



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

TALITA MATIAS BARBOSA CAVALCANTE

**AÇÃO ANTICONVULSIVANTE E NEUROPROTETORA DA IVABRADINA EM
CAMUNDONGOS**

FORTALEZA

2017

TALITA MATIAS BARBOSA CAVALCANTE

**AÇÃO ANTICONVULSIVANTE E NEUROPROTETORA DA IVABRADINA EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Dr^a Silvânia Maria Mendes Vasconcelos.

Co-orientador: Dr Carlos Clayton Torres Aguiar.

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C364a Cavalcante, Talita Matias Barbosa.
Ação anticonvulsivante e neuroprotetora da ivabradina em camundongos / Talita Matias
Barbosa Cavalcante. – 2017.
86 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina,
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Profa. Dra. Maria Silvânia Mendes Vasconcelos.
Coorientação: Prof. Dr. Carlos Clayton Torres Aguiar.

1. Ivabradina. 2. Convulsão. 3. GABA. I. Título.

CDD 615.1

TALITA MATIAS BARBOSA CAVALCANTE

AÇÃO ANTICONVULSIVANTE E NEUROPROTETORA DA IVABRADINA EM
CAMUNDONGOS

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Universidade Federal do
Ceará como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Farmacologia

Aprovada em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Silvânia Maria Mendes Vasconcelos (UFC)

Profª Drª Arlândia Cristina Lima Nobre de Moraes (UNIFOR)

Prof Dr Ricardo de Freitas Lima (UFC)

A Deus.

Às minhas avós, Francisca e Maísa

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por ser a base que me sustenta, por me iluminar e por permitir que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, Rita de Fátima e Luiz Barbosa pelo amor, carinho e ensinamentos durante toda a minha vida e pela compreensão da minha ausência durante este tempo de pós-graduação. Aos meus avós, pela bela criação que tive e por terem investido e acreditado em meus sonhos. Ao meu irmão pelo apoio e ajuda.

Ao Wagner Bezerra Cavalcante, meu esposo, amigo e professor pelo amor, paciência, por não medir esforços para me ajudar sempre que preciso. Pelo exemplo de determinação que me encoraja a ser uma pessoa melhor. Por ser a calma e a doçura que eu preciso nos momentos difíceis. Pela compreensão de minha ausência.

À professora Silvânia Maria Mendes Vasconcelos, minha orientadora, pela confiança que depositou em mim durante todos esses anos, desde o período de iniciação científica. Por ser uma pessoa tão capacitada, humilde, inteligente e sempre disposta a ajudar seus alunos no que for preciso. Agradeço a confiança e base para concretização do meu sonho e por ter me recebido, de braços abertos, em seu grupo de pesquisa.

Ao professor Carlos Clayton Torres Aguiar, meu co-orientador e maior incentivador, pela paciência, por acreditar em mim, por transmitir confiança, por me fazer ver as coisas de uma forma mais simples. Pela orientação, pelas críticas, e pela confiança para concretização do projeto.

À professora Adriana Rolim, exemplo de profissional, de humildade, disponibilidade e capacidade, por toda a ajuda durante todo o período do meu mestrado. Tornando a caminhada muito mais leve. Por todas as contribuições feitas, por ter me aberto muitas portas e cedido todo seu material e laboratório para o desenvolvimento do meu trabalho.

Ao professor Rafael Sampaio, exemplo de enfermeiro e amigo, pelo incentivo, ensinamentos desde minha época na iniciação científica.

Ao professor Eduardo Ribeiro pela paciência e por toda contribuição para o desenvolvimento de minha pesquisa.

Aos meus companheiros, José de Maria, Lia Bastos, Jéssica Gurgel, Matheus Costa, Sacha Aubrey, Lucas Borges, Charliene Xavier, Kátia Cilene, Pedro Everson, Ítalo Rosal, Marina Bastos, Ernani Magalhães, Regilane Alves, Dara Lopes, Jéssica Barbosa, Mércia Jucá, Paulo Victor, Maurício Cisne e Jamilly por todo o apoio e ajuda para o desenvolvimento deste trabalho, pois não se faz pesquisa sozinho e, sem vocês a caminhada teria se tornado muito mais difícil.

À Vila, Lena e Luciana pelo apoio técnico, amizade e cafés nos momentos mais difíceis.

A Nicácia, bibliotecária da biblioteca de ciências da saúde da Universidade Federal do Ceará pela revisão das normas desta dissertação.

À sociedade pela oportunidade e investimento financeiro a mim oferecidos através de um estudo de qualidade, ótima infraestrutura, professores capacitados e condições para o desenvolvimento da pesquisa. Espero devolver todo o investimento em forma de serviço capacitado e de qualidade.

Aos órgãos de fomento a pesquisa CNPq, CAPES e FUNCAP pelo apoio financeiro.

RESUMO

Epilepsia é uma doença que atinge aproximadamente 1% da população mundial e pode levar a déficit neurológico, disfunção intelectual, problemas comportamentais e social. É definida pela capacidade de gerar crises convulsivas recorrentes onde atualmente 30% de todos os pacientes não respondem a nenhum tipo de terapia. Ivabradina é um agente antianginoso e antiarrítmico que tem como principal mecanismo de ação o bloqueio dos canais de nucleotídeos cíclicos ativados por hiperpolarização(HNC). Estudos prévios tem relacionado a ação desse fármaco com crises convulsivas. Assim, o objetivo do presente trabalho foi estudar os possíveis efeitos anticonvulsivantes e neuroprotetores da Ivabradina, através de modelos químicos (pentilenotetrazol- PTZ, picrotoxina- PICRO e pilocarpina- PILO) de indução de convulsão em camundongos, avaliando as alterações neuroquímicas produzidas em córtex pré- frontal, hipocampo e corpo estriado e estudo de *docking* molecular nos receptores gabaérgicos (ácido gama-aminobutírico- GABA_A) e glutamatérgico (N-metil-D-aspartato- NMDA). Animais foram pré-tratados com Ivabradina- IVA (1, 10 ou 20mg/kg) ou solução salina intraperitoneal durante 3 dias. No último dia foram administrados os agentes convulsivantes e observados por 30 (modelo de PTZ- 85mg/kg, i.p. e PICRO-10mg/kg i.p.) ou 60 minutos (PILO- 400mg/kg s.c.) e, logo após, as áreas cerebrais (córtex pré-frontal- CPF, hipocampo- HC e corpo estriado- CE) foram retiradas para análise de estresse oxidativo pelos seguintes testes: dosagem do nível de malonaldeído (MDA), nitrito e glutathiona reduzida (GSH). Também foram realizados os *dockings* moleculares entre IVA e receptor GABA_A, IVA e receptor NMDA e diazepam e receptor GABA_A. Os resultados mostraram ação anticonvulsivante da IVA no modelo de convulsão induzido por PTZ, através do aumento da latência para morte (IVA 1mg/Kg: 978,3±193,0 e 10 mg/Kg: 1309,0±203,1) quando comprado ao grupo controle (235,0±42,8) e aumento do percentual de sobrevivência (IVA 10 mg/Kg: 62,5%). Efeito semelhante foi observado na convulsão induzido por PICRO, através do aumento da latência para a primeira convulsão (IVA 10 mg/Kg: 582,2±42,0) quando comparado ao controle (426,0±22,8). Também foi observado um efeito antioxidante da IVA através da redução dos níveis de MDA e aumento dos níveis de GSH nas três áreas estudadas. No estudo de *docking* molecular ivabradina mostrou compatibilidade química,

espacial e energética com o receptor GABA_A. Em conclusão os nossos resultados mostraram que IVA apresentou ação anticonvulsivante e neuroprotetora nos modelos de PTZ e PICRO além de exibir interação com o receptor GABA_A.

Palavras-chave: Ivabradina. Convulsão.GABA.

ABSTRACT

ANTICONVULSANT AND NEUROPROTECTIVE ACTION OF IVABRADINE IN MICE

Epilepsy is a disease that reaches approximately 1% of the world population and can lead to neurological deficit, intellectual dysfunction, behavioral and social problems. It is defined by the ability to generate recurring seizures crises where currently 30% of all patients do not respond to any kind of therapy. Ivabradine is an agent Antianginal and na Antiarrhythmic that has as the main mechanism of action the blocking of cyclic nucleotide channels activated by Hyperpolarization (HNC). Previous studies have related to the action of this drug with seizures crises. Thus, the objective of this work was to study the possible anticonvulsants and neuroprotective effects of Ivabradine, through chemical models (Pentilenotetrazole-PTZ, Picrotoxine-PICRO and Pilocarpine-PILO) of induction of convulsions in mice, evaluating the neurochemical changes produced in the pre-frontal cortex, hipocampo and cortex striatum body and study of molecular docking in the receptors GABAérgics (gamma-aminobutyric acid-GABA_A) and glutamatérgics (N-methyl-D-aspartate-NMDA receptor). Animals were pretreated with Ivabradine-IVA (1, 10 or 20mg/kg) or saline solution intraperitoneal for 3 days. The last day were administered the agents convulsivants and observed by 30 (model of PTZ-85mg/kg, i.p. and PICRO-10mg/kg i.p.) or 60 minutes (PILO-400mg/kg s.c.) and, shortly after, the cerebral areas (pre frontal cortex-P.F.C., Hipocampo-H.C. and cortex, striatum S.E.) were removed for oxidative stress analysis by the following tests: dosage of the Malonaldeído level (MDA), nitrite and reduced glutathione (GSH). The molecular fittings between IVA and receiver GABA, IVA and receiver NMDA receptor and diazepam and GABA_A receptor were also carried out. The results showed anticonvulsant action of IVA on the PTZ-induced convulsion model, through increased latency to death (IVA 1mg/kg: 978, 3 ± 193, 0 and 10 mg/kg: 1309, 0 ± 203, 1) when compared to the control group (235, 0 ± 42, 8) and increase of survival percentage (IVA 10 mg/kg: 62, 5%). Similar effect is observed in the seizure induced by PICRO, through the increase in the first latency (IVA 10 mg/kg: 582, 2 ± 42, 0) when compared to the control (426, 0 ± 22, 8). It was also observed an antioxidant effect of IVA by reducing the MDA levels and increased levels of GSH in the three

studied areas. In the study of molecular docking Ivabradine showed chemical, spatial and energetic compatibility with the GABA_A receptor. In conclusion, our results showed that IVA presented anticonvulsant and neuroprotective action in the PTZ and PICRO models besides displaying interaction with the GABA_A receptor.

Keywords: Ivabradine. Seizure. GABA.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
ATP	Trifosfato de adenosina
AMPAD-L	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxalona-propionato
a.C	Antes de Cristo
ANOVA	Análise de variância
Cl ⁻	Cloro
Ca ⁺⁺	Cálcio
CE	Corpo estriado
CPF	Córtex pré-frontal
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
°C	Grau Celsius
DAEs	Drogas antiepilépticas
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (reagente de Ellman)
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
EEG	<i>Eletroencefalográfica</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino-tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GSH	Glutationa
HCN	Canais de nucleotídeos cíclicos ativados por hiperpolarização
HC	Hipocampo
Hz	Hertz
IVA	Ivabradina
If	Current funny
i.p.	Intraperitoneal
kg	Quilograma
mg	Miligrama
ms	Milisegundo
mA	Miliampere

mL	Mililitro
mM	Milimolar
μl	Microlitro
mcg	Micrograma
MDA	Malonil-dialdeído ou malonaldeído
NMDA	N-metil-D-aspartato
Na ⁺	Sódio
NIH	<i>National Institutes of Health for the Care of Use Laboratory Animals</i>
nm	Nanomolar
NO	Oxido nítrico
NaNO ₂	Nitrito de sódio
Need	N-1-naftiletilenodiamina
PTZ	Pentilenotetrazol
PICRO	Picrotoxina
PILO	Pilocarpina
RL	Radicais Livres
rpm	Rotações por minutos
SNC	Sistema Nervoso Central
s	Segundo
s.c	Subcutânea
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
Zn	Zinco

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Síntese de glutamato e ciclo entre neurônio e célula da glia	17
Figura 2-	Representação da estrutura do receptor GABA _A .	19
Figura 3-	Estrutura Química da Ivabradina	25
Figura 4-	Desenho Experimental modelos de convulsão	35
Figura 5-	Efeitos da Ivabradina nos níveis de Malonaldeido no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em convulsões induzidas por Petilenotetrazol em camundongos	44
Figura 6-	Efeitos da Ivabradina nos níveis de nitrito no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em convulsões induzidas por Petilenotetrazol em camundongos	45
Figura 7-	Efeitos da Ivabradina nos níveis de GSH no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em convulsões induzidas por Petilenotetrazol em camundongos	46
Figura 8-	Efeitos da Ivabradina nos níveis de Malonaldeido no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em convulsões induzidas por Picrotoxina em camundongos.	48
Figura 9-	Efeitos da Ivabradina nos níveis de nitrito no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em convulsões induzidas por Picrotoxina em camundongos.	49
Figura 10-	Efeitos da Ivabradina nos níveis de GSH no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em convulsões induzidas por Picrotoxina em camundongos.	50
Figura 11-	Estrutura tridimensional do receptor GABA _A	44
Figura 12-	Vista ampliada do sítio de interação	52
Figura 13-	Visão superior do canal GABA _A complexado com Diazepam.	55
Figura 14-	Visão superior do canal GABA _A complexado com os clusters mais energéticos de Diazepam	56
Figura 15-	Receptor NMDA e a Ivabradina nas 10 posições de maior	57

energia.

Figura16- Complexo NMDA-Ivabradina e resíduos de aminoácidos 58 envolvidos na interação entre NMDA e Ivabradina

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Efeito da ivabradina em modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol em camundongos.	40
Tabela 2-	Efeito da ivabradina em modelo de convulsão induzido por picrotoxina em camundongos.	41
Tabela 3 -	Efeito da ivabradina em modelo de convulsão induzidos por pilocarpina em camundongos.	42
Tabela 4 -	Energia da região de interação do complexo GABAA/Ivabradina (kcal/mol).	54

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Epilepsia	14
1.2 Fisiopatologia	16
<i>1.2.1 Neurotransmissores e epilepsia.....</i>	<i>16</i>
1.3 Estresse Oxidativo e epilepsia	20
1.4 Tratamentos Farmacológico	21
1.5 Avaliação experimental das drogas antiepilépticas	23
1.7 Docking Molecular	27
2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	29
3 OBJETIVO	31
3.1 Geral	31
3.2 Específicos.....	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Animais.....	32
4.2 Drogas.....	32
4.3 Tratamento dos grupos experimentais.....	32
4.3.1.1 Pentilenotetrazol (PTZ)	33
4.3.1.2 Picrotoxina (PICRO)	33
4.3.1.3 Pilocarpina (PILO)	33
4.4 Avaliação do estresse oxidativo	36
4.5 Estudo do Docking Molecular	37
4.6 Análise Estatística	39
5 RESULTADOS.....	40
5.1 Ação Anticonvulsivante da Ivabradina.....	40

5.2 Estresse Oxidativo	43
5.3 Estudo do Docking Molecular	51
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÃO	66
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

Os casos mundiais de epilepsia atingem aproximadamente 65 milhões de pessoas com uma estimativa de 2,4 milhões de novos casos a cada ano (WHO, 2017). É uma das doenças mais comuns e debilitantes no mundo, acomete cerca de 1 % da população mundial (KANDEL, 2014). Existem evidências de sua associação a déficit neurológico, disfunção intelectual, psicológicas, problemas comportamentais e sociais (SHEFFER *et al.*, 2017). A causa de muitos transtornos epiléticos é desconhecida em, aproximadamente, 60% dos pacientes (THOMAS; BERKOVIC, 2014). Estima-se que a prevalência de epilepsia ativa é de 5-8 para 1.000 habitantes em países de alta renda e de 10 para 1.000 habitantes em países de baixa renda, taxas ainda mais altas foram reportadas em áreas rurais (HIRTZ *et al.*, 2007; NGUGI *et al.*, 2010).

A taxa de mortalidade entre as pessoas com epilepsia, em países desenvolvidos, é de duas a cinco vezes superior que da população em geral, mas pode ser até 37 vezes maior em países de baixa renda. A taxa de mortalidade pode ser ainda maior entre os mais jovens (10 a 29 anos) e no início das crises principalmente devido as comorbidades relacionadas a mesma (NELIGAN *et al.*, 2010; DING *et al.*, 2013). Segundo pesquisa realizada por Ferreira e Silva (2009) através de informações acerca dos óbitos obtidas do Subsistema de Informações sobre Mortalidade do Ministério da Saúde (SIM/MS) foram registrados 32.655 óbitos decorrentes de epilepsia no Brasil, no período de 1980 a 2003.

Além disso, as crises convulsivas podem ocorrer em até 10% da população em qualquer momento da vida. Desses, metade ocorrerá durante a infância e a adolescência. E quase um terço de todos os pacientes com diagnóstico de epilepsia recente terão epilepsia não completamente controlada (KWAN; BRODIE, 2000). Aproximadamente, 30% de todos os pacientes não respondem a nenhum tipo de terapia e apresentam mortalidade 2 a 3 vezes maior que a população geral (MORIMOTO *et al.*, 2004).

O termo convulsão refere-se à alteração transitória do comportamento e disparo rítmico recorrente, sincrônico e desordenado de populações de neurônios

cerebrais. Episódios de convulsões resultam de descargas elétricas em excesso em um grupo de células cerebrais(BRUNTON, 2006).

E epilepsia é definida pela capacidade de gerar crises convulsivas recorrentes e pode ser classificada clinicamente por qualquer uma das seguintes condições: Pelo menos duas convulsões não provocadas ocorrendo em um intervalo maior que 24 horas entre as mesmas; uma convulsão não provocada com risco de ocorrência de pelo menos 60 % nos próximos 10 anos após as duas convulsões; ou pode ser definida como síndrome epiléptica (FISHER et al., 2014; KANDEL, 2014). Síndrome epiléptica pode ser definida de acordo com sinais e sintomas, como tipo de crise, idade de início, histórico familiar e achados eletroencefalográficos, que juntos formam a descrição de epilepsia (ILAE,1989).

As crises epiléticas podem ser classificadas como focais, generalizadas, combinadas generalizadas e focais e de causa desconhecida. As focais envolvem um hemisfério cerebral (SHEFFER *et al.*, 2017). Originam-se em um pequeno grupo de neurônios, portanto, os sintomas vão depender da localização do foco epilético (KANDEL, 2014). As crises generalizadas, envolvem ambos os hemisférios cerebrais desde o início da crise, o paciente apresenta atividade generalizada no eletroencefalograma (EEG) (FISHER *et al.*, 2014). Podem ser divididas em crises convulsivas (mioclônica, clônica ou tônica e tônico-clônica) e crises não convulsivas (crise de ausência) (KANDEL, 2014). As convulsões mioclônicas correspondem a uma contração muscular breve, cerca de um segundo, semelhante a um choque, que pode ser restrita a uma extremidade do corpo ou ser generalizada, as clônicas são definidas como uma série de movimentos espasmódicos e as tônico-clônicas são caracterizadas como o aumento do tônus muscular seguido de movimentos espasmódicos (RUBINSON; LANG, 2009)

Epilepsias combinadas generalizadas e focais, onde os pacientes têm diagnóstico apoiado por achados no EEG, pela presença de descargas generalizadas e descargas epileptiformes focais. E desconhecida, quando o paciente tem epilepsia mas o clínico não consegue definir se o tipo de epilepsia é focal ou generalizado porque não há informação suficiente disponível, como por exemplo, não haver acesso ao EEG, ou os estudos de EEG podem ter sido não-informativos, ou apresentar resultados dentro do padrão de normalidade (SHEFFER *et al.*, 2017).

As epilepsias podem ser classificadas, dependendo da causa, como idiopática, provocada ou sintomática. A epilepsia idiopática é definida como tendo uma causa genética e não há alterações neuroanatômicas ou neuropatológicas significativas. As provocadas devem suas causas, principalmente, a fatores ambientais ou sistêmicos específicos, sem anomalias neuroanatômicas ou neuropatológicas significativas. As epilepsias sintomáticas podem ser causadas por trauma, tumor, infecção, malformação ou doença genética sistêmica (SHORVON, 2011).

1.2 Fisiopatologia

1.2.1 Neurotransmissores e epilepsia.

A fisiopatologia da epilepsia é multifatorial, esta pode sofrer influência de fatores estruturais, genéticos, metabólicos, imunológicos, causas desconhecidas, infecciosos como também estar relacionada a neurotransmissão (SHEFFER *et al.*, 2017).

