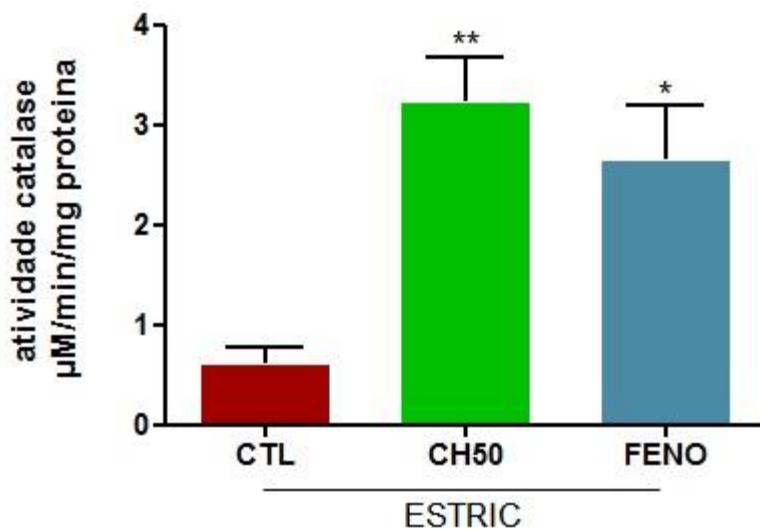
#### MEDULA

Os animais tratados com chambá apresentaram aumento da atividade da catalase [CH50:  $6,35 \pm 1,03$  ( $p<0,05$ )] quando comparado ao controle ( $2,42 \pm 0,77$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, aumentou a atividade da catalase [FENO:  $9,17 \pm 0,84$  ( $p<0,001$ )] em relação ao controle ( $2,42 \pm 0,77$ ). (**Figura 18**)



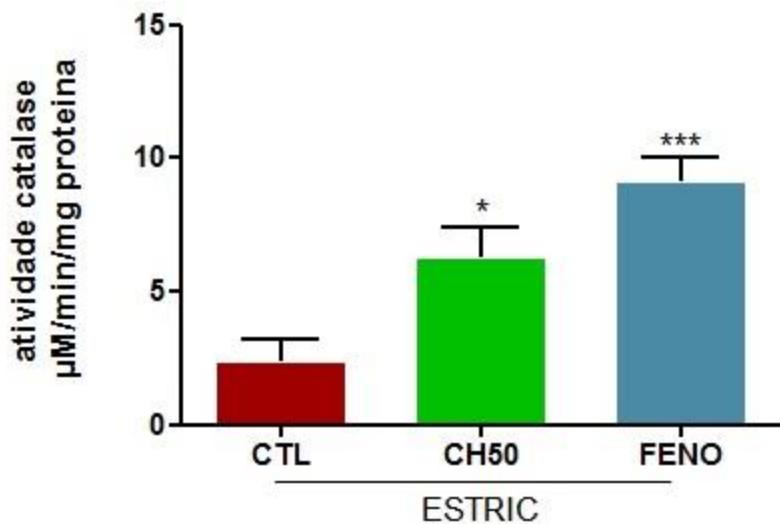
**FIGURA 16 Efeito do chambá e fenobarbital sobre a atividade da catalase em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão induzida por estriptinina**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com estriptinina (3 mg/Kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 10$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle (\*\*p<0,001). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; ESTRIC: estriptinina



**FIGURA 17 Efeito do chambá e fenobarbital sobre a atividade da catalase em corpo estriado de camundongos submetidos à convulsão induzida por estricnina**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com estricnina (3 mg/Kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n = 10). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle (\*p<0,05; \*\*p<0,01). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; ESTRIC: estricnina



**FIGURA 18 Efeito do chambá e fenobarbital sobre a atividade da catalase na medula de camundongos submetidos à convulsão induzida por estricnina**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com estricnina (3 mg/Kg, i.p.). Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n = 10). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; ESTRIC: estricnina

#### **4.3 Efeito do chambá sobre o estresse oxidativo em camundongos submetidos à convulsão induzida por eletrochoque**

##### **4.3.1 Efeito do chambá sobre a concentração de malondialdeído (MDA) em homogenatos cerebrais de hipocampo e corpo estriado**

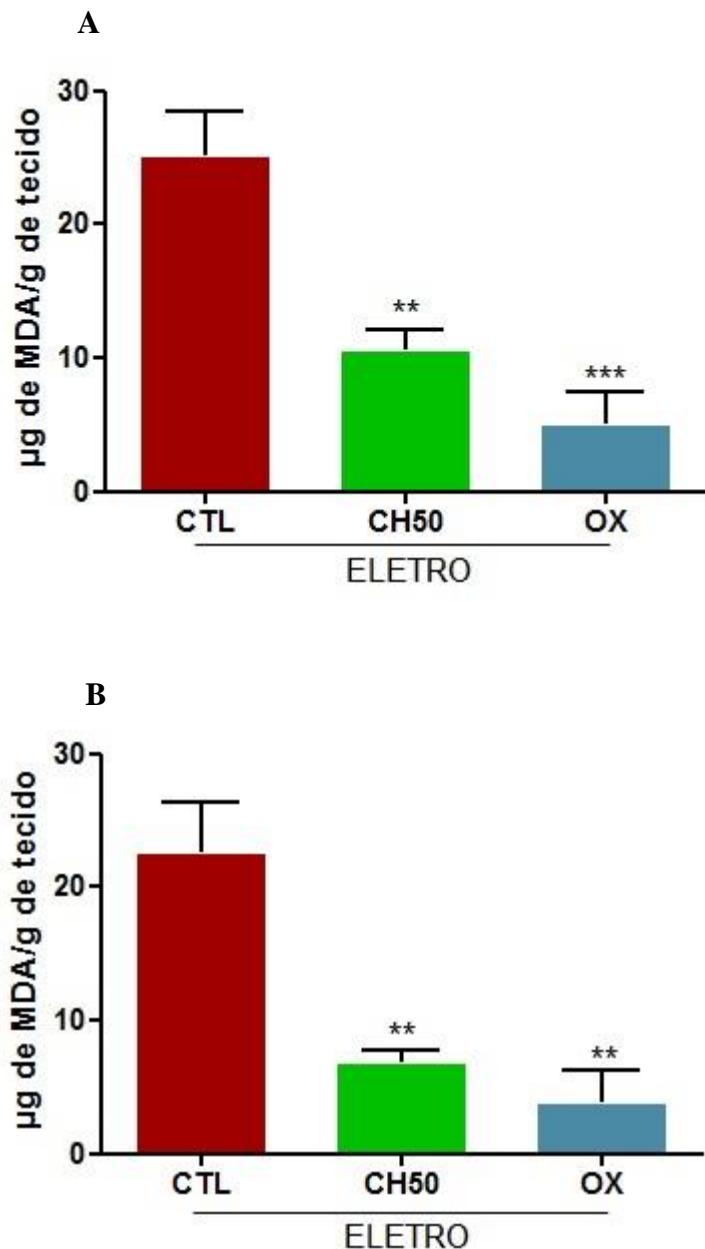
Neste protocolo foi determinada a concentração de malondialdeído (MDA), marcador de peroxidação lipídica, em animais tratados com chambá (50mg/Kg), oxcarbazepina (60 mg/Kg) ou água destilada que foram submetidos à convulsão por eletrochoque.

#### **HIPOCAMPO**

Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de MDA [CH50:  $10,68 \pm 1,34$  ( $p<0,01$ )] quando comparado ao controle ( $25,25 \pm 3,18$ ). Oxcarbazepina, utilizada como padrão positivo, reduziu a concentração de MDA [OX:  $5,17 \pm 2,30$  ( $p<0,001$ )] em relação ao controle ( $25,25 \pm 3,18$ ). (**Figura 19 A**)

#### **CORPO ESTRIADO**

Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de MDA [CH50:  $6,99 \pm 0,75$  ( $p<0,01$ )] quando comparado ao controle ( $22,73 \pm 3,59$ ). Oxcarbazepina, utilizada como padrão positivo, reduziu a concentração de MDA [OX:  $6,50 \pm 2,28$  ( $p<0,01$ )] em relação ao controle ( $22,73 \pm 3,59$ ). (**Figura 19 B**)



**FIGURA 19 Efeito do chambá e oxcarbazepina sobre a concentração de MDA em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por eletrochoque**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e oxcarbazepinal (60 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com eletrochoque. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 10$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle (\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). CTL: controle; CH: chambá; OX: oxacarbazepina; ELETRO: eletrochoque

#### 4.3.2 Efeito do chambá sobre a concentração de nitrito/nitrato em homogenatos cerebrais de hipocampo e corpo estriado

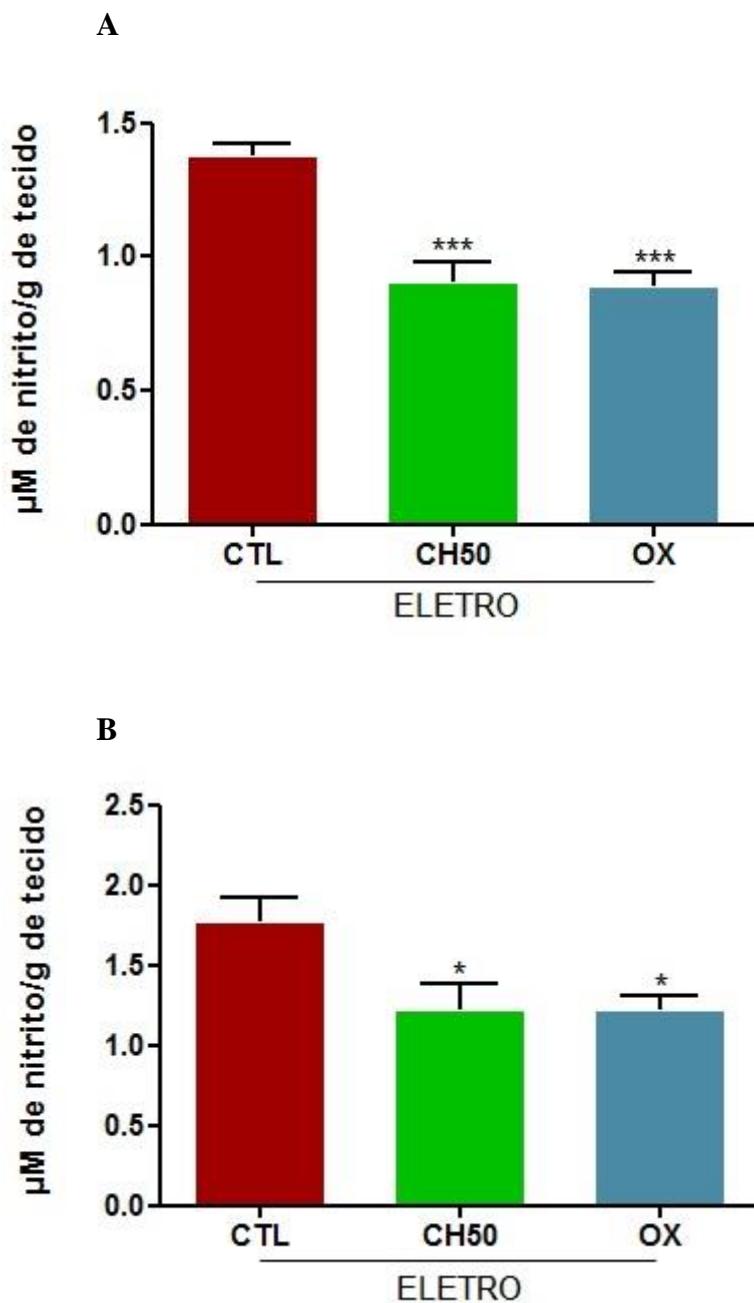
Neste protocolo foi determinada a concentração de nitrito/nitrato em animais tratados com chambá (50mg/Kg), oxcarbazepina (60 mg/Kg) ou água destilada que foram submetidos à convulsão por eletrochoque.

#### HIPOCAMPO

Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de nitrito/nitrato [CH50:  $0,91 \pm 0,07$  ( $p<0,001$ )] quando comparado ao controle ( $1,38 \pm 0,03$ ). Oxcarbazepina, utilizada como padrão positivo, reduziu a concentração de nitrito/nitrato [OX:  $0,90 \pm 0,03$  ( $p<0,001$ )] em relação ao controle ( $1,38 \pm 0,03$ ). (**Figura 20 A**)

#### CORPO ESTRIADO

Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de nitrito/nitrato [CH50:  $1,23 \pm 0,15$  ( $p<0,05$ )] quando comparado ao controle ( $1,78 \pm 0,14$ ). Oxcarbazepina, utilizada como padrão positivo, reduziu a concentração de nitrito/nitrato [OX:  $1,23 \pm 0,06$  ( $p<0,05$ )] em relação ao controle ( $1,78 \pm 0,14$ ). (**Figura 20 B**)



**FIGURA 20 Efeito do chambá e oxcarbazepina sobre a concentração de nitrito/nitrato em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por eletrochoque**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e oxcarbazepinal (60 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com eletrochoque. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 10$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle ( $*p < 0,05$ ;  $***p < 0,001$ ). CTL: controle; CH: chambá; OX: oxacarbazepina; ELETRO: eletrochoque

#### 4.3.3 Efeito do chambá sobre a atividade da catalase em homogenatos cerebrais de hipocampo e corpo estriado

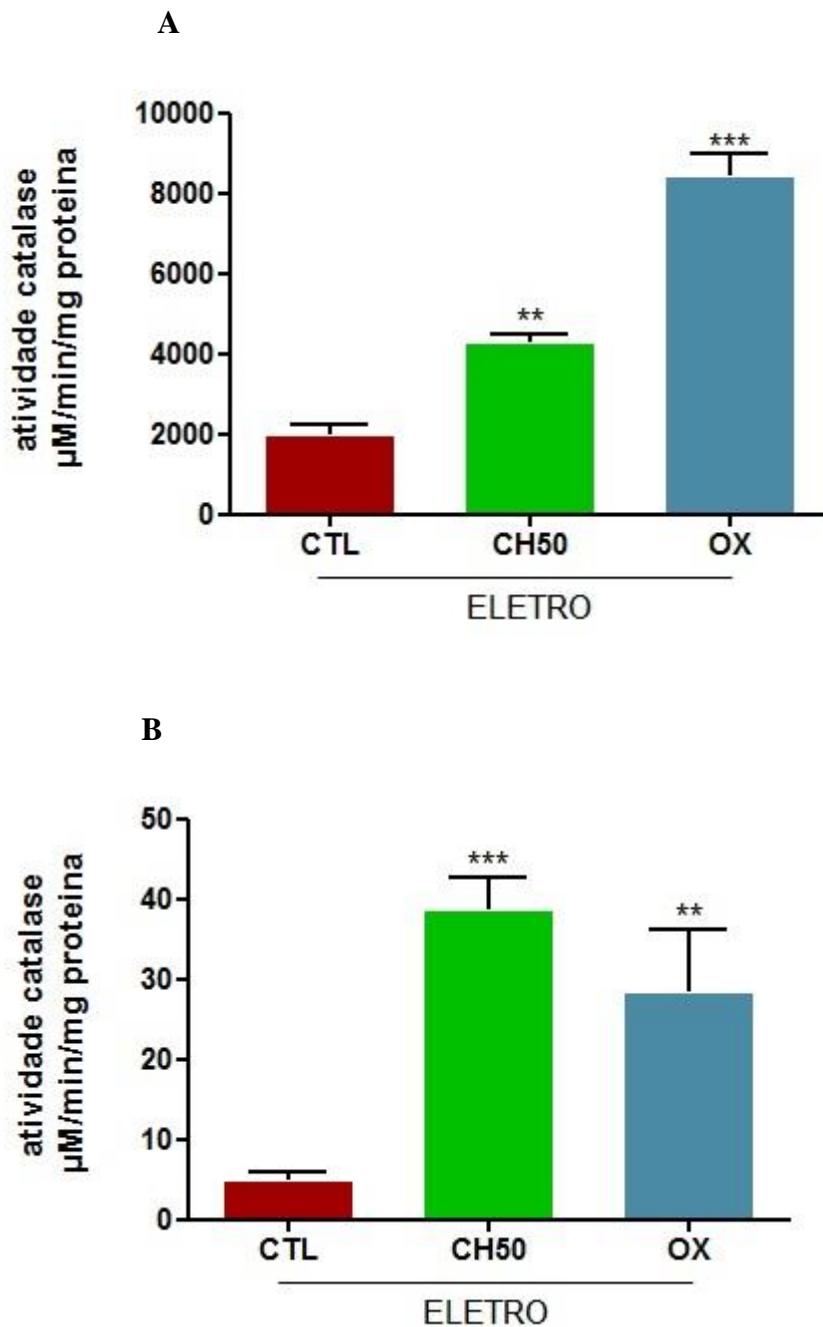
Neste protocolo foi avaliada a atividade da catalase em animais tratados com chambá (50mg/Kg), oxcarbazepina (60 mg/Kg) ou água destilada que foram submetidos à convulsão por eletrochoque.

#### HIPOCAMPO

Os animais tratados com chambá apresentaram aumento da atividade da catalase [CH50:  $4336 \pm 164,5$  (p<0,01)] quando comparado ao controle ( $2058 \pm 171,9$ ). Oxcarbazepina, utilizada como padrão positivo, aumentou a atividade da catalase [OX:  $8494 \pm 490,7$  (p<0,001)] em relação ao controle ( $2058 \pm 171,9$ ). (**Figura 21 A**)

#### CORPO ESTRIADO

Os animais tratados com chambá apresentaram aumento da atividade da catalase [CH50:  $38,93 \pm 3,65$  (p<0,001)] quando comparado ao controle ( $5,16 \pm 0,85$ ). Oxcarbazepina, utilizada como padrão positivo, aumentou a atividade da catalase [OX:  $28,58 \pm 7,53$  (p<0,01)] em relação ao controle ( $5,16 \pm 0,85$ ). (**Figura 21 B**)



**FIGURA 21** Efeito do chambá e oxcarbazepina sobre a atividade da catalase em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por eletrochoque

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e oxcarbazepinal (60 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com eletrochoque. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 10$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle ( $^{**}p < 0,01$ ;  $^{***}p < 0,001$ ). CTL: controle; CH: chambá; OX: oxacarbazepina; ELETRO: eletrochoque

#### **4.4 Efeito do chambá sobre o estresse oxidativo em camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina**

##### **4.4.1 Efeito do chambá sobre a concentração de malondialdeído (MDA) em homogenatos cerebrais de hipocampo e corpo estriado**

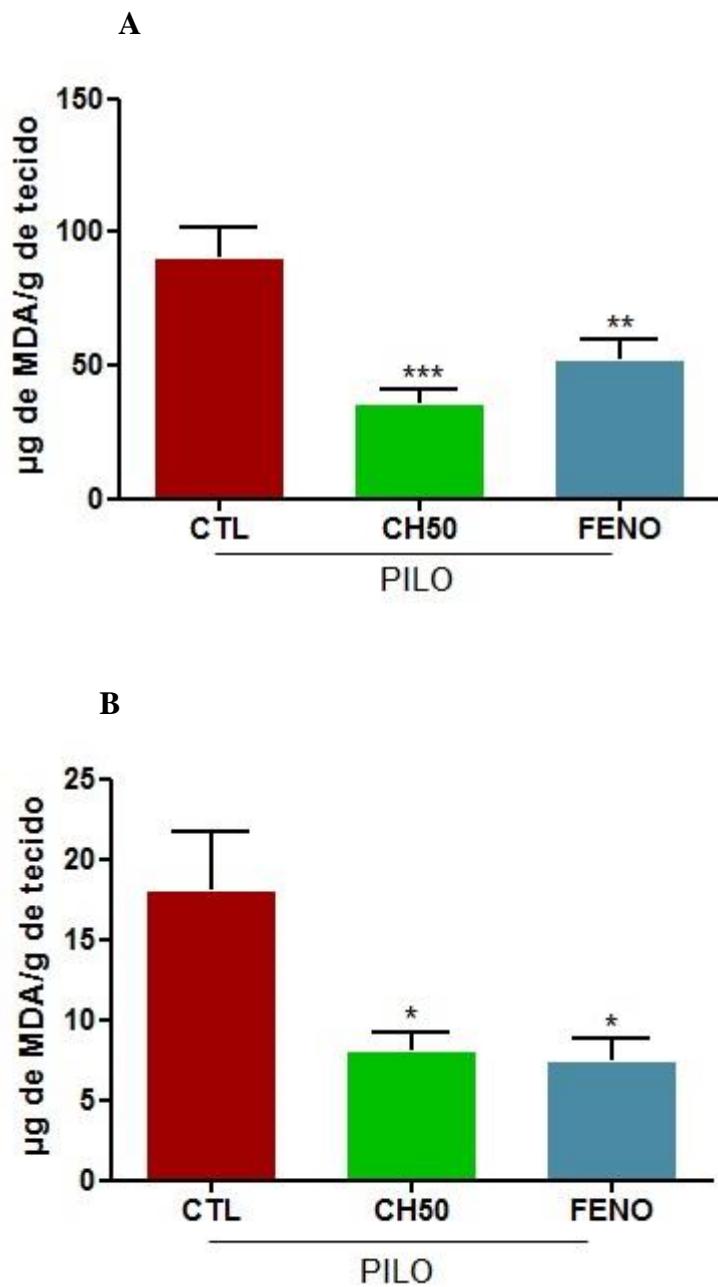
Neste protocolo foi determinada a concentração de malondialdeído (MDA), marcador de peroxidação lipídica, em animais tratados com chambá (50mg/Kg), fenobarbital (10 mg/Kg) ou água destilada que foram submetidos à convulsão por pilocarpina (400 mg/Kg).

