

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

GISLEI FROTA ARAGÃO

**EFEITOS DOS TRITERPENOS α - e β -AMIRINA E DE SEUS DERIVADOS
ACETILADOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

FORTALEZA - CE

2008

A671e Aragão, Gislei Frota

Efeitos dos triterpenos α - e β -amirina e de seus derivados acetilados no sistema nervoso central/ Gislei Frota Aragão. 2008.

196 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana
Tese (Doutorado)- Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina, Fortaleza, 2008.

1. Triterpenos. 2. Burseraceae. 3. Sistema Nervoso Central.
I. Viana, Glauce Socorro de Barros (Orient.). II. Título.

CDD 615.32

GISLEI FROTA ARAGÃO

**EFEITOS DOS TRITERPENOS α - e β -AMIRINA E DE SEUS DERIVADOS
ACETILADOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Glauce Socorro de Barros Viana

FORTALEZA - CE

2008

GISLEI FROTA ARAGÃO

**EFEITOS DOS TRITERPENOS α - e β -AMIRINA E DE SEUS DERIVADOS
ACETILADOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL**

Tese submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Setorial desta Instituição.

Data da Defesa: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Glauce Socorro de Barros Viana (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Antônio José Lapa
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Reinaldo Nóbrega de Almeida
Universidade Federal da Paraíba

Prof^a. Dr^a. Marta Maria de França Fonteles
Universidade Federal do Ceará

Prof^a. Dr^a. Geanne Matos de Andrade Cunha
Universidade Federal do Ceará

Dedico esta tese a duas pessoas que foram imprescindíveis na minha educação e formação, minhas tias: *Clery e Juracy*. A elas o meu eterno agradecimento; À *minha mãe*, uma anônima heroína e a uma pessoa mais que especial, *meu filho Filipe*.

AGRADECIMENTOS

** À Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana pela sua disponibilidade irrestrita, sua forma exigente, crítica e criativa de apresentar sugestões que possibilitaram nortear de maneira objetiva este trabalho. Pela compreensão silenciosa dos momentos difíceis pelos quais passei, permitindo que meu tempo interno fluísse, respeitosamente. Pela alegria de trabalharmos juntos.*

** À Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos que contribuiu em minha formação acadêmica e ao Prof. Dr. Paulo Nogueira Bandeira que nos forneceram o material para estudo, bem como por toda cooperação prestada e amizade.*

** A Profa. Dra. Geanne e a Profa. Marta e a todos os Profs. do curso de pós-graduação em Farmacologia, que de maneira direta ou indireta fizeram parte deste trabalho.*

** Aos Professores Reinaldo Nóbrega e José Lapa que gentilmente aceitaram o convite para participar desta banca e que desta forma abrilhantaram esta defesa de tese.*

** A Lyvia Maria Vasconcelos Carneiro por todo incentivo, colaboração e constante estímulo ao meu trabalho sempre me fazendo crer no meu potencial, me conduzindo a degraus mais altos e elevando sempre minha auto-estima e principalmente sempre do meu lado.*

** A meu primo Antônio Paulino Frota Junior pela amizade, lealdade e valiosa colaboração, sendo imprescindível na execução deste trabalho.*

** As amigas Ligia e Valéria pela disponibilidade e ajuda nos experimentos.*

** À Vilani Rodrigues Bastos pela amizade e imprescindível auxílio técnico.*

** Aos amigos da pós-graduação, pela amizade, ajuda mútua e alegre convivência no período do curso.*

** Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do CCS da UFC, com os quais tive ótimo convívio e pude contar com suas colaborações.*

** Ao incentivo de meus familiares: meu pai, meus irmãos e meu cunhado Marcony que me serviu de inspiração para chegar até aqui.*

** A MEAC/UFC pelo apoio e incentivo profissional.*

** Ao CNPq pela concessão dos recursos financeiros*

*“O temor do Senhor é o princípio do saber, mas os loucos
desprezam a sabedoria e o ensino” (Provérbios 1:7).*
*“Adquire a sabedoria, adquiere o entendimento e não te esqueças das
palavras da minha boca, nem delas te apartes” (Provérbios 4:5).*

RESUMO

EFEITOS DOS TRITERPENOS α - e β -AMIRINA E DE SEUS DERIVADOS ACETILADOS NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A mistura triterpênica de α - e β -amirina (AMI) é obtida da planta *Protium heptaphyllum* Aubl March (Família Burseraceae), comum em vários estados brasileiros e conhecida popularmente como breu branco, também é utilizada na prática da medicina popular para tratar várias enfermidades. O acetato de α - e β - amirina (AcAMI) é a forma acetilada desta mistura triterpênica. Vários estudos experimentais já foram feitos utilizando estes triterpenos, mas estudos da ação destes no Sistema Nervoso Central (SNC) ainda são escassos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da administração destes compostos naturais em camundongos e verificar uma possível atividade sedativa, ansiolítica, antidepressiva e anticonvulsivante, procurando ainda esclarecer por que mecanismos estes compostos agem. A metodologia utilizada foi utilizando testes farmacológicos já descritos na literatura e estudos de doseamento de monoaminas e aminoácidos através de HPLC. Os resultados mostraram que tanto a AMI como o AcAMI mostraram-se bastante ativos farmacologicamente. No teste do Campo Aberto ambas misturas (AMI e AcAMI) administradas por via aguda e sub-crônica demonstraram efeitos sedativos, nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg, após a constatação da diminuição do movimento exploratório dos animais e do número de *grooming* e de *rearing*, utilizando o diazepam como controle positivo. No Teste do Plus Maze também ambas as misturas demonstraram atividade ansiolítica aumentando o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos. No teste do nado forçado, AMI nas doses de 2,5 e 5 mg/kg, i.p., aumentou o tempo de imobilidade dos animais comparado ao controle, e foi potencializado pela imipramina. No teste de indução de sono por pentobarbital, AMI e AcAMI tiveram o tempo de sono aumentado de forma significativa. As misturas triterpênicas apresentaram atividade anticonvulsivante quando a indução da convulsão foi feita com pentilenotetrazol (PTZ) efeito este não aparecendo quando a indução foi com pilocarpina e estriçnina. A atividade sedativa e ansiolítica da AMI foram revertidas com a presença de flumazenil, efeito similar ao diazepam. O efeito anticonvulsivante da AMI foi aumentado por drogas que inibem a proteína quinase C, polimixina B e estaurosporina. O doseamento de monoaminas de córtex de camundongos tratados com AMI (1, 2,5 e 5 mg/kg) mostrou diminuição nas concentrações de noradrenalina e serotonina. No doseamento de aminoácidos, houve aumento nas concentrações de taurina e tirosina e uma diminuição de aspartato, glutamato e GABA nos grupos tratados com AMI e AcAMI na dose de 25 mg/kg, por 7 dias. Conclui-se, portanto com este trabalho, que tanto a AMI e o AcAMI possuem atividades sedativas, ansiolíticas, antidepressivas e anticonvulsivante e provavelmente estas ações possam estar ligadas a inibição de proteína quinase C, envolvimento gabaérgico e diminuição de monoaminas e aminoácidos.

PLAVRAS CHAVES: Triterpenos. Burseraceae. Sistema Nervoso Central.

ABSTRACT

EFFECTS ON THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF THE TRITERPENES ALPHA- AND BETA-AMYRIN AND THEIR ACETYLATED DERIVATIVES, IN MICE

The mixture of alpha- and beta-amyrin (AMY) triterpenes was isolated from *Protium heptaphyllum* Aubl March (Burseraceae) which is a medicinal plant common to several Brazilian states and popularly known as “breu branco”. Although the literature presents several studies with these triterpenes, only a few of them emphasizes the CNS, and almost none were performed with triterpene acetylated derivatives. Then, the objectives of the present work were to evaluate, in mice, sedative, anxiolytic, antidepressant and anticonvulsant activities of these drugs, in order to clarify their mechanisms of action. Besides, measurements of monoamines and amino acids by HPLC, in the cortex of mice treated with these drugs, were also performed. The results showed that not only the mixture of alpha- and beta-amyrin (AMY) but also its acetylated derivative (AcAMY) were pharmacologically active and, at some instances, AcAMY was even more efficacious than AMY. In the open field test, AMY and AcAMY, administered acutely or sub-chronically at the doses of 10, 25 and 50 mg/kg, showed a great sedative effect, as indicated by the significant decrease of the exploratory activity (decrease in the number of crossings) as well as the decrease in numbers of grooming and rearing, as compared to diazepam used as a positive control. In the plus maze test, both drugs presented a potent anxiolytic activity indicated by the increase in the number of entrances as well as in the time spent in the open arms. In the forced swimming test, AMY at the doses 2.5 and 5 mg/kg, i.p., increased the immobility time as compared to control and was potentiated by imipramine. In the barbiturate-induced sleeping time, AMY and AcAMY showed a significant increase in parameter analysed, duration of sleep. Furthermore, AMY and its acetylated derivative showed anticonvulsant activities, in the model of PTZ-induced convulsions, but not in two other convulsion models (pilocarpine- and strychnine-induced convulsions). Sedative and anxiolytic activities of AMY were reversed in the presence of flumazenil, a competitive benzodiazepine action inhibitor, an effect similar to that observed with diazepam. In addition, the anticonvulsant effect of AMY was potentiated by polymyxin B and staurosporine, drugs known to inhibit protein kinase C (PKC). Data from cortical monoamine measurements showed significant decreases in noradrenaline and serotonin concentrations, after mice treatments with AMY (1, 2,5 and 5 mg/kg). As far as the amino acid determination is concerned, results showed an increase in taurine and tyrosine levels, and a decrease in glutamate, aspartate and GABA contents, with AMY and AcAMY at the dose of 25mg/kg for seven days. In conclusion, the present study demonstrated anxiolytic, sedative, antidepressant and anticonvulsant actions in AMY and AcAMY, probably involving PKC inhibition and interaction with BDZ receptor. Decreases in monoamines levels, as noradrenaline and serotonin, and amino acid alterations may also play a role.