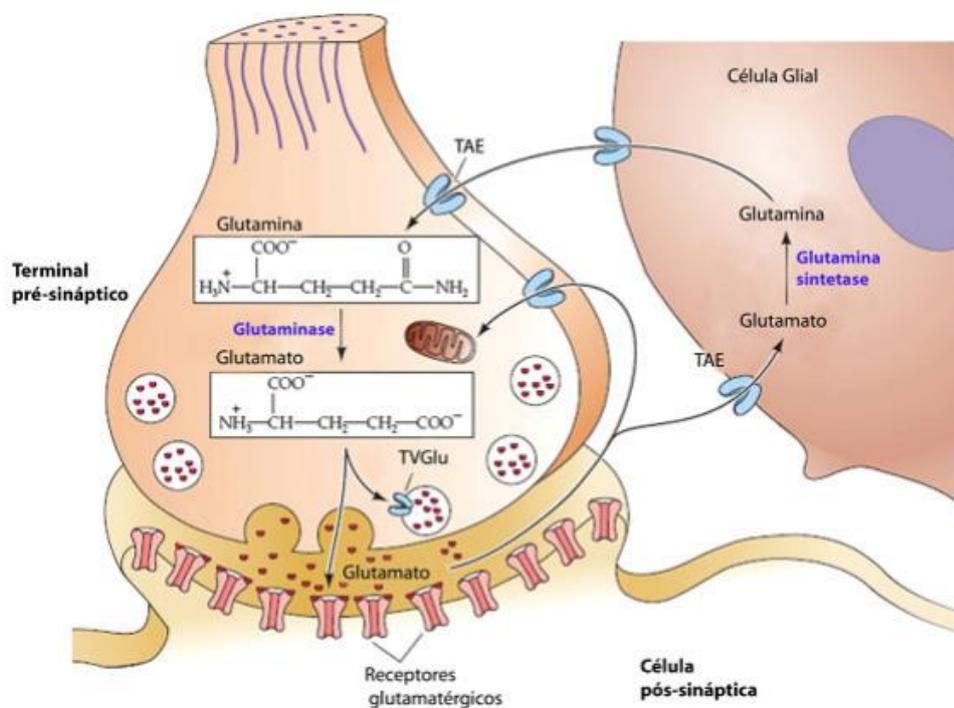
O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório presente em grande parte das sinapses excitatórias do sistema nervoso central (SNC). É sintetizado a partir da glutamina. Ele está envolvido no desenvolvimento neural, na plasticidade sináptica, atividades como memória e aprendizagem (Figura 1) (RUBINSON; LANG, 2009; NAIE; VAUGHAM, 2004; WILLARD; KOOCHKPOUR, 2013). Os receptores de glutamato podem ser ionotrópicos ou seja, receptores de canais iônicos ativados por ligante, ou metabotrópicos. Os ionotrópicos são D-L- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxalona-propionato (AMPA), cainato e N-metil-D-aspartato (NMDA). Enquanto os receptores metabotrópicos são acoplados a proteína G e participam de forma indireta da abertura de canais pela produção de segundos mensageiros (GOODMAN; GILMAN, 2012; KANDEL, 2014). Como a epilepsia é uma doença caracterizada pela capacidade de hiperexcitabilidade, a desregulação do glutamato é crítica para o desenvolvimento de epilepsia (DINGLELINE, 2012).

O aumento da estimulação dos receptores pós-sinápticos de glutamato do tipo NMDA, induz convulsões e dano neuronal. Estes geram mudanças paroxísticas

despolarizantes sobre focos epilépticos, que por sua vez são capazes de originar descargas na epileptogênese (KOHL; DANNAHARDT, 2001).

Os receptores NMDA são canais iônicos permeáveis a íons Na^+ , Ca^{2+} (maior permeabilidade que os receptores AMPA e cainato). Os receptores NMDA estão inibidos por Mg^{++} em seu estado de repouso. Após a despolarização da membrana, o Mg^{++} é removido do seu sítio de ligação ao receptor e, com isso, mais corrente flui através do canal. Nesse sentido o receptor NMDA conduz melhor a corrente quando a célula está despolarizada e quando o glutamato se liga ao mesmo. Os receptores AMPA e cainato conduzem Na^+ e Ca^{2+} . Por esta razão, estes receptores são denominados como receptores glutamatérgicos ionotrópicos. O potencial de ação causado pelo influxo de íons através dos receptores AMPA possui papel importante na ativação dos receptores NMDA (PINHEIRO; MULLE, 2008; KANTROWITZ; JAVIT, 2010; KANDEL, 2014).

Figura 1 Síntese de glutamato e ciclo entre neurônio e célula da glia.



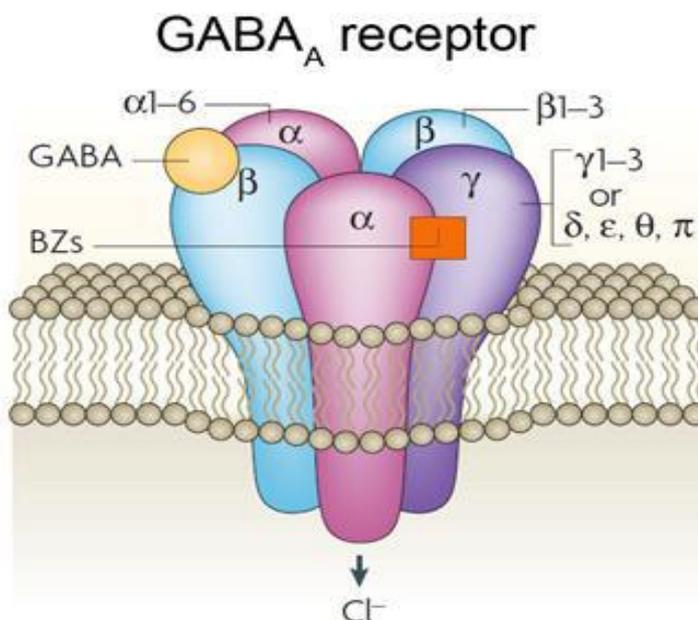
Fonte RUGGIERO *et al.*, 2011: O glutamato, um neurotransmissor excitatório sintetizado a partir da glutamina, é armazenado em vesículas e liberado na fenda sináptica, onde seus efeitos podem ser limitados por sua recaptação através de transportadores presentes na célula da glia e neurônios vizinhos (RUGGIERO *et al.*, 2011).

Altas concentrações de glutamato nos neurônios podem gerar uma elevação significativa do influxo de Ca^{2+} através dos receptores NMDA, causando assim um aumento das lesões neuronais devido à excitotoxicidade, podendo levar a morte da célula e neurodegeneração (FRIEDELER, 2003).

O ácido gama- aminobutírico (GABA) é o principal transmissor inibitório no encéfalo e na medula espinhal, exercendo um importante papel no sistema nervoso, pois atuam na prevenção da excitação excessiva e coordenação das atividades das redes de neurônios. A transmissão sináptica inibitória é mediada por canais ionotrópicos GABAérgicos e glicinérgicos que possuem permeabilidade ao cloreto (KANDEL *et al.*, 2014). O glutamato e o GABA, armazenados em vesículas sinápticas, sofrem exocitose em resposta ao aumento da concentração de Ca^{++} , onde se ligam a receptores pós-sinápticos. Os receptores GABAérgicos estão classificados em três tipos: GABA_A e GABA_C (receptores ionotrópicos) e GABA_B (receptores metabotrópicos) (Figura 1-2) (RUBINSON; LANG, 2009).

Os receptores GABA_A e GABA_C são canais iônicos que permitem o influxo de Cl^- , levando assim a uma hiperpolarização localizada na membrana neuronal, dificultando o disparo do potencial de ação necessário para a liberação de neurotransmissores (PAUL, 1995). O receptor GABA_A corresponde a um receptor pentamérico que possui cinco subunidades (duas subunidades α , duas subunidades β e uma subunidade γ ou δ) vários fármacos ou agonistas se ligam a diferentes regiões deste receptor (Figura 2). Os receptores GABA_B agem através da ativação, por segundos mensageiros, dos canais de K^+ e, conseqüentemente, hiperpolarização da célula pós-sináptica, reduzem, também, a condutância de Ca^{++} (GOODMAN; GILMAN, 2012).

Figura 2: Representação da estrutura do receptor GABA_A.



Fonte: Jacob *et al.*, 2008. Receptor GABA_A, pentamérico (subunidades 2 alfas, 2 betas e 1 gama) formando um canal permeável ao Cl⁻.

Um dos principais mecanismos envolvidos na geração de crises têm sido baseados no aumento da excitação glutamatergica e diminuição da inibição GABAérgica. Quando a inibição GABAérgica não é suficiente para controlar o aumento da excitação glutamatergica, as descargas progridem e dão origem às crises epilépticas espontâneas e recorrentes (KANDEL, 2014).

A acetilcolina (ACh), sintetizada a partir da acetil coenzima A e colina, está presente em neurônios do córtex pré-frontal que se projetam para regiões como neocórtex e hipocampo (RUBINSON; LANG, 2009). Estudos mostram que a acetilcolina, também, pode estar envolvida com a fisiopatologia da epilepsia. Este processo se deve a excitação colinérgica muscarínica no cérebro, devido ao favorecimento do influxo de íons sódio e cálcio nos neurônios pela ação deste transmissor, causando uma despolarização da membrana celular, importante para eventos na epileptogênese (BENARDO; PRINCE, 1982; PUMAIN *et al.*, 1983).

Apesar de alterações da excitabilidade neuronal ser o pré-requisito primário para a epileptogênese, descargas epiléticas não podem ser provocadas por uma anormal atividade de neurônios individuais, mas requer uma ativação e hiperexcitabilidade de uma larga população de neurônios (SHORVON *et al.*, 2016).

1.3 Estresse Oxidativo e epilepsia

O cérebro de um humano adulto consome cerca de 20% do oxigênio produzido, sendo o oxigênio o principal produtor de radicais livres. Maior parte da energia produzida é utilizada para retomar o potencial de repouso das células excitatórias, nesse sentido o SNC possui uma grande quantidade de mitocôndrias com o objetivo de suprir essa grande quantidade de energia. Fato que o torna altamente vulnerável a qualquer disfunção desta organela. Através da cadeia transportadora de elétrons, a mitocôndria é a principal fonte geradora de radicais livres. Estes são átomos que possuem um elétron desemparelhado na última camada. A excessiva produção dessas substâncias e a disfunção na regulação da produção das mesmas geram o estresse oxidativo (STAMLER *et al.*, 1992; CLARK; SOKOLOFF, 1999; AMES, 2000; PATEL, 2002).

Estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes, onde há uma produção excessiva de substâncias pró-oxidantes (KEMP; GO; JONES, 2008).

A maioria das estruturas celulares, incluindo membranas, proteínas estruturais, enzimas e ácidos nucleicos, são suscetíveis à oxidação por espécies reativas de oxigênio (EROS), podendo sofrer mutações e apoptose celular (MARES, 2000). Essas espécies reativas podem induzir dano neuronal através da redução do sistema antioxidante não-enzimático no cérebro e das atividades das enzimas antioxidantes como a glutatona S-transferase, glutatona peroxidase, catalase e superóxido dismutase (LESGARDS *et al.*, 2011).

O estresse oxidativo vem sendo estudado nos últimos anos como um dos possíveis mecanismos na patogênese da epilepsia (CHANG; YU, 2010). Atualmente, alguns estudos já comprovaram que o *status epilepticus*, uma crise epilética prolongada ou repetida em intervalos muito curtos que geram uma condição

epiléptica persistente e invariável (ROGER *et al.*,1974), provoca mudança no equilíbrio de RL e substâncias redutoras, além de diminuir o nível de ATP. Convulsões são capazes de gerar estresse oxidativo e gerar danos ao DNA, lipídeos de membrana, proteínas, dano neuronal e disfunção cognitiva (PATEL, 2004, PERSON *et al.*, 2015).

Vale ressaltar que a descarga neuronal anormal que ocorre na epilepsia consome enormes quantidades de energia, representando o estresse oxidativo extenso observado na doença. Assim, o estresse oxidativo tornou-se um evento emergente na fisiopatologia da epilepsia. O equilíbrio anti e pro-oxidante perturbado cria uma acumulação de radicais livres, que são tóxicos e podem danificar lipídios, proteínas ou ácidos nucleicos e causar mutação e morte celular (GREWAL *et al.*,2017).

Além disso alterações relacionadas ao estresse oxidativo podem ser quantificadas através de modelos de convulsão. Danos da função mitocondrial foram relatados em roedores após serem submetidos a modelos de convulsão por pilocarpina, picrotoxina, ácido cáinico e eletrochoque (BURIGO *et al.*,2006; ACHARYA; KATYARE, 2005; GAO *et al.*,2007). Estudos mostraram que os modelos de convulsão através do pentilenotetrazol, picrotoxina e pilocarpina aumentam os níveis de substâncias relacionadas ao estresse oxidativo (PATSOUKIS *et al.*,2004;AGUIAR *et al.*, 2012).

1.4 Tratamentos Farmacológico

Uma droga antiepiléptica (DAE) pode ser definida como um fármaco que quando administrado por um dado período de tempo, pode reduzir a incidência ou severidade das crises epilépticas que acometem pacientes portadores desta patologia (TREVISOL-BITTENCOURT; SANDER, 2007).

Há mais de 20 fármacos antiepilépticos no mercado (KWAN; BRODIE, 2000). Os principais mecanismos propostos para a ação das DAEs são: Bloqueio de canais iônicos dependentes de voltagem, levando, conseqüentemente, a uma redução dos disparos neuronais recorrentes, aumento da neurotransmissão

GABAérgica e bloqueio da neurotransmissão excitatória mediada pelo glutamato (PATSALOS *et al.*, 2008).

As DAEs são classificadas em três gerações. Primeira geração entre 1857-1958 que incluem alguns fármacos como o brometo de potássio, fenobarbital, fenitoína, primidona, trimitadiona e etosuximida (SHORVON., 2009a). A fenitoína age através do bloqueio de canais de sódio (ROWAN *et al.*, 2005). A ação do fenobarbital está relacionada ao aumento da ação do GABA através dos receptores GABA_A e inibição da ação do glutamato, bloqueando os canais de sódio (SILVA; CABRAL, 2008). Os fármacos de primeira geração apresentam um número significativo de efeitos adversos (LOSHER; SCHMDIT, 2002).

Os DAEs de segunda geração (entre 1960-1975) incluem carbamazepina, valproato, benzodiazepínicos entre outros (SHORVON, 2009b). A carbamazepina age, também, através do bloqueio de canais de sódio inibindo descargas repetidas (ROWAN *et al.*, 2005). Valproato age dificultando excitação mediada pelo glutamato e bloqueio de canais de Na⁺ dependentes de voltagem. Benzodiazepínicos aumentam a ação do GABA (PORTO *et al.*, 2007).

Os DAEs de terceira geração (a partir de 1980) incluem vigabatrina, lamotrigina, felbamato, gabapentina, topiramato, tiagabina, levetiracetan entre outros (SHORVON, 2009b). Vigabatrina aumenta os níveis de GABA, agindo especificamente na enzima gaba transaminase (ROGAWSKI; CAVAZOS, 2015). Lamotrigina causa bloqueio de canais de Na⁺ dependentes de voltagem (DUPERE *et al.*, 1999). Felbamato é um modulador do receptor GABAérgico, mas também age inibindo os receptores NMDA (RHO *et al.* 1994). Gabapentina é um agonista de receptores GABAérgicos (ROGAWSKI; CAVAZOS., 2015). Topiramato age através da potencialização da transmissão GABAérgica (GABA_A) e a inativação de canais de Na⁺ sensíveis a voltagem e interfere na transmissão glutamatérgica (KWAN *et al.*, 2001). O tiagabina possui ação através da inibição do transportador de GABA, o GAT-1 (GOODMAN; GILMAN, 2012).

O tratamento das epilepsias tem avançado com o surgimento das DAEs de segunda e terceira geração, no entanto, o número de pacientes sem controle apropriado das crises continua sem significativa diminuição (LOSHER; SCHMDIT, 2002). Existe uma preocupação com a eficácia do tratamento da epilepsia, pois, aproximadamente, 30% de todos os pacientes não respondem a nenhum tipo de

terapia e apresentam mortalidade 2 a 3 vezes maior que a população geral (MORIMOTO; FAHNESTOCK; RACINE, 2004; SHORVON, 2009). Os eventos adversos das DAEs representam uma causa importante na descontinuação do tratamento como, também, podem impedir o uso de doses mais eficazes (PERUCCA; GILLIAM, 2012).

1.5 Avaliação experimental das drogas antiepilépticas

Os modelos experimentais ajudam a reproduzir ou modelar características da epilepsia e a maior parte do conhecimento adquirido através de estudos sobre o assunto foi devido o uso de modelos animais, por isso estes são uma importante ferramenta de pesquisa (GRONE; BARABAN, 2015).

Os modelos experimentais ajudam na triagem de drogas antiepilépticas (WHITE, 1997), ajudando, também, no conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na origem e manutenção das crises. De um modo geral, dois pontos são importantes em estudos desta natureza: a escolha do modelo experimental e as drogas a serem estudadas (LIMA, 2011).

Os animais mais utilizados para esses modelos experimentais são ratos e camundongos, pois estes apresentam várias vantagens, desde neuroanatômicas a financeiras (LOSHER *et al* 2011).

Para ser considerado um eficaz modelo experimental, requisitos devem ser levados em consideração como: o padrão de atividade eletroencefalográfica (EEG) com semelhanças aos observados na condição humana, comportamento animal com mudanças patológicas semelhantes às observadas no homem e devem responder a medicação anticonvulsivante com mecanismo de ação semelhante (ARIDA *et al.*, 2006).

Há vários modelos experimentais em animais, que interferem em diversos sistemas como: sistema gabaérgico, sistema glutamatérgico, sistema colinérgico e as vias da glicina envolvidos na ocorrência de convulsões (LIMA.,2011).

Dentre os diversos modelos animais existentes, o modelo animal com Pentilenotetrazol (PTZ) é bastante utilizado. Ele é um convulsivante que age através do antagonismo competitivo dos receptores GABA_A pela interação alostérica dos

canais de cloreto, fazendo com que ocorra uma diminuição da ação inibitória do GABA no SNC (MACDONALD; BARKER, 1977; HUANG *et al.*, 2001). A ativação dos receptores NMDA também está envolvida na geração destas crises (LOSCHER *et al.*, 1991).

A exposição ao PTZ induz uma sequência de comportamentos estereotipados os quais iniciam com movimentos orofaciais e finalizam em convulsões clônicas em roedores (SHORVON, 2009; LOSHER; SCHMIDT, 2011).

Este modelo, juntamente com o modelo de convulsão induzido por eletrochoque, foi desenvolvido há mais de 60 anos e é utilizado para triagem de drogas anticonvulsivantes (WHITE *et al.*, 2002).

A Picrotoxina (PICRO) é um agente convulsivante também chamado de cocculina, extraído de uma planta venenosa (*Anamirta cocculus*) (BOULLAY, 1812). Ela é um antagonista não-competitivo do receptor GABA_A amplamente utilizado para desenvolver modelos de convulsões animais, seu efeito convulsivo se deve ao bloqueio deste canal ou por modulação alostérica do mesmo (KAILA *et al.*, 2014).

A reversão da estimulação por este agente é considerado um parâmetro satisfatório na investigação de drogas anticonvulsivantes que atuam em mecanismos que envolvem a neurotransmissão gabaérgica (QUINTANS-JÚNIOR, 2007).

A pilocarpina (PILO), um agonista muscarínico colinérgico, é extraído das folhas do jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*), uma planta encontrada no Brasil e conhecida como a única fonte comercial de extração deste alcalóide (ABREU *et al.*, 2007; GIL *et al.*, 2001).

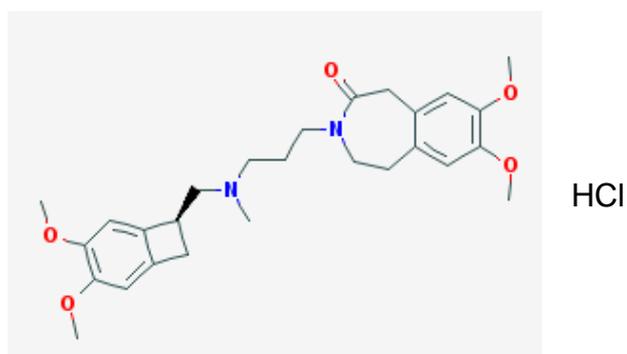
A administração de altas doses de pilocarpina, produz eventos epiléticos, convulsões ou *status epilepticus* completo em roedores (CHO *et al.*, 2015). Pois ocorre a ativação dos receptores muscarínicos e aumento da ACh (JOPE *et al.*, 1987; SERRA *et al.*, 1997). Acredita-se que o início da atividade convulsiva se deva a inicial ativação de neurônios excitatórios do sistema glutamatérgico, sendo o sistema colinérgico responsável por esta ativação. A alta concentração de glutamato durante o *status epilepticus* mantém a despolarização celular, ocasionando a liberação contínua de cálcio dos estoques intracelulares, gerando assim, lesão da membrana da célula e de organelas podendo induzir a morte celular por excitotoxicidade (TURSKI *et al.*, 1989; CAVALHEIRO *et al.*, 1994).

A injeção de pilocarpina (300-400mg/Kg) dá início à fase aguda deste modelo químico de indução e mimetiza em roedores o comportamento convulsivo em humanos. Características como, perda ou irregularidade da coordenação muscular, automatismos faciais, tremores alterações eletroencefalográficas, lesão cerebral principalmente no hipocampo são sinais e sintomas observados após a administração desta substância. Este modelo químico de indução de convulsão é utilizado por mimetizar a epilepsia do lobo temporal (TURSKI *et al.*, 1983; LEITE *et al.*, 1990; BELISSIMO *et al.*, 2001).

1.6 Ivabradina

A ivabradina (S 16257) é um agente antianginoso e antiarrítmico, com fórmula química 3- [3 - [[(7S) -3,4-dimetoxi-7-biciclo [4.2.0] octa-1,3,5-trienil] metil-metilamino] propil] -7 , 8-dimetoxi-2,5-di-hidro-1H-3-benzazepin-4-ona e fórmula molecular $C_{27}H_{36}N_2O_5$, HCl. A estrutura química da ivabradina contém dois anéis: um benzazepinona e um benzociclobutano ligados a uma cadeia de azapentano. Pertence à classe dos compostos orgânicos conhecidos como benzazepines. Estes são compostos orgânicos contendo um anel benzeno fundido com um anel azepina (heterociclo insaturado de sete membros com um átomo de azoto substituindo um átomo de carbono) (SAVELIEVA., 2008; VILAINE, 2006; ROBINSON; DI FRANCESCO, 2001; DI FRANCESCO, 1985).