#### **HIPOCAMPO**

Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de MDA [CH50:  $36,73 \pm 4,10$  ( $p<0,001$ )] quando comparado ao controle ( $91,21 \pm 10,27$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, reduziu a concentração de MDA [FENO:  $52,83 \pm 7,29$  ( $p<0,01$ )] em relação ao controle ( $91,21 \pm 10,27$ ). (**Figura 22 A**)

#### **CORPO ESTRIADO**

Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de MDA [CH50:  $8,18 \pm 1,01$  ( $p<0,05$ )] quando comparado ao controle ( $18,23 \pm 3,42$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, reduziu a concentração de MDA [FENO:  $7,58 \pm 1,29$  ( $p<0,05$ )] em relação ao controle ( $18,23 \pm 3,42$ ). (**Figura 22 B**)



**FIGURA 22 Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de MDA em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com pilocarpina. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 10$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; PILO: pilocarpina

#### 4.4.2 Efeito do chambá sobre a concentração de nitrito/nitrato em homogenatos cerebrais de hipocampo e corpo estriado

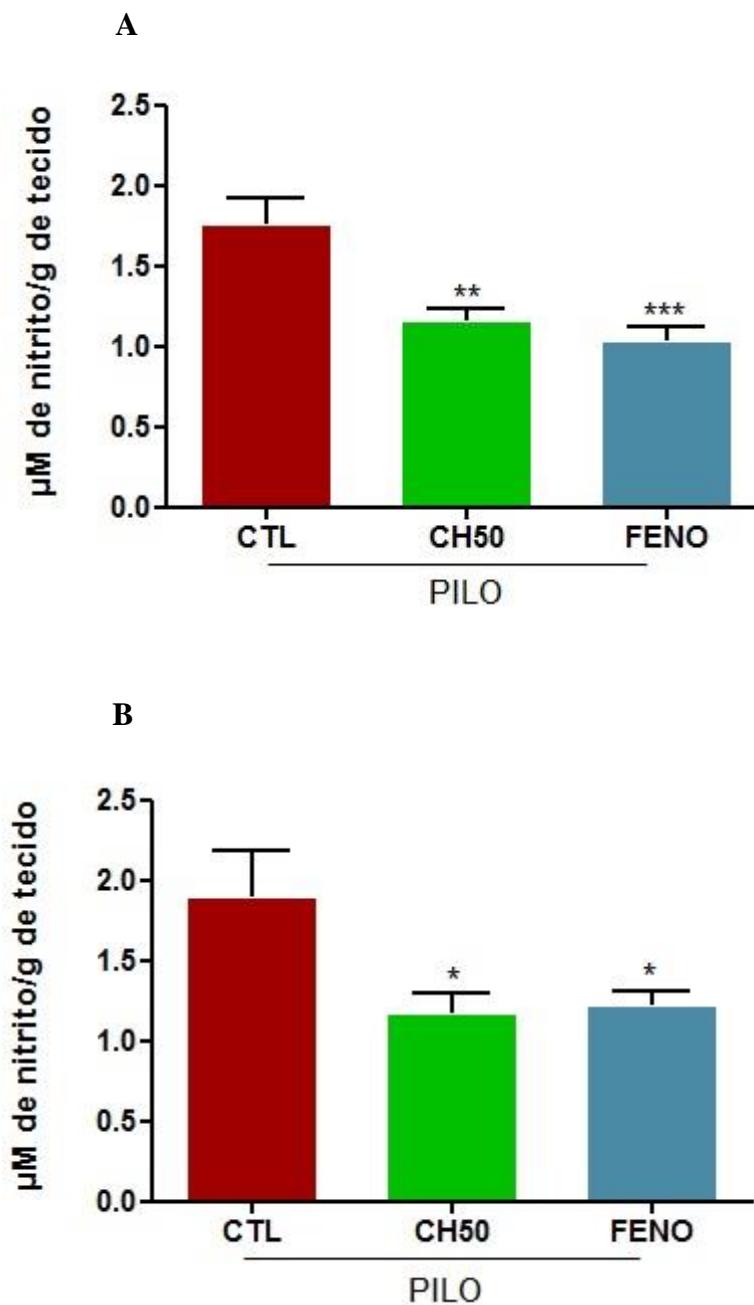
Neste protocolo foi determinada a concentração de nitrito/nitrato em animais tratados com chambá (50mg/Kg), fenobarbital (10 mg/Kg) ou água destilada que foram submetidos à convulsão por pilocarpina (400 mg/Kg).

#### HIPOCAMPO

Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de nitrito/nitrato [CH50:  $1,16 \pm 0,06$  ( $p<0,01$ )] quando comparado ao controle ( $1,77 \pm 0,15$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, reduziu a concentração de nitrito/nitrato [FENO:  $1,04 \pm 0,08$  ( $p<0,001$ )] em relação ao controle ( $1,77 \pm 0,15$ ). (**Figura 23 A**)

#### CORPO ESTRIADO

Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de nitrito/nitrato [CH50:  $1,18 \pm 0,11$  ( $p<0,05$ )] quando comparado ao controle ( $1,90 \pm 0,27$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, reduziu a concentração de nitrito/nitrato [FENO:  $1,23 \pm 0,07$  ( $p<0,05$ )] em relação ao controle ( $1,90 \pm 0,27$ ). (**Figura 23 B**)



**FIGURA 23 Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração de nitrito/nitrato em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com pilocarpina. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 10$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ;  $***p < 0,001$ ). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; PILO: pilocarpina.

#### 4.4.3 Efeito do chambá sobre a atividade da catalase em homogenatos cerebrais de hipocampo e corpo estriado

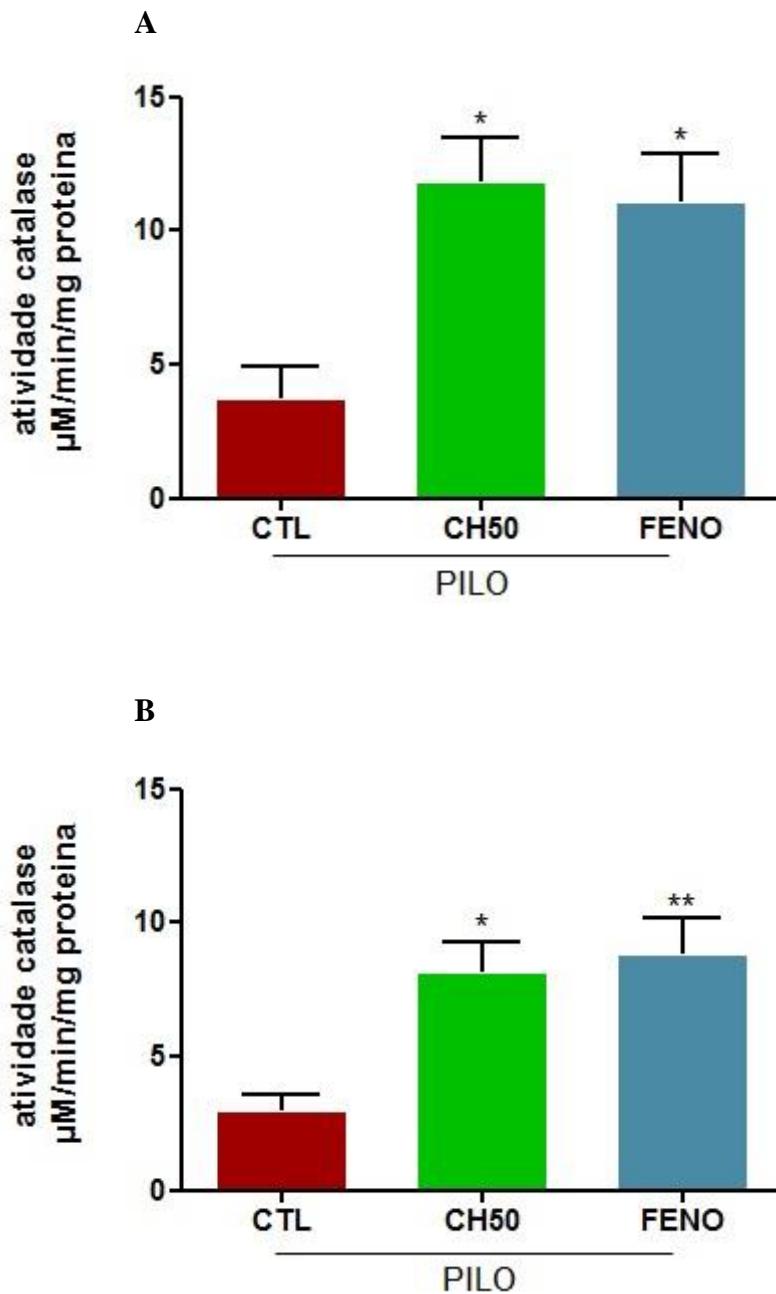
Neste protocolo foi avaliada a atividade da catalase em animais tratados com chambá (50mg/Kg), fenobarbital (10 mg/Kg) ou água destilada que foram submetidos à convulsão por pilocarpina (400 mg/Kg).

#### HIPOCAMPO

Os animais tratados com chambá apresentaram aumento da atividade da catalase [CH50:  $11,91 \pm 1,52$  ( $p<0,05$ )] quando comparado ao controle ( $3,76 \pm 1,19$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, aumentou a atividade da catalase [FENO:  $11,15 \pm 1,72$  ( $p<0,05$ )] em relação ao controle ( $3,76 \pm 1,19$ ). (**Figura 24 A**)

#### CORPO ESTRIADO

Os animais tratados com chambá apresentaram aumento da atividade da catalase [CH50:  $8,25 \pm 1,00$  ( $p<0,05$ )] quando comparado ao controle ( $3,03 \pm 0,57$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, aumentou a atividade da catalase [FENO:  $8,89 \pm 1,30$  ( $p<0,01$ )] em relação ao controle ( $3,03 \pm 0,57$ ). (**Figura 24 B**)



**FIGURA 24** Efeito do chambá e fenobarbital sobre a atividade da catalase em hipocampo (A) e corpo estriado (B) de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com pilocarpina. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 10$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; PILO: pilocarpina

## 5 Discussão

Estresse oxidativo é classicamente definido como um desequilíbrio redox causada por um excesso de oxidante ou de uma falta de antioxidantes naturais do sistema (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1999; POLJSAK, MILISAV, 2012). O cérebro consome taxa mais elevada de oxigênio por unidade de massa de tecido e contém concentrações elevadas de peroxidação lipídica, aminoácidos excitatórios e baixas concentrações de antioxidantes (DUGAN, CHOI, 1999; BERGAMINI, GAMBETTI, 2004). Lipídios do cérebro são altamente enriquecidos com ácidos graxos poli-insaturados (AZIZ et al., 1997; DUGAN, CHOI, 1999). Além disso, certas regiões do sistema nervoso central tais como hipocampo e corpo estriado, podem ser, particularmente, mais suscetíveis ao estresse oxidativo do que outras regiões do cérebro (HUONG et al., 1998).

Vários estudos tem demonstrado que radicais livres apresentam papel importante na patogênese de muitas doenças, especialmente as doenças neurológicas e psiquiátricas (TAKUMA et al., 2004; ESSICK, SAM, 2010; AGUIAR et al., 2012). O estresse oxidativo pode ser um mecanismo subjacente comum em muitas desordens do SNC, uma vez que o cérebro tem comparativamente maior vulnerabilidade ao dano oxidativo (BERK et al., 2008).

Espécies reativas do oxigênio (ERO) são frequentemente produzidas e reguladas rigidamente para manter um equilíbrio juntamente com as substâncias antioxidantes sob circunstâncias fisiológicas normais. Demonstrou-se que as ERO são cruciais em vários processos biológicos, incluindo a transdução de sinais, envelhecimento, apoptose e o desenvolvimento. Por outro lado, a produção excessiva de ERO está envolvida em várias alterações patológicas do Sistema Nervoso Central, principalmente na epilepsia (MALINSKA et al., 2010).

Vários modelos de convulsão, incluindo estimulação elétrica, indução química (ex. pilocarpina), modelos físicos (ex. hipertermia), genéticos (ex. knockout), bem como modelos de convulsão espontânea (ex. pós-kindling) (CHUANG, 2010) demonstraram que a produção de convulsões está ligada a alterações nos níveis intracelulares de antioxidantes e oxidantes. Portanto, os modelos experimentais de convulsão foram utilizados para investigar vários

antioxidantes endógenos, bem como marcadores de estresse oxidativo (DEVI et al., 2008; HSIEH et al., 2011; JAIN et al., 2011; LIANG et al., 2012; VERMA et al., 2012).

As descargas convulsivas crônicas estão relacionadas a alterações em neurotransmissores (exemplo, glutamato e GABA), ativação de citocinas, neuroplasticidade e estresse oxidativo (CHEN et al., 2010). Picrotoxina, estricnina, eletrochoque e pilocarpina são modelos reconhecidos de indução de convulsão com mecanismos de ação distintos (VELISEK, 2006), apesar de terem uma via comum que é a participação do estresse oxidativo.

Nas últimas décadas, várias substâncias de origem natural dotadas de atividade anticonvulsivante apresentaram também propriedades antioxidantes (ILHAN et al., 2006; SILVA et al., 2009; RATHON et al., 2013). Nesse contexto, no presente capítulo foi investigado se alguma ação antioxidante estaria envolvida na atividade anticonvulsivante do chambá. Para isto, avaliou-se a atividade da catalase, o grau de peroxidação lipídica e a concentração de nitrito em hipocampo, corpo estriado e medula de animais tratados com chambá (50 mg/Kg) e submetidos aos modelos de picrotoxina, estricnina, eletrochoque ou pilocarpina.

Todos os componentes da célula são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana é uma das mais atingidas em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na sua estrutura e permeabilidade (VAN DER KRAAIJ et al., 1988). Consequentemente, há a perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação e produtos citotóxicos (como o malondialdeído), culminando com a morte celular (HERSHKO, 1989). Embora nem sempre os processos de lipoperoxidação sejam prejudiciais, pois seus produtos são importantes na reação em cascata a partir do ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990), o excesso de tais produtos pode ser lesivo (ROSS; MOLDEUS, 1991), sobretudo ao cérebro, que contém grande quantidade de lipídeos de membrana.

A peroxidação lipídica produzida em muitas condições, tal como convulsão, tem sido avaliada e pode ser verificada indiretamente através do homogenato cerebral e de diferentes tecidos (BRUCE & BAUDRY, 1995; FREITAS et al., 2004a). A peroxidação lipídica é um processo que envolve a oxidação de ácidos gordurosos poli-insaturados, os quais são componentes básicos de membranas biológicas. Compostos reativos eletrofílicos são

formados durante este processo e estes compostos reagem, principalmente, com o DNA mostrando ação genotóxica e mutagênica (LUCZAJ & SKRZYDLEWSKA, 2003).

As alterações no metabolismo dos fosfolipídios de membrana podem resultar também na liberação de eicosanoides, lipídios peróxido e radicais livres. Os radicais livres estão envolvidos em inúmeras condições patológicas e, indiretamente, parecem refletir nos mecanismos do estresse oxidativo, tais como: aumento da atividade das enzimas removedoras dos radicais livres (superóxido dismutase, catalase e glutationa peroxidase), oxidação de lipídios e proteínas estruturais (AHLEMEYER & KRIEGLSTHEIN, 2000).

A lipídio peroxidação de tecidos pode ser utilizada com um índice indicador de dano biológico irreversível dos fosfolipídios de membrana celular em inúmeras condições patológicas (GILBERT & SAWAS, 1983) e a produção de lipídios peróxidos pode ser induzida por muitos compostos químicos indutores de convulsão (FREITAS, A et al., 2007; SILVA et al., 2009; AGUIAR et al., 2013). Pode ser sugerido que a produção dos mesmos seja um dos efeitos neurotóxicos ocasionados pelo processo convulsivo no cérebro de ratos (WALZ et al., 2000). Acredita-se que a lipoperoxidação amentada pode ser casualmente relacionada com a presença e anormalidades estruturais do cérebro de pacientes epilépticos (KARAKOC et al., 2002; FREITAS et al., 2004a).

Como esperado, as convulsões induzidas por picrotoxina, estricnina, eletrochoque e pilocarpina levaram a um aumento da peroxidação lipídica no hipocampo, estriado e medula dos camundongos. O pré-tratamento dos animais com chambá (50 mg/Kg) significativamente previu este efeito, pois reduziu a concentração de MDA em todas as áreas estudadas quando comparado aos animais controle tratados apenas com veículo. Dados na literatura mostram que convulsões seguidas por peroxidação lipídica em tecidos cerebrais podem ser diminuídas pela administração de substâncias com propriedades anticonvulsivantes (FERITAS et al., 2006; SILVA et al., 2007).

Existem evidências de que a convulsão apresenta sinais aumentados de estresse oxidativo e que há participação dos caminhos do óxido nítrico (NO) na sua patogenia (REHNI et al., 2009). Embora exerça diversas funções fisiológicas úteis, quando em excesso, o NO pode exercer efeitos nocivos. Em determinadas condições, o NO e o  $O_2^-$  podem interagir, resultando na formação de peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), um produto extremamente tóxico. Este

composto é capaz de reagir com diversas moléculas: proteínas, lipídios, carboidratos e ácidos nucléicos, danificando-os. Além disso, seus prováveis produtos de decomposição, o radical OH<sup>-</sup> e o dióxido de nitrogênio, dentre outros, têm semelhante potencial deletério (RADENOVIC et al., 2003; UZÜM et al., 2005).

O NO no SNC pode ser produzido pela NO sintase (NOS) endotelial (NOSe), uma enzima constitutiva, e pela NOS neuronal (NOSn). Outra parte do NO é sintetizada pela NOS induzível (NOSi) que regula a resposta imune. O excesso de NOSi foi detectada em hipocampo de camundongos geneticamente epilépticos (MURASHIMA et al., 2002). O nitrito (metabólito estável do NO) pode ser associado com a fisiopatologia da convulsão, uma vez que o estresse oxidativo cerebral induzido pelas convulsões pode ser bloqueado ou reduzido de forma significativa através do bloqueio da inibição da enzima NOSi (RAJASEKARAN, 2004). Durante as convulsões, nitrito e nitrato têm sido implicados em muitos mecanismos moleculares do processo, podendo participar do subsequente dano neuronal em todo o cérebro e ativar outros mecanismos que potencializem os danos e a propagação do foco epiléptico (SOSUNOV et al., 2005).

As convulsões induzidas por picrotoxina, estricnina, eletrochoque e pilocarpina levaram a um aumento da produção de nitrito e nitrato no hipocampo, estriado e medula dos camundongos. O pré-tratamento dos animais com chambá (50 mg/Kg) significativamente previu este efeito, pois reduziu a produção e nitrito e nitrato em todas as áreas estudadas quando comparado aos animais controle tratados apenas com veículo. Como esperado, os animais pré-tratados com fenobarbital ou oxcarbazepina apresentaram redução na produção de nitrito e nitrato.

Uma elevação na formação de radicais livres pode ser acompanhada por aumento compensatório imediato na atividade de enzimas inativadoras de radicais livres. O estresse agudo da convulsão pode alterar sistemas antioxidantes e ativar enzimas responsáveis pela remoção de EROs, como a catalase, indicando uma resposta celular à elevação na formação de espécies reativas do oxigênio (ABDEL-WAHAB et al., 2011).

A catalase é uma hemeproteína citoplasmática que catalisa a redução do peróxido e hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em oxigênio e água (MICHELS et al., 1994; MEISTER, 1995; SIMONIE et al., 2000). É importante na manutenção do metabolismo normal das EROs, sendo seu papel

bastante relevante para o funcionamento celular em diferentes partes do organismo (NAFFAH-MAZZACORATTI et al., 2001; PONG et al., 2002). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por si só não é um radical livre, mas em alta concentração pode reagir com o íon superóxido (Reação de Haber-Weiss) ou com o ferro (Reação de Fenton) produzindo um novo radical livre, o radical hidroxila (OH<sup>-</sup>) que é altamente reativo e pode induzir diferentes danos teciduais ao reagir com macromoléculas proteicas.

Considerando que um aumento da demanda metabólica pode ser observado durante as convulsões límbicas, pode-se sugerir que a catalase poderia ser uma das enzimas que teria sua atividade inalterada, aumentada ou diminuída durante a atividade epiléptica. Neste estudo foi verificado que o pré-tratamento dos animais com chambá (50 mg/Kg) significativamente aumentou a atividade da catalase em todas as áreas estudadas, quando comparado aos animais controle tratados apenas com veículo. Como esperado, os animais pré-tratados com fenobarbital ou oxcarbazepina apresentaram aumento na atividade da catalase.