KEYWORDS: Triterpenes. Burseraceae. Central Nervous System.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fotografia da espécie <i>Protium heptaphyllum</i> March	22
Figura 2	<i>Protium heptaphyllum</i> March. Fotografia ilustrando folhas e frutos.	24
Figura 3	<i>Protium heptaphyllum</i> . Fotografia ilustrando a obtenção e coleta da resina.	25
Figura 4	Fórmula estrutural dos isômeros alfa e beta-amirina	27
Figura 5	Fotografia do labirinto em cruz elevado e do campo aberto.	60
Figura 6	Alterações no movimento exploratório pela AMI em modelo agudo no teste do campo aberto em camundongos, via oral.	78
Figura 7	Alterações do <i>rearing</i> provocado pela AMI em modelo agudo no teste do campo aberto em camundongos, via oral.	79
Figura 8	Alterações do <i>grooming</i> provocado pela AMI em modelo agudo no teste do campo aberto em camundongos, via oral.	80
Figura 9	Avaliação da participação GABAérgica no efeito sedativo da AMI medida pelas alterações do movimento exploratório em modelo agudo no teste do campo aberto em camundongos, via intra-peritoneal.	82
Figura 10	Avaliação da participação GABAérgica no efeito sedativo da AMI medida pelas alterações do <i>rearing</i> em modelo agudo no teste do campo aberto em camundongos, via intra-peritoneal.	83
Figura 11	Avaliação da participação GABAérgica no efeito sedativo da AMI medida pelas alterações do <i>grooming</i> em modelo agudo no teste do campo aberto em camundongos, via intra-peritoneal.	84
Figura 12	Parâmetros avaliados na determinação da atividade ansiolítica da AMI no teste do plus maze, em camundongos em modelo sub-crônico, via intraperitoneal.	86
Figura 13	Avaliação da participação GABAérgica no efeito ansiolítica da AMI no teste do plus maze em modelo agudo utilizando camundongos, via intraperitoneal.	90
Figura 14	Efeito antidepressivo da AMI em modelo do nado forçado utilizando camundongos em tratamento agudo por via oral e intraperitoneal.	92
Figura 15	Alterações no tempo da primeira convulsão provocado pela AMI em modelo agudo por indução com PTZ em camundongos, via oral.	98
Figura 16	Alterações no tempo de morte provocado pela AMI em modelo agudo por indução com PTZ em camundongos, via oral.	99
Figura 17	Efeito anticonvulsivante da AMI induzido por pilocarpina utilizando camundongos em tratamento agudo por via intraperitoneal.	101
Figura 18	Efeito anticonvulsivante da AMI induzido por estriçnina utilizando camundongos em tratamento agudo por via intraperitoneal.	103
Figura 19	Avaliação da participação de proteínas quinases no efeito anticonvulsivante da AMI verificado na latência para primeira convulsão induzido por PTZ em camundongos, via intraperitoneal.	105

Figura 20	Avaliação da participação de proteínas quinases no efeito anticonvulsivante da AMI verificado tempo de morte do teste de convulsão induzido por PTZ em camundongos, via intraperitoneal.	106
Figura 21	Doseamento realizado através de HPLC de monoaminas em homogenatos do córtex cerebral de camundongos tratados com AMI.	124
Figura 22	Doseamento realizado através de HPLC de aminoácidos em homogenatos de áreas cerebrais de camundongos tratados com AcAMI.	126
Figura 23	Doseamento realizado através de HPLC de aminoácidos em homogenatos de áreas cerebrais de camundongos tratados com AMI.	128
Figura 24	Potencialização do efeito anticonvulsivante de AMI pela PMX	149
Figura 25	Potencialização do efeito anticonvulsivante de AMI pela STP	150
Figura 26	Fórmula estrutural do acetato de α - e β -amirina	151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito da administração da AMI em camundongos no teste do rota rod em camundongos.	72
Tabela 2	Efeito da AMI no tempo de sono induzido por pentobarbital 40 mg/Kg, via intraperitoneal em camundongos	74
Tabela 3	Efeito da AMI em modelo sub-crônico no teste do campo aberto em camundongos, via intraperitoneal.	76
Tabela 4	Atividade ansiolítica da AMI no teste do plus maze em camundongos em modelo agudo, via oral.	88
Tabela 5	Avaliação do envolvimento adrenérgico sobre a atividade antidepressiva da AMI no teste do nado forçado em camundongos tratados de forma aguda e por via intraperitoneal.	94
Tabela 6	Avaliação do envolvimento serotoninérgico sobre a atividade antidepressiva da AMI no teste do nado forçado em camundongos tratados de forma aguda e por via intraperitoneal.	96
Tabela 7	Avaliação do efeito sinérgico entre a estaurosporina e a AMI, via intraperitoneal, no modelo de convulsões induzidas por PTZ.	108
Tabela 8	Avaliação da atividade exploratória do AcAMI no teste do campo aberto em camundongos no modelo agudo.	110
Tabela 9	Avaliação da atividade exploratória do AcAMI no teste do campo aberto em camundongos no modelo sub-crônico.	112
Tabela 10	Avaliação da atividade ansiolítica do AcAMI no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos no modelo agudo.	114
Tabela 11	Avaliação da atividade ansiolítica do AcAMI no teste do labirinto em cruz elevado em camundongos no modelo sub-crônico.	116
Tabela 12	Avaliação da atividade anticonvulsivante da AcAMI induzido por PTZ em camundongos no modelo agudo.	118
Tabela 13	Avaliação da atividade anticonvulsivante do AcAMI por indução com pilocarpina em camundongos.	120
Tabela 14	Avaliação do efeito do AcAMI no tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.	122

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

μL	Microlitro
v_{max}	Velocidade máxima
^{13}C	Carbono 13
2-IPP	Pirofosfato de 2-isopentila
3-IPP	Pirofosfato de 3-isopentila
5-HETE	5-hidroxiicosatetraenóico
5-HIAA	Ácido 5-hidroxi-indolacético
5-HT	Serotonina
6-OHDA	6-hidroxidopamina
AA	Ácido araquidônico
AAP	Palmitato de alfa-amirina
AAS	Ácido acetilsalicílico
ABA	Ácido abscísico
AC	Antes de Cristo
AcAMI	Acetato de alfa- e beta-amirina
ACN	Acetonitrila
ADP	Adenosina difosfato
ADT	Antidepressivos tricíclicos
ALT	Alanina aminotransferase
AMI	Mistura isomérica de alfa- e beta-amirina
AMPA	Ácido aminometilsulfônico
AMPc	Adenosina monofosfato cíclica
AMS	Área motora suplementar
ASP	Aspartato
AST	Aspartato amino transferase
ATP	Adenosina trifosfato
AVC	Acidente vascular cerebral
BR	Brassinoesteróides
BZD	Benzodiazepínicos
cAK	<i>Cyclin activating kinase</i>
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CDPK	Proteína quinase cálcio dependente
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
CKs	Citocininas
cm^{-1}	Centímetro ⁻¹
COMT	Catecol o-metiltransferase
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
DA	Dopamina
DAE'S	
DAG	Diacilglicerol

DNA	Ácido desoxiribonucleico
DOPAC	Ácido dihidroxifenilacético
DP	Desvio Padrão
DZP	Diazepam
EEG	Eletroencefalograma
EPM	Erro padrão da média
ERK	Quinase regulada por sinal extracelular
FLU	Flumazenil
g	Gramma
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GAD	Desordens da ansiedade generalizada
GAs	Giberelinas
GLI	Glicina
GLU	Glutamato
GSH	Glutationa hepática
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HPLC	High performance liquid chromatography
HVA	Ácido homovanílico
i.c.v.	Intra cérebroventricular
i.p	Intra peritoneal
i.t.	Intra tecal
IL-1	Interleucina 1
IMAO	Inibidores da monoaminoxidase
IP ₃	Inositol trifosfato
IPP	Isopentenipirofosfato
IR	Infra vermelho
ISRSs	Inibidores seletivos da recaptção de serotonina
KBr	Brometo de potássio
kg	Kilograma
LORR	Loss of righting reflex
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTD	Long term depression
LTP	Potencial de longa duração (<i>Long Term Potentiation</i>)
m.p.	Ponto de fusão
ME	Movimento exploratório
mg	Miligrama
MHPG	3-metoxi-4hidroxifenilglicol
MHz	MegaHertz
MLCK	Quinase da cadeia leve da miosina
mmol	Milimol
NaOH	Hidróxido de sódio
NB	Núcleos da base
NE	Norepinefrina