Figura 3: Estrutura química da S-Ivabradina



Fonte: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ivabradine#section=Top>

Foi aprovado pela Agência Médica Europeia em 2005 para o tratamento da angina e pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2015 por reduzir a hospitalização por agravamento da insuficiência cardíaca (FDA, 2015). E aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para o tratamento sintomático da angina pectoris crônica estável na doença arterial coronariana de adultos com ritmo sinusal normal e frequência cardíaca ≥ 70 bpm e para o tratamento da insuficiência cardíaca crônica.

A Ivabradina é uma das primeiras medicações específicas para diminuir a frequência cardíaca, inibe seletivamente a corrente I_f , de maneira a não afetar as outras correntes iônicas cardíacas, não causando efeito inotrópico negativo no miocárdio. Dessa maneira, a utilização de Ivabradina diminui o consumo e demanda de oxigênio pelo miocárdio sem prejudicar a contratilidade ventricular (DI FRANCESCO; BORER, 2007; SVELIEVA, 2008; JONES, 2013). A Ivabradina interage com os canais de nucleotídeos cíclicos ativados por hiperpolarização (HCN) através de um sítio de ligação intracelular, ou seja, age na parte interna da membrana celular, requerendo que os canais estejam abertos para poder atuar (MONNET *et al.*, 2001).

Os canais HCN são uma família de canais de cátions não seletiva, pois suas alças P são desprovidas de resíduos de aminoácidos necessários para possuírem seletividade para íons potássio, portanto, conduzem íons sódio e potássio, gerando uma corrente conhecida como I_f no coração e I_h ou I_q nos neurônios. É durante a fase de hiperpolarização que ocorre a abertura do canal e a entrada dos íons de sódio (DI FRANCESCO; OJEDA, 1980; KANDEL *et al.*, 2014; VASSALLE *et al.*, 1992).

A corrente I_h é uma corrente despolarizante (WANG *et al.*, 2003). Ela tem papel fundamental na regulação da excitabilidade neuronal (BRENNAN *et al.*, 2016). Ela é uma corrente de Na^+ e K^+ despolarizante que é ativada por hiperpolarização e está presente em muitos tecidos neuronais e cardíacos (PAPE, 1996; ACCILI *et al.*, 2002; SANTORO; TIBBS, 1999).

O aumento da corrente I_f , no qual modula a atividade de marca-passo no nó-sinusal, na insuficiência cardíaca crônica pode causar arritmias, nesse sentido, a Ivabradina pode agir de maneira benéfica pela inibição dessa corrente em

pacientes portadores de insuficiência cardíaca crônica com redução da fração de ejeção (CERBAI, 1997; WHITE *et al.*, 2009).

Estudo de eletrofisiologia demonstrou que a Ivabradina bloqueia canais HCN 1 em ratos e HCN 4 em humanos, mais fortemente, mas não possui seletividade entre as isoformas (PIAN *et al.*, 2006; STIEBER *et al.*, 2006).

Além de sua função nas células do marca-passo cardíaco, vários artigos têm demonstrado a ação benéfica da Ivabradina na nocicepção, inflamação, psicoses e amnésia (LUDWIG *et al.*, 2003; ROUBILLE *et al.*, 2013; LALLY *et al.*, 2013; NOH *et al.*, 2014) Alguns estudos, também, têm demonstrado a ação anticonvulsivante da Ivabradina em animais submetidos a indução de convulsão por diversos mecanismos, drogas quimioconvulsivantes e estímulo elétrico (LUSZCZKI *et al.*, 2013; IBRAHIM; MANSUOR *et al.* 2015; LUSZCZKI *et al.*, 2017).

Estudos tem demonstrado um possível efeito anticonvulsivante da Ivabradina através de modelo de convulsão induzido por eletrochoque máximo e, quimicamente, por ácido caínico em camundongos (LUSZCZKI *et al.*, 2013; IBRAHIM; MANSUOR *et al.* 2015). Também, foi demonstrado, também, que a Ivabradina influencia a atividade anticonvulsivante do valproato através do aumento significativo da eficácia do mesmo por diminuir o valor média de dose efetiva (LUSZCZKI *et al.*, 2017).

1.7 Docking Molecular

O *docking* molecular é uma ferramenta computacional padrão que consiste em três principais objetivos conectados: Previsão de posição, triagem virtual e estimativa de afinidade de ligação (GUEDES *et al.*, 2014; JAIN; NICHOLLS, 2008).

A evolução da tecnologia computacional tornou possível o desenvolvimento de quantidades crescentes de novos dados, programas e simulações relacionadas ao *docking* com aplicações cruciais em rastreamento virtual de alto padrão que auxiliam a descoberta e estudo de possíveis encaixes moleculares de medicamentos. Além disso, a análise do reconhecimento do encaixe proteína-ligante através do *docking* molecular tornou-se uma ferramenta valiosa na identificação da estrutura de fármacos (SANTIAGO *et al.*, 2017).

Este método é útil para orientar na triagem e descoberta de agonistas, como também fornece evidências de que modelos *in silico* são ferramentas poderosas neste sentido (SANTIAGO *et al.*, 2011).

Vários autores tem realizado esta metodologia com o objetivo de investigar possíveis locais de interação, afinidade química, espacial e energética de um receptor a um determinado fármaco (DAMASCENO *et al.*, 2016; DE MELO JÚNIOR *et al.*, 2017). A identificação estrutural do receptor GABA_A e a interação com fármacos foram descritas através de técnicas de *docking* molecular. Esta técnica permitiu uma maior compreensão deste receptor, como também auxiliou na melhor compreensão da neurotransmissão GABAérgica (MILLER; ARICESCU , 2014).

Existem desenvolvidos mais de 60 programas diferentes com o objetivo de realizar o *docking* (VENKATACHALAM *et al.*, 2003).

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A epilepsia é uma das doenças que mais afeta o comportamento e a qualidade de vida por ser um quadro crônico e possuir apresentação clínica, sendo, portanto, um grande desafio para os profissionais da área da saúde (FERNANDES *et al.*, 2011).

A maioria dos estudiosos da área preconiza o início do tratamento recorrendo ao uso de um único fármaco, monoterapia, com o objetivo de diminuir efeitos secundários (GRAHAME-SMITH; AROSON, 2004).

Quando os pacientes não respondem satisfatoriamente a monoterapia, associam-se outras drogas antiepilépticas, politerapia. Se mesmo com a politerapia o paciente continuar não respondendo satisfatoriamente, mesmo utilizando drogas antiepilépticas eficazes, com níveis e doses máximas, denomina-se que este paciente é de difícil controle (GARZON, 2002).

Aproximadamente, 30% de todos os pacientes não respondem a nenhum tipo de terapia e apresentam mortalidade 2 a 3 vezes maior que a população geral (MORIMOTO *et al.*, 2004). A falta de alternativa para o tratamento de pacientes de difícil controle demonstra a necessidade de desenvolvimento de estudos de novos fármacos ou mecanismos de ação com o objetivo de solucionar ou abrir novas perspectivas sobre esta questão. Estes estudos de novas substâncias tornam-se possíveis através dos modelos de indução a convulsão. Estes modelos experimentais e seus parâmetros avaliados ajudam na triagem de drogas antiepilépticas (WHITE, 1997),

Estudos científicos usando vários modelos experimentais têm demonstrado existir uma correlação entre convulsões e estresse oxidativo através da presença de marcadores de estresse oxidativo por meio de modelos de convulsão. Como, por exemplo, as convulsões induzidas por picrotoxina onde relatou-se aumentar os níveis de peroxidação lipídica em diferentes regiões cerebrais de ratos (RAJASEKARAN, 2005).

Como também através do modelo de PTZ, onde constatou-se o aumento da peroxidação lipídica e altas concentrações de ácidos graxos livres em diferentes regiões cerebrais de roedores (ERAKOVICV *et al.*, 2003). Também foi reportado o aumento dos níveis de peroxidação lipídica através de convulsão em ratos induzida por pilocarpina (SHARMA; SANDHIR *et al.*, 2006). Como, também, a redução de

substância antioxidantes tem sido reportado através de modelos de convulsão por PTZ, PICRO e PILO. Nesse sentido, os modelos de convulsão escolhidos são ótimos parâmetros para avaliação de novas substâncias.

A Ivabradina tem demonstrado ação importante no sistema nervoso central. Existem poucos estudos que demonstraram a ação anticonvulsivante e neuroprotetora da Ivabradina, como também, mecanismo de ação (IBRAHIM; MANSUOR *et al.* 2015; LUSZCZKI *et al.*, 2013; LUSZCZKI *et al.*, 2017). Com isso, sentiu-se a necessidade de estudar os efeitos da Ivabradina em modelos de indução de convulsão e investigar a sua eficácia na neuroproteção.

3 OBJETIVO

3.1 Geral

- Estudar os possíveis efeitos anticonvulsivantes e neuroprotetores da Ivabradina, através de modelos químicos de indução de convulsão em camundongos, avaliando as alterações neuroquímicas produzidas em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado e estudo do *docking* molecular.

3.2 Específicos

- Avaliar a ação anticonvulsivante da administração, em doses repetidas, de Ivabradina após convulsão induzida por pentilenotetrazol, picrotoxina, pilocarpina em camundongos.
- Determinar as alterações neuroquímicas pelos seguintes parâmetros: níveis malonaldeído (MDA), de nitrito e determinação da concentração da glutathiona reduzida (GSH) em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos após tratamento com Ivabradina e dos grupos controles após convulsão induzida por modelos químicos.
- Buscar identificar possíveis ligações, os sítios e tipos de ligação da Ivabradina e receptor GABA_A, Diazepam e receptor GABA_A e Ivabradina e receptor NMDA através do estudo do *docking* molecular.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos *Swiss* machos (25-30g), 06 semanas provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará e do Núcleo de Pesquisa em Biologia Experimental (NUBEX) da Universidade de Fortaleza (UNIFOR). Foram mantidos em ambientes com temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), com ciclo claro/escuro de doze horas e recebendo água e comida à vontade. Os experimentos foram realizados de acordo com *National Institutes of Health for the Care of Use Laboratory Animals (NIH, 1996)*. O projeto obteve aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA), do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, protocolo número 30/2016 e aprovação pelo Comitê de Ética em Investigação Animal da Universidade de Fortaleza protocolo número 013/2014. Foram necessários 130 animais ao todo com número de 8-11 por grupo.

4.2 Drogas

- Procoralan (Ivabradina, Laboratório Servier do Brasil Ltda, Rio de Janeiro-RJ)
- Pentilenotetrazol (Sigma Chemical Co, USA).
- Picrotoxina (Sigma Chemical Co, USA).
- Cloridrato de Pilocarpina (Sigma Chemical Co, USA).

4.3 Tratamento dos grupos experimentais

Os camundongos foram pré-tratados durante 3 dias por via intraperitoneal com:

- Ivabradina 1 mg/kg, 10 mg/kg ou 20mg/kg;
- Solução salina (controle).

4.3.1 Métodos de indução a convulsão

4.3.1.1 Pentilenotetrazol (PTZ)

Os animais foram pré-tratados com Ivabradina (1, 10, 20mg/kg) ou solução salina (controle), via intraperitoneal (i.p), durante 3 dias consecutivos, no terceiro dia foi administrada 30 minutos antes da indução de convulsão por PTZ (Sigma Chemical Co, USA) (i.p). Este foi dissolvido em solução salina na dose de 85mg/kg. Os animais foram colocados em gaiolas (caixas) individuais, e observados por 30 minutos. Os parâmetros avaliados foram: tempo de latência para a primeira convulsão clônica (série de movimentos espasmódicos) ou tônico-clônica (aumento do tônus muscular seguido de movimentos espasmódicos) (RUBINSON; LANG, 2009) e latência de morte, em segundos, percentual de animais que apresentaram crise convulsiva e percentual de sobrevivência (AGUIAR et al., 2012; LIMA et al.,2012).

4.3.1.2 Picrotoxina (PICRO)

Os animais foram pré-tratados com Ivabradina (1, 10, 20mg/kg) ou solução salina (controle), via intraperitoneal, durante 3 dias consecutivos, no terceiro dia foi administrada 30 minutos antes da indução de convulsão por PICRO (Sigma Chemical Co, USA) (i.p). Este foi dissolvido em solução salina na dose de 10mg/kg. Os animais foram colocados em gaiolas (caixas) individuais, e observados por 30 minutos. Os parâmetros avaliados foram: tempo de latência para a primeira convulsão clônica ou tônico-clônica e latência de morte, em segundos, percentual de animais que apresentaram crise convulsiva e percentual de sobrevivência (LIMA et al.,2012; AGUIAR et al., 2012).

4.3.1.3 Pilocarpina (PILO)

Os animais foram pré-tratados com Ivabradina (1, 10, 20mg/kg) ou solução salina (controle), via subcutânea, durante 3 dias consecutivos, no terceiro dia foi administrada 60 minutos antes da indução de convulsão por PILO (Sigma Chemical Co, USA). Esta foi dissolvido em solução salina na dose de 400mg/kg. Os animais foram colocados em gaiolas (caixas) individuais, e observados por 60 minutos. Os parâmetros avaliados foram: tempo de latência para a primeira

convulsão clônica ou tônico-clônica e latência de morte, em segundos, percentual de animais que apresentaram crise convulsiva e percentual de sobrevivência (LIMA et al., 2012; AGUIAR et al., 2012).

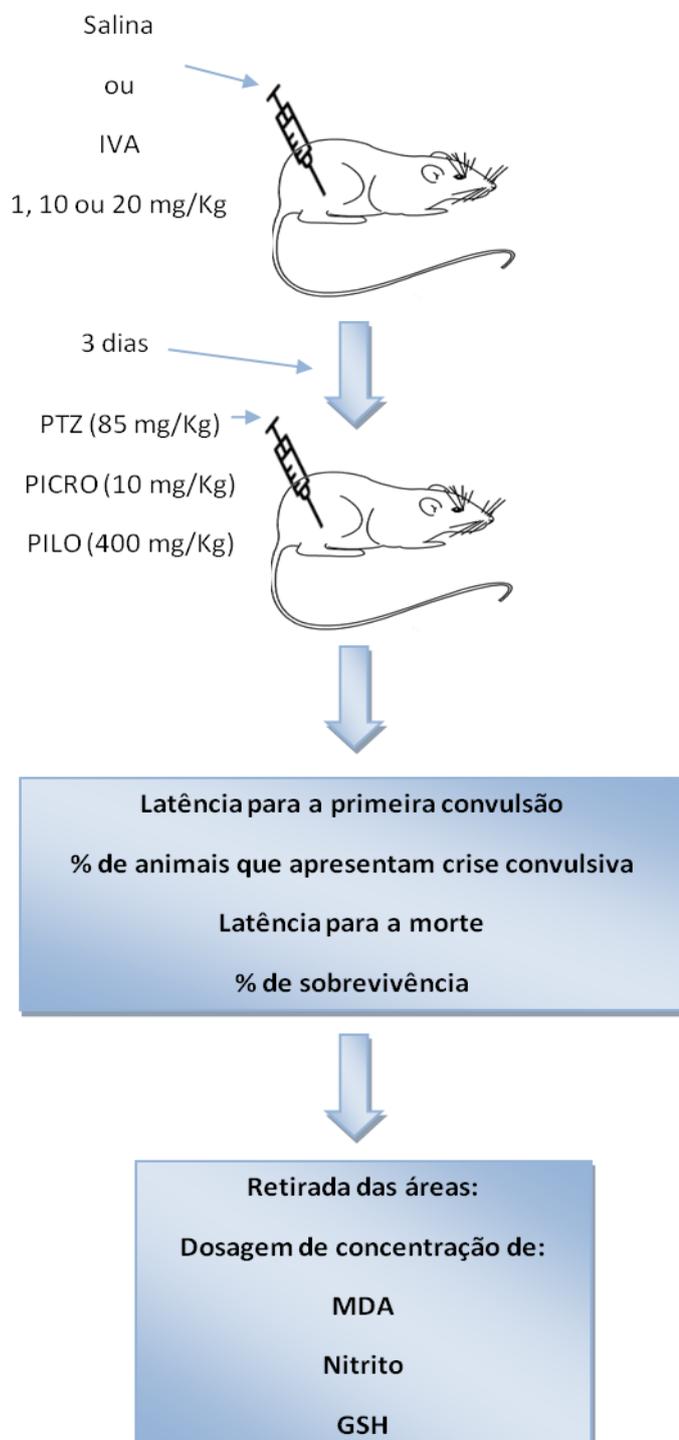
O tempo de latência para a primeira convulsão foi definido como o tempo de início da administração da droga quimioconvulsivante até o início da primeira crise convulsiva tônico-clônica ou clônica. O tempo de latência para morte foi definido como o tempo de início da administração da droga quimioconvulsivante até o término dos 30 minutos adotados para os modelos de convulsão por PTZ e PICRO e 60 minutos adotados para avaliação no modelo de PILO (AGUIAR et al., 2012).

A IVA foi diluída em solução aquosa de Tween 80 a 1% e as doses escolhidas de IVA, PICRO, PTZ, PILO foram baseadas em estudos anteriores (REAGAN-SHAW et al., 2007; AGUIAR et al., 2012; LUSZCKI et al., 2013). Todas as soluções foram administradas em volume de 0,1mL para cada 10 g de peso corporal. Os animais foram ambientados por um período de uma semana antes do início de todos os testes.

Os testes neuroquímicos foram realizados com as dosagens de IVA (1, 10, 20 mg/kg) e solução salina (controle). Logo após os experimentos de indução de convulsão, descritos anteriormente, os animais foram eutanasiados e seus cérebros foram removidos e lavados em solução salina gelada. Os animais que sobreviveram foram eutanasiados após o período de tempo determinado pelo experimento especificado.

As regiões cerebrais córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HC) e corpo estriado (CE) foram dissecadas, congeladas e armazenadas a -80 °C até serem utilizadas para os ensaios. Os tecidos foram homogeneizados em 10 volumes do tampão de estudo, então centrifugados a 30.000 xg por 10 minutos. Os pellets resultantes serão lavados, recentrifugados, e ressuspensos em tampão para adição ao ensaio. A descrição dos testes neuroquímicos foi feita de forma mais detalhada posteriormente.

Figura 4 : Esquema do tratamento dos grupos que foram submetidos a modelos de indução a convulsão por pentilenotetrazol, picrotoxina ou pilocarpina e, posteriormente, retirada de áreas cerebrais para testes neuroquímicos.



Fonte: Elaborado pelo autor

4.4 Avaliação do estresse oxidativo

4.4.1 Dosagem dos níveis de lipoperoxidação através da determinação dos níveis de MDA

O grau de lipoperoxidação nos tecidos foi medido através da determinação dos níveis de MDA, conforme o método de Ohkawa (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979), descrito no protocolo a seguir. Tampão fostato de potássio monobásico 150 mM foi utilizado para homogeneizar (à 10%) as amostras. Logo após, foram centrifugadas (1.200 rpm/30 minutos). Foi retirado 63 µl do homogenato e adicionado 100 µl de ácido perclórico e recentrifugados (7.000 rpm/15 minutos) sendo retirados 150 µl do sobrenadante e adicionado 50 ml de tiobarbitúrico a 1,2%. Logo após, as amostras foram levadas à banho Maria (95 °C /30 minutos), depois será resfriada em água corrente. Em seguida a peroxidação lipídica foi determinada por absorbância a 535 nm e foi expressa em mcg de MDA/ g de tecido úmido. A curva-padrão de malonildialdeído (MDA) será determinada a partir da solução padrão de MDA. Serão preparadas as soluções a 0,627; 1,247; 2,463; 4,8; 9,16 e 16,77µmol. O branco foi feito com água destilada.

4.4.2 Dosagem de nitrito

Utilizado para avaliar a produção de óxido nítrico (NO) das amostras em estudo. As amostras foram homogenizadas (11000rpm/15 min). Logo após, foi adicionado 100 µl de Reagente de Griess (1:1: 1:1) e 100 µl do sobrenadante das amostras e incubado a temperatura ambiente durante 10 minutos.Foi realizado o método de preparação de curva-padrão com concentração de (NaNO₂) variando entre 0,75-100 mM e o tampão branco foi preparado pela adição de 100 µl de Reagente de Griess e 100 µl do tampão usado para o homogenato. Em seguida, foi feita a leitura com absorbância a 540 nm e expressa em nM de nitrito/g de tecido úmido (GREEN; GOLDMAN, 1981; RADENOVIC; SELAKOVIC, 2005).

4.4.3 Determinação da concentração da glutathiona reduzida (GSH)

Método utilizado para avaliar o grau de defesa endógena do organismo contra o estresse oxidativo. Após serem adicionadas EDTA 0,02 M em ácido

tricloracético 50%, as amostras foram homogeneizadas (3000 rpm/15 min). Em seguida, foram adicionadas as amostras 25ml de tampão Tris-HCl e 0,65ml de DTNB 0,01M. Em seguida foi feita a leitura com absorvância a 412 nm e expressa em nM de GSH/g de tecido úmido (SEDLAK; LINDSAY, 1968). A partir da solução padrão de GSH (1mg/mL), foi preparado 4 mL (em triplicata) de soluções a 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL. O branco foi feito com água destilada (4 mL) e a cada tudo das soluções de GSH foi acrescentado 4 mL de tampão Tris HCl 0,4 M (pH 8,9). Adicionou-se ainda a cada tubo 0,1 mL de DTNB (0,01M) e feita a leitura da absorvância a 412 nm após 1 min da adição do DTNB, e determinada a equação da curva padrão de GSH.