Quando os animais foram pré-tratados com chambá, verificou-se redução da concentração de MDA, redução da produção de nitrito e nitrato e aumento da atividade da catalase. Nossos dados nos permitem sugerir que o mecanismo anticonvulsivante do extrato padronizado de chambá poderia estar auxiliando as células cerebrais no combate à superprodução de ERO e consequente dano oxidativo induzido pela picrotoxina, estricnina, eletrochoque e pilocarpina.

## CAPÍTULO 3 – Determinação da concentração de aminoácidos

### 1 Introdução

A informação sobre o controle do Sistema Nervoso Central (SNC) pode ser altamente baseada na comunicação entre as unidades sinápticas excitatórias e inibitórias. O ácido gama-aminobutírico, glutamato, glicina, taurina e aspartato representam os mais importantes aminoácidos neurotransmissores ou derivados de aminoácidos. Os principais neurotransmissores excitatório e inibitório no cérebro são o glutamato e o GABA, respectivamente e, assim, há elevada concentração desses aminoácidos no sistema nervoso (ISOKAWA, 1998).

Algumas doenças estão associadas a mudanças nos níveis dos aminoácidos. A interrupção da transmissão glutamatérgica na etiologia de doenças neurodegenerativas crônicas e esquizofrenia foi postulada (FARBER; NEWCOMER; OLNEY, 1999). Estudos farmacológicos revelaram que a microinjeção de antagonistas de receptores GABA<sub>A</sub> ou agonistas de diferentes subtipos de receptores de glutamato causaram convulsões em experimentos animais *in vivo*, portanto o início das convulsões pode ser produzido por uma redução da concentração de GABA ou aumento da concentração de glutamato, bem como pela estimulação direta da atividade colinérgica endógena (JOPE et al., 1992; MARINHO et al., 1998).

O modelo de convulsão induzido por pilocarpina é um excelente modelo para se estudar os processos neuroquímicos essenciais para a geração e manutenção das convulsões, já que muitas das características são semelhantes as da epilepsia humana do lobo temporal (CAVALHEIRO et al., 1994; MARTIM, 1996). Inúmeros estudos sugerem o envolvimento do sistema colinérgico na epilepsia humana (TURSKI et al., 1983a; MICHOTTE et al., 2000; PERSINGER et al., 2001).

O processo convulsivo decorrente do tratamento de ratos com pilocarpina, agonista colinérgico, em doses convulsivas, parece interagir com o sistema GABAérgico, uma vez que a ativação do receptor GABAérgico do tipo GABA<sub>A</sub> pode reduzir sua resposta em decorrência do aumento da concentração do cálcio intracelular induzida pelos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA, que pode ser essencial para a instalação e propagação da atividade epiléptica

(PISANI et al., 2004). A pilocarpina também altera os níveis de outros neurotransmissores, como taurina, glicina e aspartato (RAOL et al., 2001; COSTA-LOTUFO et al., 2002).

Assim, no presente capítulo é abordada a investigação dos efeitos do Extrato Padronizado de *Justicia pectoralis* (chambá) sobre a concentração dos aminoácidos excitatórios e inibitórios do sistema nervoso central.

## 2 Objetivos específicos

Descrever o efeito do pré-tratamento com o extrato padronizado de *Justicia pectoralis* sobre as alterações neuroquímicas induzidas por modelo de convulsão por pilocarpina em hipocampo, por meio da determinação da concentração dos aminoácidos GABA, glicina, taurina, glutamato e aspartato.

### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1 Procedimento Experimental

Os testes neuroquímicos foram realizados em animais divididos em 3 grupos (n=8), tratados, por via oral, com chambá (50 mg/Kg), água destilada (controle) ou fenobarbital (10 mg/Kg). Logo após os experimentos de indução da convulsão por pilocarpina, descrito anteriormente no Capítulo 1, os animais mortos foram decapitados e tiveram o cérebro removido. Os animais que sobreviveram foram sacrificados por rápida decapitação após o período de tempo determinado pelo modelo de convulsão. A região cerebral hipocampo (HC) foi dissecada e armazenada a – 70° para posterior preparação dos homogenatos utilizando um volume de 1 % da área em ácido preclórico 0.1M.

A análise dos aminoácidos GABA, glicina, taurina, glutamato e aspartato foram realizadas em equipamento de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC, Shimadzu, Japão). A espectroscopia de fluorescência pode ser usada como um método de detecção específica (LINDROTH; MOPPER, 1979), e é um dos mais sensíveis para compostos que fluorescem. As amostras de tecido congeladas foram, brevemente, homogeneizadas com ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) 0,1 e sonicadas por 30 minutos. Depois de sonicadas, as amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4° C. Os sobrenadantes foram removidos e filtrados através de membrana (Millipore 0,2 µm) e os aminoácidos foram derivatizados com mercaptoetanol e O-ftaraldeído (OPA). Uma alíquota de 20 µL foi retirada e injetada no sistema de HPLC para análise química.

Para a determinação das concentrações dos aminoácidos, uma coluna de fase-reversa C18 (Shimadzu, Japão), foi utilizada. A fase móvel composta de duas fases: A (pH 6,95) – acetato de sódio (0,1M), metanol (6%, v/v) e tetrahidrofurano (1,5 %); B – Metanol puro (100%), correu em um fluxo de 1,0 mL/min em um gradiente de 30 minutos de duração (MASSIEU; TAPIA, 1997). A área de cada pico foi determinada com software Shimadzu e comparada com a área de pico do padrão externo correspondente. As concentrações de aminoácidos foram expressas em µmol/ g de tecido.

### **- Preparo dos Padrões dos aminoácidos**

Todos os aminoácidos foram preparados nas concentrações de 2,5 mmol/L ou 2,5 mM. GABA, glicina, taurina, glutamato e aspartato foram solubilizados em ácido perclórico 0,1M. O ácido perclórico foi preparado adicionando 1,8 mL do ácido e completando volume para 300 mL com água mili-Q.

### **- Solução de Derivatização**

13,5 mg de OPA foram dissolvido em 250  $\mu$ L de etanol, juntamente com 10  $\mu$ L de 2-mercaptoetanol, o volume da solução foi então completado para 2,25 mL com tampão borato, pH 9,3. A solução foi filtrada com milipore 0,22  $\mu$ m. A solução foi acondicionada em vidro âmbar no refrigerador por, no máximo, uma semana. Para as derivatizações, 20  $\mu$ L da amostra foi diluída em 20  $\mu$ L de OPA e injetada no HPLC após um minuto de agitação.

### **- Determinação Fluorimétrica de Aminoácidos (AA por gradiente**

Para o funcionamento do aparelho e do gradiente foi necessária a preparação das duas fases móveis:

#### **FASE MÓVEL A:**

- 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Volume final = 25 mL
- 20 % v/v MetOH
- pH = 5.5

#### **FASE MÓVEL B:**

- Metanol puro (Padrão HPLC)
- 

#### **DERIVATIZAÇÃO PRÉ-COLUNA**

#### **TAMPÃO BORATO**

- Bórax 1,24g
- Água mili Q
- Ajustar o pH para 9,3 (com NaOH ou HCl): - volume final = 50 mL

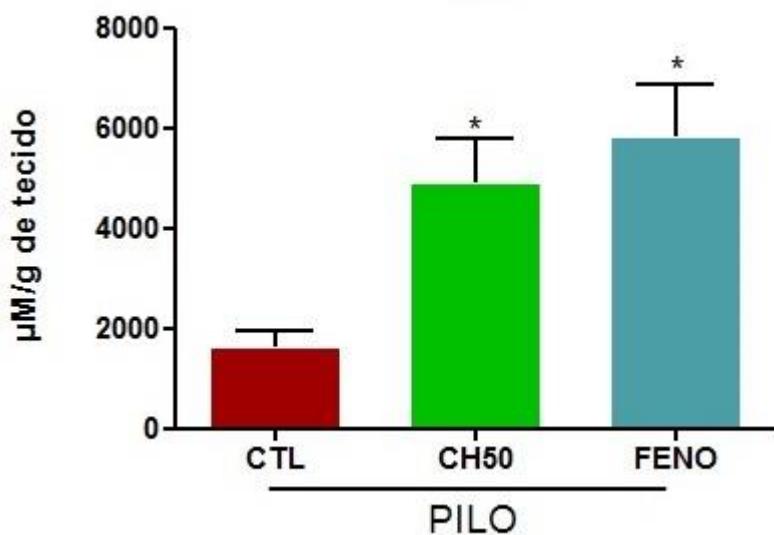
## 4 Resultados

### 4.1 Efeito do chambá sobre a concentração de aminoácidos em camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina

4.1.1 Efeito do chambá sobre a concentração de GABA em homogenatos cerebrais de hipocampo

Neste protocolo foi determinada a concentração de GABA, aminoácido inibitório do Sistema Nervoso Central, em animais tratados com chambá (50mg/Kg), fenobarbital (10 mg/Kg) ou água destilada que foram submetidos à convulsão por pilocarpina (400 mg/Kg).

Os animais tratados com chambá apresentaram aumento da concentração de GABA [CH50:  $4946 \pm 860,1$  ( $p<0,05$ )] quando comparado ao controle ( $1654 \pm 305,1$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, aumentou a concentração de GABA [FENO:  $5870 \pm 987,2$  ( $p<0,05$ )] em relação ao controle ( $1654 \pm 305,1$ ). (Figura 25)



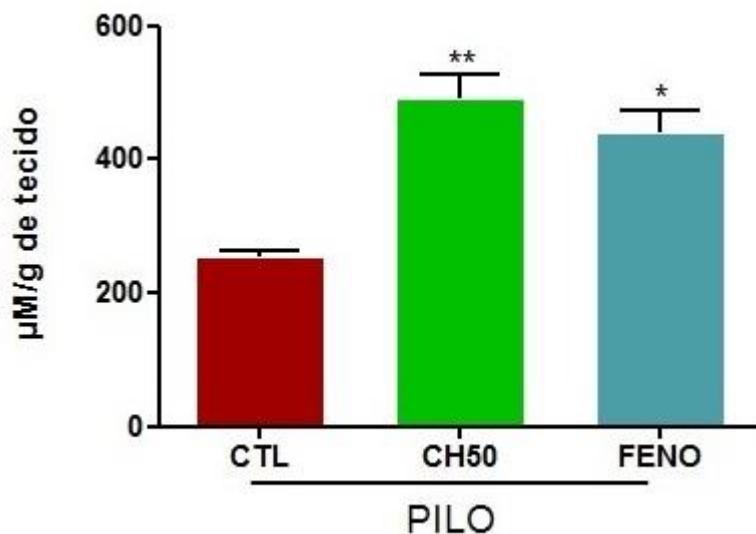
**FIGURA 25** Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração do aminoácido GABA em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com pilocarpina. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 8$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle ( $*p < 0,05$ ). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; PILO: pilocarpina

#### 4.1.2 Efeito do chambá sobre a concentração de Glicina em homogenatos cerebrais de hipocampo

Neste protocolo foi determinada a concentração de Glicina, aminoácido inibitório do Sistema Nervoso Central, em animais tratados com chambá (50mg/Kg), fenobarbital (10 mg/Kg) ou água destilada que foram submetidos à convulsão por pilocarpina (400 mg/Kg).

Os animais tratados com chambá apresentaram aumento da concentração de Glicina [CH50:  $494,1 \pm 31,77$  (p<0,01)] quando comparado ao controle ( $255,9 \pm 5,85$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, aumentou a concentração de Glicina [FENO:  $442,4 \pm 30,01$  (p<0,05)] em relação ao controle ( $255,9 \pm 5,85$ ). (**Figura 26**)



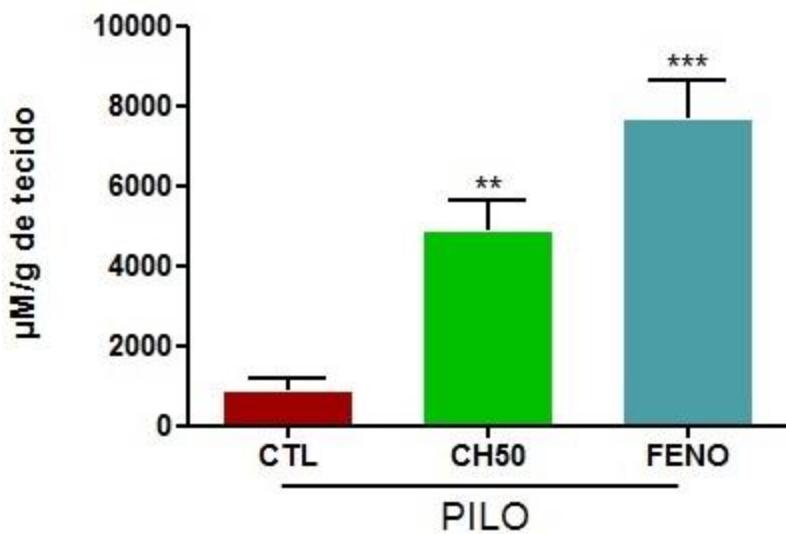
**FIGURA 26 Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração do aminoácido Glicina em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com pilocarpina. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 8$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle ( $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,01$ ). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; PILO: pilocarpina

#### 4.1.3 Efeito do chambá sobre a concentração de Taurina em homogenatos cerebrais de hipocampo

Neste protocolo foi determinada a concentração de Taurina, aminoácido inibitório do Sistema Nervoso Central, em animais tratados com chambá (50mg/Kg), fenobarbital (10 mg/Kg) ou água destilada que foram submetidos à convulsão por pilocarpina (400 mg/Kg).

Os animais tratados com chambá apresentaram aumento da concentração de Taurina [CH50:  $4929 \pm 694,1$  ( $p<0,01$ )] quando comparado ao controle ( $937,4 \pm 253,3$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, aumentou a concentração de Taurina [FENO:  $7746 \pm 868,1$  ( $p<0,001$ )] em relação ao controle ( $937,4 \pm 253,3$ ). **(Figura 27)**



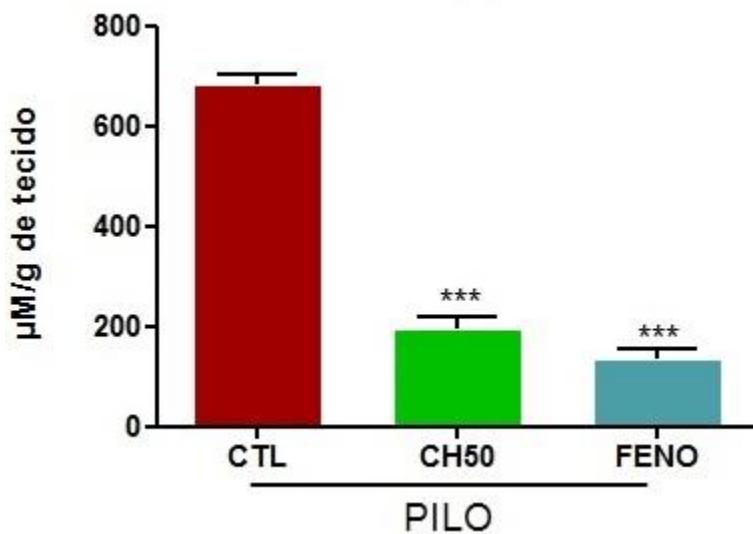
**FIGURA 27 Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração do aminoácido Taurina em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com pilocarpina. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 8$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; PILO: pilocarpina

#### 4.1.4 Efeito do chambá sobre a concentração de Glutamato em homogenatos cerebrais de hipocampo

Neste protocolo foi determinada a concentração de Glutamato, aminoácido excitatório do Sistema Nervoso Central, em animais tratados com chambá (50mg/Kg), fenobarbital (10 mg/Kg) ou água destilada que foram submetidos à convulsão por pilocarpina (400 mg/Kg).

Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de Glutamato [CH50:  $199,0 \pm 21,37$  ( $p<0,001$ )] quando comparado ao controle ( $685,5 \pm 18,94$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, reduziu a concentração de Glutamato [FENO:  $138,4 \pm 15,57$  ( $p<0,001$ )] em relação ao controle ( $685,5 \pm 18,94$ ). (**Figura 28**)



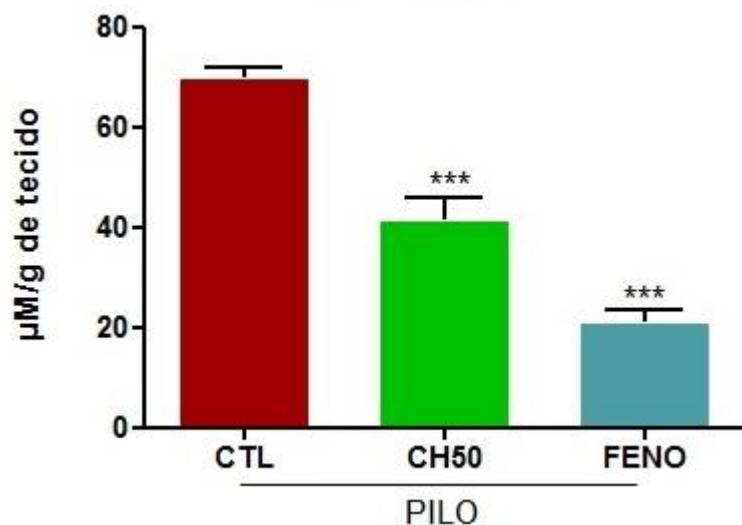
**FIGURA 28 Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração do aminoácido Glutamato em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina**

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com pilocarpina. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 8$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle (\*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; PILO: pilocarpina

#### 4.1.5 Efeito do chambá sobre a concentração de Aspartato em homogenatos cerebrais de hipocampo

Neste protocolo foi determinada a concentração de Aspartato, aminoácido excitatório do Sistema Nervoso Central, em animais tratados com chambá (50mg/Kg), fenobarbital (10 mg/Kg) ou água destilada que foram submetidos à convulsão por pilocarpina (400 mg/Kg).

Os animais tratados com chambá apresentaram redução da concentração de Aspartato [CH50:  $42,03 \pm 3,75$  (p<0,001)] quando comparado ao controle ( $70,28 \pm 1,76$ ). Fenobarbital, utilizado como padrão positivo, reduziu a concentração de Aspartato [FENO:  $21,33 \pm 2,21$  (p<0,001)] em relação ao controle ( $70,28 \pm 1,76$ ). (**Figura 29**)



**FIGURA 29** Efeito do chambá e fenobarbital sobre a concentração do aminoácido Aspartato em hipocampo de camundongos submetidos à convulsão induzida por pilocarpina

Controle (água destilada, v.o.), chambá (50 mg/Kg, v.o.) e fenobarbital (10 mg/Kg) foram administrados 60 min antes do tratamento com pilocarpina. Os valores representam a média  $\pm$  EPM ( $n = 8$ ). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle (\*\*p<0,001). CTL: controle; CH: chambá; FENO: fenobarbital; PILO: pilocarpina

## 5 Discussão

Os aminoácidos são classificados em dois grupos: excitatórios, como o glutamato e aspartato; aminoácidos inibitórios, como GABA, glicina e taurina. Os aminoácidos excitatórios estão associados com ações pró-convulsivantes, enquanto os aminoácidos inibitórios com a ação anticonvulsivante (NOGUEIRA et al., 2011).

Estudos de convulsões induzidas quimicamente têm mostrado em nível pré-sináptico que a atividade convulsivante está associada com uma ampla gama de alterações bioquímicas locais, afetando a liberação de vários neurotransmissores cerebrais, como os aminoácidos (LI et al, 2000; FERRAZ et al., 2002).

As convulsões podem ser vistas como resultantes de um desequilíbrio entre os processos excitatórios no cérebro. Os neurotransmissores mais envolvidos nessas subunidades excitatórias e inibitórias são o glutamato e o GABA, respectivamente, sendo que estes dois aminoácidos estão altamente implicados e são de extrema importância na integridade funcional do SNC e podem participar dos mecanismos de inúmeras desordens neurológicas, inclusive nos mecanismos de geração e manutenção da epilepsia (SCHOUSBOE, WAAGEPETERSEN, 2003; BECK et al., 2003; BOROWICZ et al., 2004).

Os mecanismos propostos para a geração e disseminação da atividade epiléptica no cérebro incluem a diminuição da neurotransmissão inibitória, que é medida, principalmente, pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), ou aumento da neurotransmissão excitatória, que é mediada, principalmente, pelo aminoácido glutamato (ILODIGWE et al., 2010).

O modelo de epilepsia induzido por pilocarpina têm sido extensivamente analisado, uma vez que, exibe convulsões recorrentes espontâneas (com doses menores) e podem esclarecer muitas das alterações vistas na epilepsia do lobo temporal de humanos (PERSINGER, DUPONT, 2004; KRSEK et al., 2004; Belissimo et al., 2001).

No modelo de convulsão por pilocarpina, estudos demonstram que as convulsões são ativadas pelo sistema colinérgico (FREITAS et al., 2003) que promovem um importante papel na ativação das convulsões límbicas e nos sistemas GABAérgicos e glutamatérgicos que são

responsáveis pela propagação e/ou manutenção das convulsões e indução do *status epilepticus* induzido pela pilocarpina (TOMÉ et al., 2010).