NEBA	Número de entradas nos braços aberto
NEBF	Número de entradas nos braços fechados
NFκB	Fator nuclear κB
NMDA	N-metil-D-aspartato
NMR1H	Ressonância magnética nuclear de próton
NQ	Número de quedas
NT	Neurotransmissores
°C	Grau centígrado
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator de agregação plaquetária
PCA	Ácido perclórico
PDBu	4-β-forbol-12,13-dibutirato
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PLC	Fosfolipase C
PMX	Polimixina B
PTZ	Pentilenotetrazol
RNA	Ácido ribonucléico
SNC	Sistema Nervoso Central
STP	Estaurosporina
TAU	Taurina
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TP	Tempo de permanência
TPBA	Tempo de permanência nos braços abertos
TPBF	Tempo de permanência nos braços fechados
TPST	Tirosil proteína sulfontransferase
TRI	Triptofano
TRPV ₁	Receptores polimodais vanilóides
TXA ₂	Tromboxano A ₂
u.i.	Unidades internacionais
UFC	Universidade Federal do Ceará
v.o.	Via oral
W	Watt
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Plantas medicinais	19
1.2 Estudo de plantas da família Burseraceae	20
1.2.1 <i>Protium heptaphyllum</i>	21
1.3 Estudo do triterpeno Amirina	26
1.3.1 Atividade Antiartrítica.....	28
1.3.2 Atividade Antipruriginosa.....	29
1.3.3 Atividade Hepatoprotetora e Gastroprotetora.....	30
1.5.4 Atividade Antinociceptiva e Analgésica.....	31
1.5.5 Atividade Antiinflamatória e Antiedematogênica.....	34
1.5.6 Atividade Antiagregante plaquetária.....	39
1.5.6 Ações no Sistema Nervoso Central.....	41
2 OBJETIVOS	45
2.1 Geral	45
2.2 Específicos	45
3 MATERIAL	47
3.1 Planta	47
3.2 Animais	47
3.3 Reagentes, soluções e outros	47
3.4 Equipamentos	48
4 MÉTODOS	50
4.1 Obtenção da resina do <i>Protium heptaphyllum</i>	50
4.2 Obtenção da mistura isomérica de alfa e beta amirina (AMI) a partir da resina	50
4.3 Acetilação da mistura isomérica de alfa e beta amirina	50
4.4 Preparação da amostra e doses utilizadas	51
4.5 Preparações das soluções reagentes para HPLC	51
4.5.1 Fase Móvel A para detecção fluorimétrica de aminoácidos em HPLC.....	51
4.5.2 Fase Móvel B para detecção fluorimétrica de aminoácidos em HPLC.....	51
4.5.3 Preparo do Reagente de Derivatização.....	52

4.5.4	Preparo dos padrões dos aminoácidos.....	52
4.5.5	Fase Móvel para doseamento de monoaminas por HPLC.....	52
4.5.6	Padrões para monoaminas e metabólitos.....	53
4.5.7	Método de utilização do HPLC.....	53
4.6	Avaliação da Atividade sedativa, ansiolítica e antidepressiva da AMI.....	55
4.6.1	Avaliação da coordenação motora no teste do rota rod	55
4.6.2	Avaliação do tempo de sono induzido por pentobarbital.....	56
4.6.3	Determinação da atividade sedativa da AMI no teste do campo aberto em camundongos em modelo sub-crônico.....	56
4.6.4	Determinação da atividade sedativa da AMI no teste do campo aberto em camundongos em modelo agudo.....	57
4.6.5	Avaliação do envolvimento GABAérgico no efeito sedativo da AMI.....	57
4.6.6	Determinação da atividade ansiolítica da AMI no Teste do Labirinto em Cruz elevado (Plus Maze) em camundongos em modelo sub-crônico.....	58
4.6.7	Determinação da atividade ansiolítica da AMI no Teste do Labirinto em Cruz elevado (Plus Maze) em camundongos em modelo agudo.....	60
4.6.8	Avaliação do envolvimento GABAérgico no efeito ansiolítico da AMI.....	60
4.6.9	Determinação da Atividade Antidepressiva da AMI no modelo do nado forçado em camundongos.....	61
4.6.10	Avaliação do envolvimento serotoninérgico do efeito antidepressivo da AMI.....	62
4.6.11	Avaliação do envolvimento serotoninérgico do efeito antidepressivo da AMI.....	62
4.7	Determinação da atividade anticonvulsivante da mistura isomérica de alfa e beta amirina (AMI).....	63
4.7.1	Por indução por Pentilenotetrazol com AMI via oral.....	63
4.7.2	Por indução por Pilocarpina com AMI via intraperitoneal.....	63
4.7.3	Por indução por estriçnina com AMI via intraperitoneal.....	63
4.7.4	Avaliação da participação de proteína quinase C no efeito anticonvulsionante da AMI no modelo de indução por PTZ, via intraperitoneal utilizando Polimixina B.....	64
4.7.5	Avaliação da participação de proteína quinase C no efeito anticonvulsionante da AMI no modelo de indução por PTZ, via intraperitoneal utilizando Estaurosporina.....	64

4.8 Avaliação de efeitos comportamentais relacionados ao SNC pelo Acetato de alfa e beta amirina (AcAMI) em camundongos	65
4.8.1 Avaliação da atividade exploratória no teste do campo aberto em modelo agudo.....	65
4.8.2 Avaliação da atividade exploratória no teste do campo aberto em modelo sub-crônico.....	66
4.8.3 Avaliação da atividade ansiolítica no teste do labirinto em cruz elevado em modelo agudo.....	66
4.8.4 Avaliação da atividade ansiolítica no teste do labirinto em cruz elevado em protocolo sub-crônico.....	67
4.8.5 Avaliação da atividade anticonvulsivante do AcAMI induzido por PTZ.....	67
4.8.6 Avaliação da atividade anticonvulsivante do AcAMI induzido por Pilocarpina.....	67
4.8.7 Avaliação do tempo de sono induzido por pentobarbital.....	68
4.9 Doseamento de aminoácidos e monoaminas de áreas cerebrais de camundongos tratados com AMI e AcAMI	68
4.9.1 Doseamento de monoaminas realizado através de HPLC obtidos a partir de homogenatos de córtex cerebral de camundongos tratados com AMI.....	68
4.9.2 Doseamento de aminoácidos realizado através de HPLC obtidos a partir de homogenatos de áreas cerebrais de camundongos tratados com AcAMI.....	69
4.9.3 Doseamento de aminoácidos realizado através de HPLC obtidos a partir de homogenatos de áreas cerebrais de camundongos tratados com AMI.....	69
5 RESULTADOS	71
5.1 Avaliação da Atividade sedativa, ansiolítica e antidepressiva da AMI	71
5.1.1 Avaliação da coordenação motora no teste do rota rod	71
5.1.2 Avaliação do tempo de sono induzido por pentobarbital.....	73
5.1.3 Determinação da atividade sedativa da AMI no teste do campo aberto em camundongos em modelo sub-crônico.....	75
5.1.4 Determinação da atividade sedativa da AMI no teste do campo aberto em camundongos em modelo agudo.....	77
5.1.5 Avaliação da participação GABAérgica no efeito sedativo da AMI.....	81

5.1.6 Determinação da atividade ansiolítica da AMI no Teste do Labirinto em Cruz elevado (Plus Maze) em camundongos em modelo sub-crônico.....	85
5.1.7 Determinação da atividade ansiolítica da AMI no Teste do Labirinto em Cruz elevado (Plus Maze) em camundongos em modelo agudo via oral.....	87
5.1.8 Avaliação da participação GABAérgica no efeito ansiolítico da AMI.....	89
5.1.9 Determinação da Atividade Antidepressiva da AMI em camundongos.....	91
5.1.10 Avaliação da participação noradrenérgica no efeito antidepressivo da AMI.....	93
5.1.11 Avaliação da participação serotoninérgica no efeito antidepressivo da AMI.....	95
5.2 Determinação da atividade anticonvulsivante da mistura isomérica de alfa e beta amirina (AMI).....	97
5.2.1 Efeito anticonvulsivante da AMI induzido por pentilenotetrazol utilizando camundongos em tratamento agudo por via oral	97
5.2.2 Efeito anticonvulsivante da AMI induzido por pilocarpina utilizando camundongos em tratamento agudo por via intraperitoneal	100
5.2.3 Efeito anticonvulsivante da AMI induzido por estriçnicina (2,5 mg/kg), utilizando camundongos em tratamento agudo por via intraperitoneal.....	102
5.2.4 Avaliação do envolvimento de Proteínas Quinases na atividade anticonvulsivante da AMI, utilizando a Polimixina B.....	104
5.2.5 Avaliação do envolvimento de Proteína Quinase C na atividade anticonvulsivante da AMI, utilizando a Estaurosporina.....	107
5.3 Avaliação de efeitos comportamentais relacionados ao SNC pelo Acetato de alfa e beta amirina (AcAMI) em camundongos.....	109
5.3.1 Avaliação da atividade exploratória no teste do campo aberto em modelo agudo.....	109
5.3.2 Avaliação da atividade exploratória no teste do campo aberto em modelo sub-crônico.....	111
5.3.3 Avaliação da atividade ansiolítica no teste do labirinto em cruz elevado em modelo agudo.....	113
5.3.4 Avaliação da atividade ansiolítica no teste do labirinto em cruz elevado em modelo sub-crônico.....	115

5.3.5 Avaliação da atividade anticonvulsivante do AcAMI induzido por PTZ em camundongos em modelo agudo.....	117
5.3.6 Avaliação da atividade anticonvulsivante do AcAMI por indução com Pilocarpina....	119
5.3.7 Avaliação do efeito do AcAMI no tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos.....	121
5.4 Doseamento de aminoácidos e monoaminas de áreas cerebrais de camundongos tratado com AMI e AcAMI.....	123
5.4.1 Doseamento realizado através de HPLC de monoaminas em homogenatos de córtex cerebral de camundongos tratados com AMI.....	123
5.4.2 Doseamento realizado através de HPLC de aminoácidos em homogenatos de áreas cerebrais (núcleos da base e hipocampo) de camundongos tratados com AcAMI.....	125
5.4.3 Doseamento realizado através de HPLC de aminoácidos em homogenatos de áreas cerebrais (núcleos da base e hipocampo) de camundongos tratados com AMI.....	127
6. DISCUSSÃO.....	129
6.1 Efeitos sedativos, ansiolíticos e antidepressivos da AMI.....	129
6.2 Efeitos anticonvulsivante da AMI.....	140
6.3 Avaliação neurofarmacológica do AcAMI.....	152
6.4 Doseamento de aminoácidos e monoaminas de áreas cerebrais de camundongos tratados com AMI e AcAMI.....	159
7. CONCLUSÕES.....	170