4.5 Estudo do Docking Molecular

Foram realizados pelo químico Antônio Eufrásio Vieira Neto, no laboratório de Biologia Estrutural da Universidade de Fortaleza.

4.5.1 Estudo do Docking da Ivabradina vs GABA_A

Foi realizado o estudo por *Docking Molecular* a partir da estrutura tridimensional do receptor GABA_A (PDB ID: 4COF), que foi determinada experimentalmente por métodos cristalográficos (MILLER; ARICESCU, 2014), proporcionando uma resolução de 2,97 angstroms. Para o encaixe, foi rotacionada, por toda a área do receptor, uma molécula de Ivabradina (PUBCHEM CID: 3045381), não considerando moléculas de água e explorando toda a superfície do receptor GABA_A.

A obtenção de clusters com alta energia de interação foi o fator determinante do sítio de interação. Para isso foram determinados os seguintes parâmetros: Tipo de correlação – “Shapeonly”, Dispositivo de Cálculo – “CPU”, Número de Soluções – “50000”, Modo FFT – “3D fast lite”, Grid Dimension – “0.6”, Faixa do receptor – “180”, Faixa do Ligante – “180”, Faixa de Torção – “360”, Faixa de Distância – “40”.

4.5.2 Estudo do Docking da Ivabradina vs Diazepam

Para validação do docking entre Ivabradina e o receptor GABA_A, foi realizado uma prospecção de docking molecular com um agonista clássico do receptor: Diazepam.

Para o experimento foram utilizadas as estruturas tridimensionais de ambas as moléculas, canal GABA (a) e Diazepam, obtidas gratuitamente no Protein Data Bank e Pubchem Project, respectivamente. A estrutura do receptor GABA_A (PDB ID: 4COF) foi centralizada em uma caixa de simulação da ferramenta computacional HEX 8.0.0_Cuda, e o algoritmo do software foi orientado para rotacionar sobre toda a superfície do canal, uma molécula tridimensional de Diazepam (PUBCHEM ID: 3016) até que todos os encaixes possíveis fossem registrados, assim como foi feito com a Ivabradina.

4.5.3 Estudo do Docking da Ivabradina vs Receptor NMDA

O docking foi feito sem considerar moléculas de água e explorando toda a superfície do canal receptor, e para isso foram investigados o ligante (Ivabradina) e o receptor ionotrópico (NMDA). Para a simulação, foram utilizados os softwares: HEX 8.0.0 (MACINDOE *et al.*, 2010), que realiza esta ordenação de forma automática, e o PyMol v1.4.7, que permite a investigação detalhada dos complexos formados, assim como medição de ligações, análise dos resíduos de aminoácidos envolvidos e observação do enovelamento dos sítios de interação. Neste experimento, foi utilizada a estrutura tridimensional do receptor NMDA (PDB ID: 5FXG) e a estrutura tridimensional da Ivabradina (PUBCHEM ID: 3045381), obtidas no Protein Data Bank e no PubChem Project, respectivamente.

Os parâmetros utilizados para o processo de docking foram: Tipo de Correlação, Tipo de cálculo (CPU), Pós-processamento de energia, Número de Soluções- 50000, Modo FFT- 3D fast lite, Grid Dimension- 0.6, Faixa do receptor- 180 Receptor, Faixa do Ligante -180, Faixa de Torção - 360, Faixa de Distância - 40.

4.6 Análise Estatística

A Análise estatística dos dados foi realizada através do programa *GraphPadPrism*[®], versão 6.0 *copyright*[®]. Foi aplicado o teste de *omnibus D'Agostino Pearson* para avaliar a normalidade dos dados obtidos. Os resultados foram analisados através de *Oneway ANOVA* seguido por teste *post hoc* de *Tukey* para comparações múltiplas. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão de média (EPM). Em todos os casos foram utilizados os critérios de significância de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Ação Anticonvulsivante da Ivabradina

5.1.1 Efeito da Ivabradina no modelo de convulsão induzida por Pentilenotetrazol.

Os animais pré-tratados com Ivabradina não sofreram alteração no tempo de latência para a primeira convulsão em nenhum dos grupos estudados, [F(3,29) = 0,7451; P= 0,5340], quando comparado ao controle (71,50 \pm 2,63) nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol. Contudo, houve um aumento significativo do tempo de latência de morte dos animais pré-tratados com IVA 1 mg/Kg ($p < 0.05$) ou 10 mg/Kg ($p < 0.01$), em comparação ao grupo controle, [F(3,34) = 5,836; P= 0,0025]. (Tabela 1). Os animais pré-tratados com IVA 10 mg/kg apresentaram a maior taxa de sobrevivência (62,5%).

Tabela 1 - Efeito da Ivabradina em modelo de convulsão induzidos por Pentilenotetrazol.

Grupos	Latencia para convulsão (s)	% Animais que exibiram convulsão	Latência para morte (s)	% Sobrevivência dos animais
Pentilenotetrazol				
Controle	71,50 \pm 2,63	100	235,0 \pm 42,82	25%
IVA-1mg/Kg	73,75 \pm 9,46	90	978,3 \pm 193 ^{a*}	22%
IVA-10mg/Kg	85,63 \pm 13,49	90	1309 \pm 203,1 ^{a**}	62.5%
IVA- 20mg/Kg	85,00 \pm 5,05	100	742,1 \pm 192,7	11.1%

Fonte: Resultados da pesquisa

Tabela 1: Os animais foram tratados durante 3 dias com Ivabradina (1, 10, or 20 mg/Kg) ou solução salina i.p. No último dia de tratamento, PTZ (85 mg/Kg) foi administrado 30 minutos após a administração de IVA ou salina. Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão de média (EPM). Em todos os casos foram utilizados os critérios de significância de $p < 0,05$. (A letra a representa o grupo em questão quando comparado ao grupo controle. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

5.1.2 Efeito da Ivabradina nos modelos de convulsão induzida por Picrotoxina

No modelo de convulsão induzido por picrotoxina (Tabela 2), os animais pré-tratados Ivabradina (10 mg/Kg) apresentaram aumento ($p < 0.01$) no tempo de latência para a primeira convulsão em relação ao controle, [$F(3,34) = 7,261$; $P = 0,0007$], sem alteração no tempo de latência para a morte, [$F(3,34) = 1,514$; $P = 0,2286$]. (Tabela 2). Noventa por cento dos animais tratados com IVA (em todas as doses testadas) exibiram convulsão. Com relação ao percentual de sobrevivência os grupos controle e Ivabradina (10 e 20 mg/Kg) obtiveram um percentual de 20%. Ivabradina 1mg/Kg obteve percentual de sobrevivência igual a 10 %.

Tabela 2 - Efeito da Ivabradina em modelos de convulsão induzidos por Picrotoxina.

Grupos	Latencia para convulsão (s)	% Animais que exibiram convulsão	Latência para morte (s)	% Sobrevivência dos animais
Picrotoxina				
Controle	426,0 ±22,8	100	948,8 ± 111,8	20
IVA-1mg/Kg	402,5±24,11	90	812,4 ± 66,63	10
IVA-10mg/Kg	582,2±42,09 ^{***}	90	1057± 111,2	20
IVA- 20mg/Kg	482,6 ±27,76	90	1107 ± 133,1	20

Fonte: Resultados da pesquisa

Tabela 2: Os animais foram tratados durante 3 dias com Ivabradina (1, 10, or 20 mg/Kg) ou solução salina i.p. No último dia de tratamento, PICRO (10 mg/Kg) foi administrado 30 minutos após a administração de IVA ou salina. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão de média (EPM). Em todos os casos foram utilizados os critérios de significância de $p < 0,05$. (A letra a representa o grupo em questão quando comparado ao grupo controle. ** $p < 0,01$).

5.1.3 Efeito da Ivabradina nos modelos de convulsão induzida por Pilocarpina

A Ivabradina não alterou o tempo de latência para a primeira convulsão, [F(3,33) = 1,056; P= 0,3808], e tempo de latência de morte, [F(3,35) = 3,395; P= 0,0285], no modelo de convulsão induzido por pilocarpina (Tabela 3). Com relação ao percentual de animais de exibiram convulsão, o grupo controle e IVA (1 mg/Kg) obtiveram um percentual de 90%. Nos grupos de IVA (10 e 20 mg/Kg) 100% dos animais exibiram convulsão. Com relação ao percentual de sobrevivência somente os grupos controle e IVA (1mg/Kg) obtiveram percentual de sobrevivência de 30% e 40%, respectivamente.

Tabela 3 - Efeito da Ivabradina em modelo de convulsão induzidos por Pilocarpina.

Grupos	Latencia para convulsão (s)	% Animais que exibiram convulsão	Latência para morte (s)	% Sobrevivência dos animais
Pilocarpina				
Controle	992,8 ± 93,33	90	2008 ± 351,5	30
IVA 1mg/Kg	869,1 ± 96,70	90	2233 ± 432,4	40
IVA 10mg/Kg	889,3 ± 77,99	100	1202 ± 121,7	00
IVA 20mg/Kg	792,0 ± 55,31	100	1267 ± 101,8	00

Fonte: Resultados da pesquisa

Tabela 1: Os animais foram tratados durante 3 dias com Ivabradina (1, 10, or 20 mg/Kg) ou solução salina i.p. No último dia de tratamento, PILO (400 mg/Kg) foi administrado 30 minutos após a administração de IVA ou salina. Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão de média (EPM). Em todos os casos foram utilizados os critérios de significância de $p < 0,05$.

5.2 Estresse Oxidativo

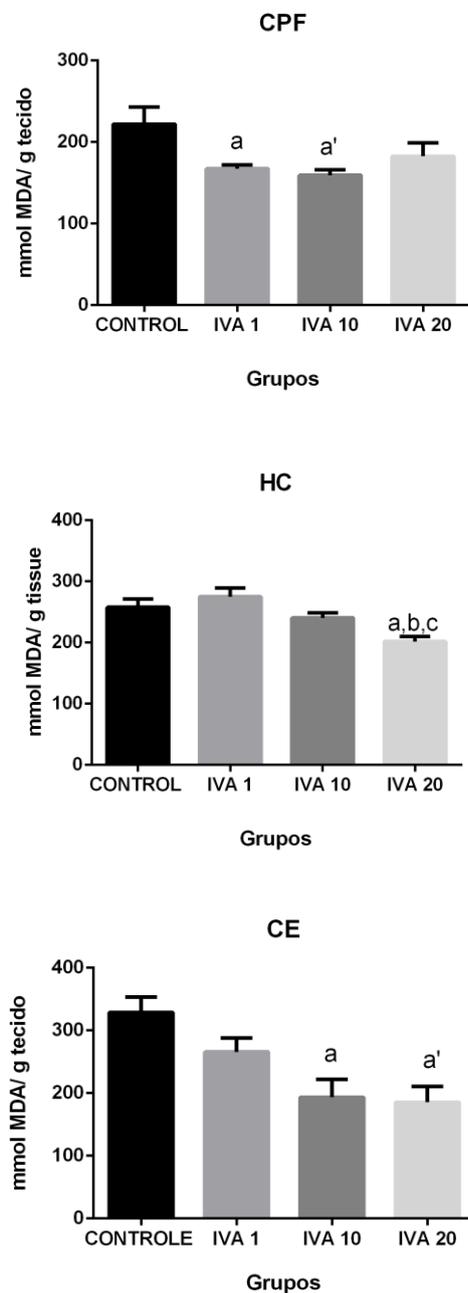
5.2.1 Nível de malodialdeído, nitrito e glutathiona reduzida do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos com modelo de convulsão induzido por Pentilenotetrazol.

O pré-tratamento com ivabradina reduziu os níveis de TBARS no córtex pré-frontal (IVA 1 e 10 mg/Kg; $p < 0,05$) com $[F(3,30) = 4,075; P = 0,0153]$, e corpo estriado (IVA 10 e 20 mg/Kg; $p < 0,01$) $[F(3,29) = 6,442; P = 0,0018]$, quando comparada ao grupo controle (Figura 5). No hipocampo, IVA, na maior dose (20 mg/Kg), reduziu as concentrações de MDA em comparação ao controle com $[F(3,34) = 7,150; P = 0,0008]$.

Com relação aos níveis de nitrito, houve uma redução no CPF na dose de IVA 10mg/Kg ($p < 0,05$) com $[F(3,30) = 4,419; P = 0,0109]$. No entanto, nenhuma alteração foi verificada no HC quando comparada ao controle. Entretanto, um aumento desses níveis foram observados no corpo estriado na dose de IVA 1 ($p < 0,01$) quando comparado ao controle $[F(3,34) = 6,199; P = 0,0018]$ (Figura 6).

Os níveis de GSH (Figura 7) foram aumentados no córtex pré-frontal, $[F(3,31) = 5,739; P = 0,0030]$, e corpo estriado, $[F(3,32) = 5,187; P = 0,0049]$, somente na maior dose de IVA ($p < 0,05$) e ($p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle e respectivamente.

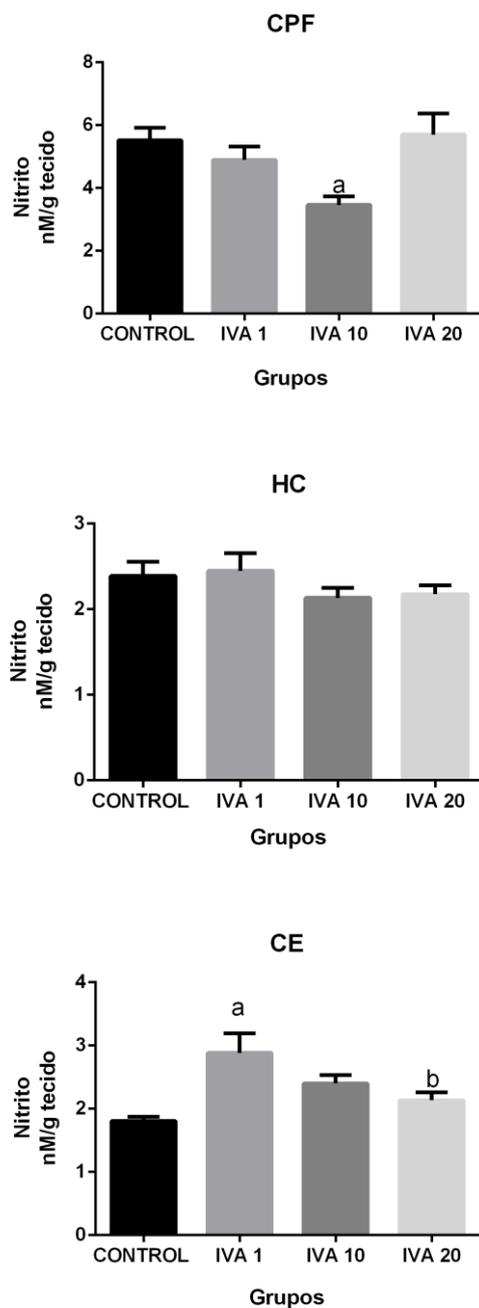
Efeitos da Ivabradina nos níveis de Malonaldeído no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em convulsões induzidas por Pentilenotetrazol em camundongos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Fig.5: Efeitos da Ivabradina nos níveis de Malonaldeído, nitrito e GSH no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em convulsões induzidas por Pentilenotetrazol em camundongos. Os animais foram submetidos à 30 minutos de observação e eutanasiados logo após. As colunas representam a média \pm E.P.M de 8–11 animais/grupo (ANOVA and Tukey test post hoc). CPF: Córtex pré-frontal, HC: Hipocampo, CE: corpo estriado.

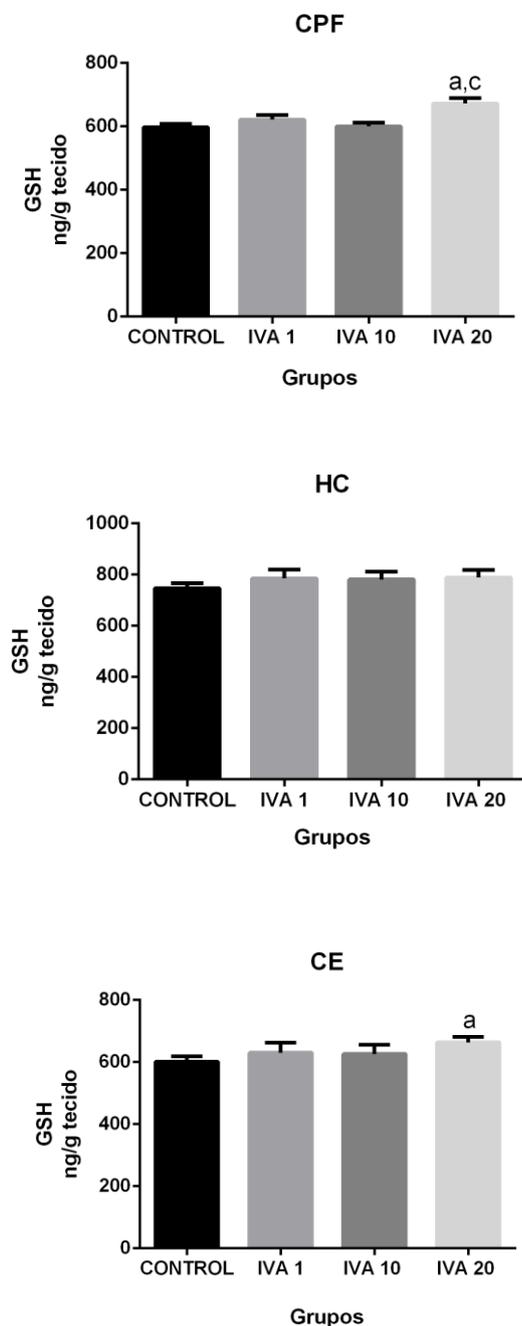
Efeitos da Ivabradina nos níveis de nitrito no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em convulsões induzidas por Pentilenotetrazol em camundongos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Fig.6: Efeitos da Ivabradina nos níveis de nitrito no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em convulsões induzidas por Petilenotetrazol em camundongos. Os animais foram submetidos à 30 minutos de observação e eutanasiados logo após. As colunas representam a média \pm E.P.M de 8–11 animais/grupo (ANOVA and Tukey test post hoc). CPF: Córtex pré-frontal, HC: Hipocampo, CE: corpo estriado.

Efeitos da Ivabradina nos níveis de GSH no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em convulsões induzidas por Pentilenotetrazol em camundongos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Fig.7: Efeitos da Ivabradina nos níveis de GSH no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em convulsões induzidas por Petilenotetrazol em camundongos. Os animais foram submetidos à 30 minutos de observação e eutanasiados logo após. As colunas representam a média \pm E.P.M de 8–11 animais/grupo (ANOVA and Tukey test post hoc). CPF: Córtex pré-frontal, HC: Hipocampo, CE: corpo estriado.

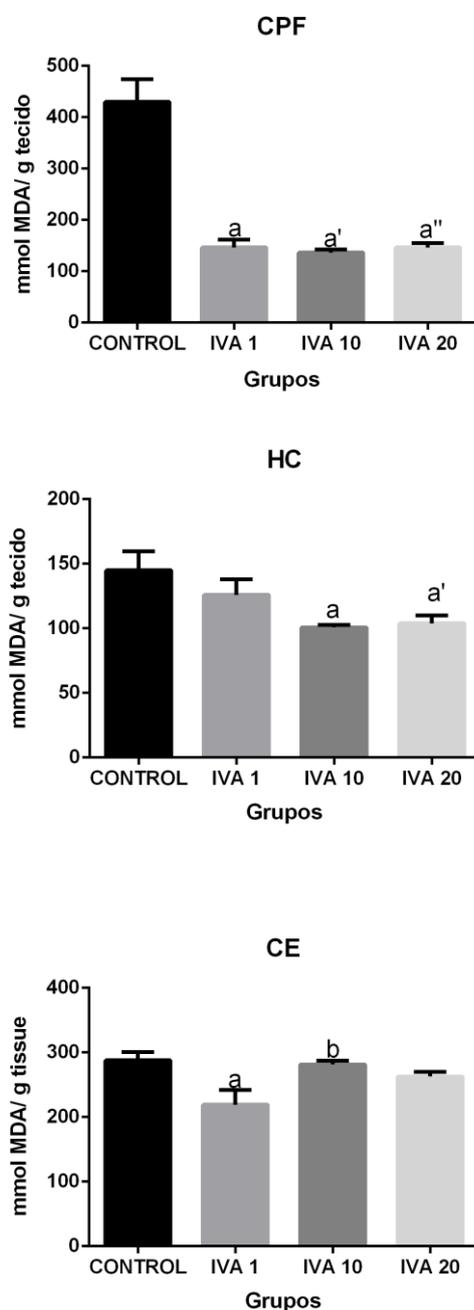
5.2.2 Nível de malodialdeído, nitrito e glutathiona reduzida do córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos com modelo de convulsão induzido por Picrotoxina em camundongos.

A Ivabradina reduziu os níveis de MDA no córtex pré-frontal [$F(3,31)=34,19$; $p<0,0001$], em todas as doses estudadas ($p<0,0001$). Efeito semelhante foi observado no hipocampo (IVA 10 e 20 mg/Kg; $p< 0,05$) e corpo estriado (IVA 1 mg/Kg; $p < 0,01$) quando comparada ao grupo controle (Figura 8).

Com relação aos níveis de nitrito, houve redução no córtex pré-frontal (IVA 1 mg/Kg, $p<0,01$; IVA 10 e 20 mg/Kg; $p<0,05$) e corpo estriado (IVA 1 mg/Kg; $p< 0,05$) quando comparada ao grupo controle. Nenhuma alteração foi verificada no hipocampo quando comparado ao grupo controle [$F(3,29) = 0,4229$; $P= 0,7380$], (Figura 9).