A pilocarpina produz modificações nos aminoácidos excitatórios elevando glutamato (Walton et al., 1993). Santos et al. (2011) estudaram o efeito do ácido lipóico nas concentrações de glutamato e taurina no hipocampo de ratos submetidos a convulsões por pilocarpina. No grupo tratado somente com pilocarpina observou-se aumento, significativo, na concentração de glutamato (37 %) e diminuição de taurina (18 %). Em outro estudo avaliando a atividade anticonvulsivante do ácido lipóico, demonstrou-se que a administração intraperitoneal de pilocarpina induz elevação dos aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato e redução do aminoácido inibitório GABA no hipocampo de ratos Wistar com dois meses de idade (Freitas et al., 2011).

O papel dos aminoácidos como neurotransmissores e suas funções na epilepsia tem sido foco de um grande número de pesquisas nos últimos anos. Nesse contexto, no presente capítulo foi investigada a influência do chambá, administrado de forma aguda e por via oral (gavage), nas concentrações dos aminoácidos GABA, glicina, taurina, glutamato e aspartato. Para isto, as concentrações dos aminoácidos foram mensuradas em hipocampo de animais tratados com chambá (50 mg/Kg) e submetidos ao modelo de pilocarpina.

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o maior neurotransmissor inibitório no cérebro dos mamíferos. Sua ação é, principalmente, ativar o receptor ionotrópico GABA tipo A levando a um influxo de  $\text{Cl}^-$  e uma resposta de hiperpolarização. A sinapse inibitória resulta de níveis transitoriamente altos de GABA que ativa os receptores GABA<sub>A</sub>. Estudos de fatias cerebrais (SEMYANOV et al., 2003), culturas neurais (BAI et al., 2001) e *in vivo* (CHADDERTON et al., 2004) tem mostrado que diferentes subtipos de receptor GABA<sub>A</sub> são responsáveis por mediar a inibição tônica, dependendo das regiões cerebrais (FARRANT et al., 2005). O comprometimento da inibição pode contribuir para estados patológicos como a epilepsia crônica (HOUSER et al., 2003).

No presente capítulo, nossos resultados mostraram que o pré-tratamento dos animais com chambá (50 mg/Kg) e posterior estímulo convulsivante com pilocarpina promoveu um aumento, significativo, nas concentrações do aminoácido GABA no hipocampo em relação ao grupo submetido apenas à administração de pilocarpina. Como esperado, os animais pré-

tratados com fenobarbital apresentaram aumento da concentração de GABA. Estudos prévios evidenciaram efeito ansiolítico do SNC induzido pelo chambá, possivelmente relacionado ao sistema GABAérgico, em específico ao sítio de ação benzodiazepínico (Venâncio et al., 2011). Corroborando com esses dados, no Capítulo 1 mostrou-se que o extrato de chambá apresentou efeito anticonvulsivante no modelo de convulsão por picrotoxina, cujo mecanismo envolve sistema GABAérgico.

Pereira (2008) mostrou que animais tratados com cumarina apresentaram efeito ansiolítico e, posteriormente, aumento dos níveis do aminoácido GABA (Pereira et al., 2009). Em outro estudo foi relatado que a imperatorina (uma furanocumarina isolada dos frutos de *Angelica archangelica*) inibiu GABA-transaminase (a enzima responsável pela degradação de GABA) e, assim, levou ao aumento do teor de GABA na fenda sináptica dos neurônios (CHOI et al., 2005). Drogas que aumentam a transmissão do GABA no cérebro possuem, provavelmente, efeito anticonvulsivante (CZUCZWAR; PATSALOS, 2001).

A inibição mediada pelo GABA pode ser um dos alvos da ação central da pilocarpina e a participação deste neurotransmissor pode inibir as convulsões. Estudos de *binding* em neurônios hipocampais mostraram que a pilocarpina em alta dose reduz a concentração dos receptores GABAérgicos (FREITAS et al., 2004a). Estes resultados corroboram com estudos farmacológicos anteriores que mostram uma significativa proteção da convulsão induzida por pilocarpina em ratos pré-tratados com diazepam, reforçando a hipótese da interação entre os sistemas GABAérgicos e colinérgicos, não somente na fase aguda mas na crônica, já que os resultados descritos foram determinados para ratos epilépticos crônicos (CAVALHEIRO, GUEDES, 1997).

A glicina, outro importante transmissor inibitório do sistema nervoso central foi mensurado e nossos dados mostraram que os animais tratados com chambá apresentaram aumento das concentrações de glicina, bem como os animais tratados com fenobarbital, quando comparados ao grupo controle tratado somente com pilocarpina.

A glicina é um simples aminoácido não-essencial, formado por uma molécula de carbono ligado a um grupo amino e um grupo carboxil. Na membrana plasmática, ativa um canal de cloro que hiperpolariza ou estabiliza o potencial de membrana. Como resultado disto, bloqueia a entrada de cálcio intracelular, que estimula a cascata de formação de citocinas

(ZHONG, 2003). É encontrada em concentrações elevadas (5  $\mu\text{mol/g}$  de tecido) na substância cinzenta da medula espinhal, tronco cerebral e retina (SMITH, WILCOX, WHITE, 2007).

Glicina apresenta ações anti-inflamatórias, citoprotetoras e imunomoduladoras. Isto deve, possivelmente, explicar as ações neuroprotetoras de algumas cumarinas, como mostrado em um estudo realizado com componentes das raízes da *A. gigas*, onde sua fração n-butanol demonstrou ter uma significante atividade neuroprotetora (LEE et al., 2003; YAN et al., 2004). Chambá também demonstrou atividade neuroprotetor quando avaliado através da mensuração de agentes oxidantes e antioxidantes (Capítulo 2).

Outro aminoácido estudado foi a taurina, encontrado em grande quantidade no hipocampo, nos interneurônios, nos neurônios piramidais e nas células granulares denteadas (MAGNUSSON et al., 1989). Nossos resultados mostraram que o extrato padronizado de *Justicia pectoralis* aumentou a concentração do aminoácido taurina nos animais tratados, onde resultado similar foi observado nos animais tratados com fenobarbital, quando comparados ao grupo controle.

Taurina possui importante papel na manutenção da homeostase do cérebro, sendo associada, em concentrações moderadas, a ativação dos receptores de glicina e por ser um fraco agonista de receptor GABA<sub>A</sub> (SMITH et al., 2006; MACIEJAK ET AL., 2010). Estudo mostra que a taurina protege os neurônios dos efeitos tóxicos provocados pelos aminoácidos excitatórios, além de atenuar o influxo de cálcio durante a isquemia cerebral (WANG et al., 2007). Em outro estudo, taurina elevou a condutância da membrana íon cloreto, ao abrir os canais de cloreto induzindo a hiperpolarização dos neurônios no hipocampo, e reduzindo a excitabilidade celular (DEL OLMO et al., 2000).

A taurina é potencialmente capaz de tratar convulsões associadas a dano cerebral e, pode se supor que grandes quantidades de taurina sejam liberadas como uma forma de regular os efeitos do glutamato (MACIEJAK et al., 2010). Sobre a ação neuroprotetora, a taurina pode atenuar a ação dos principais aminoácidos excitatórios: glutamato e aspartato (MOLCHANNOVA et al., 2006; MOLCHANNOVA, OJA, SARANSAARI, 2007; WU, PRENTICE, 2010).

Estudos têm mostrado que a excitotoxicidade está relacionada com uma superprodução de radicais livres no hipocampo de ratos adultos. A liberação excessiva de aminoácidos como o glutamato e aspartato pode matar os neurônios através da ativação excessiva de seus receptores facilitando a instalação e/ou propagação das crises (CAVALHEIRO et al., 1994; MELDRUM et al., 1994). Dependendo da maturidade neuronal, o glutamato pode induzir morte por apoptose ou necrose (FERRE et al., 1995) por alterar a homeostase do cálcio e induzir o estresse oxidativo (LEITE et al., 1990; SANTOS et al., 2010). Segundo Freitas (2004) ocorre aumento na densidade de receptores glutamatérgicos no hipocampo (FREITAS et al., 2004), sugerindo que isso pode ser adquirido durante o *status epilepticus*.

O sistema glutamatérgico foi também implicado nas propriedades aditivas da pilocarpina e parece ter um importante papel nos efeitos neurotóxicos da droga. O aumento da estimulação dos receptores NMDA induz convulsões e dano neuronal (KOHL, DANHARDT, 1995). Dentre os diferentes receptores glutamatérgicos, o receptor NMDA está envolvido com os sistemas cardiovascular, respiratório e neural (OLNEY, 1986; WEST, HUANG, 1994; BERGER et al., 1995), todos os quais estão seriamente comprometidos durante as convulsões induzidas por pilocarpina. O aspartato, um aminoácido excitatório, o que pode facilitar o desenvolvimento das convulsões e seus efeitos neurotóxicos. Coyle e colaboradores (2001) também detectaram um aumento do conteúdo deste aminoácido durante o período agudo das convulsões induzidas por ácido caínico.

Considerando estas informações e avaliando a atividade do chambá sobre a concentração de aminoácidos, nosso estudo mostrou que os animais pré-tratados com chambá (50 mg/Kg), bem como os animais pré-tratados com fenobarbital apresentaram redução da concentração de glutamato quando submetidos ao modelo de convulsão por pilocarpina e comparados com o grupo controle.

Em resumo, os resultados do presente capítulo corroboram com os dados obtidos no Capítulo 1, onde o chambá apresentou atividade anticonvulsivante e, possivelmente, relacionada à redução da concentração dos aminoácidos excitatórios e aumento da concentração de aminoácidos inibitórios do sistema nervoso central.

## CAPÍTULO 4 – Análise Histopatológica

### 1 Introdução

As células nervosas são destruídas ou danificadas após várias condições, tais como: longos períodos de excitação, convulsões severas, danos crônicos e em outras condições neuropatológicas (SOLLAS et al., 2001).

A epilepsia do lobo temporal pode estar associada à esclerose do hipocampo (LOTHAMN et al., 1981; MELDRUM et al., 1990). Patologicamente a esclerose hipocampal refere-se a uma perda neuronal em grau variável e relativamente seletiva em CA1, CA3 e regiões do giro dentado do hipocampo. A epilepsia do lobo temporal, a forma mais frequente das epilepsias resistentes ao tratamento farmacológico entre a população adulta, se caracteriza por perda neuronal hipocampal e comprometimento cognitivo progressivo (GUEDES et al., 2006). Em casos mais graves, além da esclerose hipocampal, há perda neuronal também em locais extra-hipocampais, como córtex entorrinal, giro para-hipocampal, amígdala, tálamo e cerebelo. Entretanto, a perda celular fora do hipocampo não ocorre a menos que haja também perda neuronal no hipocampo (GUEDES et al., 2006).

O modelo de epilepsia induzido por pilocarpina têm sido extensivamente analisado, uma vez que, exibe convulsões recorrentes espontâneas e podem esclarecer muitas das alterações vistas na epilepsia do lobo temporal de humanos. As mudanças histopatológicas observadas no hipocampo reproduzem muitas destas alterações em humanos, incluindo perda neuronal e remoção do tecido de sustentação do SNC (PERSINGER, DUPONT, 2004; KRSEK et al., 2004)

A pilocarpina pode não ser capaz de produzir toxicidade aguda, no entanto, pode induzir neurodegeneração após o estado epiléptico (fase aguda) e nas convulsões recorrentes espontâneas (fase crônica) (HOLMES et al., 2004; HOFFMANN et al., 2006). Do ponto de vista estrutural, o hipocampo é a região cerebral mais sensível aos efeitos neuropatológicos desencadeados pela ação epileptiforme resultante da ativação colinérgica (CAVALHEIRO et al., 1995; SCORZA et al., 2005; AUVIN et al., 2010).

As principais alterações descritas durante a fase aguda da convulsão e estado epiléptico são perda neuronal, gliose e degeneração vacuolar típica, em várias estruturas, como hipocampo, corpo estriado e amígdala (FREITAS et al., 2003a). Novos estudos histopatológicos e de possíveis alternativas para evitar o dano neuronal desenvolvido após o estado epiléptico devem ser realizados.

Com base na necessidade de novos agentes terapêuticos e do conhecimento da atividade anticonvulsivante e antioxidante do extrato padronizado de chambá, no presente capítulo aborda a investigação dos efeitos neuroprotetores do extrato em hipocampos de animais submetidos ao *status epilepticus* após convulsão induzida por pilocarpina

## 2 Objetivos específicos

Avaliar a atividade neuroprotetora do extrato padronizado de *Justicia pectoralis* por meio da porcentagem de danos neuronais nas áreas CA1 e CA3 no hipocampo de animais pré-tratados com o extrato e submetidos ao *status epilepticus* após indução de convulsão por pilocarpina.

### 3 Materiais e Métodos

#### Indução do *status epilepticus*

Os animais foram divididos em 3 grupos (n=4), pré-tratados, por via oral, com chambá (50 mg/Kg – grupo 1), água destilada (controle – grupo 2), água destilada (posterior grupo pilocarpina – grupo 3). Após 1 hora, os grupos 1 e 3 receberam, inicialmente, metilescopolamina 0,01% na dose de 1 mg/Kg (via subcutânea), visando minimizar os efeitos colinérgicos periféricos da pilocarpina. Após 30 minutos foi administrada pilocarpina (200 mg/Kg) para indução da convulsão, descrito anteriormente no Capítulo 1, e monitorada a ocorrência do *status epilepticus* (SE) em cada animal. O SE é definido como crises clônicas generalizadas e ininterruptas persistindo por um período mínimo de 30 minutos antes do seu término espontâneo (TURSKI et al., 1983b; CAVALHEIRO et al., 1991; SANABRIA, CAVALHEIRO, 2000).

Depois da administração das drogas os camundongos foram continuamente observados. Imediatamente após o início do SE, os camundongos continuaram a ser monitorados por 1 hora. Somente animais que apresentaram SE ininterruptos durante 1 hora foram incluídos nos grupos.

#### Perfusão e Corte em criostato

Os animais dos grupos 1, 2 e 3 foram anestesiados com xilazina (10mg/Kg) e ketamina (90mg/Kg) administrados por via intraperitoneal para o procedimento cirúrgico. A temperatura foi mantida entre 36,5 e 37°C. Apenas após observação de anestesia profunda por fortes pinçadas na cauda, patas e esterno, sem que se observe qualquer reação do animal, a perfusão foi iniciada. O tórax foi aberto com tesoura e uma agulha foi inserida no ventrículo esquerdo, com uma tesoura pontiaguda realizou-se leve corte no átrio direito e o animal foi perfundido através do ventrículo esquerdo com salina gelada, seguido de paraformaldeído a 4% em PBS. Os cérebros foram removidos e pós-fixados em formol tamponado por 24 horas,

após esse período foram armazenados em solução crioprotetora de sacarose a 30% em geladeira.

Após 2 dias, os cérebros foram retirados da solução de sacarose e preparados para o corte em criostato. A base da medula e cerebelo foram cortados com bisturi paraplainar a superfície a ser colada ao suporte do criostato. O cérebro foi fixado à base do suporte com cola especial para tecidos (Tissue-Tek®) e, então, cortado sequencialmente em fatias de 30  $\mu\text{m}$  de espessura. Os cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas e mantidas a temperatura ambiente até o momento da coloração.

### **Coloração de Nissl com violeta de cresila**

As lâminas foram incubadas em solução de 0,5 % de violeta cresil, preparada em tampão de acetato (20 % acetato de sódio 2,7 % + 80 % de ácido acético glacial a 1,2 %) durante 10 minutos e protegidos da luz. Para fixar a marcação foram realizadas duas lavagens em tampão de acetato e desidratadas com duas passagens (de 20 segundos cada) em 100 % etanol. As fatias foram clareadas em xileno durante 5 minutos e montadas usando o meio DPX (não fluorescente).

### **Avaliação dos danos neuronais**

A coloração de Nissl foi utilizada para a avaliação do grau de perda neuronal nas camadas piramidais CA1 e CA3. Essa avaliação foi feita ao nível do hipocampo dorsal esquerdo. Foram utilizados dois cortes seriais para cada animal, distanciados 180  $\mu\text{m}$  entre eles, da região mencionada acima. Atribuiu-se um escore para cada uma das regiões (CA1 e CA3) dos dois cortes, segundo a tabela 2, proposta por Nascimento et al (2012). Os valores dos escores de cada região foram ordenados para o cálculo da mediana, a qual correspondeu ao escore final da região analisada em cada animal. A avaliação do grau de perda neuronal foi feita utilizando-se um microscópio Nikon Optiphot 2, com a objetiva de 40 x e a identificação

do grupo ao qual pertenciam os espécimes analisados não era do conhecimento do experimentador

QUADRO 4 – Escores de danos neuronais

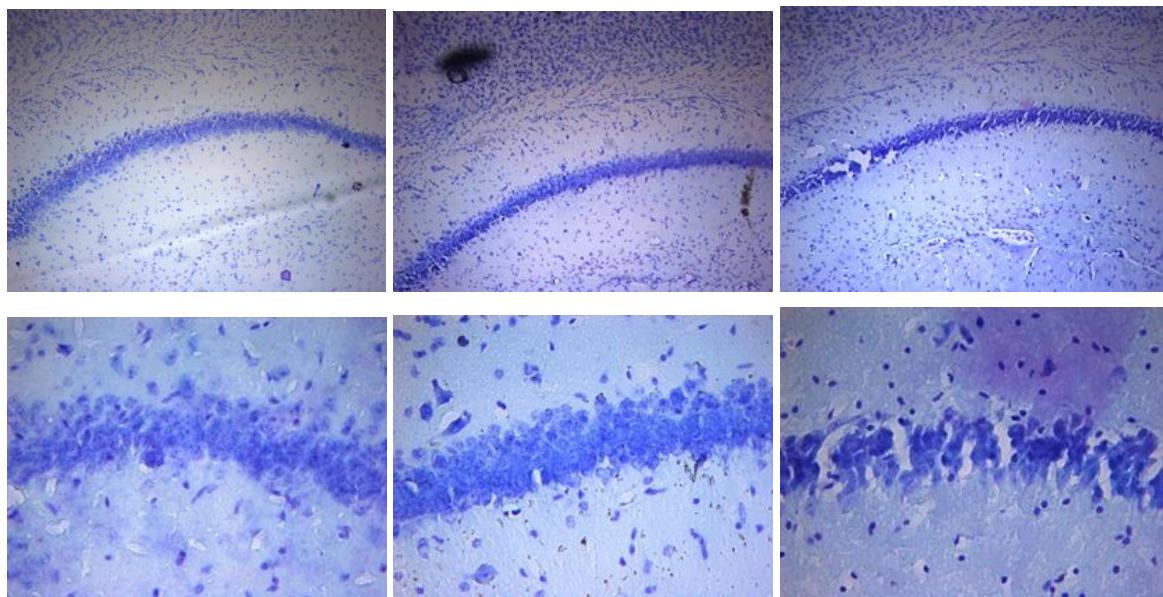
Escore	Neurônios saudáveis (formato normal e mancha do núcleo e nucléolo indistinguível do controle)
0	100%
1	>75 % e < 100%
2	>50 % até < 75%
3	>25 % até < 50 %
4	>0% até 25 %

## 4 Resultados

### 4.1 Efeito do chambá sobre a porcentagem de danos neuronais em área CA1 hipocampal de camundongos submetidos ao *status epilepticus* induzido por convulsão por pilocarpina

Neste protocolo foram determinados os danos neuronais na área CA1 de animais tratados com chambá (50mg/Kg) e água destilada que foram submetidos ao *status epilepticus* induzido por convulsão por pilocarpina (200 mg/Kg). O grupo controle foi tratado com água destilada e perfundido após 1 hora.

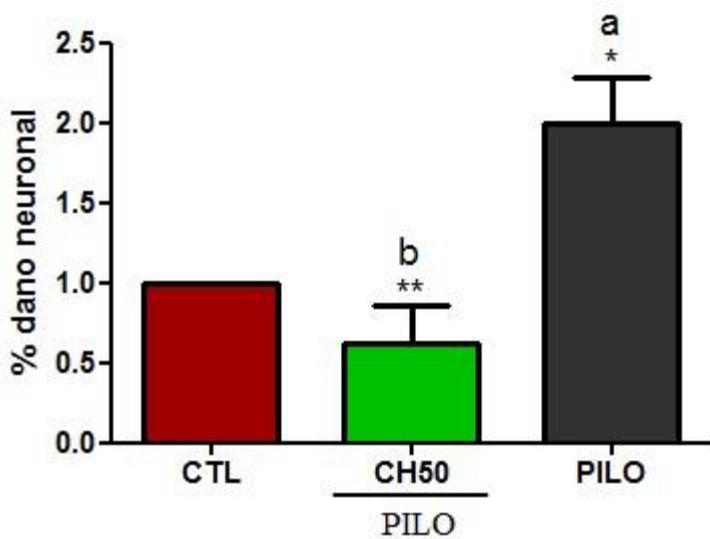
Os animais tratados com pilocarpina apresentaram maior dano neuronal [ $2,0 \pm 0,2887$  ( $p < 0,05$ )] quando comparados ao controle ( $1,0 \pm 0$ ). Os animais pré-tratados com chambá apresentaram menor dano neuronal [ $0,6250 \pm 0,2394$  ( $p < 0,01$ )] quando comparados ao grupo pilocarpina ( $2,0 \pm 0,2887$ ). (Figuras 30 e 31)



**FIGURA 30** Imagens representativas do efeito do chambá sobre os danos neuronais (coloração Cresila violeta) em área CA1 hipocampal de camundongos submetidos ao *status epilepticus* induzido por pilocarpina

Chambá (50 mg/Kg, v.o.) foi administrados 60 min antes do tratamento com pilocarpina. O grupo controle não foi submetido à indução de convulsão.