1. INTRODUÇÃO

1.1. PLANTAS MEDICINAIS

Plantas medicinais é um tema recorrente na pauta da ciência brasileira. Unanimidade entre químicos e farmacólogos brasileiros de reconhecida expressão internacional, os estudos com plantas medicinais ainda não receberam no Brasil, a atenção que o tema merece das agências financiadoras, embora já exista uma massa crítica de pesquisadores qualificados nas áreas de química e farmacologia. Até o presente momento, não houve um processo coordenado de todos os atores (indústria, farmacólogos, fitoquímicos, químicos sintéticos, farmacêuticos, médicos, etc) visando o desenvolvimento de fármacos a partir de plantas. O único recurso terapêutico de parcela da população brasileira e de mais de 2/3 da população do planeta, o mercado mundial de fitoterápicos movimentava cerca de US\$ 22 bilhões por ano e vem seduzindo a cada ano mais adeptos nos países desenvolvidos. Em 2000, o setor faturou US\$ 6,6 bilhões nos EUA e US\$ 8,5 bilhões na Europa, sendo a Alemanha, de longe, o maior mercado mundial de fitoterápicos (Pinto et al, 2002).

O extrato padronizado de *Gingko biloba* é hoje um dos fitoterápicos mais vendidos no mundo e no Brasil. A balança comercial brasileira é altamente deficitária neste item. O país exporta cerca de US\$ 7 milhões em extratos vegetais de alcaçuz, áloes, bardana, catuaba, ipeca e quina. Por outro lado, importa uma quantidade considerável de hormônios esteroidais, produtos cosméticos de fonte natural, verdadeiro contra-senso para uma nação que possui uma das maiores populações vegetais do planeta. Um problema grave na comercialização de fitoterápicos no Brasil ou a possibilidade de exportação é a falta do *status* de medicamento ético que lhe garanta eficácia, segurança e qualidade, padrões estes mensurados em bases científicas para a segurança do usuário. Assim, as plantas medicinais endêmicas ainda são pouco conhecidas e se constituem num fascinante assunto de pesquisa acadêmica e de desenvolvimento (Pinto et al, 2002).

1.2 ESTUDO DE PLANTAS DA FAMÍLIA BURSERACEAE

Várias são as famílias de plantas utilizadas hoje na medicina popular brasileira, entre elas podemos citar: Anacardiaceae, Apocynaceae, Araceae, Aristolochiaceae, Boraginaceae, Burseraceae, Cactaceae, Euphorbiaceae, Lamiaceae, Liliaceae, Malvaceae, Myrtaceae, Papaveraceae, Rutaceae, Solanaceae, Verbenaceae, entre muitas outras (Fenner et al, 2006).

A família Burseraceae pertencente à ordem Rutales é bastante rica em espécies distribuídas em 16 gêneros sendo encontrada nas regiões tropicais e subtropicais. As mais de 800 espécies conhecidas são bastante dispersas ocorrendo na América do Sul, América do Norte, África Tropical, Ásia Tropical e nas Antilhas. Alguns gêneros desta família são produtores de uma seiva oleosa rica em óleo essencial e triterpenos das séries oleano, ursano e eufano (Pernet, 1972).

São árvores de pequeno porte ou arbustos, mas algumas espécies podem atingir o dossel da floresta. A presença de resina aromática é encontrada em quase todas as partes da planta, com cheiro lembrando incenso ou terpenos (breu). Suas folhas são alternas e compostas, geralmente imparipenadas. Os folíolos muitas vezes têm puvínulo (*Protium*). As inflorescências podem ocorrer como racemos, panículas ou pseudo-espigas. As flores são unissexuadas e muito pequenas, de cor creme amareladas ou esverdeadas, raramente avermelhadas. As flores tem de 3 a 5 sépalas, normalmente unidas, e 3 a 5 pétalas, livres ou unidas. Os frutos são drupáceos, às vezes capsulares, muitas vezes oblíquos. O pirênio está envolto por polpa de cor branca que se destaca devido à cor vistosa das válvulas ou columela ou devido à cor preta do pirênio (Ribeiro et al, 1999).

A família é subdividida em três tribos, segundo Engler: Protieae, Boswellieae e Canarieae. A tribo protieae por sua vez, está distribuída em três gêneros: *Garuga*, *Tetragastris* e *Protium* (Guimarães, 1997).

1.2.1 *Protium heptaphyllum*

O gênero *Protium* (Burseraceae) é o mais representativo da família com cerca de 136 espécies e dentre estas espécies temos, *Protium heptaphyllum* (*Amyris ambrosiaca* Willd., *Icica guianensis* T. & Pl, *I. heptaphyllum* Aubl., *I. surinamensis* Miq., *I. Tacahamaca* H.B.K., *P. aromaticum* Engl.). (Susunaga, 1995).

É uma árvore que proporciona boa sombra e apresenta qualidades ornamentais, podendo, por conseguinte, ser utilizada na arborização urbana e rural (**Figura 1**). Abaixo segue a descrição botânica transcrita textualmente, segundo Corrêa, 1984.

“Árvore grande podendo medir até 20 metros de altura; casca cinzenta, pouco espessa; folhas pinadas, 2-3 jugas ou raras vezes 4-jugas; folíolos oblongos, inteiros, glabros, de 10 centímetros de comprimento e 5 centímetro de largura 9; flores verde-amareladas, pequenas abundantíssimas, dispostas em panículas; fruto drupa vermelha, ovóide, contendo polpa resinosa e amarela envolvendo 1 semente, rara vezes mais, até 4. Fornece madeira branco-avermelhada, com cerne mais escuro, compacta, uniforme, ondeada, bastante elástica e acetinadas, dura, revessa, porém dócil ao cepilho e à serra, excelente para construção civil, obras internas, soalho, marcenaria, torno, carpintaria, etc., sendo de grande duração em lugares secos; peso específico 0,771. A casca e as folhas são muito reputadas popularmente contra úlceras gangrenosas e as inflamações em geral. Parece ser esta a espécie do gênero que exsuda maior quantidade de resina, cuja cor é branco-avermelhada”.



Figura 1 - Fotografia da espécie *P.heptaphyllum* Marchand.

Fonte: <http://www.fapepi.pi.gov.br/novafapepi/sapiencia10/pesquisa1.php>. Em 07/12/07

Existe as variedades *puberullum* de pecíolos e nervuras dos folíolos pubescentes, 3 pares de folíolos, panículas maiores e flores completamente brancas; *brasiliensis* (*A. ambrosiaca* Vell., *brasiliensis* Willd., *I. heptaphylla* M.), geralmente de 7 folíolos oblongos-acuminados, flores muito aglomeradas com pétalas maiores e drupas maiores; e *angustifolium* (*I. Salzmanni* Turcz.) de folíolos muito mais estreitos (**Figura 2**). A espécie tipo ou as variedades encontram-se em todo Brasil, vegetando de preferência em terrenos arenosos. São conhecidas popularmente como: Almecega, Almecega-do-Brasil, Almecega-verdadeira, Almecegueira-cheirosa, Almecegueira-de-cheiro, Almecegueira-vermelha, almecegueiro-bravo, Almica, Aime, Árvore-do-incenso, Breu-almecega, Breu-branco, Breu-branco-do-campo, Beu-janaricica, Cicantaa-ihua, Elmi, Elmi-do-Brasil, Elemieira, Erva-feiticeira, Goma-limão, Guapohy, Guapoy-ici, Ibicaraica, Icaraiba, Icica, Icariba, Mescla, Mirra, Pau-de-Breu, Resina-icica, Arouaou, Haiawa e Ubirasiguá de algumas tribos aborígenes; Breu branco verdadeiro, na Amazônia; Icica-assú, Incenso de caiena, na Guiana Francesa, Curucaí, na Venezuela; Karun-phul, na Índia; Tacahamaca, na Colômbia; Tembetari-hu, na Argentina (Corrêa, 1984).

A espécie *Protium heptaphyllum*, assim como as demais espécies da família Burseraceae são produtoras de resina oleosa conhecida como breu branco, goma limão, etc (**Figura 3**). A resina oleosa é obtida pela lesão do tronco, causada pelo ataque de insetos, secretada de forma espontânea ou pela ação do homem, apresenta-se de consistência variável e não possui composição simples (Costa, 1994). É utilizada na indústria de verniz, tinta, na calafetação de embarcações e em rituais religiosos como incensos (Corrêa, 1984).

Muitos são os usos terapêuticos atribuídos à espécie *Protium heptaphyllum* na medicina popular, como sonífera, afecção dos olhos, diarreia, enteralgia, hérnia, inflamação e úlcera gangrenosa. Estudos farmacológicos com registros na literatura tem destacado a atividade cercaricida dos óleos essenciais das folhas e dos frutos (Frischkorn, 1978) e o uso do óleo essencial da resina e das folhas como antiinflamatório, antinociceptivo e antineoplásico (Siani e cols., 1999). Recentemente foi estudado o efeito antiinflamatório e gastroprotetor da resina do *Protium heptaphyllum* (Oliveira et al, 2004).