Nenhum efeito foi observado nos níveis de GSH nas áreas estudadas quando comparado ao grupo controle [HC: $F(3,32) = 3,374$; $P= 0,0303$; CE: [$F(3,29) = 2,441$; $P= 0,0844$], Exceto por um aumento desses níveis no CPF após o pré-tratamento com IVA na maior dose [$F(3,33) = 7,668$; $P= 0,0005$] (Figura 10).

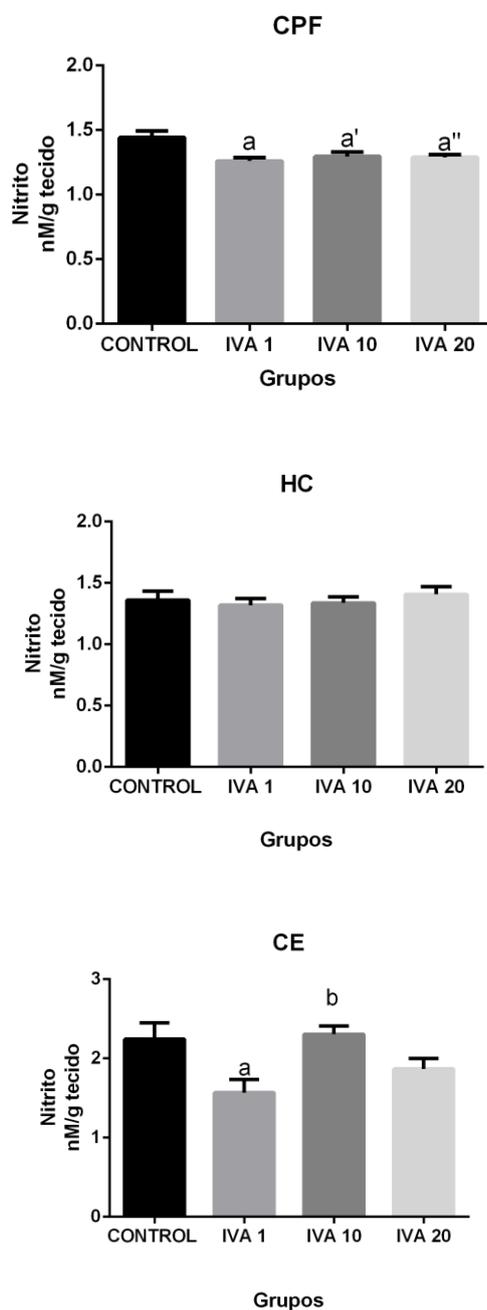
Efeitos da Ivabradina nos níveis de Malonaldeído no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em convulsões induzidas por Picrotoxina em camundongos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Fig.8: Efeitos da Ivabradina nos níveis de Malonaldeído no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em convulsões induzidas por Picrotoxina em camundongos. Os animais foram submetidos à 30 minutos de observação e eutanasiados logo após. As colunas representam a média \pm E.P.M. de 8–11 animais/grupo (ANOVA and Tukey test post hoc). CPF: Córtex pré-frontal, HC: Hipocampo, CE: corpo estriado.

Efeitos da Ivabradina nos níveis de nitrito no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em convulsões induzidas por PicROTOXINA em camundongos.



Fonte: Elaborado pela autora.

Fig.9: Efeitos da Ivabradina nos níveis de nitrito no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em convulsões induzidas por PicROTOXINA em camundongos. Os animais foram submetidos à 30 minutos de observação e eutanasiados logo após. As colunas representam a média \pm E.P.M de 8–11 animais/grupo (ANOVA and Tukey test post hoc). CPF: Córtex pré-frontal, HC: Hipocampo, CE: corpo estriado.

Efeitos da Ivabradina nos níveis de glutathiona reduzida no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em convulsões induzidas por Picrotoxina em camundongos.

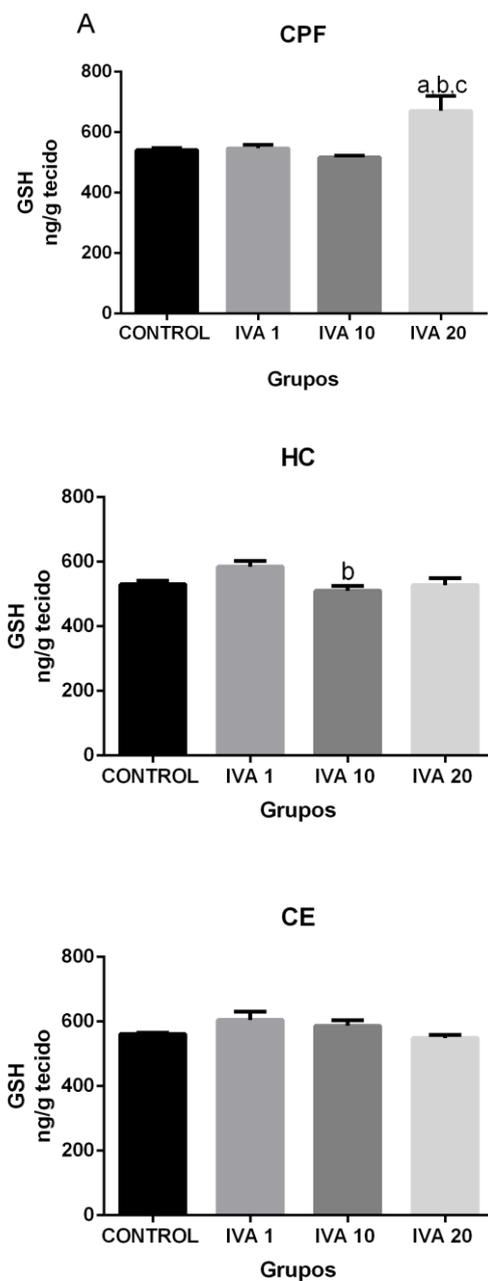


Fig.10: Efeitos da Ivabradina nos níveis de GSH no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em convulsões induzidas por Picrotoxina em camundongos. Os animais foram submetidos à 30 minutos de observação e eutanasiados logo após. As colunas representam a média \pm E.P.M de 8–11 animais/grupo (ANOVA and Tukey test post hoc). CPF: Córtex pré-frontal, HC: Hipocampo, CE: corpo estriado.

5.3 Estudo do Docking Molecular

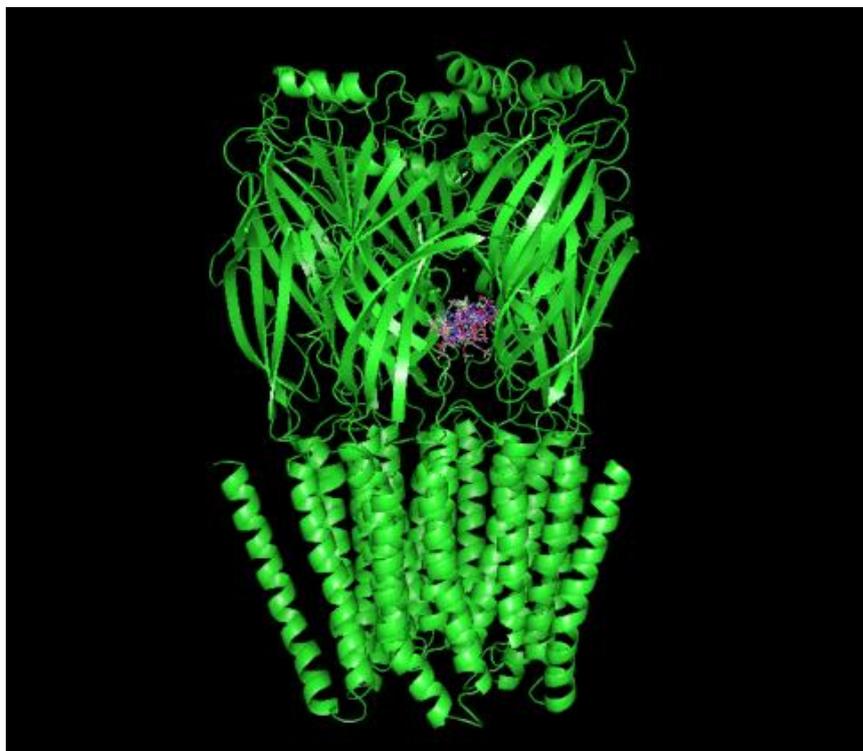
5.3.1 Ivabradina x GABA_A

Utilizando o programa PyMol v1.4.7, foi observado o encaixe da Ivabradina em todos os 10 clusters de maior energia, gerados a partir do modelo matemático utilizado na procura de sítios de interação pelo *software*. Com base nestes clusters, foi possível sobrepor os 10 sítios de interação, e foi visualizada a sobreposição dos 7 mais energéticos. Isto sugere que dentro de 50 mil possibilidades prospectadas pelo software, as 10 mais energéticas foram selecionadas, e 7 estavam no mesmo sítio com uma reprodutibilidade química e espacial que sugere fortemente que aquele é o melhor sítio de ligação. O sítio corresponde à fração extracelular do receptor, especificamente se liga aos resíduos de aminoácidos Ala45, Asn100, Ala135, Met137, Thr151, Arg180 e Glu182.

Observando o complexo formado entre o receptor GABA_A (em verde) e a Ivabradina (em roxo), pôde-se perceber que o ligante teve maior afinidade pela fração rica em estruturas folha- β (Figura 11), tendo em vista que o canal GABA_A tem, em sua estrutura tridimensional, um equilíbrio grande entre estruturas α -hélice e folhas- β .

A partir deste encaixe, foi necessário rotacionar o complexo formado para verificar se o sítio de ligação da Ivabradina causaria impedimento estérico na função de passagem de íons. Desta forma, foi observado que, de fato, o ligante não obstrui a passagem de íons pelo poro do canal do receptor GABA_A (Figura11-b).

A



B

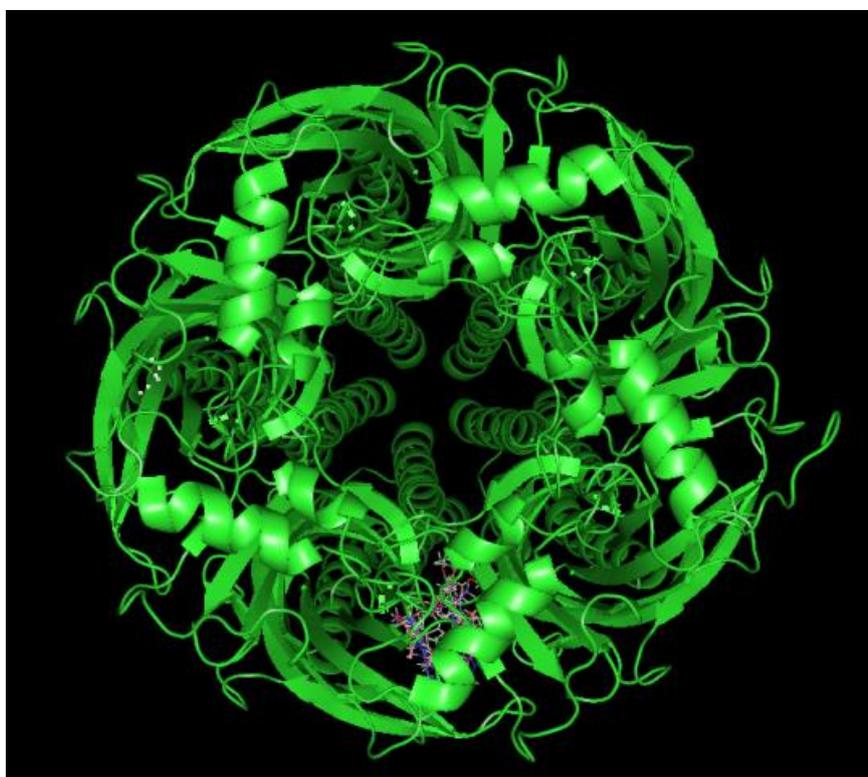


Figura 11: a) Estrutura tridimensional do receptor GABA_A (PDB ID: 4COF) com os clusters mais energéticos sobrepostos em um sítio de ligação na porção rica em folhas- β . b) Visão central do canal GABA_A, evidenciando que o sítio de interação da Ivabradina não obstrui a passagem, e sugere uma ação agonista como observado nos experimentos *in vivo*.

Em relação à interação química, é possível observar que o receptor GABA_A interage fortemente com o ligante, com ligações químicas que variam de 1,9 a 3,1 angstroms, e que vários aminoácidos do receptor propiciam encaixe estável do ligante (Figura 6), garantindo a ação biológica sugerida pelo experimento *in vivo*. Poucas repulsões eletrostáticas são observadas e os aminoácidos do receptor que interagem mais fortemente são: Ala45, Asn100, Ala135, Met137, Thr151, Arg180 e Glu182.

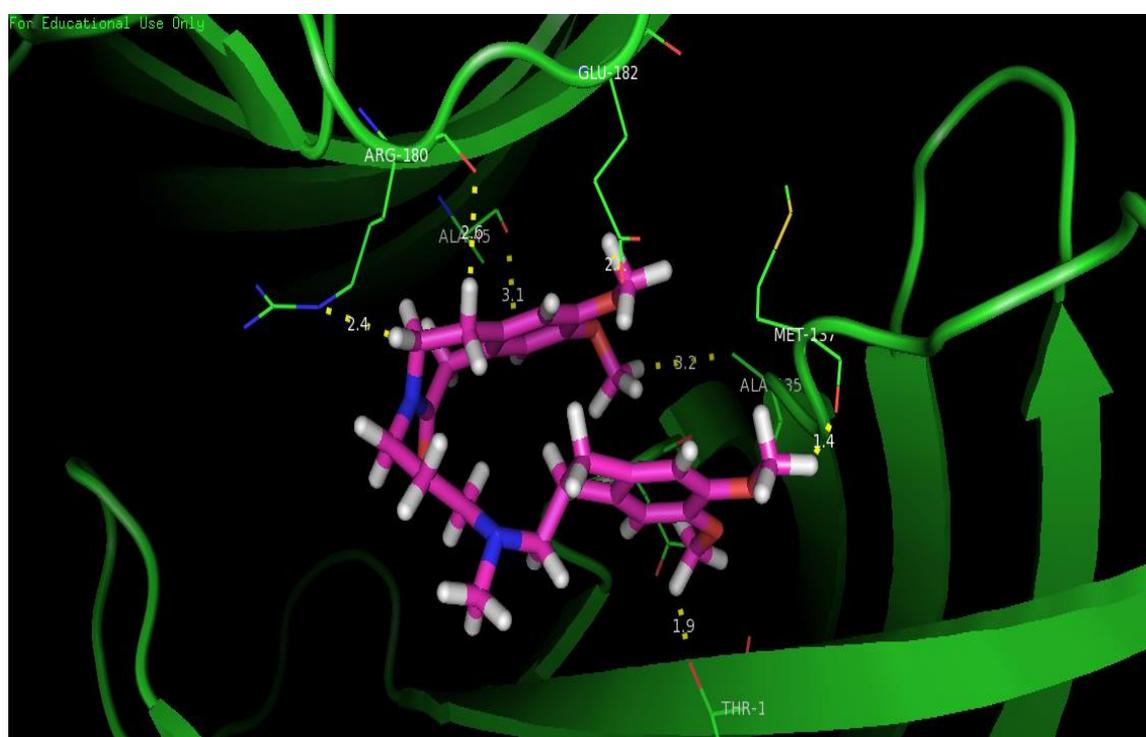


Figura 12: Vista ampliada do sítio de interação, mostrando as distancias de ligação entre o canal GABA_A (verde) e a Ivabradina (púrpura), variando de 1,9 a 3,1 angstroms.

Os resultados obtidos sugerem que existe compatibilidade química, espacial e energética entre o receptor GABA_A e a Ivabradina, com ligações químicas que sugerem forças de van der Waals e até mesmo interações de hidrogênio. Isso possibilita ao estudo do docking, usar parâmetros energéticos de medição (Tabela 4). Para isso, observa-se, computacionalmente, que uma estrutura protéica tridimensional não é estática, e devido a vibração e movimentação causada pelos diferentes átomos, a molécula tem uma energia intrínseca, que ao se ligar à Ivabradina, se estabiliza e demonstra perda energética. Desta forma, a formação do

complexo GABA_A/Ivabradina é evidenciada possivelmente *in vivo*, e *in silico*, sob perspectivas energéticas, espaciais e químicas.

Tabela 04 - Energia da região de interação do complexo GABA_A/Ivabradina (kcal/mol)

CLUSTER	GABA_A x Ivabradina
Cluster 01:	-293,02
Cluster 02:	-292,80
Cluster 03:	-272,97
Cluster 04:	-270,31
Cluster 05:	-266,21
Cluster 06:	-262,21
Cluster 07:	-258,23
Cluster 08:	-256,95
Cluster 09:	-253,45
Cluster 10:	-252,04

VE – valor energético (kcal/mol)

5.3.2 Diazepam X GABA_A

Com base neste modelo, foram gerados 128 clusters, e os 10 mais energéticos (de maior afinidade) foram analisados. Como esperado, houveram muitas sobreposições entre os 10 clusters mais energéticos, garantindo a reprodutibilidade do encaixe entre as duas moléculas. Desta forma, foi observado que a localização do Diazepam se assemelha à Ivabradina, entre conformações estruturais de loops e folhas-beta na região extracelular do receptor GABA_A. Porém, também se torna necessário rotacionar o complexo formado para verificar possíveis impedimentos estéricos da função do canal iônico, e como o Diazepam é um agonista, os dados encontrados corroboram com os dados farmacológicos: o complexo não apresenta impedimentos estéricos

Figura 13: Sobreposição dos clusters mais energéticos (colorido) e sua localização na estrutura tridimensional do receptor GABA_A(cinza).

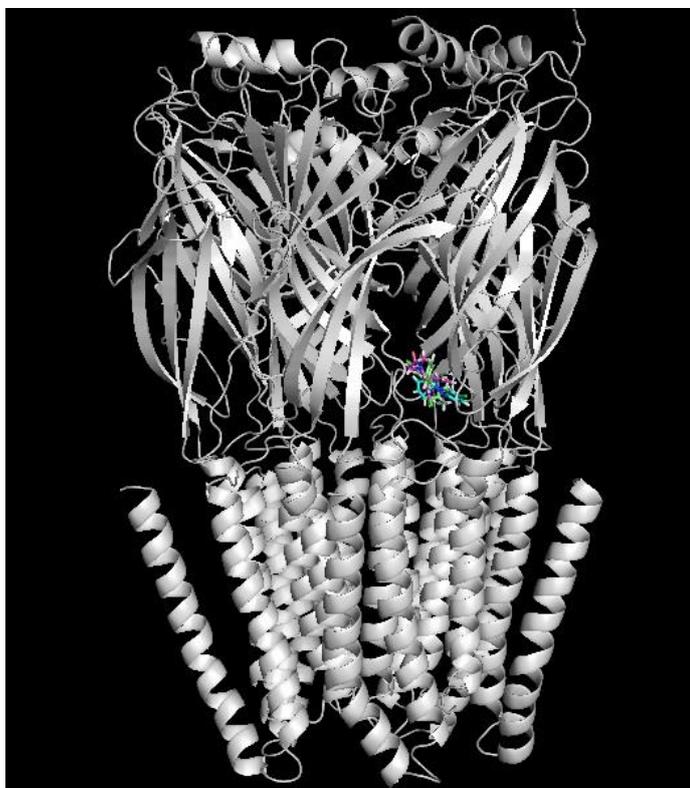


Figura 13: Estrutura tridimensional do receptor GABA_A (em cinza) (PDB ID: 4COF) com os clusters mais energéticos sobrepostos em um sítio de ligação na porção rica em folhas-β com a molécula de diazepam (colorido).

Outra informação que sustenta a validação da Ivabradina como molécula com afinidade ao receptor GABA_A é a compatibilidade química semelhante ao Diazepam, ao observar o ligante com aproximações computacionais (Figura 8).