CTL: controle; CH: chambá; PILO: pilocarpina

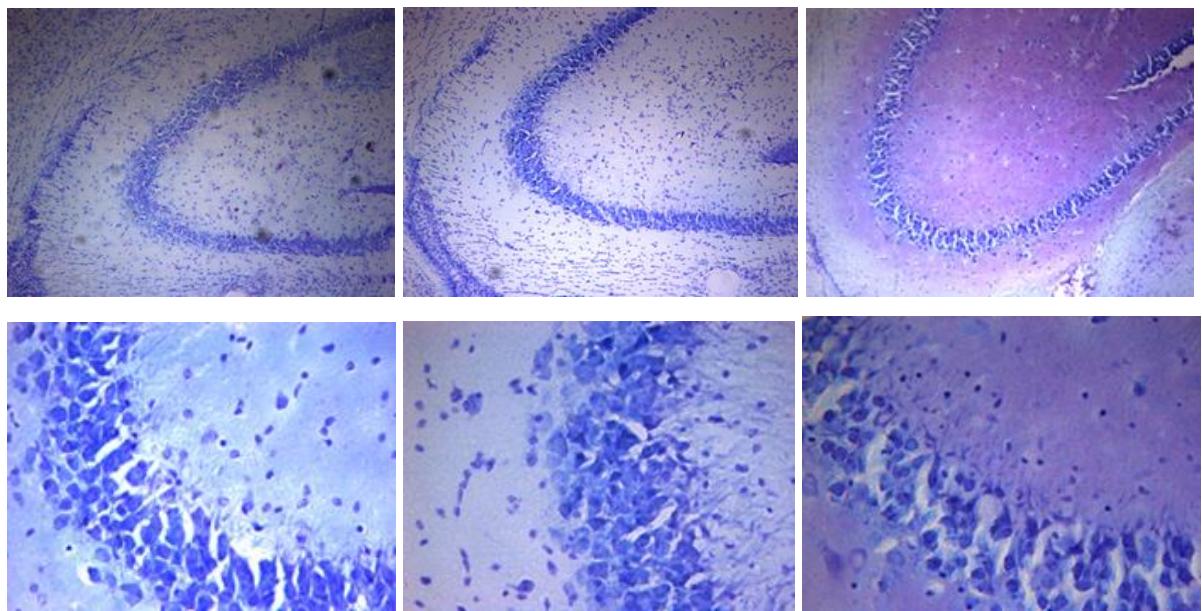


**FIGURA 31 Efeito do chambá sobre a porcentagem de danos neuronais em área CA1 hipocampal de camundongos submetidos ao *status epilepticus* induzido por pilocarpina**  
 Chambá (50 mg/Kg, v.o.) foi administrados 60 min antes do tratamento com pilocarpina. O grupo controle não foi submetido à indução de convulsão. Os valores representam a média ± EPM (n = 4). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle (\*p<0,05; \*\*p<0,01). a vs CTL; b vs PILO.  
 CTL: controle; CH: chambá; PILO: pilocarpina

#### **4.2 Efeito do chambá sobre danos neuronais em área CA3 hipocampal de camundongos submetidos ao *status epilepticus* induzidos por convulsão por pilocarpina**

Neste protocolo foram determinados os danos neuronais na área CA3 de animais tratados com chambá (50mg/Kg) e água destilada que foram submetidos ao *status epilepticus* induzido por convulsão por pilocarpina (200 mg/Kg). O grupo controle foi tratado com água destilada e perfundido após 1 hora.

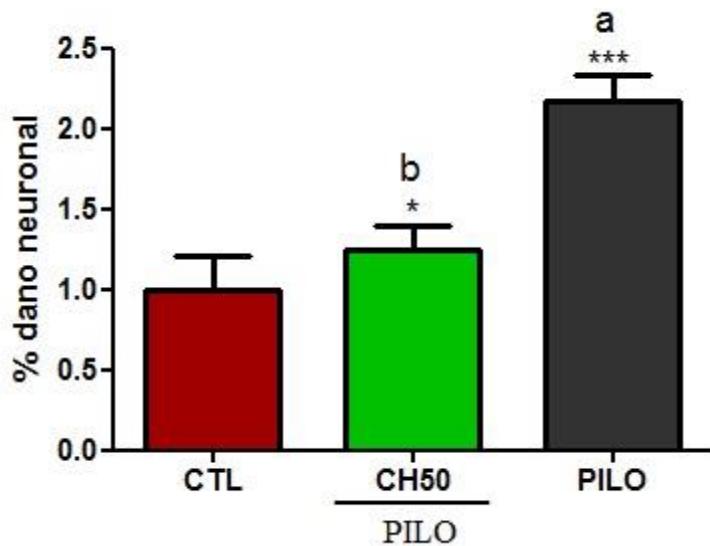
Os animais tratados com pilocarpina apresentaram maior dano neuronal [ $2,167 \pm 0,1667$  ( $p < 0,001$ )] quando comparados ao controle ( $1,0 \pm 0,2041$ ). Os animais pré-tratados com chambá apresentaram menor dano neuronal [ $1,250 \pm 0,1443$  ( $p < 0,05$ )] quando comparados ao grupo pilocarpina ( $2,167 \pm 0,1667$ ). (Figuras 32 e 33)



**FIGURA 32** Imagens representativas do efeito do chambá sobre os danos neuronais (coloração Cresila violeta) em área CA3 hipocampal de camundongos submetidos ao *status epilepticus* induzido por pilocarpina

Chambá (50 mg/Kg, v.o.) foi administrados 60 min antes do tratamento com pilocarpina. O grupo controle não foi submetido à indução de convulsão.

CTL: controle; CH: chambá; PILO: pilocarpina



**FIGURA 33 Efeito do chambá sobre a porcentagem de danos neuronais em área CA3 hipocampal de camundongos submetidos ao *status epilepticus* induzido por pilocarpina**

Chambá (50 mg/Kg, v.o.) foi administrados 60 min antes do tratamento com pilocarpina. O grupo controle não foi submetido à indução de convulsão. Os valores representam a média  $\pm$  EPM (n = 4). Para análise estatística foi utilizado ANOVA seguido por Tukey. Valores significativos comparados ao controle (\*p<0,05; \*\*\*p<0,001). a vs controle; b vs PILO.

CTL: controle; CH: chambá; PILO: pilocarpina

## 5 Discussão

O hipocampo é um tecido vulnerável com alto potencial epileptogênico e extensivas conexões para outras áreas (SURGES et al., 2008). A suscetibilidade desta estrutura deve-se ao grande número de sinapses excitatórias que possui, estando também associada à maioria das desordens comportamentais em epilepsia (FISHER, 1989; LOTHMAN et al., 1991). A perda de neurônios desta região tem sido apontada como causa ou efeito da convulsão, já que o *status epilepticus* é caracterizado por convulsões prolongadas ou repetidas frequentemente seguidas por dano neuronal que envolve o hipocampo e outras estruturas límbicas (SUTULA et al., 1994). Intensa destruição neuronal é observada no hipocampo, principalmente na subárea CA3.

No presente trabalho, a perda neuronal nas camadas piramidais de CA1 e CA3 hipocampais dos animais do grupo 3 (pré-tratados com água destilada) e submetidos ao *status epilepticus* induzido pela pilocarpina foi similar à previamente descrita em outros trabalhos com camundongos (TURSKI et al., 1984; CAVALHEIRO et al., 1996; BORGES et al., 2003) mostrando que pilocarpina induz alterações comportamentais gerando crises convulsivas as quais progressivamente envolvem sistemas não colinérgicos. Estas convulsões causam uma excessiva liberação de glutamato por neurônios glutamatérgicos que estimulam a liberação contínua de acetilcolina. Esta atividade convulsiva “auto-propagante” resulta em dano neuronal mediado pelo receptor NMDA (HAMILTON et al., 1997).

Nossos dados mostraram que as áreas CA1 e CA3 do hipocampo dos camundongos do grupo 1 (tratados com chambá) e submetidos ao *status epilepticus* apresentaram significativa proteção neuronal quando comparados ao grupo pilocarpina. Não houve diferença, significativa, entre os animais tratados com chambá e o grupo controle tratado apenas com água destilada.

Densidades axonais de origem colinérgica são encontradas na camada piramidal das áreas CA1 e CA3 do hipocampo de camundongos (AZNAVOUR et al., 2002). A camada piramidal de CA3 faz parte do circuito glutamatérgico, e, portanto, também recebe estímulos do aminoácido excitatório glutamato. A interação dos aminoácidos excitatórios com a membrana dos elementos pós-sinápticos vulneráveis promove a ativação dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e

determina seu influxo nos elementos celulares com alta densidade de canais de  $\text{Ca}^{2+}$ , alterando a homeostase intracelular e promovendo sérias consequências no processo de excitação e de comunicação celular (SIESJO et al., 1986; LANDFIELD et al., 1989; MOYER et al., 1992).

Os íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) são importantes mensageiros intracelulares dirigindo funções celulares, tais como diferenciação e crescimento, excitabilidade da membrana, exocitose e atividade sináptica. Os neurônios possuem mecanismos homeostáticos para assegurar um alto controle dos níveis citosólicos de  $\text{Ca}^{2+}$ . No seu estado de repouso, os níveis de cálcio livre são mantidos reduzidos (100nM). Deste modo elevações localizadas de  $\text{Ca}^{2+}$  que ocorrem na vizinhança de um canal iônico ou em locais que liberam  $\text{Ca}^{2+}$  intracelulares podem eficientemente ativar enzimas ou canais iônicos próximos. Os neurônios controlam os níveis intracelulares e a localização dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  através de uma complexa interação entre o influxo, efluxo, tamponamento e armazenamento interno de  $\text{Ca}^{2+}$  (SATTLER, TYMIANSKI, 2000).

Em condições fisiológicas estes processos permitem múltiplas cascadas sinalizantes reguladas pelo  $\text{Ca}^{2+}$  para ocorrerem independentemente, dentro dos limites da mesma célula. Entretanto, excessivo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  ou liberação a partir de depósitos intracelulares podem elevar as cargas deste íon para níveis que excedem a capacidade dos mecanismos regulatórios de  $\text{Ca}^{2+}$ . Isto leva a ativação inapropriada de processos  $\text{Ca}^{2+}$ -dependentes que estão normalmente inativos ou operam em baixos níveis, causando desarranjos e eventual morte celular (ARUNDINE, TYMIANSKI, 2003; MÁTYAS et al., 2004).

Os resultados do presente capítulo corroboram com os dados obtidos nos Capítulo 1, 2 e 3, onde o chambá apresentou atividade anticonvulsivante através de vários mecanismos de ação, incluindo colinérgico; reduziu o estresse oxidativo e aumentou a atividade da enzima antioxidante catalase; reduziu a concentração dos aminoácidos excitatórios e aumentou a concentração de aminoácidos inibitórios do sistema nervoso central, promovendo, dessa forma, proteção ao hipocampo de animais submetidos ao *status epilepticus* induzido por pilocarpina.

## 6 CONCLUSÃO

A avaliação do potencial anticonvulsivante do extrato padronizado de *Justicia pectoralis* (Chambá) em camundongos nos mostrou que:

O chambá apresentou atividade anticonvulsivante contra convulsões induzidas por picrotoxina, estricnina, eletrochoque e pilocarpina;

Os animais pré-tratados com chambá apresentaram redução dos níveis de peroxidação lipídica e de nitrito, bem como aumento na atividade da catalase;

Os animais tratados com chambá apresentaram aumento dos níveis dos aminoácidos inibitórios e redução dos aminoácidos excitatórios do sistema nervoso central;

Chambá reduziu os danos neuronais nas áreas CA1 e CA3 hipocampais

Dessa forma, o estudo sugere uma ação moduladora, exercida pelo extrato padronizado de *Justicia pectoralis*, sobre a convulsão através da alteração dos níveis de neurotransmissores, aminoácidos, estresse oxidativo e danos neuronais, sendo estes, mecanismos envolvidos na patologia.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, B. A.; SALAMA, R. H. Venlafaxine protects against stress-induced oxidative DNA damage in hippocampus during antidepressant testing in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.100 (1), p. 59-65, 2011.
- AGUIAR, C.C.T.; ALMEIDA, A.B.; ARAÚJO, P.V.P.; VASCONCELOS, G.S.; CHAVES, E.M.C.; VALE, O.C.; MACÊDO, D.S.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.B.; VASCONCELOS, S.M.M. Anticonvulsant effects of agomelatine in mice. **Epilepsy and Behavior**, v. 24, p. 324-328, 2012.
- AHLEMEYER, B.; KRIEGLSTEIN, J. Inhibition of glutathione depletion by retinoic acid and tocopherol protects cultured neurons from staurosporine-induced oxidative stress and apoptosis. **Neurochem. Int.**, v.6, p. 1-5, 2000.
- ALMEIDA, R.N.; OLIVEIRA, T.M.L. Triagem Farmacológica Comportamental. In: Psicofarmacologia: fundamentos práticos, 1º ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, cap. 11, p. 131-137, 2006.
- AMIN, K. M.; RAHMAN, D. E. A.; AL-ERYANI, Y. A. Synthesis and preliminary evaluation of some substituted coumarins as anticonvulsant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 5377-5388, 2008.
- ANDRADE, S.F. Manual de Terapêutica Veterinária, 2º ed., São Paulo: **Roca**, 2003.
- AKINDELE, A. J.; AJAO, M. Y.; AIGBE, F. R.; ENUMAH, U. S. Effects of *Telfairia occidentalis* (Fluted Pumpkin; Cucurbitaceae) in mouse models of convulsion, muscle relaxation, and depression. **J. Med. Food**, v. 16 (9), p. 810-816, 2013.
- APRISON, M.H.; LIPPKWITZ, K.B.; SIMON, JR. Identification of a glycine-like fragment on the strychnine molecule. **Journal Neurosci. Res.**, v.17: p. 209-213, 1987.
- ARIZA, S.Y.; RUEDA, D.C.; RINCÓN, E.L.J.; LINARES, E.L.; GUERRERO, M.F. Efectos farmacológicos sobre el sistema nervioso central inducidos por cumarina, aislada de *Hygrophilatyttha*, **Rev. Fac. Quim. Farm.**, v.14, p. 51-58, 2007.
- ARUNDINE, M.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. **Cell Calcium**, v.34, p. 325-337, 2003.

ASCONAPÉ, J.J. The selection of antiepileptics drugs for the treatment of epilepsy in children and adults. **Neurologic clinics**, v.28, p.843-852, 2010.

ATTWELL, D.; BARBOUR, B.; SZATKOWSKI, M. Nonvesicular release of neurotransmitter. **Neuron**, v. 11, p. 401-407, 1993.

AUVIN, S.; SHIN, D.; MAZARATI, A.; SANKAR, R. Inflammation induced by LPS enhances epileptogenesis in immature rat may be partially reversed by IL1RA. **Epilepsia**, v.51 (Suppl 3), p. 8-34, 2010.

AVOLI, M.; CURTIS, M. GABAergic synchronization in the limbic system and its role in the generation of epileptiform activity. **Progress in Neurobiology**, v. 95, p. 104-132, 2011.

AZIZ, S. M.; TOBOREK, M.; HENNIG, B.; ENDEAN, E.; LIPKE, D. W. Polyamine regulatory processes and oxidative stress in monocrotaline-treated pulmonary artery endothelial cells. **Cell Biology International**, v. 21, n. 12, p. 801-812, 1997.

AZNAVOUR, N.; MECHAWAR, N.; DESCARRIES. L. Comparative analysis of cholinergic innervation in the dorsal hippocampus of adult mouse and rat: A quantitative immunocytochemical study. **Hippocampus** v.12, p. 206-217, 2002.

BAKRE, A. G.; ADERIBIGBE, A. O.; ADEMOWO, O. G. Studies on neuropharmacological profile of ethanol extract of *Moringa oleifera* leaves in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 783-789, 2013.

BARNARD, E.A.; SKOLNICK, P.; OLSEN, R.W.; MOHLER, H.; SIEGHART, W.; BIGGIO,W.; BRAESTRUP, C.; BATESON, A.N.; LANGER, S.Z. Subtypes of gammaaminobutyric acid receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. **Pharmacological Reviews**, v. 50, p. 291-313, 1998.

BARNHAM, K. J.; MASTERS, C. L.; BUSH, A. I. Neurodegenerative diseases and oxidative stress. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v.3, p. 205–214, 2004.

BARROS, D.O.; XAVIER, S.M.; BARBOSA, C.O.; SILVA, R.F.; FREITAS, R.L.; MAIA, F.D.; OLIVEIRA, A.A.; FREITAS, R.M.; TAKAHASHI, R.N. Effects of the vitamin E in catalase activities in hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. **Neuroscience Letters**, v. 416, p. 227-230, 2007.

BARROS, H. M. T.; LEITE, J. R. Mecanismos neuroquímicos da ação de drogas anticonvulsivantes. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria**, v. 8, p. 80-83, 1986.

BARROS, R.F.M. **Efeito da radiação solar sobre o crescimento e produção de cumarinas em *Justicia pectoralis* var *stenophylla* Leonard.** 1992, 143f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.

BATESON, A. N. The benzodiazepine site of the GABA<sub>A</sub> receptor: an old target with new potential? **Sleep Medicine Reviews**, v. 5, p. 9-15, 2004.

BECK, H.; BECKER, A.; URBAN, B. W.; ELGER; SOCHIVKO, D.; CHEN, J.; REMY, S.; ELLERKMANN, R.K. Molecular and functional changes in voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels following pilocarpine-induced status epilepticus on rat dentate granule cells. **Neuroscience**, v. 119, p. 323-333, 2003.

BELISSIMO, M. I.; AMADO, D.; ABDALLA, D.S.; FERREIRA, E. C. CAVALHEIRO, E. A.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activites and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Research**, v. 46, n. 2, p. 121-128, Aug 2001.

BERG, A.T.; BERKOVIC, S.F.; BRODIE, M.J.; BUCHHALTER, J.; CROSS, F.H.; VANEMDE BOAS, W.; ENGEL, J.; FRENCH, J.; GLAUSER, T.A.; MATHERN, G.W.; MOSH, S.L.; NORDLI, D.; PLOUIN, P.; SCHEFFER, I.E. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, v.51, p. 676-685, 2010.

BERG, A.T.; SCHEFFER, Y. E. New concepts in classification of the epilepsies: Entering the 21<sup>st</sup> century. **Epilepsia**, v.52 (6), p. 1058-1062, 2011.

BERGAMINI, C. M.; GAMBETTI, S; DONDI, A.; CERVELLATI, C. Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n.14, p. 1611-1626, 2004.

BERGER, I., GILLIS, R. A., VITAGLIANO, S., PANICO, W. H., AGEE, S., KELLY, M., NORMAN, W. P., MC MANIGLE, J. E., TAVEIRA DA SILVA, A. M. NMDA receptors are involved at the ventrolateral nucleus tractus solitarii for termination of inspiration. **Eur J Pharmacol.**, v. 277, p. 195-208, 1995.

BERK, M.; NG, F.; DEAN, O.; BUSH, A. I. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 11, n. 6, p. 851-876, 2008.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, v.29, n. 6, p. 1340-1344, 2006.

BHAT, M.A.; AL-OMAR, M.A. Coumarin incorporated triazoles: a new class of anticonvulsants. **Acta PoloniaePharmaceutica – DrugResearch**, v. 68 (6), p. 889- 895, 2011.

BONNER, T. I.; BUCKLEY, N. J.; YOUNG, A. C.; BRANN, M. R. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. **Science.**, v.237, p. 527-532, 1987.

BONNERT, T. P.; MICKERNAN, R.M.; FARRAR, S.; LE BOURDELLÈS, B.; HEAVENS, R.P.; SMITH, D. W.  $\theta$ , a novel  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor subunit. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 9891-9896, 1999.

BOER, H.M.; MULA, M.; SANDRE, J.W. The global burden and stigma of epilepsy. **Epilepsy and Behavior**, v.12, p. 540-546, 2008.

BORGES, K.; GEARING, M.; McDERMOTT, D.L.; SMITH, A.B.; ALMONT, A.G.; WAINER, B.H.; DINGLEDINE, R. Neuronal and glial pathological changes during epileptogenesis in the mouse pilocarpine model. **Experimental Neurology**, v.182, p. 21-34, 2003.

BORMANN, J. Electrophysiology of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor subtypes. **Trends Neurosci.**, v.11, p. 112-116, 1988.