Frutos da amescla

Figura 2 - *P. heptaphyllum* March, fotografia ilustrando folhas e frutos

Fonte: Fotos Serliete Carvalho, no campus da UFRPE e no Parque Estadual de Dois Irmãos, Recife.



Figura 3. Extração da resina do *Protium heptaphyllum*. Fonte: Bandeira, 2003.

Os estudos fitoquímicos desta espécie ainda são poucos e aliado ao grande uso na terapêutica popular levaram ao grupo de pesquisa em Química Orgânica da UFC, coordenado pela Professora Dra. Telma Leda Gomes de Lemos a fazer um estudo detalhado desta planta. Deste estudo resultou o isolamento e identificação de oito substâncias, sendo um monoterpreno: p-ment-3-eno-1,2,8 triol; três triterpenos: α -amirina e β -amirina como mistura binária e Breina; uma cumarina: escopoletina; dois flavonóides: quercetina e quercetina-3-O-raminosil e uma catequina e também a identificação dos constituintes voláteis dos óleos essenciais da resina, frutos verdes, frutos maduros, folhas e cascas. A análise quantitativa por cromatografia líquida de alta eficiência, da mistura α -amirina e β -amirina presente em quantidade na resina de *Protium heptaphyllum*, observou-se à proporção de 3% destes constituintes (Bandeira, 2003).

1.3 ESTUDO DO TRITERPENO AMIRINA

Triterpenóides são metabólitos secundários não-esteroidais presente na flora terrestre, marinha e fauna, constituindo-se nos componentes majoritários em algumas plantas usadas na medicina tradicional, com ocorrência na forma livre, bem como na forma de éteres, ésteres e glicosídeos. Como o nome deixa entender, triterpenóides são isopentenóides compostos de 30 átomos de carbono, com esqueleto acíclico do tipo mono-, di-, tri-, tetra- ou pentacíclico. Os triterpenóides pentacíclicos são os constituintes dominantes desta classe, e têm sido amplamente investigados, dos quais fazem parte os compostos α -amirina e β -amirina, mostrado na **Figura 4**, (Mahato e Kundu, 1994).

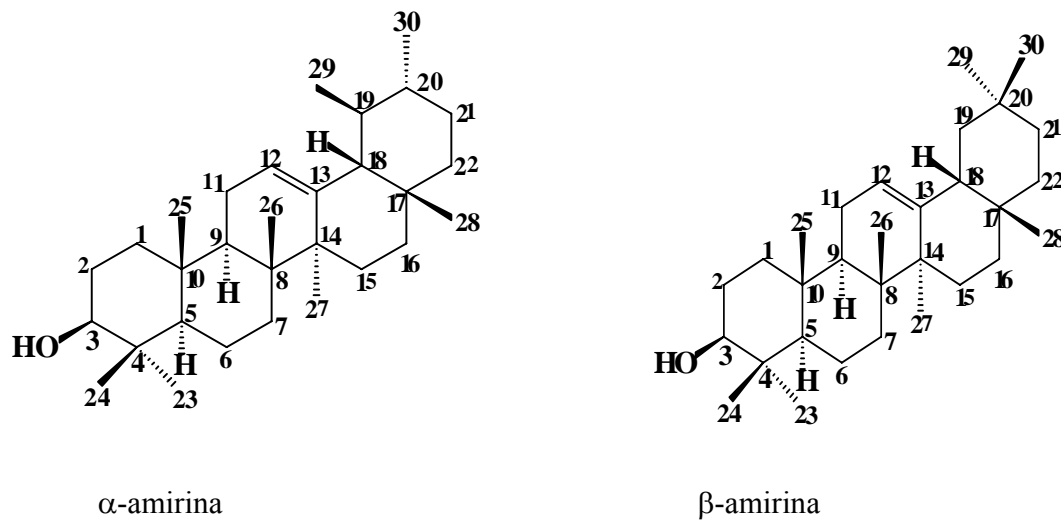


Figura 4 – Fórmula estrutural dos isômeros alfa e beta amirina.

Quimicamente as misturas isoméricas de alfa e beta amirina são dois triterpenos pentacíclicos pertencente às séries ursano (alfa-amirina) e oleano (beta-amirina). Eles estão presentes na resina do gênero *Protium* (fam. Burseraceae), incluindo a espécie *P. heptaphyllum*. Estes triterpenos possuem atividade antiinflamatória e antinociceptiva, efeitos que foram estudados em vários modelos animais. Recentemente nós demonstramos que a mistura de alfa e beta amirina apresenta atividade no sistema nervosa central, apresentando atividade ansiolítica e antidepressiva, quando administrado agudamente em camundongos, avaliado em modelos farmacológico experimental como plus maze e nado forçado (Aragão et al, 2006).

A amirina e seus ésteres foram descritos contendo várias atividades farmacológicas. Com atividade antinociceptiva Krogh et al, (1999) demonstraram que amirina isolada da *Ipomoea pes-caprae* apresentou pronunciada atividade frente aos testes de contorções com ácido acético e formalina, justificando o uso popular desta planta para esta finalidade. Foi demonstrado efeito antiartrítico para o éster palmitato de alfa amirina (Kweifio-Okai et al, 1994; Kweifio-Okai et al, 1995). A atividade antiinflamatória da alfa amirina extraída do látex do *Himatanthus sucuuba*, foi evidenciada no modelo de edema de pata induzido por carragenina em ratos (Miranda et al, 2000), também atividades como antimicrobiana (Ramesh et al, 2001) e citostática (Gomez et al, 1997) foram descritas para a amirina. Outras atividades, como inibidor enzimático, tal como, inibição seletiva de proteína quinase de células eucarióticas (Hamedda et al, 1999), inibidor da

serina protease (Rajic et al, 2000) e inibidor da lipoxigenase (Kwefio-Okai and Macrides, 1992). Efeitos ao nível de Sistema Nervoso Central, de ésteres da amirina, também foram estudados e estão registrados na literatura como efeitos inibitórios da atividade locomotora de camundongos, assim como efeitos sedativos e antidepressivo (Subarnas et al, 1993a; Subarnas et al, 1993b; Subarnas et al, 1993c).

1.3.1 ATIVIDADE ANTIARTRITICA

Os triterpenos alfa amirina (AA), palmitato de alfa amirina (AAP) e linoleato de alfa amirina (AAL) foram testados em modelos de processos inflamatórios e artrites destrutivas e seus efeitos foram comparados com drogas antiartríticas clássicas usada na clínica, a indometacina e o metotrexato. Os triterpenos não tiveram efeito na fase prostaglandínica do edema de pata induzido por carragenina em ratos, que foi reduzida em 28% por 100 μ M de indometacina. O linoleato causou uma considerável redução de 5-lipoxigenase, 5-HETE, LTB₄, isômero I e isômero II sintetizado por neutrófilos humanos. O crescimento de células de osteosarcoma de ratos foi inibido por todos os triterpenos com IC 50's (μ M) de < 10 (AAP), 14 (AA) e 27 (AAL) e foram mais efetivos do que a indometacina. Metotrexato causou 100% de inibição na concentração de 10 μ M comparado com 64% de inibição pelo o AAP. A digestão de colagenase de girino do tipo colágeno nativo tipo I foi completamente inibida por todos os triterpenos como também pela indometacina e metotrexato a 100 μ M. O principal ponto de intervenção antiartrítica pela amirina situa-se no seu local de inibição da destruição da cartilagem da articulação (Kwefio Okai et al, 1994). Em outro estudo o palmitato de alfa amirina foi sintetizado e testado em ratos machos adultos em modelos de artrite por injeção intraplantar de Adjuvante Completo de Freund's (CFA). Quando administrado oralmente na dose de 66 mg/Kg durante 48 horas por 5 dias, a partir do 32º dia até o 40º dia após o CFA e avaliado no 50º dia, palmitato de alfa amirina regressou o aumento de hialuronato no soro e granulócitos sanguíneos para níveis observados em não artríticos e corrigiu a anemia provocada pelo CFA. Examinações histológicas do segundo e terceiro dedo proximal na articulação interfalangeal mostrou redução de proliferação sinovial e invasão de cartilagem e reduziu a infiltração de leucócitos da medula óssea em ratos tratados com

palmitato de alfa amirina, ou seja a droga preveniu ou reduziu a destruição óssea (subcondral ou cortical) e de cartilagem (articular) em ratos com artrite (Kweifio-Okai et al, 1994).

Um estudo similar ao acima descrito feito com o palmitato de alfa amirina extraído de uma preparação de plantas medicinais, onde estão presente as espécies *Alstonia boonei*, *Elaies guineensis* e *Rauwolfia vomitória*, foi testada em modelos de artrite de ratos (*Complete Freund's Adjuvant*). Administrado oralmente na dose de 56 mg/Kg diariamente por 8 dias, do 11° ao 18° dia após o CFA (fase aguda) ou 66 mg/Kg a cada 48 horas por 5 dias do 32° ao 40° dia (fase crônica). Os resultados foram idênticos ao trabalho citado acima, onde a droga conseguiu reverter o aumento de hialuronato no sangue e de granulócitos sanguíneos, voltando a níveis não artríticos e corrigindo a moderada anemia provocada pelo CFA. Nas examinações histológicas dos dedos proximais na articulação interfalangeal mostrou redução de proliferação sinovial e invasão de cartilagem e reduziu a infiltração de leucócitos da medula óssea e tecido periarticular em ratos tratados (Kweifio-Okai et al, 1995).