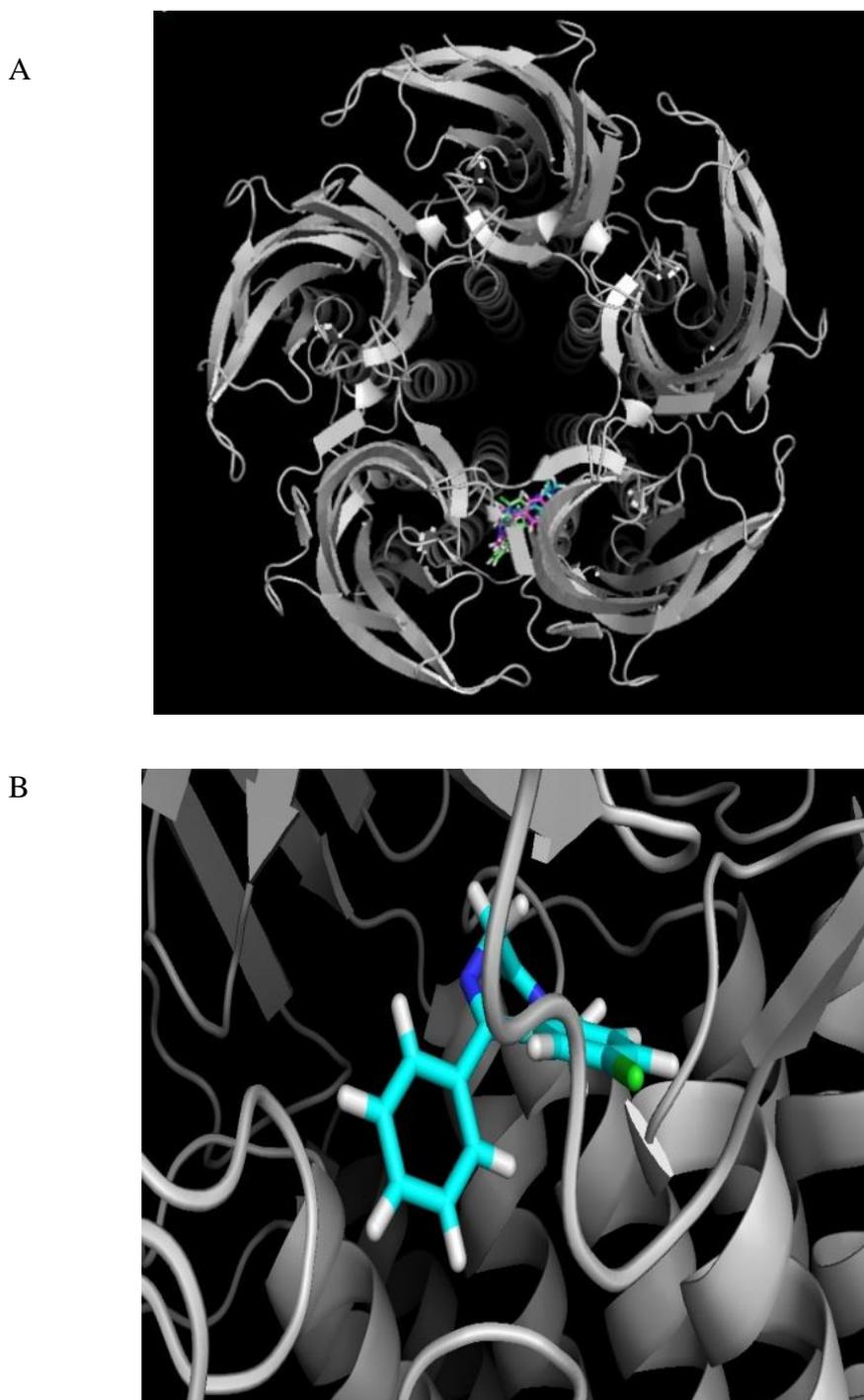


Figura 14: a) Visão superior do canal GABA_A complexado com os clusters mais energéticos de Diazepam (colorido): evidência de que a função do canal não é comprometida por impedimentos estéricos e químicos. b) Molécula de Diazepam complexada ao receptor GABA_A : evidência de interações químicas, poucas repulsões, e encaixe de alta energia de complexação (afinidade)

5.3.3 Ivabradina X Receptor NMDA

A partir das 50.000 soluções de encaixe projetadas pelo encaixe simulado do software, os clusters com maior energia de complexação foram salvos e analisados para determinação do sítio de docking entre as duas moléculas. Apesar de alta energia, também foi possível observar que entre os 10 clusters mais energéticos houveram poucas sobreposições (Figura 9), o que indica que o receptor não apresenta sítio específico para a droga, e que, apesar da formação de ligações químicas fortes, a baixa reprodutibilidade do encaixe sugere pouca afinidade entre receptor e ligante.

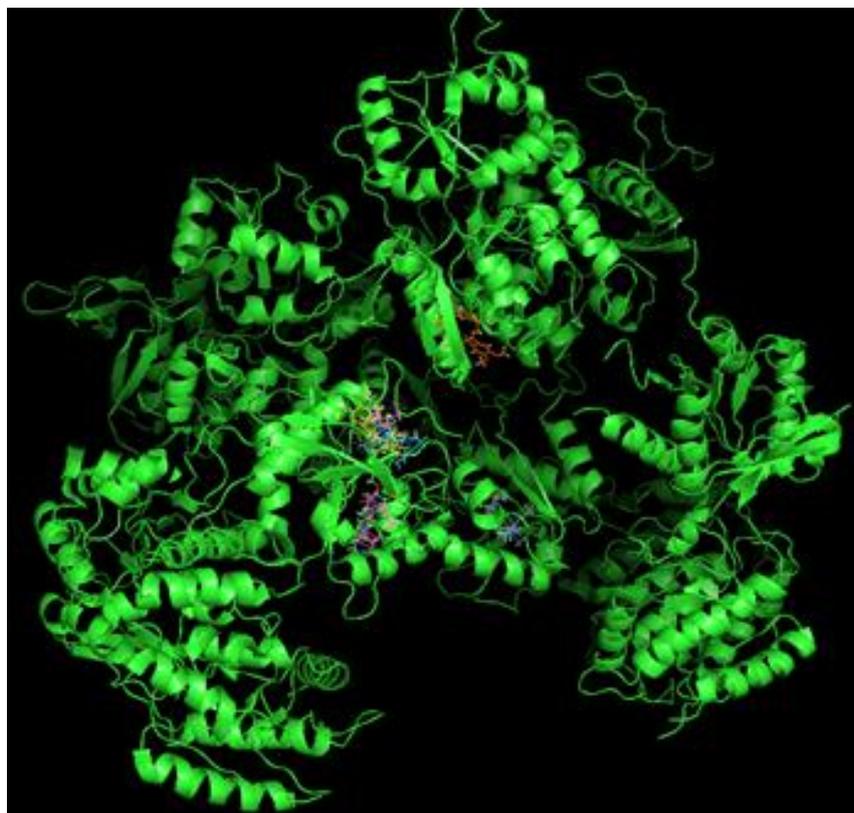


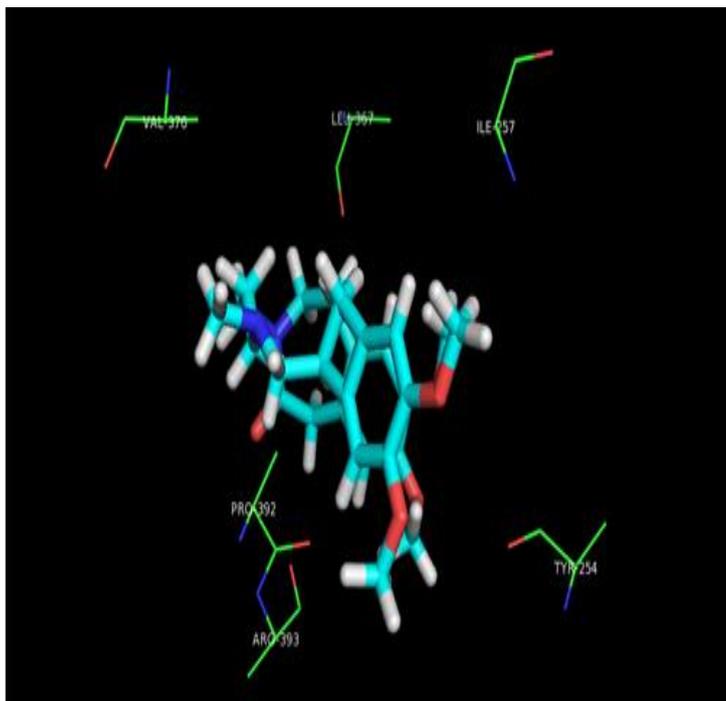
Figura 15: Receptor NMDA (verde) e a Ivabradina nas 10 posições de maior energia, evidenciando poucas sobreposições.

Com base no complexo formado, foi considerado o cluster 01 (mais energético) para elucidação das bases moleculares que sustentam a possível interação entre a Ivabradina e o receptor NMDA (Figura 9).

Ao aproximar este sítio, foi possível perceber a ação direta dos aminoácidos Tyr254, Ile257, Leu376, Val376, Pro392 e Arg393 (Figura 10), que apesar das evidências que sugerem a baixa compatibilidade no docking, fazem interações fortes com as extremidades reativas da Ivabradina, com ligações de até 1,1 angstroms (Figura 10).

A interação mais forte é realizada entre o resíduo Pro392 com uma distância de 1,1 angstroms de um dos hidrogênios reativos da Ivabradina não garantem a atividade biológica de ativação/inativação do canal NMDA, porém mostram bases moleculares de interação entre os dois, que apresentam baixa afinidade *in silico*.

A



B

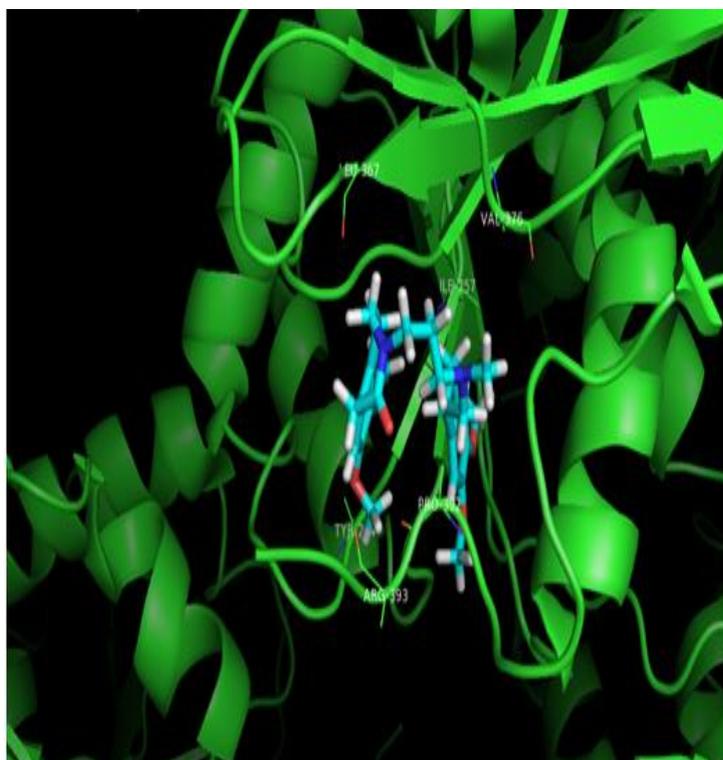


Figura 16: Complexo NMDA-Ivabradina, evidenciando a localização do ligante e a sobreposição de quatro moléculas de Ivabradina no mesmo sítio. Resíduos de aminoácidos envolvidos na interação entre NMDA e Ivabradina (Tyr254, Ile257, Leu376, Val376, Pro392 e Arg393).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que o pré-tratamento com IVA atenuou a ocorrência de convulsões em camundongos utilizando os modelos de convulsão de PTZ e PICRO. Esta atenuação foi acompanhada por um aumento dos níveis de GSH no córtex pré-frontal e diminuição dos níveis de MDA no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado dos animais submetidos ao modelo de convulsão induzido por PTZ. Efeito semelhante foi observado nos níveis de MDA em todas as áreas estudadas, os níveis de nitrito apresentaram efeitos opostos, dependendo da área cerebral estudada no modelo de indução de convulsão por PTZ e uma diminuição no modelo de PICRO. de GSH somente no córtex pré-frontal de animais submetidos ao teste de convulsão induzido por picrotoxina. Também foi demonstrado afinidade da IVA na ligação com o receptor GABA_A através do estudo de docking molecular.

Para tornar a explanação da discussão mais didática, resolvemos abordar os resultados na seguinte ordem: avaliação da ação anticonvulsivante da IVA nos modelos de convulsão induzidos por PTZ e PICRO; docking molecular da IVA vs. Receptor GABA_A, diazepam vs. Receptor GABA_A e IVA vs. Receptor NMDA.

Notavelmente, de acordo com a literatura científica, esta é a primeira avaliação do efeito anticonvulsivante do pré-tratamento com IVA no modelo de convulsão induzido por PTZ e PICRO e relacionando esta ação ao receptor ionotrópico GABA_A, bem como ação neuroprotetora no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado relacionadas a esses modelos de indução de convulsão. Atualmente, são escassos os estudos da ação da IVA no sistema nervoso central (IBRAHIM; MANSUOR, 2015; LUSZCZKI *et al.*, 2013; LUSZCZKI *et al.*, 2017).

Os resultados mostraram que IVA, com diferentes doses, apresentou efeito anticonvulsivante nos testes de PTZ e PICRO. Contudo, IVA não apresentou efeito anticonvulsivante no teste de PILO. Sabemos que a indução de convulsão por esses modelos seguem via diferentes de neurotransmissores.

A capacidade convulsiva da PTZ depende, em grande parte, do antagonismo do complexo do receptor GABA_A, provavelmente através de uma interação alostérica com o canal Cl⁻ que diminui as correntes inibitórias mediadas

por GABA (LOSHER et al., 1988; HUANG et al. 2001; QUITANS-JÚNIOR et al., 2002). Além disso, a ativação do receptor de NMDA parece estar envolvida na iniciação e generalização de crises induzidas por PTZ (OLSEN et al., 1981; VELISEK, 2006; MOEZI et al., 2011).

Neste estudo, pré-tratamento da IVA em doses baixas aumentou latência de morte dos animais submetidos ao modelo de convulsão por PTZ. O aumento da latência de morte pode ser um indicativo de possível efeito anticonvulsivante de drogas submetidas à avaliação por este modelo (AGUIAR, et al., 2012; CHAVES, 2012). Neste contexto, sugerimos que o efeito anticonvulsivante do IVA possa ser mediado pela interação do sistema GABAérgico e inibição do glutamatérgico.

A PICRO também atua como bloqueador do canal de cloreto do receptor GABA_A e é muito útil para o rastreamento de fármacos antiepilépticos (VELISEK, 2006). Vários fármacos anticonvulsivantes, como a vigabatrina, topiramato e benzodiazepínicos agem através da potencialização da neurotransmissão gabaérgica (LOSCHER; SHIMITT, 1988; DORRONZORO et al., 2001). Em nosso estudo, o pré-tratamento com IVA aumentou a latência de convulsão dos animais tratados com este agente. O aumento da latência para o aparecimento das convulsões é um forte indicativo de uma ação anticonvulsivante. Drogas como o diazepam e clonazepam aumentam este parâmetro (DE SARRO et al, 1996; HARUNA, 2000).

Um estudo recente (IBRAHIM; MANSUOR, 2015) que induziu convulsão em ratos através da administração de ácido caínico, um modelo de epilepsia do lobo temporal, demonstrou a ação anticonvulsivante e antioxidante da Ivabradina. Este fármaco aumentou o tempo de latência para convulsão quando comparada ao controle e diminuiu o tempo de duração das crises. Também verificou uma redução nos níveis de malonaldeído e nitrito nos animais tratados com IVA.

Em outro estudo, IVA mostrou um aumento do limiar para convulsões no modelo de eletrochoque máximo em camundongos, sugerindo que esse fármaco possui um potencial anticonvulsivante para convulsões tônicas (LUSZCZKI et al., 2013).

Como os nossos resultados apresentaram efeito anticonvulsivante da IVA relacionados principalmente a indutores de convulsão ligados ao sistema gabaérgico

e glutamatérgico, resolvemos realizar o estudo de *docking* molecular da IVA com o receptor GABA_A e o receptor glutamatérgico NMDA.

Os resultados do *docking* realizado com a IVA demonstraram que esse fármaco apresenta compatibilidade química, espacial e enérgica pelo receptor GABA_A, bem como interage fortemente com vários aminoácidos deste receptor localizados na porção extracelular do rica em folhas- beta propiciando uma ligação estável sem obstrução do canal do íon cloreto. Vários autores utilizam estes a energia de ligação, distância entre as ligações, compatibilidade espacial e energética como parâmetro para indicar a possível ação entre duas moléculas (MELO et al., 2016; DAMASCENO et al., 2016; MELO JÚNIOR et al., 2017). Esse resultado da IVA foi semelhante ao apresentado pelo Diazepam, pois o mesmo também se ligou em porções ricas em folhas- beta localizada na porção extracelular deste receptor. O diazepam é um fármaco utilizado na clínica médica como um anticonvulsivante de urgência, nos receptores GABA_A (PORTO et al., 2007; DORRONZORO et al., 2011). Vale salientar que o tratamento com diazepam melhora a mortalidade causando redução da duração e intensidade de convulsões (SHIH; DUNIBO; MC DONOUGH, 2003).

Em relação ao estudo de *docking* molecular da IVA nos receptores de NMDA, nós observamos que esse fármaco se ligou com baixa afinidade e reprodutibilidade a esse receptor. Esses resultados juntos levam a sugerir que a ação anticonvulsivante da IVA esteja relacionada ao sistema gabaérgico e possivelmente através de um efeito de modulação do receptor GABA_A.

Vários estudos (GOMES et al., 2011; HONÓRIO et al., 2012; AGUIAR et al., 2013) relacionam o estresse oxidativo a mudanças neuroquímicas observadas durante processos convulsivos. Nessa linha de pensamento resolvemos realizar o estudo do estresse oxidativo apenas nos animais onde a IVA apresentou efeito anticonvulsivante (modelos de PTZ e PICRO). Para esse estudo utilizamos áreas cerebrais que são envolvidas com o processo convulsivo e também importante regiões relacionadas à varredura de radicais livres, como córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado. Vale salientar que essas regiões também têm funções fisiológicas importantes no processo de julgamento, formação de memória e movimento motor, respectivamente (RUBINSON; LANG, 2009).

Os resultados do presente estudo, também, demonstraram que o pré-tratamento de IVA diminuiu os níveis de MDA nas áreas cerebrais estudadas e aumentou os níveis de GSH no córtex pré-frontal e corpo estriado de animais submetidos ao modelo de convulsão induzido por PTZ. Por outro lado, os níveis de nitrito nos animais apresentou um efeito oposto conforme a dose de IVA administrada. Substâncias oxidantes, como a PTZ causam aumentos nos níveis de MDA, enquanto as substâncias com propriedades antioxidantes, como a vitamina E, tendem a diminuir este parâmetro (LIMA *et al.*, 2016).

Os resultados demonstraram que o pré-tratamento de IVA diminuiu os níveis de MDA nas três áreas cerebrais estudadas de animais submetidos ao modelo de convulsão induzido por PICRO. Neste modelo, os níveis de nitrito apresentou uma diminuição no córtex pré-frontal e corpo estriado, mas não apresentou diminuição no hipocampo. Já no córtex pré-frontal, houve um aumento nos níveis de GSH neste modelo. Contudo, o aumento dos níveis de GSH está relacionado com a redução do desequilíbrio oxidativo em doenças neurodegenerativas (VASCONCELOS *et al.*, 2015; LIMA, 2016; SOUSA *et al.*, 2015).

Estudos têm demonstrado que as espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenham um papel importante na neurobiologia de muitas doenças, especialmente doenças neurológicas, como epilepsia (TAKUMA *et al.*, 2004; AGUIAR *et al.*, 2012; AGUIAR *et al.*, 2013; MARES *et al.*, 2013). A epilepsia é caracterizada por hiperexcitabilidade neuronal e requer alta energia na sinapse neuronal. Isto pode explicar o aumento dos níveis de estresse oxidativo como consequência da própria doença (MARES *et al.*, 2013).

Dessa maneira, durante um quadro de convulsão existe um alto consumo de oxigênio, alto consumo lipídico e baixa defesa antioxidante no SNC, por conta disso o cérebro tem, comparativamente, maior vulnerabilidade a danos oxidativos (ONO *et al.*, 2000; VALKO *et al.*, 2007).

Evidências indicam que o estresse oxidativo pode estimular inúmeras vias, levando ao aumento da produção de radicais de oxigênio que podem atacar proteínas, ácidos nucleicos e membranas lipídicas, perturbando assim a função e integridade dos neurônios (KOVACS *et al.*, 1996). Uma das causas mais plausíveis para estas alterações neuronais é o estresse oxidativo elevado devido ao aumento

da produção de radicais livres. Neste contexto, já foi relatado que os radicais livres são elevados em epilepsia (MACEDO *et al.*, 2009; AGUIAR *et al.*, 2012; AGUIAR *et al.*, 2013).

O aumento da concentração de TBARS (MDA) está relacionado com a formação de radicais livres durante as convulsões (SHAKEEL *et al.*, 2017). Os níveis de TBARS (MDA) são amplamente adotados como método sensível para a medida da peroxidação lipídica (AGUIAR *et al.*, 2012; VASCONCELOS *et al.*, 2015). O estresse oxidativo pode afetar drasticamente as propriedades da membrana através do MDA, que é uma das reações de radicais livres mais biologicamente relevantes (UCHIDA, 2000).

O nitrito é um metabolito do óxido nítrico (NO) e a produção de NO pode ser medida através da análise de quantificação da produção de nitrito (TSIKAS, 2005). No entanto, o papel preciso do NO na epilepsia não é totalmente compreendido; embora a maioria dos estudos tenha revelado que os inibidores do NO são anticonvulsivantes (OSONOE *et al.*, 1994; MULSCH *et al.*, 1994), suas ações pró-convulsivas (HERBERG *et al.*, 1995) foram relatadas. Estes diferentes efeitos podem ser explicados devido a diferenças experimentais como espécie utilizada, agente convulsivo, tipo de modelo de convulsão, condições experimentais ou área cerebral estudada (BOROWICZ *et al.*, 2000).

A produção endógena de radicais livres é normalmente limitada e contrabalançada por sistemas de defesa. Existem mecanismos de defesa antioxidante, após as crises convulsivas. Um bom exemplo disso é a glutatona (GSH), considerado o principal responsável pela defesa antioxidante intracelular não enzimática no organismo (PIERREFICHE; LABORIT, 1995; REED; SAVAGE, 1995).

O estresse oxidativo pode causar danos nos organismos e neurotoxicidade induzidos por radicais livres. Isto ocorre devido a alterações nos níveis de GSH. Uma consequência importante dos níveis alterados de GSH é a ativação de cascatas de morte celular. Um estudo demonstrou que as alterações no estado de GSH são suficientes para contribuir para a perda neuronal induzida por convulsões (JONES; BROWN; STEMBERG, 1995; ISCHIROPOULOS, 1998).