BOROWICZ, K. K., LUSZCZKI, J., SWIADER, M., KLEIRONK, Z., CZUCZWAR, J. Influence of sexual hormone antagonists on the anticonvulsant action of conventional antiepileptic drugs against electrically- and pentylenetetrazol-induced seizures in mice. **European Neuropsychopharmacology**, v. 14, p. 77-85, 2004.

BOWERY, N. G. Historical perspective and emergence of the GABAB receptor. **Adv. Pharmacol.**, v.58, p. 1-18, 2010.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO, M.L. **Psicofisiologia**. São Paulo: Ateneu, p.197, 2000.

BRENNEKE, F., BUKALO, O., DITYATEVA, A., LIE, A. A. Mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-r show physiological and structural hallmarks of increased hippocampal excitability, but not increased susceptibility to seizures in the pilocarpine model of epilepsy. **Neuroscience**, v. 124, p. 841-855, 2004.

BRIELLMANN, R. S., NEWTON, M. R., WELLARD, R. M., JACKSON, G. D. Hippocampal sclerosis following brief generalized seizures in adulthood. **Neurology**, v. 57, p. 315-7, 2001.

BRODIE, M.J.; COVANIS, A.; GIL-NAGEL, A.; LERCHE, H.; PERUCCA, E.; SILLS, G.J.; WHITE, H. S. Antiepileptic drug therapy: Does mechanisms of action matter? **Epilepsy & Behaviour**, v.21, p. 331-341, 2011.

BROOKS-KAYAL, A. R., SHUMATE, M. D., JIN, H., LIN, D. D., RIKHTER, T.Y., HOLLOWAY, K. L., COULTER, D. A. Human neuronal gamma-aminobutyric acid A receptors: coordinated subunit mRNA expression and functional correlates in individual dentate granule cells. **J. Neurosci.**, v.19, p. 8312-8313, 1999.

BRUCE, A.J.; BAUDRY, M. Oxygen free radicals in rat limbic structures after kainite-induces seizures. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 18, p. 993-1002, 1995.

BRUNEAU, E.G.; AKAABOUNE, M. Running to stand still: ionotropic receptor dynamics at central and peripheral synapses. **Mol. Neurobiol.**, v.34 (2) p. 137-51, Oct 2006.

CAMPOS, M.G.; CUNHA, A.P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2005.

CAROBEZ, A. P. Glutamatergic neurotransmission as molecular target in anxiety. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, v. 25, p. 52-58, 2003.

CATTERALL, W.A.; KALUME, F.; OAKLEY, J.C. NaV1.1 channels and epilepsy. **J Physiol.**, v.588 (Pt 11), p. 1849-59, 2010.

CAVALHEIRO, E. A.; BELÍSSIMO, M. I.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G. Profile of prostaglandina levels in the rat hippocampus in pilocarpine model of epilepsy. **Neurochemical**, v.27, n.6, p. 461-466, March 1995.

CAVALHEIRO, E. A., FERNANDES, M. J., TURSKI, L., NAFFAN-MAZZACORATTI, M. G. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. **Epilepsia**, v. 35, p. 1-11, 1994.

CAVALHEIRO, E. A., GUEDES, R. C. A. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. **Epilepsy Res**, v. 26, p. 115-121, February 1996.

CAVALHEIRO, E. A.; LEITE, J. P.; BORTOLOTTO, Z. A.; TURSKI, W. A.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**, v.32, p. 778-782, 1991.

CAVALHEIRO, E. A.; PRIEL, M. R.; SANTOS, N. F. Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Research**, v.26, p. 115-121, February 1996.

CHAGNON, N.F.; Le QUESNE, P.; COOK, J.M. Yanomame hallucinogens: anthropological, botanical and chemical findings. **Current Anthropology**, v.12, p. 72-74, 1971.

CHANCE B, MAEHLY, A. C. Assay of catalase and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v.2 (11), p. 764–775, 1955.

CHANFRAU, J.E.R. et al. Estudios preliminares de extractos fluidos 30% de *Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonard. **Revista Cubana Planta Medica**, v.13, n. 4, 2008.

CHANG, S.J.; YU, B.C. Mitochondrial matters of the brain: mitochondrial dysfunction and axidative status in epilepsy. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 42, p. 457-459, 2010.

CHARIANDY, C.M. et al. Screening medicinal plants from Trinidad and Tobago for antimicrobial and insecticidal properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, p. 265-270, 1999.

CHAUDHARY, U. J.; DUNCAN, J. S.; LEMIEUX, L. A dialogue with historical concepts of epilepsy from the Babylonians to Hughlings Jackson: Persistent belief. **Epilepsy and Behavior**, v.21, p. 109-114, 2011.

CHEBIB, M.; JOHNSTON, G.A. The “ABC” of GABA receptors: a brief review. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 26, p. 937-940, 1999.

CHEN, S.D.; CHANG, A.Y.; CHUANG, Y.C. The potential role of mitochondrial dysfunction in seizure-associated cell death in the hippocampus and epileptogenesis. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v.42, p. 461-465, 2010.

CHINDO, B. A.; YA’U, J.; DANJUMA, N. M.; OKHALE, S. E.; GAMANIEL, K. S.; BECKER, A. Behavioral and anticonvulsant effects of the standardized extract of *Ficus platyphylla* stem bark. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, p. 351-360, 2014.

CHOI, S. Y.; AHN, E. M.; SONG, M. C.; KIM, D. W.; KANG, J. H.; KWON, O. S.; KANG, T. C.; BAEK, N. I. In vitro GABA-transaminase inhibitory compounds from the root of *Angelica dahurica*. **Phytother. Res.**, v. 19, p. 839–845, 2005.

CHUANG, Y.C. Mitochondrial dysfunctional and oxidative stress in seizure-induced neuronal cell death. **Acta Neurol. Taiwan**, v. 19, p. 3-15, 2010.

CLIFFORD, D.B.; OLNEY, J.W.; MANIOTIS, A.; COLLINS, R.C.; ZORUMSKI, C.F. The Functional Anatomy and Pathology of Lithium-pilocarpine and High-dose Pilocarpine Seizures. **Neuroscience**, v.23, p. 953-68, 1987.

COCK, H.R. The role of mitochondrial and oxidative stress in neuronal damage after brief and prolonged seizures. **Prog. Brain. Res.**, v. 135, p. 187-196, 2002.

COSTA-LOTUFO, L.V.; FONTELES, M.M.F.; LIMA, I.S.P.; OLIVEIRA, A.A.; NASCIMENTO, V.S.; BRUIN, V.M.S.; VIANA, G.S.B. Attenuating effects of melatonin on pilocarpine-induced seizures in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 131, p. 521-529, February 2002.

COTTERMAN-HART, S. Depression in epilepsy: Why are not we treating? **Epilepsy and Behavior**, v.19, p. 419-421, 2010.

COURSIN, D.B. Convulsive seizures in infants with pyridoxine-deficient diet. **The Journal of the American medican Association**, v. 154, p. 406, 1954.

COYLE, J. T., PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, neurodegeneration disorders. **Science**, v. 262, p. 689-695, 1993.

CZUCZWAR, S. J.; PATSALOS, P. N. The new generation of GABA enhancers potential in the treatment of epilepsy. **CNS Drugs**, v. 15, p. 339–350, 2001.

DE BRUIN, V. M. S.; MARINHO, M. M. F.; DE SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Behavioural and neurochemical alterations after lithium-pilocarpine administration in Young and adult rats: a comparative study. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 65, pp. 547-551, 2000.

DE ROBERTIS, E. D. P.; De ROBERTIS, E. M. F. J. A maquinaria para a síntese protéica. In: De Robertis, E. D. P.; De Robertis, E. M. F. J. (eds.) **Bases da Biologia Celulas e Molecular**, 2º Ed., Editora Guanabara Koogan S. A., pp. 243-261, Rio de Janeiro, 1993.

DE VRIES, J.X.; TAUSCHER, B.; JOSHI, B.S. Constituents of *Justicia pectoralis* Jacq. Gas chromatography/mass spectrometry of simple coumarins, 3-phenilpropionic acid and their hydroxyl and methoxy derivatives acid. **Biomed Environ Mass Spectrom**, v.15, p. 413-417, 1988.

DECKERS, C.L.P.; GENTON, P.; SCHMIDT, D. Current limitations of antiepileptic drug therapy: a conference review. **Epilepsy Research**, v.53, p. 1-17, 2003.

DEL OLMO, N.; BUSTAMANTE, J.; DEL RIO, R. M.; SOLIS, J. M. Taurine activates GABA (A) but not GABA (B) receptors in rat hippocampal CA1 area. **Brain Res.**, v. 864, p. 298–307, 2000.

DEVI, P.U.; MANOCHA, A.; VOHORA, D. Seizures, antiepileptics, antioxidants and oxidative stress: an insight for researchers. **Expert Opin Pharmacother**, v.9, p. 31-3177, 2008.

DOPP, J.M.; PHILLIPS, G.P. Sleep disorders. In: Dipiro, J.T., Talbert, R. L., Yee, G. C., Matzke, G. R., Wells, B. G., Posey, L. M.(Eds.), **Pharmacotherapy: A Pathophysio- logic Approach**, p.1191–1201, 2008.

DUGAN, L. L.; CHOI, D. W. Hypoxic-ischemic brain injury and oxidative stress, In G. J. Siegel et al. **Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects**, 6th edition, p. 722– 723, Williams & Wilkins, Baltimore, Md, USA, 1999.

EISERICH, J.P.; HRISTOVA, M.; CROSS, C.E.; JONES, A.D.; FREEMAN, B.A.; HALLIWELL, B.; VAN DER VLIET, A. Formation of nitric oxide derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. **Nature**, v.391, p. 393–397, 1998.

ELGOYHEN, A.B.; KATZ, A.; ROTHLIN, C.V.; VETTER, D.E.; HEINEMANN, S.F.; BOULTER, J. The  $\alpha$ 10 nicotinic subunit is a determinant of the cochlear outer hair cell cholinergic receptor function. **Elsevier Science**., v.2.2, p. 2–4, 2000.

EMERIT, J.; EDEAS, M.; BRICAIRE, F. Neurodegenerative disease and oxidative stress. **Biomed Pharmacother**, v.58, p. 39-46, 2004.

ENGEL, J.; PEDLEY, T.A. Epilepsy: a comprehensive textbook, **Lippincott-Raven**. **Philadelphia**, p. 2013-2019, 1997.

ENZ, R.; CUTTING, G.R. Molecular composition of GABA<sub>C</sub> receptors. **Vision. Res.**, v.38 p. 1431–1441, 1998.

ESSICK, E. E.; SAM, F. Oxidative stress and autophagy in cardiac disease, neurological disorders, aging and cancer. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.3, n. 3, p. 168–177, 2010.

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

FAINGOLD, C. L.; FROMM, G.H. The electro shock model, neuronal network and antiepileptic drugs. In: (Eds.), Drugs for Control of Epilepsy: Actions on Neuronal Networks in Seizure Disorders. **CRC Press, Boca Raton, FL**, p. 195-211, 1991.

FATTAL, O.; BUDUR, K.; VAUGHAN, A. J.; FRANCO, K. Review of the literature on major mental disorders in adults patients with mitochondrial diseases. **Psychosomatics**, v. 47, p. 1-7, 2006.

FEIGENSPAN, A.; BORMANN, J. Differential pharmacology of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>C</sub> receptors on rat retinal bipolar cells. **Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sect.**, v.288 p. 97-104, 1994a.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v.43, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P.T. Mortalidade por epilepsia no Brasil, 1980-2003, **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 14 (1): p. 89-94, 2009.

FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the international League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v.46, n. 4, p. 470-2, 2005.

FISHER, S.R. Animal models of epilepsies. **Brain Research Reviews**, v.14, p. 245-278, June 1989.

FREITAS, R. M. Alterações comportamentais, histopatológicas e neuroquímicas em ratos adultos durante a fase aguda da convulsão induzida por pilocarpina. [Dissertação de Mestrado]. Fortaleza: Faculdade de Medicina da UFC; 2003.

FREITAS, R. M., DE OLIVEIRA, S. F., SALDANHA, G. B.; JORDAN, J. Lipoic acid alters amino acid neurotransmitters content in rat hippocampus after pilocarpine-induced seizures. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 4, p. 485-492, Aug 2011.

FREITAS, R. M.; SOUSA, F. C. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; FONTELES, M. M. F. Acute alterations of neurotransmitters levels in striatum of Young rat after pilocarpine-induced status epilepticus. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v.61, p. 430-433, 2003a.

FREITAS, R. M.; SOUSA, F. C. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; FONTELES, M. M. F. Pilocarpine-induced seizures in adult rats: lipid peroxidation level, nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the hippocampus, striatum and frontal cortex. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.78, n.2, p.327-332, 2004a.

FREITAS, R. M.; VASCONCELOS, S.M; SOUSA, F. C, VIANA, G.S; FONTELES, M. M. Pharmacological studies of the opioids, mood stabilizer and dopaminergic drugs on pilocarpine-induced seizures and status epilepticus. **Neurosci. Lett.**, v. 408, p. 84–88, 2006b.

FROESTL, W. Química e farmacologia de GABA B ligandos do receptor. **Adv. Pharmacol.**, v.58, p. 19-62, 2010.

GASTAUT, H. Clinical and electrographical classification of seizures. **Epilepsia**, v.10, p. S2-S13, 1969b.

GAWRON, A.; GLOWNIAK, K. Cytostatic activity of coumarins in vitro. **Planta Medica**, v.9, p. 526-529, 1987.

GERLAI, R. Effects of acute and chronic ethanol exposure on the behavior of adult zebrafish (danio rerio). **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.85, n. 4, p. 752-761, 2006.

GILBERT, J. C.; SAWAS, A. H. ATPase activities and lipid peroxidation in rat cerebral cortex synaptosomes. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v.263, p. 89-196, 1983.

GLUCK, M. R.; JAYATILLEKE, E.; SHAW, S.; ROWAN, A. J.; HAROUTUNIAN, V.; CNS oxidative stress associated with the kainic acid rodent model of experimental epilepsy. **Epilepsy Res.**, v. 39, p. 63-71, 2000.

GOTTESMANN, C., GABA mechanisms and sleep. **Neuroscience**, v.111, p. 231–239, 2002.

GREEN, L., FISHER, E. B. JR., PERLOW, S., SHERMAN, L. Preference reversal and self-control: choice as a function of reward amount and delay. **Behav. Anal. Lett.**, v.1, p. 43–51, 1981.

GRIFFITH, J. W., PETERSON, S.L. PURVIS, R. S. Differential Neuroprotective Effects of the NMDA Receptor-Associated Glycine Site Partial Agonist 1-Aminocyclopropanecarboxylic Acid (ACPC) and D-Cycloserine in Lithium-pilocarpine status epilepticus. **Neurotoxicology**, p. 2004.

GU, L.; WANG, X.; LIU, Z.; JU, P.; ZHANG, L.; ZHANG, L.; ZHANG, Y.; MA, B.; BI, K.; CHEN, X. A study of Semen Strychni-induced renal injury and herb-herb interaction of Radix Glycyrrhizae extract and/or Rhizoma Ligustici extract on the comparative toxicokinetics of strychnine and brucine in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 68, p. 226-233, 2014.

GUASTELLA, J.; BRECHA, N.; WEIGMANN, C.; LESTER, A.; DAVIDSON, N. Cloning, expression and localization of a rat brain high-affinity glycine transporter. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, v.89, p. 7189-7193, 1992.

GUEDES, F. A.; GALVIS-ALONSO, O. Y.; LEITE, J. P. Plasticidade neuronal associada a epilepsia do lobo temporal mesial: insights a partir de estudos em humano e modelos animais. **J. Epilepsy Clin. Neurophys.**, v.12, p. 10-17, 2006.

GUERRINI, R.; GENTON, P.; BUREAU, M.; PARMEGGIANI, A.; SALAS-PUIG, X.; SANTUCCI, M.; BONANNI, P.; AMBROSETTO, G.; DRAVET, C. Multilobar polymicrogyria, intractable drop attack seizures, and sleep-related electrical status epilepticus. **Neurology**, v.51, p. 504-512, 1998.

GUPTA, R. C. Brain regional heterogeneity and toxicological mechanisms of organophosphates and carbamates. **Toxicol. Mech. Methods**, v.14, p. 103-143, 2004.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press**, 1999.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.**, v.186, p. 1-85, 1990.

HAMILTON, S.E.; LOOSE, M.D.; QI, M.; LEVEY, A.I.; HILLE, B.; STANLEY, M.; IDZERDA, R.L.; NATHANSON, N.M. Disruption of the m1 receptor gene ablates muscarinic receptor-dependent M current regulation and seizure activity in mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.94, p. 13311-13316, 1997.

HAN, H.; MA, Y.; EUN, J.S.; LI, R.; HONG, J.T.; LEE, M.K.; OH, K. Anxiolytic-like effects of sanjoinine A isolated from Zizyphi Spinosi Semen: Possible involvement of GABAergic transmission. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 92, p. 206-213, 2009.

HARMAN, D. Aging—a theory based on free radical and radiation-chemistry. **J. Gerontol.**, v.11, p. 298-300, 1956.

HARMAN, D. Free-radical theory of aging—dietary implications. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.25, p. 839-843, 1972.

HAWKINS, J.E.J.; SARET, L.H. On the efficacy of asparagine, glutamine, aminobutyric acid and 2-pyrrolodinone in preventing chemically induced seizures in mice. **Clinica Chimica Acta**, v.2 (6), p. 481-484, 1957.

HAWKINS, N. A.; MARTIN, M. S.; FRANKEL, W. N.; KEARNEY, J. A.; ESCAYG, A. Neuronal voltage-gated ion channels are genetic modifier of generalized epilepsy with febrile seizures plus. **Neurobiology of Disease**, v. 41, p. 665-660, 2011.

HAYES, R.L., JENKINS, L.W., LYETH, B. G. Neurotransmitter-mediated mechanisms of traumatic brain injury; acetylcholine and excitatory amino acids. **J. Neurotrauma**, v. 9, p. S173-S187, 1992.

HEIDARI, M.R.; KHALILI, F.; GHAZI-KHANSARI, M., et al. Effect of picrotoxin on antinociception in formalintest. **J. Pharmacol. Toxicol.** v.78, p.313–316, 1996.

HEIDARI, M.R.; MANDEGARY, A.; HOSSEINI, A. et al. Anticonvulsant effect of methanolic extract of Echiumamoenum Fisch and C.A Mey. against seizure induced by picrotoxin in mice. **Pakistan J. Biol. Sci.**, v.9, p. 772-776, 2006.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin. Hematol.**, v.26, p. 277-285, 1989.

HIGGINS, N.P.; PEEBLES, C.L.; SUGINO, A.; COZZARELLI, N.R. Purification of subunits of Escherichia coli DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity. **Proceeding Academic Science**, v.75 (4), p. 1773-1777, 1978.

HOFFMANN, K.; GASTENS, A. M.; VOLK, H. A.; LOSCHER, W. Expression of the multidrug transporter MRP2 in the blood-brain after pilocarpine-induced seizure in rats. **Epilepsy Research**, v.69, p. 1-14, 2006.

HOLMES, G. L.; CHA, B. H.; AKMAN, C.; SILVEIRA, D. C.; LIU, X. Spontaneous recurrent seizure following status epilepticus enhances dentate gyrus neurogenesis. **Brain & Development**, 2004.

HOLZMANN, I.; FILHO, V. C.; MORA, T. C.; CÁCERES, A.; MARTÍNEZ, J. V.; CRUZ, S. M.; SOUZA, M. M. Evaluation of behavioral and pharmacological effects of

Hydroalcoholic extract of *Valeriana prionophylla* Standl. From Guatemala. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2011.

HONG, J. Role of natural product diversity in chemical biology. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.15, p. 1-5, 2011.

HSIEH, P. F.; HOU, C.W.; YAO, P. W.; WU, S. P.; PENG, Y. F.; SHEN, M. L.; LIN, C. H.; CHAO, Y. Y.; CHANG, M. H.; JENG, K. C. Sesami ameliorates oxidative stress and mortality in kainic acid-induced status epilepticus by inhibition of MAPK and COX-2 activation. **J. Neuroinflammation**, v.8, p. 57, 2011.

HUANG, S.H.; LEONARD, S.; SHI, X.; GOINS, M.R.; VALLYATHAN, V. Antioxidant activity of lazaroid (U-75412E) and its protective effects against crystalline silica-induced cytotoxicity. **Free Radic. Biol. Med.**, v.24, p. 529-536, 1998.

HUGHLINGS-JACKSON, J. On right or left sided spasm at the onset of epileptic paroxisms, and on crude sensation warnings, and elaborate mental states. **Brain**, v.3, p. 192-206, 1880.

HULME, E.C.; BIRDSALL, N.J.M.; BUCKLEY, N.J. Muscarinic receptors subtypes. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.30, p. 633-673, 1990.

HUNG, O.L.; SHIH, R.D. Antiepileptic Drugs: The old and the New. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v.29, p. 141-150, 2011.