Os triterpenos acetato de alfa amirina, acetato de beta amirina, beta amirina e acetato de lupeol, isolados do extrato etéreo da casca da raiz de *Alstonia boonei* De Wild, foram testados por seus efeitos antiinflamatórios em ratos com artrite induzidas por CFA. Quando administrada oralmente e diariamente do 11° ao 19° dia após o adjuvante, acetato de lupeol e acetato de beta amirina foram mais eficazes em prevenir o aumento do inchaço nos joelhos após o CFA. Todos os triterpenos aboliram o aumento na contagem de WBC, aumentaram o peso do fígado e rins, mas somente o acetato de alfa amirina aumentou significativamente as taxas de TGO. Na presença de beta amirina houve uma significativa degeneração de neutrófilos. Neste estudo todos os triterpenos demonstraram ser tóxicos para o fígado, rins e baço (Kweifio-Okai and Carrol, 1992).

1.3.2 ATIVIDADE ANTIPRURIGINOSA

O laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará realizou sob supervisão do Prof. Dr. Vietla Satyanarayana Rao uma série de estudos sobre a mistura de alfa e beta amirina, onde em um estudo sob atividade antipruriginosa esta mistura foi capaz de suprimir de forma experimental o prurido, evidenciado pelo seu efeito inibitório no comportamento de coceira induzido por

dextrano T40 e composto 48/80 em camundongos. O efeito pruridogênico do composto 48/80 é atribuído a liberação de histaminas dos mastócitos e alguns estudos sugerem que o aumento da permeabilidade da membrana e a ativação da fosfolipase D dos mastócitos pode ser um alvo essencial para a liberação dos mediadores destas células. Composto 48/80, entretanto, pode induzir coceiras em camundongos independentemente de histamina e serotonina, esta pode ser a razão por que a ciproeptadina, um antagonista dos receptores de histamina e serotonina, assim como a alfa e beta amirina demonstraram mais eficácia na melhora de coceira induzida por dextrano T40, quando comparado ao composto 48/80. Desta forma para justificar este efeito, os mastócitos e os mediadores derivados destas células, podem ter um papel importante (Oliveira et al, 2004a).

1.3.3 EFEITO HEPATOPROTETOR E GASTROPROTETOR

Na pesquisa por agentes hepatoprotetores de origem natural, a alfa e beta amirina, foi testada contra lesões no fígado provocadas pelo paracetamol em camundongos. O paracetamol na dose de 500 mg/kg, v.o., causou lesões fulminantes no fígado caracterizado pela necrose com infiltração de células inflamatórias, um aumento no soro de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), uma diminuição da glutathiona hepática (GSH) e 50% de mortalidade. O pré-tratamento com alfa e beta amirina atenuou o aumento de ALT e AST e reduziu as alterações histopatológicas, de maneira similar a N-acetilcisteína, um doador de sulfidrilas e antídoto para intoxicação com paracetamol. Também a mortalidade foi completamente suprimida pelos triterpenóides. Este estudo demonstrou o potencial hepatoprotetor da alfa e beta amirina contra lesões tóxicas no fígado e sugere que a diminuição do estresse oxidativo e a formação de metabólitos tóxicos são os mecanismos envolvidos na hepatoproteção (Oliveira et al, 2005a).

Outro estudo envolvendo o efeito antiinflamatório e gastroprotetor da resina extraída do *protium heptaphyllum*, material este rico em alfa e beta amirina, avaliou seu potencial antiinflamatório e como protetor gástrico em modelos clássico de inflamação e de úlceras gástricas induzidas por etanol. Em camundongos, a resina (20 mg/kg e 400 mg/kg) diminuiu significativamente os danos gástricos induzidos pelo etanol ou pelo etanol acidificado com ácido

clorídrico, efeito este similar ao do n-acetil-cisteína, onde o autor chega a conclusão que embora o efeito tenha sido similar o mecanismo de ação parece ser diferente. O resultado foi uma proteção gástrica significativa nos camundongos tratados com a resina em relação ao controle e um efeito antiinflamatório descrito com diminuição da permeabilidade vascular e redução de formação de granulomas, com baixa toxicidade aguda. Esta combinação de efeitos é favorável, devido ao fato de que a maioria dos antiinflamatórios produz irritação gástrica, o que muitas vezes limitam o seu uso. Um outro dado importante sobre esta resina rica em alfa e beta amirina é sua baixa toxicidade, em testes com camundongos, doses de 5g/Kg, via oral foram consideradas não tóxicas (Oliveira et al, 2004b).

1.3.4 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANALGÉSICA

Um dos primeiros trabalhos publicados que cita a atividade analgésica e antipirética da amirina é de 1971, onde Bhalla et al, descreve que o acetato de alfa amirina e o acetato de beta amirina na dose de 40 mg/kg, i.p. de forma significativa exerce efeito antipirético em ratos albinos. A atividade analgésica foi verificada nas doses que variavam de 20 a 80 mg/kg, ip., no teste das contorções abdominais. O autor conclui que a presença de atividade antiinflamatória, analgésica e antipirética nos triterpenóides deve estar ligado ao fato de que eles possuem um anel hidrocarboneto similar ao dos esteróides (Bhalla et al, 1971).

Em estudo realizado no Laboratório de Neurofarmacologia da UFC, demonstramos que a mistura de alfa e beta amirina apresenta propriedades antinociceptivas assim como propriedades antiedematogênica em modelos experimentais em camundongos. Estes resultados indicaram que a alfa e beta amirina produz efeito antinociceptivo periférico e central e que esta independe do sistema opióide.

Em experimento realizado com teste de formalina, a AMI inibiu predominantemente a segunda fase (resposta inflamatória), mas também inibiu significativamente a primeira fase (resposta neurogênica). Interessantemente, AMI mostrou uma intensa atividade antiinflamatória nos modelos de indução de edema de pata por carragenina e por dextrano. No primeiro modelo, AMI inibe o efeito edematogênico da carragenina que resulta de um estímulo local causando a liberação de mediadores do processo inflamatório, assim como a migração de células

polimorfonucleares. AMI também inibe o edema de pata induzido por dextrano que causa a liberação de mediadores como histamina e 5-HT. A reação com dextrano é caracterizada pela presença de um pequeno número de leucócitos no exsudato quando comparado com o edema induzido pela carragenina. Estes resultados sugerem que AMI é mais eficaz no processo inflamatório do que na nocicepção (Aragão, 2004)

Além do efeito analgésico periférico, a AMI também apresenta efeitos analgésicos determinado pelo aumento no tempo de permanência de camundongos expostos a estímulos térmicos, como no teste da placa quente. O efeito da amirina foi manifestado após administração intraperitoneal na dose de 50 mg/kg, mas não apresentou efeito quando a administração foi oral. E nestas mesmas condições, foi demonstrado que o efeito não foi revertido após prévio tratamento com naloxona confirmando que antinocicepção é independente do sistema opióide (Aragão, 2004).

Foram encontradas propriedades antinociceptivas de compostos extraídos da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., uma planta medicinal frequentemente empregada na medicina de muitos países contra várias doenças inclusive inflamação e dor. Compostos como glochidona, ácido betulínico, acetato de alfa e beta amirina, isoquercetina, entre outros, demonstraram pronunciadas propriedades antinociceptivas no teste de contorções abdominais e teste de formalina em camundongos (Krogh et al, 1999). Um estudo do extrato metanólico e de duas frações obtidas das partes aéreas (acetato de etila e aquoso) da *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br onde estas exibiram considerável atividade antnociceptiva em dois modelos clássicos de dor em camundongos. O extrato metanólico apresenta uma ID 50 calculada no valor de 33,8 mg/kg, i.p. no teste de contorções e também inibe ambas as fases de dor (neurogênica e inflamatória) no teste da formalina com ID 50 de 37,7 e 12,5 mg/kg, i.p. para a primeira e segunda fase, respectivamente (Sousa et al, 2000).

O látex extraído do *Himatanthus sucuuba* contendo triterpenos é usado na medicina popular da Amazônia como remédio antiinflamatório. Frações deste látex foram preparadas farmacotecnicamente e avaliados como uma maneira de estudar seu uso popular, utilizando modelos de edema de pata induzido por carragenina em ratos e contorções abdominais provocadas por ácido acético em camundongos. A fração hexânica inibiu a formação de edema em 35,9% na dose de 200 mg/kg (v.o.), mas nenhuma atividade foi observada na dose de 100

mg/kg (v.o.). Os triterpenos presentes na fração hexânica foram identificados como acetato de lupeol, alfa amirina e cinamatos lupeol (Miranda et al, 2000).

Em 2003, o efeito analgésico de extratos de hexano, cloreto de metileno e etanol da *Miconia rubiginosa* foi avaliado em camundongos e ratos usando os testes de contorções abdominais e placa quente. Os extratos 100, 200 e 300 mg/kg e indometacina 5 mg/kg, produziram inibições significantes nas contorções abdominais induzidas por ácido acético. Em alguns extratos mostrou um efeito significativo antinociceptivo na dose de 200 mg/kg que foi menor que o efeito exercido pela morfina 4 mg/kg no teste da placa quente. Os triterpenos identificados no extrato hexânico foram, alfa amirina, beta amirina, lupeol e beta-sitosterol (Spessoto et al, 2003).