Menon *et al.* (2012) realizou um estudo para investigar se o aumento dos níveis de estresse oxidativo em pacientes com epilepsia é o resultado da própria doença ou relacionado aos agente anticonvulsivantes. Os resultados mostraram um

aumento significativo nos níveis de malonaldeído em pacientes com epilepsia, em comparação com os grupos controles.

Um outro estudo realizado por Oliveira et al. (2016) demonstrou efeito neuroprotetor e antioxidante de levetiracetam e clonazepam, dois anticonvulsivantes em roedores, pela diminuição de substâncias pró-oxidantes através da redução dos níveis de peroxidação lipídica, nitrito e catalase e, também, através do aumento os níveis de GSH.

Esses dados reforçam nossos achados onde o pré-tratamento com IVA pela demonstração do efeito neuroprotetor no modelo de convulsão induzido por PTZ e PICRO. Semelhante aos nossos achados MOHAMED *et al.*(2015) também demonstraram que a IVA apresentou um efeito antioxidante. Esses autores investigaram o efeito do pré-tratamento da IVA (20 mg/kg), em um modelo de convulsão induzido por ácido caínico, e observaram uma redução dos níveis corticais de MDA e nitrito.

A ativação excessiva e repetida dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA aumentam o influxo de Ca^{++} , resultando em uma sobrecarga destes íons em neurônios pós-sinápticos, podendo causar excitotoxicidade glutamatérgica. Processo este que pode levar a produção de radicais livres através da ativação de proteases e fosfolipases cálcio- dependentes o que pode contribuir para danos celulares relacionados a crises convulsivas (KANDEL, 2014).

Azan et al.(2012) colaboradores concluíram que o uso de substâncias que diminuem os radicais livres no tratamento da epilepsia tem proporcionado importantes perspectivas para o desenvolvimento futuro de novas drogas antilépticas.

Alguns estudos relacionam a atividade convulsivante a ação do canal HCN (CHEN *et al.*,2001; KITAYAMA *et al.*, 2003; SURGES, 2003; POOLOS, 2004; POSTEA; BIEL, 2011;). Um estudo realizado por Atherton et al.(2010) relatou que a ativação dos canais HCN, no núcleo subtalâmico, podem antagonizar a neurotransmissão inibitória GABAérgica. Estudo futuros são necessários para esclarecer a relação entre os canais HCN e o sistema GABAérgico.

7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados apresentados neste trabalho permitiu as seguintes considerações:

- A Ivabradina possui uma atividade anticonvulsivante possivelmente relacionada à via gabaérgica em animais pré-tratados por três dias consecutivos e, logo após, submetidos a indução de convulsão por PTZ e PICRO.
- A Ivabradina administrada em doses repetidas reduziu significativamente a lipoperoxidação lipídica nas áreas estudadas em animais submetidos a modelos de convulsão por PTZ e PICRO.
- A Ivabradina administrada em doses repetidas reduziu significativamente os níveis de nitrito nas áreas estudadas em animais submetidos à modelo de convulsão por PTZ E PICRO.
- A Ivabradina administrada em doses repetidas aumentou de forma significativa os níveis de glutathiona reduzida (GSH) nas áreas estudadas em animais submetidos à modelo de convulsão por PTZ e PICRO.
- A Ivabradina apresenta compatibilidade química, espacial e energética pelo receptor $GABA_A$, bem como interage fortemente com vários aminoácidos deste receptor propiciando uma ligação estável sem obstrução do canal do íon cloreto através do estudo do docking molecular da Ivabradina vs. Receptor $GABA_A$.
- A Ivabradina se ligou com baixa afinidade ao receptor NMDA no estudo do docking molecular da Ivabradina vs. receptores de NMDA.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo demonstrou a ação anticonvulsivante e neuroprotetora do tratamento em doses repetidas de Ivabradina através dos modelos de convulsão por pentilenotetrazol e picrotoxina. Diante dos achados, podemos concluir que a ivabradina possui ação anticonvulsivante, neuroprotetora e afinidade com o receptor gabaérgico GABA_A, mas não o NMDAR, semelhante a apresentada pelo diapezam. Os achados do comportamento referentes aos animais que receberam PTZ e PICRO corroboram com os achados do docking molecular. Esta ação anticonvulsivante pode ser, possivelmente, relacionada com a via GABAérgica, pois atenuou a ação convulsivante de dois agente inibitórios clássicos desta via. Mas serão necessários mais estudos para uma melhor elucidação do mecanismo de ação e compreensão dessa ação.

REFERÊNCIAS

- ABREU, I.N.; MAZZAFERA, P.; EBERLIN, M.N.; ZULLO, M.A.; SAWAYA, C.H.F. Characterization of the variation in the imidazole alkaloid profile of *Pilocarpus microphyllus* in different seasons and parts of the plant by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting and identification of novel alkaloids by tandem mass spectrometry. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, v. 21, n. 7, p.1205-1213, 2007. <http://dx.doi.org/10.1002/rcm.2942>
- ACCILI, E.A. From funny current to HCN channels: 20 years of excitement. **News Physiol. Sci.**, v.17, p. 32–37, 2002.
- ACHARYA, M.M.; KATYARE, S.S. Structural and functional alterations in mitochondrial membrane in picrotoxin-induced epileptic rat brain. **Exp Neurol**, v.192, p. 79 -88, 2005.
- AGUIAR, C.C.; ALMEIDA, A.B.; ARAÚJO, P.V.; DE ABREU, R.N.; CHAVES, E.M.; DO VALE, O.C.; MACÊDO, D.S.; WOODS, D.J.; FONTELES, M.M.; VASCONCELOS, S.M. Oxidative stress and epilepsy: literature review. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, 2012.
- AGUIAR, C.C.; ALMEIDA, A.B.; ARAÚJO, P.V.; VASCONCELOS, G.S.; CHAVES, E.M.; DO VALE, O.C.; MACÊDO, D.S.; LEAL, L.K.; DE BARROS, V.G.S.; VASCONCELOS, S.M. Effects of agomelatine on oxidative stress in the brain of mice after chemically induced seizures. **Cell Mol Neurobiol**, v.33, n.6, p.825-835, 2013.
- AGUIAR, C.C.T.; ALMEIDA, A.B.; ARAÚJO, P.V.P.; VASCONCELOS, G.S.; CHAVES, E.M.C.; VALE, O.C.; MACÊDO, D.C.; SOUSA, F.C.F.; VIANA, G.S.V.; VASCONCELOS, S.M.M. Anticonvulsant effects of agomelatine in mice. **Epilepsy & Behavior**. v.24, p.324-328, 2012.
- AMES, A. CNS energy metabolism as related to function. **Brain Research Reviews**, v. 34, n. 1-2, p.42-68, nov. 2000.
- ATHERTON, J.E.; KATSUNORI KITANO, JEROME BAUFRETON, J.; FAN, K.; WOKOSIN, D.; TKATCH, T.; SHIGEMOTO, R.; SURMEIER, D.J.; BEVAN, M.D. Selective participation of somatodendritic HCN channels in inhibitory but not excitatory synaptic integration in neurons of the subthalamic nucleus. **J Neurosci**. v.30, p.16025–16040, 2010.
- AZAM, F., PRASAD, M. V. V., THANGAVEL, N. “Targeting oxidative stress component in the therapeutics of epilepsy,” **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 9, p. 994–1007, 2012.
- BELISSIMO, M.I.; AMADO, D.; ABDALLA, D.S.; FERREIRA, E.C.; CAVALHEIRO, E. A.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Research**, v.46, n. 2, p.121-128, 2001.

BENARDO, L.S.; PRINCE, D.A. Ionic mechanisms of cholinergic excitation in mammalian hippocampal pyramidal cells. **Brain Res.**, v.249, p.333-344, 1982.

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

BOROWICZ, K.K.; LUSZCZKI, J.; KLEINROK, Z.; CZUCZWAR, S.J. 7-nitroindazole, a nitric oxide inhibitor, enhances the anti-convulsive action of ethosuximide and clonazepam against pentylenetetrazol-induced convulsions. **J. Neural Transm.** v.107, 2000.

BOULLAY, P. F. G. Analyse chimique de la Coque du Levant, *Menispermum cocculus*. **Bulletin de Pharmacie**, v. 4, p. 1-34, 1812.

BRENNAN, G. P.; BARAM, T.Z.; POOLOS, N.P. Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated (HCN) Channels in Epilepsy. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v. 6, p. 223-84, 2016.

BRUNTON, L.; PARKER, K.; BLUMENTHAL, D.; BUXTON, I. (Ed.) Neurotransmitters. **Goodman & Gilman's: manual of pharmacology and therapeutics**. New York: McGraw Hill, 2006.

BURIGO, M.; ROZA, C.A.; BASSANI, C.; FAGUNDES, D. A.; REZIN, G. T.; FEIER, G.; STRECK, E. L. Effect of electroconvulsive shock on mitochondrial respiratory chain in rat brain. **Neurochem Res**, v.31, p.1375 -9, 2006.

CAVALHEIRO, E. A.; FERNANDES, M. J.; TURSKI, L.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G. Spontaneous Recurrent Seizures in Rats: Amino Acid and Monoamine Determination in the Hippocampus. **Epilepsia**, v. 35, n. 1, p.1-11, jan. 1994.

CERBAI, E.; PINO R.; PORCIATTI, F.; SANI, G.; TOSCANO, M.; MACCHERINI, M.; GIUNTI, G.; MUGELLI, A. Characterization of the Hyperpolarization-Activated Current, I_h, in Ventricular Myocytes From Human Failing Heart. **Circulation**, v. 95, n. 3, p.568-571, 1997

CHANG, S.J.; YU, B.C. Mitochondrial matters of the brain: mitochondrial dysfunction and oxidative status in epilepsy. **Journal Of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 42, n. 6, p.457-459, 18 nov.2010

CHAVES, E.M.C; VALE, O.C; MACÊDO, D.C; SOUSA, F.C.F; VIANA, G.S.V; VASCONCELOS, S.M.M; .Anticonvulsant effects of agomelatine in mice. **Epilepsy & Behavior**. v.24, p.324-328, 2012.

CHEN, K.; ARADI, I.; THON, N.; EGHBAL-AHMADI, M.; BARAM, T.Z.; SOLTESZ, I. Persistently modified h-channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability. **Nature Medicine**, v. 7, n. 3, p.331-337, 2001

CHO, K.O.; et al. Aberrant hippocampal neurogenesis contributes to epilepsy and associated cognitive decline. **Nat Commun.** v.6, p.6606, 2015.

CLARK, D.D.; SOKOLOFF, L. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. Philadelphia: Lippincott-Raven; p.637-70, 1999.

Commission on Terminology of the International League Against Epilepsy. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. **Epilepsia.** v.30, p.389-399, 1989

DAMASCENO, M.B.M.V, et al. "Frutalin reduces acute and neuropathic nociceptive behaviours in rodent models of orofacial pain. **Chemico-biological interactions.** v.256,p. 9-15, 2016.

DE SARRO, G.; GITTO, R.; RIZZO, M.; ZAPPIA, M.; DE SARRO, A.1, 4-Benzodiazepine derivatives as anticonvulsant agents in DBA/2 mice **General Pharmacology: The Vascular System.**v.27, p. 935-41, 1996

DI FRANCESCO, D.; OJEDA, C. Properties of the current I_f in the sino-atrial node of the rabbit compared with those of the current I_K , in Purkinje fibres. **The Journal of Physiology**, v. 308, p. 353, 1980.

DI FRANCESCO, D. The cardiac hyperpolarizing-activated current I_f : origin and developments. **Prog Biophys Mol Biol.** v.46; p.163-83; 1985

DIFRANCESCO, Dario; BORER, Jeffrey S. The Funny Current. **Drugs**, v. 67, n. 2, p.15-24, 2007

DING, D.; WANG, W.; WU, J.; YANG, H.; LI, S.; DAI, X.; YANG, B.; WANG, T.; YUAN, C.; MA, G.; BELL, G. S.; KWAN, P.; BOER, H.M.; HONG, Z.; SANDER, J.W. Premature mortality risk in people with convulsive epilepsy: long follow-up of a cohort in rural China. **Epilepsia.** v.54, p.512–517, 2013.

DINGLE DINE, R. Glutamatergic mechanisms related to epilepsy. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. 4th ed, 2012.

DORRONZORO, E.; SANTOS-BUESO, E.; VICO-RUIZ, E.; SÁENZ-FRANCES, F.; ARGAYA, J.; GEGÚNDEZ-FERNÁNDEZ, J. A. Myopia and retinal striae induced by topiramate. **Archivos de La Sociedad Española de Oftalmología**, v.86, n.1, p.24-26, 2001.

DUPERE, J. R.; DALE, T. J.; STARKEY, S. J.; XIE, X. The anticonvulsant BW534U87 depresses epileptiform activity in rat hippocampal slices by an adenosine-dependent mechanism and through inhibition of voltage-gated Na^+ channels. **British Journal Of Pharmacology**, v. 128, n. 5, p.1011-1020, 1999.

ERAKOVIC V, Z. G.; VARLJEN, J.; SIMONIC, A. Pentylentetrazole-induced seizures and kindling: changes in free fatty acids, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activity. **Neurochem Int**, v.42 : p.173 -8, 2003.

FDA- <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm442978.htm>. Acesso em 08.02.2017

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

FISHER, R.S.; ACEVEDO, C.; ARZIMANOGLU, A.; BOGACZ, A.; CROSS, J. H.; ELGER, C. E.; ENGEL JR, J.; FORSGREN, L.; A. RENCH, J.A.; GLYNN, M.; HESDORFFER, D. C.; B.I. LEE, MATHERN, G.W.; L. MOSHE, S.L.; PERUCCA, E.; SCHEFFER, I.E.; TOMSON, T.; WATANABE, M.; WIEBE, S. ILAE official report: a practical clinical definition of epilepsy. **Epilepsia**, v.55, n.4, p.475-482, 2014.

GAO, J.; CHI, Z.F.; LIU, X.W.; SHAN, P. Y.; WANG, R.. Mitochondrial dysfunction and ultrastructural damage in the hippocampus of pilocarpine-induced epileptic rat. **Neurosci Lett**. v.411, p.152 -7, 2007.

GARZON, E. Epilepsia refratária: conceito e contribuição das novas drogas antiepilépticas e de outras modalidades terapêuticas. **Revista Neurociências**, v. 10, n. 2, p. 66-82, 2002.

GIL, D.; SPALDING, T.; KHARLAMB, A.; SKJAERBAEK, N.; ULDAM, A.; TROTTER, C.; BRANN, M. Exploring the potential for subtype-selective muscarinic agonists in glaucoma. **Life Sciences**, v. 68, n. 22-23, p.2601-2604, 2001

GOMES, T. K. C.; OLIVEIRA, S. L. O.; ATAÍDE, T. R.; FILHO, E. M. T. O Papel da Dieta Cetogênica no Estresse Oxidativo Presente na Epilepsia Experimental. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, v.17, n.2, p.54-64, 2011.

GOODMAN & GILMAN. , J. Farmaco que agem no Sistema Nervoso Central. In: **As Bases Farmacológicas Da Terapêutica**. HARDMAN, J.G; LIMBIRD, L.E; GILMAN, A.G. (editors) 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2012.

GRAHAME-SMITH. D.; AROSON. **Farmacologia Clínica e Farmacoterapia**. 3. ed. Rio de Janeiro. Guanabara/Koogan. 2004.

GREEN, L; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p.56-58, 1981.

GREWAL, G.K.; KUKAL, S.; KANOJIA, N.; SASO, L.; KUKRETI, S.; KUKRETI, R. Effect of Oxidative Stress on ABC Transporters: Contribution to Epilepsy Pharmacoresistance. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 365, 2017.

GRONE, B.P.; BARABAN, S.C. Animal models in epilepsy research: legacies and new directions. **Nature Neuroscience**, v. 18, n. 3, p.339-343, 2015

GUEDES, I.A.; DE MAGALHÃES, C.S.; DARDENNE, L.E. Receptor ligand molecular docking. **Biophys Rev.**, v.6, n.1, p.75-87, 2014

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, v.142, p.231-55, 2004.

HARUNA, A. K. Depressant and anticonvulsant properties of the root decoction of *Afrormosialaxiflora* (Leguminosae). **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 1, p. 57-59, 2000.

HERBERG, L. J.; GROTTICK, A.; ROSE, I. C. Nitric oxide synthesis, epileptic seizures and kindling. **Psychopharmacology**, v. 119, n. 1, p. 115-123, 1995.
HIRTZ, D.; THURMAN, D.J.; GWINN-HARDY, K.; MOHAMED, M.; CHAUDHURI, A.R.; ZALUTSKY, R. How common are the “common” neurologic disorders? **Neurology**, v.68, p.326–37, 2007.

HONÓRIO, J.E.J.; VASCONCELOS, G.S.; RODRIGUES, F.T.; SENA FILHO, J.G.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGUIAR, C.C.; LEAL, L.K.; SOARES, P.M.; WOODS, D.J.; FONTELES, M.M.; VASCONCELOS, S.M. Monocrotaline: histological damage and oxidant activity in brain areas of mice. **Oxid Med Cell Longev**, v.2012, 2012.

HUANG, R. Q.; BELL-HORNER, C. L.; DIBAS, M. I.; COVEY, D. F.; DREWE, J. A.; DILLON, G. H. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant γ -aminobutyric acid type A (GABAA) receptors: mechanism and site of action. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 298, n. 3, p. 986-995, 2001.

IBRAHIM, A.N.; MANSOUR, M.E. Possible Anticonvulsant Effect Of Ivabradine In Kainite –Induced Epilepsy In Rats: Amelioration Of Oxidative Stress. **World Journal of Pharmaceutical Research**. v.4, n.12, p.247-257, 2015.

ISCHIROPOULOS, H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. **Arch Biochem Biophys**. v.356, n.1, p.1–11, 1998.

JACOB, T.C.; MOSS, S.J.; JURD, R. GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat Rev Neurosci.*, v. 9, p. 331-43, 2008.

JAIN, A.N.; NICHOLLS, A. D. Recommendations for evaluation of computational methods. **J. Comput. Aided. Mol. Des.**, v.22, p.133–139, 2008 doi:10. 1007/s10822-008-9196-5

JONES, D.A.; TIMMIS, A.; WRAGG, A. Novel drugs for treating angina. **BMJ**, v. 347, n. 10, p. 1076, 2013.

JONES, D.P.; BROWN, L.A.S.; STERNBERG, P. Variability in glutathione-dependent detoxication in vivo and its relevance to detoxication of chemical mixtures. **Toxicology**. v. 105, n.2–3, p.267–274 37, 1995.

JOPE, R.S.; SIMONATO, M.; LALLY, K. Acetylcholine content in rat brain is elevated by status epilepticus induced by lithium and pilocarpine. **J.Neurochem.**, v. 49, p. 944-951, 1987

KAILA, K.; RUUSUVUORI, E.; SEJA, P.; VOIPIO, J.; PUSKARJOV, M. GABA actions and ionic plasticity in epilepsy. **Current Opinion In Neurobiology**, v. 26, p.34-41, 2014.

KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M.; SIEGELBAUM, S.A.; HUDSPETH. Crises epilépticas e epilepsia. IN:Princípios de Neurociências. KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M.; SIEGELBAUM, S.A.; HUDSPETH editores. 5^oed. Editora Artmed, Porto Alegre-RS. p.970-990, 2014.

KANTROWITZ, J.T.; JAVITT, D.C. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor dysfunction o dysregulation: the final common pathway on the road to Schizophrenia? **Brain Res Bull.** v.83, p.108-21, 2010.

KEMP, M.; GO, Y-M, JONES, D.P. Non-equilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology. **Free Rad Biol Med.** v.44, n.6, p.921–937, 2008.

KITAYAMA, M.; MIYATA, H.; YANO, M.; SAITO, N.; MATSUDA, Y.; YAMAUCHI, T.; KOGURE, S. Ih Blockers Have a Potential of Antiepileptic **Epilepsia**, v. 44, n. 1, p.20-24,2003.

KOHL, B.; DANNHARDT, G. The NMDA Receptor Complex: A Promising Target for Novel Antiepileptic Strategies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 11, p.1275-1289,2001.

KOVACS, P.; JURANEK, I.; STANKOVICOVA, T.; SVEC, P. Lipid peroxidation during acute stress. **Pharmazie**, v.51, p.51–53, 1996.

KWAN, P.; BRODIE, M.J. Early identification of refractory epilepsy. **N Engl J Med.** v.342, p.314-319, 2000.

KWAN, P.; SILLS, G.J.; BRODIE, M.J. The mechanisms of action of commonly used antiepileptic drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, n. 1, p.21-34,2001.

LALLY, J.; BROOK, J.; DIXON, T.; GAUGHRAN, F.; SHERGILL, S.; MELIKIAN, N.; MACCABE, J. H. Ivabradine, a novel treatment for clozapine-induced sinus tachycardia: a case series. **Therapeutic Advances In Psychopharmacology**, v. 4, n. 3, p.117-122, 2013.

LEITE, J.P.; BORTOLOTTI, Z.A.; CAVALHEIRO, E.a.. Spontaneous recurrent seizures in rats: An experimental model of partial epilepsy. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 14, n. 4, 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. **Chemico-biological Interactions**, v. 190, n. 1, p.28-34, 2011.