HUONG, N. T. T.; MATSUMOTO, K.; KASAI, R.; YAMASAKI, K.; WATANABE, H. In vitro antioxidant activity of Vietnamese ginseng saponin and its components. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 21, n. 9, p. 978-981, 1998.

ISOKAWA, M. Modulation of GABA<sub>A</sub> receptor-mediated inhibition by postsynaptic calcium in epileptic hippocampal neurons. **Brain Research**, v. 810, p. 241-250, September 1988.

JAIN, S.; BHARAL, N.; KHURANA, S.; MEDIRATTA, P.K.; SHARMA, K.K. Anticonvulsant and antioxidant actions of trimetazidine in pentylenetetrazole-induced kindling model in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v.383, p. 385-392, 2011.

JOHNSON, J.W.; ASCHER, P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. **Nature**, v.325, p. 529-531, 1987.

JOHNSTON, G.A.R.; CURTIS, D.R.; BEART, P.M.; GAME, C.J.A.; MCCULLOCH, R.M.; TWITCHIN, B. Cis- and trans-4-aminocrotonic acid as GABA analogues of restricted conformation. **J Neurochem**, v.24, p. 157-160, 1975.

JOPE, R.S.; MORRISETT, R.A.; SNEAD, O.C. III Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats. **Exp Neurol.**, v.91, p. 471-480, 1986.

JOPE, R.S.; SONG, L.; KOLASA, K. Inositol trisphosphate, cyclic AMP, and cyclic GMP in rat brain regions after lithium and seizures. **Biol. Psychiatry.**, v.31 (5), p. 505-14, 1992.

JUNQUEIRA, J. C.; CARNEIRO, J. Tecido Nervoso. In. Junqueira, L. C, J. **Histologia Básica**. 8° Ed., Editora Guanabara Koogan S.A., pp. 127-158, Rio de Janeiro, 1995a.

JUNQUEIRA, J. C.; CARNEIRO, J. Tecido Nervoso. In. Junqueira, L. C, J. **Histologia Básica**. 8° Ed., Editora Guanabara Koogan S.A., pp. 36-45, Rio de Janeiro, 1995b.

JUNYENT, F. Prevention of epilepsy by taurine treatments in mice experimental model. **Journal of Neuroscience Research**, n. 87, p. 1500-1508, 2009.

KHAN, H.; KHAN, M. A.; HUSSAIN, S.; GAFFAR, R.; ASHRAF, N. In vivo antinociceptive and anticonvulsant activity of extracts of *Heliotropium strigosum*. **Toxicology and Industrial Health**, 2013.

KARAKOC, Y.; TOPLAN, S.; TURKDOGAN, D. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in childhood epilepsy. **J. Child. Neurol.**, v.17, n.9, p. 673-676, 2002.

KIM, M.M.; KIM, S.K. Effect of phloroglucinol on oxidative stress and inflammation. **Food Chem. Toxicol.**, v.48 (10), p. 2925-2933, 2010.

KONG, Q.; LIN, C.L. Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences and diseases. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 67, p. 1817-1829, 2010.

KONTRO, P., OJA, S. S. Mutual interactions in the transport of taurine, hypotaurine and GABA in brain slices. **Neurochem Res.**, v.8, n. 11, p. 1377-1378, 1983.

KRSEK, P.; MIKULECK, A.; DRUGA, R.; KUBOV, H.; HLINAK, Z.; SUCHOMELOV, L.; MARES, P. Long-term behavioral and morphological consequences of nonconvulsive status epilepticus in rats. **Epilepsy & Behavior**, v.5, p. 180-191, 2004.

LAI, J.; HUNTER, J.C.; PORRECA, F. The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v.13, p. 291-297, 2003.

LANCASTER, B. Alcohol, nitric oxide and neurotoxicity: is there a connection? – A review. **Alcohol Clin. Exp. Res.**, v.16, p. 539-541, 1992.

LARGE, C. H.; KALINICHEV, M.; LUCAS, A.; CARIGNANI, C.; BRADFORD, A.; GARBATI, N.; SARTORI, I.; AUSTIN, N.E.; RUFFO, A.; JONES, D. N.C.; ALVARO, G.; READ, K.D. The relationship between sodium channel inhibition and anticonvulsant activity in a model of generalized seizure in the rat. **Epilepsy Research**, v.85, p. 96-106, 2009.

LEAL, L.K.A.M. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilatator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, p.151-159, 2000.

LEE, J. K.; CHOID, S. S.; LEE, H. K.; HAN, K. J.; HAN, E. J.; SUH, H. W. Effects of ginsenoside Rd and decursinol on the neurotoxic response induced by kainic acid in mice. **Planta Med.**, v. 69, p. 230-234, 2003.

LEITE, J. P., BORTOLOTTO, Z. A. CAVALHEIRO, E. A.. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 14, p. 511-517, 1990.

LESGARDS, J.F.; GAUTHIER, C.; IOVANNA, J.; VIDAL, N.; DOLLA, A.; STOCKER, P. Effect of reactive oxygen and carbonyl species on crucial cellular antioxidant enzymes. **Chem. Biol. Interact.**, v.190 (1), p. 28-34, 2011.

LI, Z.; YAMAMOTO, Y.; MORIMOTO, T.; ONO, J.; OKADA, S.; AMATODANI, A. The effect of pentylenetetrazole-kindling on the extracellular glutamate and taurine levels in the frontal cortex of rats. **Neurosci. Lett.** v. 282, n. 1-2, p. 117-119, Mar 17 2000

LIANG, L.P.; HO, Y.S.; PATEL, M. Mitochondrial superoxide production in kainite-induced hippocampal damage. **Neuroscience**, 101, p. 563-57, 2000.

LIANG, L.P.; PATEL, M. Seizure-induced changes in mitochondrial redox status. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 40, p. 316-322, 2006.

LIANG, L.P.; WALDBAUM, S.; ROWLEY, S.; HUANG, T.T.; DA, B.J.; PATEL, M. Mitochondrial oxidative stress and epilepsy in SOD2 deficient mice: Attenuation by a lipophilic metalloporphyrin. **Neurobiol. Dis.**, v.45, p. 1068-1076, 2012.

LIAO, C. F.; THEMKEN, A. P.; JOHO, R.; BARBERIS, C.; BIRNBAUMER, M.; BIRNBAUMER, L. Molecular cloning and expression of a fifth muscarinic acetylcholine receptor. **J. Biol. Chem.**, v.264, p. 7328-7337, 1989.

LIMA, M.E.; FORTES-DIAS, C.L.; CARLINI, C.R.; GUIMARÃES, J.A. Toxicology in Brazil: a big challenge for a rich biodiversity. **Toxicon**, v.56, p. 1084- 1091, 2010.

LINDE, K.; SCHUMANN, I.; MEISSNER, K.; JAMIL, S.; KRISTON, L.; RUCKER, G.; ANTES, G.; SCHNEIDER, A. Treatment of depressive disorders in primary care protocol of a multiple treatment systematic review of randomized controlled trials. **BMC Fam. Pract.**, v.15, p. 120-127, 2011.

LINDROTH, P. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-Phthaldialdehyde. **Analytical Chemistry**, v. 51, n. 11, p. 1667-1674, 1979.

LINO, C.S. et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq. And its constituents: coumarin and umbelliferone. **Phytotherapy Research**, v.11, p. 211-215, 1997.

LIU, Z.; DIAZ, L.A.; TROY, J.L.; TAYLOR, A.F.; EMERY, D.J.; FAIRLEY, J.A. et al. A passive transfer model of the organ-specific autoimmune disease, bullous pemphigoid, using antibodies generated against the hemidesmosomal antigen, BP180. **J. Clin. Invest.**, v.92 p. 2480-8, 1993.

LOSCHER, 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.

LOSCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs: Innovative strategies. **Epilepsy Research**, v. 69, p. 183-272, 2006.

LOTHAMN, E. W.; COLLINS, R. C. Kainic acid induced limbic seizures: metabolic, behavioural, electroencephalographic and neuropathological correlates. **Brain Research**, v.218, p. 299-318, 1981.

LU, Y.; LIU, M.; SH, S.; JIANG, H.; YANG, L.; LIU, X.; ZHANG, Q.; PAN, F. Effects of stress in early life on immune functions in rats with asthma and the effects of music therapy. **J. Asthma.**, v.47 (5), p. 526-31, 2010.

LUCZAJ, W.; SKRZYDLEWSKA, E. The compounds resulting from lipid peroxidation mostly react with DNA showing both genotoxic and mutagenic action; among them, 4-hydroxynonenal is the most genotoxic, while MDA is the most mutagenic DNA damage caused by lipid peroxidation products. **Cell. Mol. Biol. Lett.**, v.8, n. 2, p. 391- 41, 2003.

LUSCZKI, J. J.; CIOCZER, J. D.; KOCHAROV, S. L.; ANDRES-MACH, M.; KOMINEK, M.; ZOLKOWSKA, D. Effects of three N-(carboxyanilinomethyl) derivates of p-isopropoxyphenylsuccinimide on the anticonvulsant action of carbamazepine, phenobarbital, phenytoin and valproate in the mouse maximal electroshock-induced seizure model. **European Journal of Pharmacology**, v. 648, p. 74-79, 2010.

LUSCZKI, J. J.; SAWICKA, K.M.; KOZINSKA, J.; DUDRA-JASTRZEBSKA, M.; CZUCZWAR, S. J. Amiloride enhances the anticonvulsant action of various antiepileptic drugs in the mouse maximal electroshock seizure model. **Journal of Neural Transmission**, v. 116, p. 57-66, 2009.

LUKASIEWICZ, P.D.; EGGERS, E.D.; SAGDULLAEV, B.T.; MCCALL, M.A. GABA<sub>C</sub> receptor-mediated inhibition in the retina. **Vision Res.**, v.44 p. 3289–3296, 2004.

MACDONALD, R.L.; KELLY, K.M. Antiepileptic drug mechanisms of action. **Epilepsia**, v.36, p. S2–S12, 1995.

MACIEJAK, P.; SZYNDLER, J.; TURZYNSKA, D.; SOBOLEWSKA, A.; BIDZINSKI, A.; KOLOSOWSKA, K.; PLAZNIK, A. Time course of changes in the concentrations of amino acids in the brain structures of pentylenetetrazole-kindled rats. **Brain Research**, v. 1342, p. 150-159, Jun 25 2010.

MACKEY, C. The anticonvulsant market. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.9, p. 265-266, 2010.

MACRAE, W.D.; TOWERS, G.H.N. *Justicia pectoralis*: a study of the basis for its use a hallucinogenic snuff ingredient. **Journal of Ethnopharmacology**, v.13, p. 93-111, 1984.

MAGNUSSON, K. R. et al. Colocalization of taurine- and cysteine sulfinic acid decarboxylase-like immunoreactivity in the hippocampus of the rat. **Synapse.**, v. 4, n. 1, p. 55-66, 1989.

MAEHLY, A. C, CHANCE, B. The assay of catalases and peroxidases. Methods of Biochemical Analysis. **Interscience Publishers Inc.**, v.1, p. 357-424, 1954.

MAES, M. et al. Depression's multiple comorbidities explained by (neuro) inflammatory and oxidative & nitrosative stress pathways. **Neuro Endocrinol Lett.**, v.32 (1) p. 7-24, 2011.

MALINSKA, D.; KULAWIAK, B.; KUDIN, A.P.; KOVACS, R.; HUCHZERMEYER, C.; KANN, O. et al. Complex III-dependent superoxide production of brain mitochondria contributes to seizure-related ROS formation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1797, p. 1163-1170, 2010.

MANTE, P. K.; ADONGO, D. W.; WOODE, E.; KUKUIA, K. K. E.; AMEYAW, E. O. Anticonvulsant effect of *Antiaris toxicaria* (Pers) Lesch. (Moraceae) Aqueous Extract in rodents. **ISRN Pharmacology**, 2013.

MARCHETTI, R. L. et al. Transtornos mentais associados à epilepsia. **J. Rev. Psiq. Clín.** v.32, n. 3, p. 170-182, 2005.

MARINHO, M.M.F. et al. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. **Neurochemistry International**, v. 33, p. 299-306, 1998.

MARINHO, M.M.F.; SOUSA, F.C.F.; BRUIN, V.M.S.; AGUIAR, L.M.V.; PINHO, R.S.N.; VIANA, G.S.B. Inhibitory Action of a Calcium Channel Blocker (nimodipine) on Seizures and Brain Damage Induced by Pilocarpine and Lithium-pilocarpine in Rats. **Neuroscience Lett.**, v.235, p. 13-6, 1997.

MARSHALL, M.E.; MENDELSOHN, L.; BUTLER, K.; RILEY, L.; CANTRELL, J.; WISEMAN, C.; TAYLOR, R.; MACDONALD, J.S. Treatment of metastatic cell carcinoma with coumarin (1,2-benzopyrone) and cimetidine: a pilot study. **Journal of Clinical Oncology**, v.5 (6), p. 862-866, 1987.

MARTIN, D.L.; OLSEN, R.W. GABA in the Nervous System: the view at fifty years. **Lippincott, Williams & Wilkins**, Philadelphia, 2000.

MATES J.M.; SANCHEZ-JIMENEZ, F. Antioxidant enzymes and their implication in pathophysiological processes. **Frontiers in Biosci.**, v.4, p. 339-345, 1999.

MATYAS, F.; FREUND, T.F.; GULYÁS, A.I. Immunocytochemically defined interneuron populations in the hippocampus of the mouse strains used in transgenic technology. **Hippocampus**, v.14, p. 460-481, 2004.

MEISLER, M. H.; KEARNEY, J. A. Sodium channel mutations epilepsy and other neurological disorders. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 2010-2017, 2005.

MEISTER, A. Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1271 (1), p. 35-42, 1995.

MELDRUM, B.; GARTHWAITE, J.; Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.11, p. 379-387, 1990.

MELDRUM, B. S.; DE SARRO, G.; CHAPMAN, A. G.; MOLDRICH, R.X. Glutamate metabotropic receptors as targets for drug therapy in epilepsy. **European Journal of Pharmacology**, v. 476, p. 3-16, July 2003.

MELO, C. T.; CARVALHO, A. M.; MOURA, B. A.; TEIXEIRA, C. P.; VASCONCELOS, L. F.; FEITOSA, M. L.; OLIVEIRA, G. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S.J.C.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M.; SOUSA, F. C. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from Aniba riparia (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v. 27 (1), p. 104-112, 2013.

MICHAELI, D.; MOLAVI, A.; MIRELMAN, D.; HANOCH, A.; WEINSTEIN, L. Mode of action of coumermycin A: comparisons with novobiocin. **Antimicrobians Agents Chemotherapy**, v.10, p. 95-99, 1970.

MICHELS, C.; RAES, M.; TOUSSAINT, O.; REMACLE, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, v.17, p. 235-248, 1994.

MICHOTTE, Y., KHAN, G.M., SMOLDERS, I., EBINGER, G. Anticonvulsant effect and neurotransmitter modulation of focal and systemic 2-chloroadenosine against the development of pilocarpine-induced seizures. **Neuropharmacology**, v.39, p. 2418-2432, March 2000.

MILITÃO, G.C.G.; FERREIRA, P.M.P.; FREITAS, R.M. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. **Neurochemistry International**, v. 56, p. 16-20, 2010.

MILLS, J.; PASCOE, K.O.; CHAMBERS, J. Preliminary investigations of the wound healing properties of a Jamaica folk plant (*Justicia pectoralis*). **The West Indian Medical Journal**, v.35, p. 190-193, 1986.

MILLS, P.B.; SURTEES, R.A.H.; CHAMPION, M.P.; BEESLEY, C.E.; DALTON, N.; SCAMBLER, P.J.; HEALES, S.J.R.; BRIDDON, A.; SCHEIMBERG, I.; HOFFMANN, G.F.; ZSCHOCKE, J.; CLAYTON, P.T. Neonatal epileptic encephalopathy caused by mutations in the PNPO gene encoding pyridox(am)ine 50-phosphate oxidase. **Human Molecular Genetics**, v. 14 (8), p. 1077-1086, 2005.

MOLCHANNOVA, S. M., OJA, S. S. e SARANSAARI, P. Inhibitory effect of taurine on veratridine-evoked D- [3H] aspartate release from murine corticostriatal slices: involvement of chloride channels and mitochondria. **Brain Res.**, v. 1130, n. 1, p. 95-102, 2007.

MOLCHANNOVA, S. M., OJA, S. S. e SARANSAARI, P. Taurine attenuates D- [3H] aspartate release evoked by, depolarization in ischemic corticostriatal slices. **Brain Res.**, v. 1099, n. 1, p. 64-72, 2006.

MONTERO, A.C.R. et al. Genotoxicidad de *Justicia pectoralis* Jacq. (tilo). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.13, n. 2, 2008.

MORRISETT, R.A.; JOPE, R.S.; SNEAD, O.C. Effects of drugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administration of pilocarpine to lithium-pretreated rats. **Exp. Neurol.**, v.97, p. 193–200, 1987a.

MOSLEY, E.E.; MCGUIRE, M.K.; WILLIAMS, J.E.; MCGUIRE, M.A. Cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid is synthesized from vaccenic acid in lactating women. **J. Nutr.**, v.136, p. 2297-2301, 2006a.

MURASHIMA, Y. L.; YOSHII, M.; SUZUKI, J. Ictogenesis and epileptogenesis in el mice. **Epilepsia**, v.5, p.130-135, 2002.

NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G.; CAVALHEIRO, E. A.; PEROSA, S. R.; ROCHA, J. B. T.; COSTA, M. S. Pilocarpine-induced status epilepticus increases glutamate release in rat hippocampal synaptosomes. **Neuroscience Letters**, v.356, n. 1, p.1-4, 2004.

NAKAMURA, T.; LIPTON, S.A. Cell death: protein misfolding and neurodegenerative diseases. **Apoptosis**, v. 14, p. 455-468, 2009.

NASCIMENTO, A. L.; SANTOS, N; F.; PELÁGIO, F. C.; TEIXEIRA, S. A.; FERRARI, E. A. M.; LANGONE, F. Neuronal degeneration and gliosis time-course in the mouse hippocampal formation after pilocarpine-induced status epilepticus. **Brain Research**, v. 1470, p. 98-11, 2012.

NATHANSON, M. H.; RIOS-VELEZ, L.; BURGSTAHLER, A. D.; MENNONE, A. Communication via gap junctions modulates bile secretion in the isolated perfused rat liver. **Gastroenterology**, v. 116, p. 1176–1183, 1999.

NELIGAN, A.; BELL, G.S.; SANDER, J.W.; SHORVON, S.D. How refractory in refractory epilepsy? Patterns of relapse and remission in people with refractory epilepsy. **Epilepsy Research**, v.96, n. 3, p. 225-230, Oct 2011.

NELSON, D.L.; COX, M.M. Principles of Biochemistry, 3<sup>rd</sup>, **Worth Publishers**, p. 1013, 2000.

NICOLL, R.A. Introduction to the pharmacology of the central nervous system. **Basic and Clinical Pharmacology**. p. 351–363, 2001.

NICHOLLS, D. G. Oxidative Stress and energy crises in neuronal dysfunction. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1147, p. 53-60, 2008.

NICHOLSON, S.S. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. Tratado de Medicina Interna Veterinária – Doenças do Cão e do Gato, **Toxicologia**, v.1 e v.5, p.375-381, 2004.

NOGUEIRA, C.R.; DAMASCENO, F. M.; DE AQUINO-NETO, M. R.; DE ANDRADE, G. M.; FONTENELE, J. B.; DE MEDEIROS, T. A.; VIANA, G. S. Doxycycline protects against pilocarpine-induced convulsions in rats, through its antioxidant effect and modulation of brain amino acids. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 98, n.4, p. 525-532, Jun 2011.

OGIWARA, I.; MIYAMOTO, H.; MORITA, N.; ATAPOUR, N.; MAZAKI, E.; INOUE, I.; TAKEUCHI, T.; ITOHARA, S.; YANAGAWA, Y.; OBATA, K.; FURUICHI, T.; HENSCH, T.K.; YAMAKAWA, K. Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. **J. Neurosci.**, v.27 p. 5903–5914, 2007.

OJEWOLE, J.A. Anticonvulsant effect of *Rhus chridnsis* (Baker F.)(Anacardiaceae stem-bark aqueous extract in mice. **Journal of Ethno pharmacology**, v.117 (1), p. 130-135, 2008.

OLIVEIRA, A. F. M.; ANDRADE, L. H. C. Caracterização morfológica de *Justicia pectoralis* JACQ e *J. gendarussa* BURM. F. (ACANTHACEAE). **Acta Amazônica**, v.30, n. 4, p. 569-578, 2000.

OLNEY, J.W.; COLLINS, R.C.; SLOVITTER, R.S. Excitoxic mechanisms of epileptic brain damage. **Adv.Neurol.**, v.44; p. 857-877, 1986.

OLNEY, J.W.; GUBAREFF, T.; SLOVITER, R.S. Epileptic brain damage in rats induced by sustained electrical stimulation of the perforant path. II. Ultrastructural analysis of acute hippocampal pathology. **Brain. Res. Bull.**, v.10, p. 699 –712, 1983.