A mistura dos dois pentacíclicos triterpenos alfa amirina e beta amirina, isolado da resina do *Protium Kleinii* e administrada por via intraperitoneal e via oral provocou significativo efeito antinociceptivo de forma dose-dependente em dores viscerais de camundongos provocada por injeção de ácido acético. Entretanto, administração de alfa e beta amirina por via i.p., v.o., i.c.v. (intracerebroventricular) ou i.t. (intratecal), inibiu ambas as fases da nocicepção (neurogênica e inflamatória) causada pela injeção intraplantar de formalina. Igualmente, alfa e beta amirina administrada por via i.p., v.o., i.t ou i.c.v. inibe a nocicepção neurogênica induzida por capsaicina. Enquanto o tratamento com alfa e beta amirina, via i.p., foi capaz de reduzir a nocicepção produzida por 8-bromo-AMPC e pelo 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato (TPA) ou a hiperalgesia causada pelo glutamato. Por outro lado, ao contrário da morfina, alfa e beta amirina falhou em causar analgesia nos modelos térmicos de dor. A antinocicepção causada pela mistura dos compostos parece envolver mecanismos independentes do sistema opióide, α -adrenérgico, serotoninérgico e mediação do sistema nitrérgico, pois ela não foi afetada pela naloxona, prazosin, ioimbina, éster metil DL-*p*-clorofenilalanina ou L-arginina. A administração i.p. da alfa e beta amirina reduz a hiperalgesia mecânica produzida pela injeção intraplantar da carragenina, capsaicina, bradicinina, substância P, prostaglandina E₂, 8-Br-cAMP e TPA em ratos. Entretanto a mistura dos compostos falhou em alterar os sítios de ligação da [³H] bradicinina, [³H] resiniferatoxina ou [³H] glutamato *in vitro*. Desta forma foi concluído que a mistura de triterpenos alfa e beta amirina produz consistente antinocicepção periférica, espinal, e supra-espinal em roedores, especialmente quando executado em inflamação proveniente de modelos de dor. O mecanismo envolve uma ação não completamente entendida, mas parece

envolver a inibição de vias que envolvam as proteína quinase A e proteína quinase C (Otuki et al, 2005)

A alfa e beta amirina extraída da resina *Protium heptaphyllum*, foi avaliada na nocicepção provocada por capsaicina em camundongos. Administrada oralmente a alfa e beta amirina (3 a 100 mg/kg) suprime de maneira significativa os comportamentos nociceptivos provocados por aplicação de capsaicina subplantar (1,6 µg) ou intracolônico (149 µg). A antinocicepção produzida pela alfa e beta amirina nos modelos de dor aguda e visceral provocada pela capsaicina pode estar relacionado a tivação da fibra tipo C e a interação com o sistema opióide (Oliveira et al, 2005). A mistura de alfa e beta amirina também foi estudada em modelos de nocicepção visceral observando-se comportamento de dor após ciclofosfamida por via intraperitoneal e também através de óleo de mostarda intracolônico, onde as doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg, foram testadas. A mistura triterpênica exerceu efeito na dor induzida por ciclofosfamida de maneira dose-dependente, onde com 100 mg/kg foi suprimido completamente o parâmetro analisado de nocicepção. No modelo com óleo de mostarda os parâmetros foram inibidos maximamente com 10 mg/kg, onde fora também revertido na presença de naloxona. O pré-tratamento com vermelho rutênio (3 mg/kg, s.c.), um antagonista não específico dos receptores vanilóides (TRPV₁), também causou inibição significativa. O pré-tratamento com um antagonista dos receptores alfa adrenérgico, ioimbina (2 mg/kg, s.c.), mostrou efeito significativo. Na dose de 10 mg/kg, ip., a mistura triterpênica de alfa e beta amirina não alterou de forma significativa o tempo de sono induzido por pentobarbital e nem alterou a coordenação motora de animais submetidos ao teste do campo aberto e do rota rod. Desta forma chegou-se a conclusão que a alfa e beta amirina possivelmente exerce efeitos antinociceptivos através de mecanismos que envolvam receptores opióides e vanilóides (TRPV₁) em dores viscerais (Oliveira et al, 2005b).

1.3.5 EFEITO ANTIINFLAMATÓRIO E ANTIEDEMATOGÊNICO

Há muito é conhecida a atividade antiinflamatória dos triterpenos, o acetato de alfa amirina e o acetato de beta amirina foram estudados por Gupta e cols (1969) e observado efeito antiinflamatório no modelo de edema de pata induzido por carragenina e também efeitos de redução da formação de tecido granulomatoso induzido por *pellet* de algodão em ratos (Gupta et

al, 1971). A atividade antiinflamatória das flores da *Calendula officinalis*, onde os triterpenóides demonstraram ser os mais importantes princípios existentes neste extrato, incluindo a beta-amirina foi descrito por Della-Loggia e cols em 1994.

Em um outro estudo com 15 espécies diferentes de plantas foram estudadas através de seus constituintes triterpênicos, onde foi identificado a beta-amirina entre outros com destacada atividade antiinflamatória (Akihisa et al, 1996).

Os triterpenos acetato de alfa amirina, acetato de beta amirina e beta amirina foram testados para avaliar seus efeitos na síntese de produtos derivados da 5-lipoxigenase em neutrófilos humanos. Todos os triterpenos reduziram a síntese de 5-HETE sem efeito na síntese de LTB₄. Este efeito relativo sugere que a inibição de 5-HETE pode explicar a atividade antiartrítica que estes compostos possuem (Kweifio Okai and Macrides, 1992).

A alfa amirina, o lupeol e os ésteres palmitato de linoleato destes triterpenóides são relativamente inibidores específicos da subunidade catalítica (cAK) da proteína quinase dependente de AMPc animal (PKA). Deste modo estes triterpenóides não inibem a MLCK e aqueles que inibem PKC ou CDPK são muito pobre inibidores desta proteína quinase como a PKA. A inibição competitiva da cAK, PKC e CDPK por triterpenóides é relacionada a ligação destes compostos com o sítio ativo destas proteínas quinases. Proteínas quinases de células eucarióticas têm muitos domínios catalíticos similares. A inibição de cAK pelo lupeol é do tipo não competitiva e competitiva com relação ao kemptídio e ATP, respectivamente, indicando que o lupeol liga-se ao sítio ativo e compete com o sítio ativo do ATP, mas não interfere na região de ligação do substrato peptídico. A inibição competitiva com a PASE (*potato high-affinity cyclic nucleotide binding phosphatase*) pela alfa amirina, palmitato de alfa amirina e palmitato de lupeol é igualmente consistente com a ligação destes triterpenóides ao sítio de ligação nucleotídica. Entretanto lupeol é notavelmente um inibidor não-competitivo da PASE (Hamedda et al, 1999).

Vários triterpenos anfífilos como o ácido litocólico, ácido 18 α - e 18 β -glicirretínico, ácido 3 β -ol-5-colênico, ácido metil-éster-litocólico, ácido ursólico e ácido oleanólico são potentes inibidores seletivos de cAK com valores de IC₅₀ para cAK na ordem de 4 – 12 μ M, similar magnitude para o IC₅₀ da cAK de alfa-amirina e lupeol e os ésteres palmitato e linoleato destes triterpenos hidrofóbicos. As características comuns destes triterpenóides anfífilos é a 3-hidroxi, um resíduo polar distal e um núcleo triterpenóide apolar e quase planar. Outros produtos

naturais anfílicos envolvem resíduos polar separados por um espaço não polar o qual são também inibidores de cAK, incluindo o carotenóide crocetina e curcumina (diferuloimetano). Entretanto a existência de dois grupos polares separados por um espaço hidrofóbico não é essencial para uma potente inibição da cAK. Desta forma lauril galato é também um potente e inibidor seletivo da cAK (IC₅₀ 1,5 µM). Triterpenóides hidrofóbicos como alfa amirina e lupeol, ambos contendo um grupamento 3-hidroxi como único grupo polar e incluso os ésteres palmitato e linoleato destes compostos, são potentes e seletivos inibidores de cAK (Hasmeda et al, 1999).

Alfa amirina e lupeol são triterpenóides bioativos que tem marcado efeito antiinflamatório. É notável que outros antiinflamatórios triterpenóides são potentes e seletivos inibidores de cAK, como o ácido 18α- e 18β-glicirretínico, ácido ursólico e ácido oleanólico e é então conhecido que a inibição dos sinais de transdução mediado por cAK pode contribuir pelos efeitos biológicos destes triterpenóides. A demonstração de que um número de triterpenóides antiinflamatórios são relativos inibidores seletivos de PKA, sugere que o mecanismo envolvido no processo inflamatório envolve a PKA, mas o mecanismo ainda não está claramente elucidado (Hasmeda et al, 1999).

Vários estudos realizados demonstram que a alfa amirina ou planta contendo este triterpeno exerce atividade antiinflamatória em roedores, em modelos experimentais como edema de orelha induzido por TPA, edema de pata induzido por carragenina e artrite induzida pelo Adjuvante Completo de Freund's (CFA). Entretanto os mecanismos moleculares permanecem sem estar devidamente esclarecidos. Uma vantagem em se conhecer o mecanismo de ação da alfa amirina é aproveitar o interesse no potencial terapêutico dos triterpenos pentacíclicos de origem natural (Medeiros et al, 2007).

Injeções intradérmicas de PGE₂, uma conhecida prostaglandina pró-inflamatória, pode causar eritema, enquanto que doses mais alta produzem edema. A PGE₂ pode amplificar a mudança na permeabilidade capilar induzida por outros mediadores. A alfa-amirina inibe o edema de orelha induzido por TPA e o influxo de polimorfonucleares e causa uma inibição do tipo dose-dependente na orelha dos níveis de PGE₂, na pele do rato tratado com TPA. Isto explicaria em parte as propriedades antinociceptivas e antiinflamatória tópica e sistêmica reportada a alfa-amirina em vários trabalhos. Um crescente número de estudos sugere que a PGE₂ está associada com a patogênese das doenças inflamatórias da pele, como exemplo a dermatite atópica. A aplicação tópica da alfa-amirina pode ser potencialmente relevante na pesquisa por

novos agentes terapêuticos o qual tem como alvo os prostanóides, pois níveis tissulares de PGE₂ foram significativamente reduzidos após a aplicação de TPA em orelhas de camundongos. Como já é bem conhecido enzimas como ciclooxigenases COX-1 e COX-2 são responsáveis pela transformação do ácido araquidônico em prostaglandinas, e tem uma importante função nos processos inflamatórios (Medeiros et al, 2007).