LIMA, E.B.C.; C.N.S.; VASCONCELOS, G.S.; MENESES, L.N.; PEREIRA, Y.F.S.; XIMENES, N.C.; SANTOS JÚNIOR, M.A.; MATOS, N.C.B.; BRITO, R.; MIRON, D.; LEAL, L.K.A.M.; Danielle MACÊDO, D.; VASCONCELOS, S.M.M. Antidepressant, antioxidant and neurotrophic properties of the standardized extract of *Cocos nucifera* husk fiber in mice **Journal of natural medicines**, v. 70, n. 3, p. 510-521, 2016.

LIMA, R.C.; SILVA, M.C.; AGUIAR, C.C.; CHAVES, E.M.; DIAS, K.C.; MACÊDO, D.S.; DE SOUSA, F.C.; CARVALHO, .K.D.E M.; RAMOS, M.V.; VASCONCELOS, S.M. Anticonvulsant action of *Calotropis procera* latex proteins. **Epilepsy Behav.** v.23, n.2, p.123-126, 2012.

LIMA, C.N.C. **Potencial convulsivante de carbapenêmico em diferentes modelos experimentais de convulsão**: avaliação comparativa, comportamental e neuroquímica. 2011. 182 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Fortaleza, 2011.

LOSCHER, W.; HONACK, D.; FASSBENDER, C.P.; NOLTING, B. The role of the chinchilla, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylentetrazole seizure models. **Epilepsy Res.** v.8, p. 171-189, 1991.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: Ways out of the current dilemma. **Epilepsia**, v. 52, n. 4, p. 657–678, 2011.
LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. **Epilepsy Research**, v.50, p.3-16, 2002.

LOSCHER, W.; SCHMIDT, D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy res** 2, 145-181, 1988.

LUDWIG, A.; BUDDE, T.; STIEBER J.; MOOSMANG, S.; WAHL, C.; HOLTTHOFF, K.; FEIL, S. Absence epilepsy and sinus dysrhythmia in mice lacking the pacemaker channel HCN2. **The Embo Journal**, v. 22, n. 2, p.216-224, 2003.

LUSZCZKI, J.J.; PRYSTUPA, A.; MACH, M.A.; MARZEDA, E.; LUSZCZKI, M.F. Ivabradine (a hyperpolarization activated cyclic nucleotide- gated channel blocker) elevates the threshold for maximal electroshock-induced tonic seizures in mice. v.65, p.1407-1414, 2013.

MACDONALD, R.L.; BARKER, J.L. Pentylentetrazol and penicillin are selective antagonists of GABA-mediated post-synaptic inhibition in cultured mammalian neurones. **Nature**, v. 267, n. 5613, p.720-721, 1977.

MACÊDO, D.S.; VASCONCELOS, S.M.; ANDRADE-NETO, M.; BELCHIOR, L.D.; HONÓRIO JÚNIOR, J.E.; GONÇALVES, D.O.; FONTELES, M.M.; SILVA, M.I.;

AGUIAR, L.M.; VIANA, G.S.; SOUSA, F.C. Cocaine-induced status epilepticus and death generate oxidative stress in prefrontal cortex and striatum of mice. **Neurochem Int.** 2010 Jan;v.56, n.1, p.183-187, 2009.

MARES, J.; STOPKA, P.; NOHEJLOVÁ, K.; ROKYTA, R. Oxidative stress induced by epileptic seizure and its attenuation by melatonin. **Physiol. Res**, v.62,s.1, p.67–74, 2013.

MAYES, P.A. Structure and function of the lipid-soluble vitamins. In: MURRAY RK, GRANNER DK, MAYES PA, RODWELI VW, ed, Harper's Biochemistry. 25ª edição. New York: Appleton & Lange; p. 642 -52., 2000.

MELO JÚNIOR, J.M.A.; Damasceno, M. D. B. M. V., Santos, S. A. A. R., Barbosa, T. M., Araújo, J. R. C., Vieira-Neto, A. E., Wong, D. V. T.; Campos, A. R. Acute and neuropathic orofacial antinociceptive effect of eucalyptol. **Inflammopharmacology**, v.2, n.25, p.247-254, 2017.

MELO, L.T.; DUAILIBE, M.A.; PESSOA, L.M.; DA COSTA, F.N.; VIEIRA-NETO, A.E.; DE VASCONCELLOS, A.A.P.; CAMPOS, A.R. (-)- α -Bisabolol reduces orofacial nociceptive behavior in rodents. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v.390, v.2, p.187-195, 2017.

MENON, B.; RAMALINGAM, K.; KUMAR, R.V. Oxidative stress in patients with epilepsy is independent of antiepileptic drugs. **Seizure**. v. 21, p. 780–784, 2012.
MILLER, P.S.; ARICESCU, A.R. Crystal structure of a human GABAA receptor. **Nature**, v. 512, n. 7514, p. 270-275, 2014.

MILLER, P.S.; ARICESCU, A.R. **Crystal structure of a human GABAA receptor. Nature.** v.512, n.7514, p.270-5, 2014.

MOEZI, L.; SHAFAROODI, H.; HOJATI, A.; DEHPOUR, A.R. The interaction of melatonin and agmatine on pentylenetetrazole-induced seizure threshold in mice. **Epilepsy Behav**, v.22, p.200-2006, 2011.

MONNET, X.; GHALEH, B.; COLIN, P.; CURZON, O. P.; GIUDICELLI, J. F.; BERDEAUX, A. Effects of heart rate reduction with ivabradine on exercise-induced myocardial ischemia and stunning. **J Pharmacol Exp Ther.** v.299, p.1133-1139, 2001.

MORIMOTO, K.; FAHNESTOCK, M.; RACINE, R.J. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. **Progress In Neurobiology**, v. 73, n. 1, p.1-60, 2004.

NAIE, K.; VAUGHAN, D.M.. Regulation by metabotropic glutamate receptor 5 of LTP in the dentate gyrus of freely moving rats: relevance for learning and memory formation, **Cereb. Cortex**. v.14, p. 189–198, 2004.

NELIGAN, A.; BELL, G.S.; SHORVON, S.D.; SANDER, J.W. Temporal trends in the mortality of people with epilepsy: a review. **Epilepsia**. v.51, p.2241-2246, 2010.

NGUGI, A.K.; BOTTOMLEY, C.; KLEINSCHMIDT, I.; SANDER, J.W.; NEWTON, C.R. Estimation of the burden of active and life-time epilepsy: a meta-analytic approach. **Epilepsia**, v.51, p.883–90, 2010.

NOH, S.; KUMAR, N.; BUKHANOVA, N.; CHEN, Y.; STEMKOWSKI, P.L.; SMITH, P.A. The heart-rate-reducing agent, ivabradine, reduces mechanical allodynia in a rodent model of neuropathic pain. **European Journal Of Pain**, v. 18, n. 8, p.1139-1147, 2014.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p.351-358, 1979.

OLIVEIRA, A.O.; LINHARES, M. I.; CHAVES FILHO, A. J. E. M.; RIOS, E. R. V.; DE CARVALHO LIMA, C. N., VENANCIO, E. T.; DE SOUZA, A.G.; DE LIMA K.A.; DE SOUSA, F.C.F.; GASPAR D.M. Antioxidant properties of antiepileptic drugs levetiracetam and clonazepam in mice brain after in vitro-induced oxidative stress. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 10, n. 14, p. 278-288, 2016.

OLSEN, R.W.; DELOREY, T.M. GABA and glycine. In: Basic Neurochemistry, eds: SIEGEL, G.J.; AGRANOFF, B.W.; ALBERTS, R.W.; FISHER, S.K.; UHLER, M.D. p. 335-346, 1999.

ONO, H.; SAKAMOTO, A.; SAKURA N. Plasma total glutathione concentration in epileptic patients taking anticonvulsants. **Clin Chm Acta**, v.298, p.135–43, 2000.

OSONOE, K.; MORI, N.; SUZUKI, K.; OSONOE, M. Antiepileptic effects of inhibitors of nitric oxide synthase examined in pentylenetetrazol-induced seizures in rats. **Brain research**, v. 663, n. 2, p. 338-340, 1994.

PAPE, H.C. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. **Annual review of physiology**, v. 58, n. 1, p. 299-327, 1996.

PATEL, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. **Free Rad Biol Med** . v.37, n.12, p.1951–1962, 2004.

PATSALOS, P. N.; BERRY, D. J.; BOURGEOIS, B. F.; CLOYD, J. C.; GLAUSER, T. A.; JOHANNESSEN, S. I.; LEPPIK, I. E.; TOMSON, T.; PERUCCA, E. Antiepileptic drugs—best practice guidelines for therapeutic drug monitoring: a position paper by the subcommission on therapeutic drug monitoring, ILAE Commission on Therapeutic Strategies. **Epilepsia**. v.49, p. 1239, 2008.

PATSOUKIS, N.; ZERVOUDAKIS, G.; PANAGOPOULOS, N.T.; et al. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazole-induced epileptic seizure. **Neurosci Lett**, v.357, p. 83 -6, 2004.

PAUL, S.M. GABA and glycine. In: BLOOM, F.E.; KUPFER, D.J (eds.). **Psychopharmacology**: The fourth generation of progress. New York: Raven Press, p. 87-94, 1995.

PEARSON, J.N.; ROWLEY, S.; LIANG, L.P.; WHITE, A.M.; DAY, B.J.; PATEL, M. Reactive oxygen species mediate cognitive deficits in experimental temporal lobe epilepsy. **Neurobiol Dis.** v. 82, p. 289–297, 2015.

PERUCCA, P.; GILLIAM, F.G. Adverse effects of antiepileptic drugs. **Lancet Neurol.**v.11, p.792–802, 2012.

PIAN, P.; BUCCHI, A.; ROBINSON, R.B.; SIEGELBAUM, S.A. Regulation of gating and rundown of HCN hyperpolarization-activated channels by exogenous and endogenous PIP2. **J Gen Physiol.** v.128, p.593–604, 2006.

PIERREFICHE, G.; LABORIT, H. Oxygen free radicals, melatonin, and aging. **Experimental Gerontology**, v. 30, n. 3-4, p. 213-227,1995.

PINHEIRO, O.S.; MULLE, C. Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. **Nat Rev Neurosci.** v. 9, p.423-36, 2008.

POOLOS, N.P.The Yin and Yang of the H-Channel and Its Role in Epilepsy.**Epilepsy Currents**, v. 4, n. 1, p.3-6,2004.

PORTO, L.A.; SIQUEIRA, J. S.; SEIXAS, L. N.; ALMEIDA,J. R.G.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.O Papel dos Canais Iônicos nas Epilepsias e Considerações Sobre as Drogas Antiepilépticas – Uma breve revisão.**J Epilepsy ClinNeurophysiol**, v.13,n.4, p.69-175, 2007.

POSTEA, O.; BIEL, M.Exploring HCN channels as novel drug targets.**Nature Reviews Drug Discovery**,p.903-914,2011.

QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Modelos animais para avaliação de drogas anticonvulsivantes: uma revisão. **Rev. Bras. Farm.**,v.88, p.163-166, 2007.

RADENOVIC, L.; SELAKOVIC, V. Differential effects of NMDA and AMPA/kainate receptor antagonists on nitric oxide production in rat brain following intrahippocampal injection. **Brain research bulletin**, v. 67, n. 1-2, p. 133–41, 2005.

RAJASEKARAN, K. Seizure-induced oxidative stress in rat brain regions: blockade by nNOS inhibition. **Pharmacol Biochem Behav**,v.80 ,p.263 -72, 2005.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited.**The Faseb Journal**, v. 22, n. 3, p.659-661,2007.

REED, D.J.; SAVAGE, M.K. Influence of metabolic inhibitors on 70.mitochondrial permeability transition and glutathione status. **Biochim.Biophys.Acta**, v.1271, n.1, p.43-50, 1995.

RHO, J.M.; DONEVAN, S.D.; ROGAWSKI, M.A. Mechanism of action of the anticonvulsant felbamate: Opposing effects onN-methyl-D-aspartate and ?-aminobutyric acidA receptors. **Annals Of Neurology**,v. 35, n. 2, p.229-234,

ROBINSON, R.B.; DI FRANCESCO, D. Sinoatrial node and impulse initiation. In: SPOONER, P.M.; ROSEN, M.R., editors. **Foundations of cardiac arrhythmias: basic concepts and clinical approaches**. Marcel Dekker; New York; p. 151-70; 2001.

ROGAWSKI, M.A.; CAVAZOS, J.E. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. In: organizadores **Wyllie's treatment of epilepsy: Principles and practice**. 6. ed. Wyllie E, 2015. p. 522–529.

ROGER, J.; LOB, H.; TASSINARI, C.A. Status epilepticus. Ed. MAGNUS, O, de LORENTZ, H.A.M. *Handbook of clinical neurology*, v.15. The epilepsies. Amsterdam: North Holland Publishing Company, p.145–188, 1974.

ROUBILLE, F.; LATTUCA, B.; BUSSEUIL, D.; LECLERCQ, F.; DAVY, J.M.; RHÉAUME, E.; TARDIF J.C. Is ivabradine suitable to control undesirable tachycardia induced by dobutamine in cardiogenic shock treatment? **Medical Hypotheses**, v. 81, n. 2, p.202-206, 2013.

ROWAN, A. J.; RAMSAY, R. E.; COLLINS, J. F.; PRYOR, F.; BOARDMAN, K. D.; UTHMAN, B. M.; MARKS, W. New onset geriatric epilepsy A randomized study of gabapentin, lamotrigine, and carbamazepine. **Neurology**, v. 64, n. 11, p. 1868-1873, 2005.

RUBINSON, K.; LANG, E. Transmissão Sináptica. In: Berne & Levy: *Fisiologia*. Ed. Bruce M. Koeppen, Bruce A. Stanton. 6ª ed. Elsevier, RJ, p.94, 2009.

RUGGIERO, R.N.; ROSS, J.B.; FACHIM, H.A.; PADOVAN-NETO, F.E.; MERLO, S.; ROHNER, C.J.S.; IKEDA, E.T.; BRUSCO, J.; MOREIRA, J.E. Neurotransmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica: aspectos moleculares, clínicos e filogenéticos. **Medic**. v. 44, n.2, p.143-56, 2011.

SANTORO, B.; TIBBS, G.R. The HCN Gene Family: Molecular Basis of the Hyperpolarization-Activated Pacemaker Channels. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, v. 868, n. 1, p.741-764, 1999.

SAVELIEVA, I.; CAMM, A.J. If Inhibition with Ivabradine. **Drug Safety**, v. 31, n. 2, p.95-107, 2008

SCHEFFER, I. E.; BERKOVIC, S.; CAPOVILLA, G.; CONNOLLY, M. B.; FRENCH, J.; GUILHOTO, L.; HIRSCH, E.; JAIN, S.; MATHERN, G. W.; MOSHÉ, S. L.; NORDLI, D. R.; PERUCCA, E.; TOMSON, T.; WIEBE, S.; ZHANG, Y.H.; ZUBERI, S. M. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v.58, p.512–521, 2017

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p.192-205, 1968.

SERRA, M.; DAZZI, L.; CAGETTI, E.; CHESSA, M.F.; PISU, M.G.; SANNA, A.; BIGGIO, G. Effect of pentylentetrazole induced kindling on acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats. **J. Neurochem.**, v.68, n.1, p. 313- 318, 1997

SHAKEEL, S.; REHMAN, M. U.; TABASSUM, N.; AMIN, U. Effect of naringenin (A naturally occurring flavanone) against pilocarpine-induced status epilepticus and oxidative stress in mice. **Pharmacognosy Magazine**, v. 13, n. s. 1, p. 154, 2017.

SHARMA, A.; SANDHIR, R. Oxidative stress after lithium-pilocarpine induced status epilepticus in mice brain. **Ann Neurosci**, v. 13, p.1 -4, 2006.

SHIH, T.M.; DUNIHO, S.M.; MCDONOUGH, J.H. Control of nerve agent-induced seizures is critical for neuroprotection and survival. **Toxicol Appl Pharmacol** . v.188,n.2,p.69–80, 2003.

SHORVON, S.D. The causes of epilepsy: Changing concepts of etiology of epilepsy over the past 150 years. **Epilepsia**, v. 52, n. 6, p.1033-1044,2011.

SHORVON, S.D. The etiologic classification of epilepsy. **Epilepsia**, v. 52, n. 6, p. 1052-1057, 2011.

SHORVON, S.D. Drug treatment of epilepsy in the century of the ILAE: The second 50 years. **Epilepsia**, v. 50, p.93-130,2009.

SHORVON, S.D. Drug treatment of epilepsy in the century of the ilae: the first 50 years, 1909-1958. **Epilepsia**, 50,suppl 3, 69-92, 2009a.

SOUSA, C.N.S.; MENESES, L.N.; VASCONCELOS, G.S.; SILVA, M.C.; SILVA, J.C.; MACÊDO, D.; LUCENA, D.F.; VASCONCELOS, S.M.M. Reversal of corticosterone-induced BDNF alterations by the natural antioxidant alpha-lipoic acid alone and combined with desvenlafaxine: Emphasis on the neurotrophic hypothesis of depression. **Psychiatry research**, v. 230, n. 2, p. 211-219, 2015.

STIEBER, J.; WIELAND, K.; STOCKL, G.; LUDWIG, A.; HOFMANN, F. Bradycardic and Proarrhythmic Properties of Sinus Node Inhibitors. **Mol. Pharmacol**. v.69,p.1328–1337, 2006.

SURGES, R.; FREIMAN, T. M.; FEUERSTEIN, T. J. Gabapentin increases the hyperpolarization-activated cation current I_h in rat CA1 pyramidal cells. **Epilepsia**. v.44, p.150–156, 2003.

TAKUMA, K.; BABA, A.; MATSUDA, T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. **Prog Neurobiol**, v.72, p.111–127, 2004.

TREVISOL-BITTENCOURT, P.C.; SANDER, J.W.A.S. Arquivos Catarinenses de Medicina. v.18, n.3, p.147-54, 1989. APUD: PORTO, L.A.; SIQUEIRA, J. S.; SEIXAS, L. N.; ALMEIDA, J. R.G.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. O Papel dos Canais Iônicos nas Epilepsias e Considerações Sobre as Drogas Antiepilépticas – Uma breve revisão. **J Epilepsiol Clin Neurophysiol**, v.13,n.4, p.69-175, 2007.

TURSKI, L.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, W.; BORTOLOTTI, Z.; CAVALHEIRO, E.A. Review: Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine. **Synapse**, v. 3, n. 2, p.154-171, 1989

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

UCHIDA, K. Cellular response to bioactive lipid peroxidation products. **Free radical research**, v. 33, n. 6, p. 731-737, 2000.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p.44-84, 2007.

VASCONCELOS, G.S.; XIMENES, N.C.; DE SOUSA, C.N.; OLIVEIRA, T.Q.; LIMA, L.L.; DE LUCENA, D.F.; GAMA, C.S.; MACÊDO, D.; VASCONCELOS, S.M. Alpha-lipoic acid alone and combined with clozapine reverses schizophrenia-like symptoms induced by ketamine in mice: Participation of antioxidant, nitrenergic and neurotrophic mechanisms. **Schizophr Res**, v.165, n.2-3, p.163-70. 2015.

VASSALLE, M.; KOTAKE, H.; LIN, C. Pacemaker current, membrane resistance, and K⁺ in sheep cardiac Purkinje fibres. **Cardiovascular Research**, v. 26, n. 4, p.383-391, 1992.

VELISEK, L. Models of chemically-induced acute seizures. In: PITKÄNEN, A.; SCHWARTZKROIN, P.A.; MOSHÉ, S.L, editors. **Models of seizures and epilepsy**. [S.l]: Elsevier, 2006. p. 127–52.

VENKATACHALAM, C.M.; JIANG, X.; OLDFIELD, T.; WALDMAN, M. Ligand Fit: a novel method for the shape-directed rapid docking of ligands to protein active sites. **J Mol Graph Model**. v.21, p.289–307, 2003.

VILAINE, J. The discovery of the selective I_f current inhibitor ivabradine A new therapeutic approach to ischemic heart disease. **Pharmacological Research**, v. 53, n. 5, p.424-434, 2006

VILAR, S.; FERINO, G.; PHATAK, S.S.; BERKA, B.; CAVASOTTO, C.N.; COSTANZI, S. Docking-based virtual screening for ligands of G protein-coupled receptors: Not only crystal structures but also in silico models **Journal of Molecular Graphics and Modelling**. v. 29, p.614–623, 2011.

VILAR, S.; SÁNCHEZ, E.S.; SANTANA, L.; URIARTE, E. Molecular Docking and Drug Discovery in β -Adrenergic Receptors. **Current Medicinal Chemistry**. v.24, 2017. DOI: 10.2174/0929867324666170724101448

WANG, Z.; XU, N. L.; WU, C. P.; DUAN, S.; POO, M. M. Bidirectional Changes in Spatial Dendritic Integration Accompanying Long-Term Synaptic Modifications. **Neuron**, v. 37, n. 3, p.463-472,2003

WHITE, H. S. Clinical significance of animal seizure models and mechanism of action studies of potential antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 38, p. 9-17, 1997.

WHITE, M.; ROULEAU, J. L.; AFZAL, R.; FLORAS, J.; YUSUF, S.; MCKELVIE, R. S. Effects of enalapril, candesartan or both on neurohumoral activation and LV volumes and function in patients with heart failure not treated with a beta-blocker. **Therapeutic Advances In Cardiovascular Disease**, v. 3, n. 2, p.113-121,2009.

WILLARD, S.S.; KOOCHKPOUR, S. Glutamate, glutamate receptors, and downstream signaling Pathways. **Int J Biol Sci**. v.9, p. 948-59, 2013.

WORLD HEATH ORGANIZATION (WHO). **Epilepsy**.2017.Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html>>.Acesso em: 15 fev. 2017.