OLNEY, J. W.; NEWCOMER, J. W.; FARBER, N. B. NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. **J. Psychiatry Res.**, v. 33, p. 523–533, 1999.

ONISHI, B. K. A. Coloração de Nissl por Violeta de Cresila. In: Xavier, G. F. Técnicas para o estudo do sistema nervoso. 1º Ed., Editora Plêiade, São Paulo, pp. 93-104, 1999.

PADGETT, C. L.; SLESINGER, P. A. GABAB receptor coupling to G-proteins and ion channels. **Adv. Pharmacol.**, v.58, p. 123-47, 2010.

PARKAS, S.; TARNAWA, I.; BERZSENYI, P. Effects of some centrally acting muscle relaxants on spinal root potentials: A comparative study. **Neuropharmacology**, v.28 (2), p. 161-173, February 1989.

PARRA, A.L. et al. Comparative study of assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v.8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PSARROPOULOU, C., POTIER, S. Endogenous acetylcoline facilitares epileptogenesis in immature rat neocortex. **Neuroscience Letters**, v. 302, p. 25-28, February 2001.

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

PAYA, M.; HALLIWELL, B.; HOULT, J.R. Interações de uma série de cumarinas com espécies reativas de oxigênio.: Eliminação de superóxido, ácido hipocloroso e radicais hidroxila. **Biochem, Pharmacol.**, v.44, p. 205-214, 1992.

PEPEU, G. Brain acetylcholine: an inventory of our knowledge on the 50<sup>th</sup> anniversary of its discovery. **Trends Pharmacol. Sci.**, v.4, p. 416-418, 1983.

PERALTA, E.G.; ASHKENAZI, A.; WINSLOW, J.W.; SMITH, D.H.; RAMACHANDRAN, J.; CAPON, D.J. Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. **EMBO J.**, v.6, p. 3923-3929, 1987.

PERALTA, E.G.; ASHKENAZI, A.; WINSLOW, J.W.; RAMACHANDRAN, J.; CAPON, D.J. Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. **Nature**, v.334, p.434-437, 1988.

PEREIRA, E. C., LUCETTI, D. L., BARBOSA-FILHO, J. M., CABRAL, A. G. S., SANTOS, T. N. LIMA, N. M., PATROCÍNIO, M. C. A., SOUSA, F. C. F., MENDONÇA, A. R., MARTIN, A. L. A. R., MONTEIRO, V. S.; VASCONCELOS, S. M. M. Atividades centrais da cumarina da *Amburana cearensis* em camundongos. In: REUNIÃO REGIONAL

DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, **Anais**. Fortaleza 2008.

PEREIRA, E. C.; LUCETTI, D. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRITO, E. M.; MONTEIRO, V. S.; PATROCÍNIO, M. C. A.; MOURA, R. R.; LEAL, L. K. A. M.; MACEDO, D. S.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B.; VASCONCELOS, S. M. M. Coumarin effects on amino acid levels in mice prefrontal cortex and hippocampus. **Neuroscience Letters**, v.454, p. 139-142, 2009.

PERSINGER, M. A.; DUPONT, M. J. Emergence of spontaneous seizures during the lithium/pilocarpine-induced epilepsy and neuronal the right temporal cortices. **Epilepsy & Behavior**, v.60, p.125-129, 2004.

PERSINGER, M.A., LEUNG, L.S., STEWART, L.S. Diurnal variation in pilocarpine-induced generalized tonic-clonic seizure activity. **Epilepsy Research**, v.44, p. 207-212, 2001.

PISANI, A., BONSI, P., MARTELLA, G., DE PERSIS, C., COSTA, C., PISANI, F., BERNARDI, G., CALABRESI, P. Intracellular calcium increase epileptiform activity: modulation by levetiracetam and lamotigine. **Epilepsia**, v. 45, n. 7, p. 719-724, july 2004.

POLJSAK, B; MILISAV, I. The neglected significance of antioxidative stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2012, p. 12, 2012.

PONG, K.; YONGQI, Y.; DOCTROW, S. R.; BAUDRY, M. Attenuation zinc-induced intracellular dysfunction and neurotoxicity by a synthetic superoxide dismutase / catalase mimetic, in cultured cortical neurons. **Brain Research**, v.950, p. 218-230, 2002.

QI, L.W.; WANG, C.A.; YUAN, C.S. Ginsenosides from American ginseng: Chemical and pharmacological diversity. **Phytochemistry**, v.72, p. 689-699, 2011.

RADENOVIC, L.; VASILJEVIS, I.; SELAKOVIC, V.; JOVANOVIC, M. 7-Nitroindazole reduces nitrite concentration in rat brain after intrahippocampal kainate-induced seizure. **Comp. Biochem. Physiol.C Toxicol. Pharmacol.**, v.135, v. 4, p. 443-450, 2003.

RAJASEKARAN, K. Seizure-induced oxidative stress in rat regions: blockade by nNOS inhibition . **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v.80, p. 263-272, 2005.

RAOL, Y.H., LYNCH, D.R., BROOKS-KAYAL, A.R. Role of excitatory amino acids in developmental epilepsies. **Ment. Retard Dev. Disabil Res. Ver.**, v.2, n.4, pp. 254-260, 2001.

RATHOR, N.; ARORA, T.; MANOCHA, S.; PATIL, A.; MEDIRATTA, P.; SHARMA, KRISHNA. Anticonvulsant activity of *Ale vera* leaf extract in acute and chronic models of epilepsy in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.66, p. 477-485, 2013.

REHNI, A. K.; SINGH, T. G.; KALRA, R.; SINGH, N. Pharmacological inhibition of inducible nitric oxide synthase attenuates the development of seizures in mice. **Nitric Oxide**, 2009.

REYNOLDS, E.H e RODIN, E. The clinical concept of epilepsy. **Epilepsia**, v.50 Suppl. 3, p. 2-7, 2009.

RHO, M. L.; SANKAR, R. The pharmacological basis of antiepileptic drug action. **Epilepsia**, v.40, p. 1471-1483, 1999.

RIZZINI, C.T. Contribuição ao crescimento da tribo Justiciae (Acanthaceae). **Arq. Jard. Bot.**, v.9, p. 37-69, 1948.

ROBERTSON, C. R.; FLYNN, S.P.; WHITE, H.S.; BULAJ, G. Anticonvulsant neuropeptides as drug leads for neurological diseases. **Natural Products Reports**, v.28, p. 741-762, 2011.

RODRIGUES, A.D. et al. Neuroprotective and anticonvulsant effects of organic and conventional purple grape juices on seizures in Wistar rats induced by pentylenetetrazole. **Neurochemistry International**, v.60, p. 799-805, 2012.

ROGAWASKI, M.A., PORTER, R.J. Antiepileptic drugs: pharmacological mechanisms and clinical efficiency with consideration of promising developmental stage compounds. **Pharmacological Reviews**, p. 42,233-286, 1990.

ROSS, D.; MOLDELS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. In: VIGO-PELFREY, C. (Ed.). Membrane lipid oxidation. 1<sup>a</sup> ed. **Boca Raton: CRC Press**, p. 151-170, 1991.

ROUX, M. J.; SUPPLISSON, S. Neuronal and glial glycine transporters have different stoichiometries. **Neuron**, v.25 p. 373 – 383, 2000.

SAMUELSSON , C., KUMLIEN, E., ELFVING, A., LINDHOLM, D., RONNE-ENGSTROM, E. The effects of PBN (penthyl- butyl-nitron) on Gtl-1 levels and on the extracellular levels of amino acids and energy metabolites in a model of iron-induced posttraumatic epilepsy. **Epilepsy Res.**, v. 56, p. 165-173, 2003.

SANABRIA, E. R. G.; CAVALHEIRO, E. A. Epileptogênese: Contribuição dos modelos experimentais. In: Guerreiro, C.A.M.; Guerreiro, M.N.; Cendes, F.; Lopes-Cendes, I. **Epilepsia**, 3<sup>a</sup> ed, Lemos Editorial, São Paulo, p. 29-57, 2000.

SANTOS, N. F. Desenvolvimento do modelo de epilepsia induzido por pilocarpina em camundongos. **Dissertação em Neurociência**. Escola Paulista de Medicina, 61 p. Universidade Federal de São Paulo- UNIFESP, São Paulo, 1995.

SARANSAARI, C., OJA, S. S. Pharmacology of taurine. **Amino Acids**, v. 32, n. 3, p. 439-446, 2007.

SATTLER, R.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. **J. Mol. Med**, v. 78, p. 3-13, 2000.

SCHOUSE, A., Role of astrocytes in the maintenance and modulation of glutamatergic and GABAergic neurotransmission. **Neurochem. Res.**, v. 28, p. 347-352, 2003.

SCORZA, C. A., ARIDA, R. M., CAVALHEIRO, E. A., NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G., SCORZA, F. A., 2005. Expression of nestin in the hippocampal formation of rats submitted to the pilocarpine model of epilepsy. **Neurosci. Res.** 51 (3), 285-291.

SCORZA, F. A.; ARIDA, R. M.; CYSNEIROS, R. M.; SCORZA, C. A.; ALBUQUERQUE, M.; CALHEIROS, E. A. Estudo qualitativo da formação hipocampal de animais hipertensos com epilepsia. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v.63, n.2A, p. 283-288, 2005.

SEGARRA, A. C.; MEJÍAS-APONTE, S.A.; JIMÉNES-RIVERA, C.A. Sex differences in models of temporal lobe epilepsy: role of testosterone. **Brain Research**, v.944, pp. 210-218, 2002.

SIEGEL, R.; AGRANOFF, B.; ALBERS, R.W.; MOLINOFF, P. Basic Neurochemistry – Molecular, Cellular and Medical Aspects. E.U.A.: **Raven. Press.**, 4th ed., 1989.

SILVA, M. I. G.; SILVA, M. A. G.; NETO, M. R. A.; MOURA, B. A.; SOUSA, H. L.; LAVOR, E. P. H.; VASCONCELOS, P. F.; MACÊDO, D. S.; SOUSA, D. P.; VASCONCELOS, S. M. M.; SOUSA, F. C. Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. **Fitoterapia**, 2009.

SIMONIÉ, A.; LAGINJA, J.; VARLJEN, J.; ZUPAN, G.; ERAKOVIC, V. Lithium plus pilocarpine induced status epilepticus – biochemical changes. **Neuroscience Research**, v.36, p. 157-166, 2000.

SINGH, S.; HOTA, D.; PRAKASH, A.; KHANDUJA, K.L.; ARORA, S. K.; CHAKRABARTI, A. Allopregnanolone, the active metabolic of progesterone protects against neuronal damage in picrotoxin-induced seizure model in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.94, p. 416-422, 2010.

SMITH, C. R.; WILCOX, K. S. e WHITE, H. S. Discovery of antiepileptic drugs neurotherapeutics. **Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics** v. 4, p. 12-17, 2007.

SMITH, P. D., MCLEAN, K. J., MURPHY, M. A., TURNLEY, A. M., COOK, M. J. Functional dentate gyrus neurogenesis in a rapid kindling seizure model. **European Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 11, p. 3195-3203, Dec 2006.

SOLLAS, A. L.; GOODMAN, J. H.; SMITH, K. L.; SCHARFMAN, H. E. Survival of dentate hilar mossy cells after pilocarpine-induced seizures and their synchronized burst discharges with area CA3 pyramidal cells. **Neuroscience**, v.104, n. 3, p. 741-759, 2001.

SOSUNOV, A. A.; KRUGLYAKOV, P. P.; Mc CANN, G. M.; KASPERSER, K.; KHOKHRYAKOV, A. V.; IVANOV, N. M.; SHIKHANOV, N. P. Studies of damage to hippocampal neurons in inbred mouse lines in models of epilepsy using kainic acid and pilocarpine. **Neurosci. Behav. Physiol.**, v.35, p. 623-638, 2005.

SOUSA, M.P. et al. Constituientes químicos de plantas medicinais brasileiras. **Fortaleza: Impr. Universitária**, p. 416, 1991.

SPINOSA, H.S.; GORNIAK, S.L.; PALERMONETO, J. **Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária**. P. 942, 2008.

STAMLER, J.S.; SIMON, D.I.; OSBORNE, J.A.; MULLINS, M.E.; JARAKI, O.; MICHEL, T.; SINGEL, D.J.; LOSCALZO, J. S-Nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.89, p. 444-448, 1992.

STEFAN, H.; PAULINI-RUF, A.; HOPFENGÄETNER, R.; RAMPP, S. Network characteristics of idiopathic generalized epilepsies in combined MEG/EEG. **Epilepsy Research**, v. 85, p. 187-198, 2009.

SURGES, R.; VOLYNSKI, K. E.; WALKER, M. C. Is levetiracetam different from other antiepileptic drugs? Levetiracetam its cellular mechanism of action in epilepsy revisited. **Ther. Adv. Neurol. Disord.**, v.1, 13–24, 2008.

SUTULA, T. P.; CAVAJOS, J. E.; WOODARD, A. R. Long-term structural and functional alterations induced in the hippocampus by kindling: implications for memory dysfunction and development of epilepsy. **Hippocampus**, v.4, p. 254-258, 1994.

SWINYARD, E. A.; KUPFERBERG, H. J. Antiepileptic drugs: detection, quantification and evaluation. **Federal Proceedings**, v. 44, p.3, 1985.

SZABÓ, C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, v.6, p. 917–935, 2007.

SZYNDLER, J.; BOBTOWICZ, T.W.; SKÓRZEWSKA, A.; MACIEJAK, P.; WALKOWIAK, J.; LECHOWICZ, W.; TURZYNSKA, D.; BIDZINSKI, A.; PLAZNIK, A. Behavioral, biochemical and histological studies in a model of pilocarpine-induced spontaneous recurrent seizures. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 81. pp. 15-23, 2005.

TAKUMA, K.; BABA, A.; MATSUDA, T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. **Progress in Neurobiology**, v. 72, n. 2, p. 111–127, 2004.

TANG, Y. Y.; LU, Q.; FAN, M.; YANG, Y.; POSNER, M. I. Mechanisms of white matter changes induced by meditation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.109, p. 1–5, 2012).

THORNES, R.D.; SHEEHAN, M.V. Coumarin and cimetidine in malignant melanoma. **Irish Medical Journal**, v.76, p. 1, 1983.

TILLEY, L. P. Consulta veterinária em 5 minutos espécies canina e felina. 2º ed. Barueri, SP: **Manole**, 2003.

TRAVÉ, T.D.; PETRI, M.E.Y.; VICTORIANO, F.G. Incidencia de la epilepsia infantil. **Anales de pediatria** (Barcelona), v.67 (1), p. 37-43, 2007.

TURRENS, J. F.; ALEXANDRE, A.; LEHNINGER, A. L. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.237, p. 408-414, 1985.

TURSKI, W.A., CAVALHEIRO, E.A., SCHWARTZ, M., CZUCZWAR, S.J., KLEINROK, Z., TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav. Brain Res.**, v. 9, p. 315-335, 1983a.

TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; BORTOLLOTO, Z. A.; MELLO, L. M.; SCHWARZ, M.; TURSKI, L. Seizures produced by pilocarpine in mice a behavioral electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Research**, v.321, p. 237-254, 1984.

TURSKI, W. A.; CZUCZWAR, S. J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L. Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. **Experientia**, v.39, p.1408-1411, 1983b.

USUI, K.; HULLEMAN, J.D.; PAULSSON, J.F.; SIEGEL, S.J.; POWERS, E.T.; KELLY, J.W. Site-specific modification of Alzheimer's peptides by cholesterol oxidation products enhances aggregation energetics and neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United St.**, v.6 (44) p. 18563-8, 2009.

UZÜM, G.; AKGÜN-DAR, K.; BAHÇEKAPILI, N.; DILER, A. S.; ZIYLAN, Y. Z. Nitric oxide involvement in seizures elicited by pentylenetetrazol and sex dependence. **Int. J. Neurosci.**, v.115, n. 11, p. 153-1514, 2005.

VACHER, H.; MOHAPATRA, D.P.; TRIMMER, J.S. Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. **Physiol. Rev.**, v.88 (4) p. 1407-47, Oct. 2008.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biol Inter.**, v.160, p. 1–40, 2006.

VAN DEN EYNDEN, J.; SAHEBALI, S.; HORWOOD, N.; CARMANS, S.; BRONE, B.; HELLINGS, N.; STEELS, P.; HARVEY, R.; RIGO, J.M. Glycine and glycine receptor signaling in non-neuronal cells. **Front Mol Neurosci**, v. 2, p. 9, 2009.

VAN DER KRAAIJ, A.M.M.; MOSTERT, L.J.; VAN EIJK, H.G.; KOSTER, J.F. Ironload increases the susceptibility of rat hearts to oxygen reperfusion damage. **Circulation**, v.78, p. 442-449, 1988.

VELISEK, L. Models of chemically induced acute seizures. In: Pitkanen, A.; Schwartzroin, P.A.; Moshe, S.L., editors. Models of seizures and epilepsy. **New York: Elsevier Academic Press.**, p. 127-152, 2006.

VENÂNCIO, E.T.; ROCHA, N.F.M.; RIOS, E.R.V.; FEITOSA, M.L.; LINHARES, M.I.M.; MELO, F.H.C.; MATIAS, M.S.; FONSECA, F.N.; SOUSA, F.C.F.; LEAL, L.K.A.M.; FONTELES, M.M.F. Anxiolytic-like effects of standardized extract of *Justicia pectoralis* (SEJP) in mice: involvement of GABA/ Benzodiazepine in receptor. **Phytotherapy Research**, v.25, p. 444-450, 2011.

VERMA, S.; SINHA, R.; KUMAR, P.; AMIN, F.; JAIN, J.; TANWAR, S. Study of *Convolvulus pluricaulis* for antioxidant and anticonvulsant activity. **Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.**, 2012.

VIANNA, E.P.M.; FERREIRA, A.T.; DONA, F.; CAVALHEIRO, E.A.; FERNANDES, M.J.S. Modulation of seizures and synaptic plasticity by adenosinergic receptors in an experimental model of temporal lobe epilepsy induced by pilocarpine in rats. **Epilepsia**, 46 (Suppl. 5) p. 166-173, 2005.

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

WALZ, R.; MOREIRA, J. C. F.; BENFATO, M. S.; QUEVEDO, J.; SCHORER, N.; VIANNA, M. M. R.; KLAMT, F.; DAL-PIZZOL, F. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. **Neurosci. Lett.**, v.291, p. 179-182, 2000.

WANG, G. H., JIANG, Z. L., FAN, X. J., ZHANG, L; LI, X., KE, K. F., Neuroprotective effect of taurine against focal cerebral ischemia in rats possibly mediated by activation of both GABA<sub>A</sub> and glycine receptors. **Neuropharmacology**, v. 52, n. 5, p.1199-1209, Apr 2007.

WASTERLAIN, C.G.; FUJIKAWA, D.G.; PENIX, L.; SANKAR, R. Pathophysiological mechanisms of brain damage from status epilepticus. **Epilepsia**, v.34 (1), p. 37-53, 1993.

WATKINS, J. C., OLERMAN, H. J. Excitatory amino acids in the brain-focus on NMDA receptors. **Trends Neurosci.**, v. 10, p. 265-272, 1987.

WEISS, J.; BUHL, T.; LAMBRECHT, G.; MUTSCHLER, E. Cholinergic receptors. **In Comprehensive Medicinal Chemistry**, v.3, p. 423-491, 1990.

WEST, M., HUANG, W. Spinal Cord excitatory amino acids and cardiovascular autonomic response. **Am J Physiol.**, v. 267, p. H685-73, 1994.

WHITING, P. J. The GABA-A receptor gene family: new targets for therapeutic intervention. **Neurochem. Int.** v.34 (5), p. 387-90, May. 1999.

WHO. Epilepsy. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html>>. Acesso em: 9 mar. 2010.

WU, J.Y.; PRENTICE, H. Role of taurine in the central nervous system. **J Biomed Sci.**, v. 24, n.17, suppl 1, 2010.

YAN, J. J.; KIM, D. H.; MOON, Y. S.; JUNG, J. S.; AHN, E. M.; BAEK, N. I.; SONG, D. K. Protection against beta-amyloid peptideinduced memory impairment with long-term administration of extract of Angelica gigas or decursinol in mice. **Prog. Neuro-psychoph.**, v. 28, p. 25-30, 2004.

YA'U, J.; YARO, A. H.; ABUBAKAR, M. S.; ANUKA, J. A.; HUSSAINI, I. M. Anticonvulsant activity of Carissa edulis (Vahl) (Apocynaceae) root bark extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 255-258, 2008.

YU, F.H.; MANTEGAZZA, M.; WESTENBROEK, R.E.; ROBBINS, C.A.; KALUME, F.; BURTON, K.A.; SPAIN, W.J.; MCKNIGHT, G.S.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W.A.

Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. **Nat. Neurosci.**, v.9 p. 1142–1149, 2006.

ZHONG, Z.; WHEELER, M. D.; LI, X.; FROH, M.; SCHEMMER, P.; YIN, M.; BUNZENDAUL, H.; BRADFORD, B.; LEMASTERS, J. J. L-Glycine: a novel antiinflammatory, immunomodulatory and cytoprotective agent. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v. 6, p. 229-240, 2003.