Ao contrário da COX-1 que é a forma constitutiva da enzima, a COX-2 é geralmente, mas não exclusivamente, induzidas em respostas a vários estímulos como fator de crescimento, citocinas, lesão tecidual e radiação ultra-violeta. A destruição de um ou mais genes responsável pela produção de COX-2 em camundongos é capaz de reduzir o processo inflamatório em modelos animal de inflamação cutânea, indicando que os metabólitos do ácido araquidônico derivados da COX-2 exercem um importante papel nas doenças inflamatórias da pele. A alfa-amirina possui habilidade em inibir níveis de PGE₂ na orelha de camundongos, no entanto esta não está relacionado com a inibição da atividade das enzimas COX-1 e COX-2. Esta conclusão baseia-se no fato de que ao contrário do que acontece com os inibidores específicos de COX-1 como o SC560 e da COX-2 como o rofecoxibe, a alfa-amirina, mesmo em altas doses *in vitro*, falhou em interferir com a atividades destas ciclooxigenases. Desta forma a inibição dos níveis de PGE₂ da orelha do camundongo após aplicação tópica da alfa-amirina pode estar associada com a capacidade em interferir com a expressão da COX-2. A alfa-amirina possui propriedades antiinflamatórias, dose-dependente, inibindo a expressão da enzima COX. Estas observações podem explicar relativamente o forte e rápido início da propriedade antiinflamatória reportada a este triterpeno (Medeiros et al, 2007).

NF-κB tem surgido como um dos mais promissores alvo molecular na prevenção de câncer e inflamação. Degradação de IκB permite o NF-κB se translocar para o núcleo, local onde é regulada a transcrição de vários genes, incluindo a COX-2 e vários genes de citocinas. Notavelmente, vários estudos têm indicado que o aumento na ativação do fator NF-κB tem um importante papel no desenvolvimento e manutenção das doenças inflamatórias cutâneas, incluindo psoríase, dermatite de contato e dermatite atópica. Então, drogas que inibem a ativação do fator NF-κB são em princípio, de potencial interesse para o tratamento de doenças inflamatórias cutâneas. TPA produz um aumento na atividade de DNA ligado ao NF-κB, através de mecanismos que envolvem a degradação de IκBα, fosforilação de p65/RelA e a subsequente translocação de NF-κB para dentro do núcleo. A aplicação tópica da alfa-amirina na pele de ratos

em iguais doses que foram eficazes em inibir a expressão de COX-2 após aplicação tópica de TPA (0,1 a 1,0 mg/orelha), consistentemente e dose-dependentemente inibiu a ativação de NF- κ B induzido por TPA. Este efeito parece estar relacionado com a habilidade de redução da degradação de I κ B β e da fosforilação de p65/RelA. Assim, a inibição da ativação de NF κ B pela alfa-amirina pode explicar os efeitos na expressão de enzimas COX-2, assim como na sua previamente relatada capacidade de alfa-amirina diminuir os níveis de IL-1 β em peles de camundongos após a aplicação de TPA (Medeiros et al, 2007).

MAPKs e PKC são importantes componentes da cascata de transdução sinalizada celular. Elas estão diretamente envolvidas em muitas doenças, incluindo câncer e inflamação, e deve se tornar em um dos mais importantes alvos de classes para o desenvolvimento de drogas. Deste modo, o tratamento tópico com alfa-amirina inibe a ativação de p38MAPK, ERK e PKC α em indução por TPA, nas mesmas doses necessárias para prevenir a degradação de I κ B α e a fosforilação de p65/RelA após aplicação de TPA. Vários estudos têm indicado que a participação destas proteínas quinases na regulação da expressão dos genes inflamatórios, agem em ambos os níveis, transcricional e pós-transcricional. MAPKs e PKC estão implicados na *up-regulation* da expressão de COX-2 por TPA, através de mecanismos dependentes da ativação de NF κ B. Da mesma forma, a ativação destas proteínas quinases tem sido implicadas na regulação das meias-vidas de muitos RNAs de mediadores inflamatórios, incluindo COX-2, TNF α e IL-1 β . Neste contexto, a alfa-amirina regula a ativação de p38 MAPK, ERK, e PKC α que pode diminuir a expressão de COX-2 por redução de atividade dos fatores transcricional (ex. NF- κ B), ou até por diminuir a estabilidade do RNAm da COX-2 (Medeiros et al, 2007).

Em um recente estudo, foi avaliado o potencial antiinflamatório dos triterpenos alfa e beta amirina na fase aguda da periodontite em ratos. Os ratos foram pré-tratados com as doses de 5 e 10 mg/kg, via oral, antes da indução da inflamação periodontal. Para controle positivo foi utilizado os antiinflamatórios lumiracoxib e a dexametasona. Foram analisados os níveis de TNF α no plasma e após o sacrifício dos ratos, o tecido gengival foi analisado para verificar o influxo de neutrófilos e a peroxidação lipídica. Os resultados mostraram que assim como a dexametasona, a alfa e beta-amirina inibiu a periodontite associada ao aumento de TNF α . Os efeitos foram mais pronunciados na dose de 5 mg/kg. Este estudo mostrou que a alfa e beta amirina retarda a inflamação aguda da periodontite (Pinto et al, 2007).

1.3.6 ATIVIDADE ANTIAGREGANTE PLAQUETÁRIA

Várias classes de terpenos, incluindo os triterpenos, isolados de produtos naturais são conhecidos por produzir inibição da agregação plaquetária, como visto na *Swietenia mahogani*, de onde se extrai um tetranotriterpenóide que inibe fortemente a agregação induzida por PAF, enquanto a glicirrizina, um composto antiinflamatório extraído da *Glycyrrhiza glabra*, foi identificado como um novo inibidor de trombina, sugerindo-se daí que o efeito anti-inflamatório destes compostos podem ser devido a sua ação antitrombina (Ekimoto et al, 1991; Franchischetti et al, 1997).

Alguns diterpenóides são também conhecidos por inibir a agregação plaquetária como os abietanos da *Salvia miltiorrhiza*, que seletivamente inibi a agregação de plaquetas de coelhos induzido por ácido araquidônico. Outros diterpenóides, isolados da *Annona squamosa*, mostrou um completo efeito inibitório também na agregação plaquetária de coelhos. Alfa e beta amirina, isoladas de várias plantas medicinais apresentou propriedades antinociceptiva, irritante, citotóxica, e com propriedades antiúlceras. Até então nenhum trabalho envolvendo propriedades antiagregante plaquetária da amirina havia sido descrito na literatura (Lin et al, 2001; Chaturvedulaa et al, 2002; Navarrete et al, 2002; Yang et al, 2002; Saeed and Sabir, 2003; Spessoto et al, 2003).

Em um trabalho realizado pelo laboratório de Neurofarmacologia da UFC, sob supervisão da Dra. Glauce Socorro de Barros Viana, demonstramos que a mistura de alfa e beta amirina, isolado do *P. heptaphyllum*, significativamente inibiu, de forma dose-dependente a agregação de plaquetas humanas induzidas por ADP, colágeno e ácido araquidônico. A ativação de plaquetas envolve uma série de eventos coordenados e regulados. Estes eventos levam a uma mudança conformacional no domínio extra-celular das glicoproteínas (GP)IIb-IIIa, uma integrina plaquetária, facilitando a ligação do fibrinogênio solúvel e facilitando a formação da aderência entre as plaquetas, essencial para a agregação plaquetária (Clutton et al, 2001).

A agregação plaquetária pode ser induzida através dos receptores acoplados a proteína G em resposta a agonistas como o ADP e trombina entre outros. ADP é um agonista que causa mudança na forma da plaqueta e agregação, como também formação de tromboxano A₂, que agem nos receptores P2Y₁, P2Y₁₂ e P2X₁. ADP desempenha um papel importante na hemostasia,

como um estimulante na agregação plaquetária e quando secretada dos grânulos da plaqueta densa, potencializa a resposta agregante induzida por outros agentes. A seqüência de eventos que conduz a liberação de ADP é muito complexa, após um aumento do ADP, não somente a agregação plaquetária mas também a alteração conformacional da plaqueta contribui para a chamada primeira fase da agregação a qual é reversível e não depende da liberação. A segunda fase da agregação plaquetária é irreversível e associada com a liberação de ADP, ATP e 5-HT que é responsável pela potencialização da resposta (Gottstein et al, 2003).

A AMI produz uma forte inibição na agregação plaquetária observada na presença de colágeno onde um efeito máximo foi observado com a concentração da mistura isomérica de alfa e beta amirina na dose de 150 μ M. Na presença de ADP ou colágeno a AMI produziu um efeito do tipo concentração-dependente. Entretanto em altas concentrações, um baixo efeito antiagregante foi detectado, caracterizando uma curva na forma de sino. Meei-Jen e cols (2002) mostraram que outros triterpenos, como a rubiarbonona A e o rubiarbonol A, promovem agregação plaquetária em altas concentrações, entretanto estes compostos também exibem uma alta atividade antiplaquetária em baixas concentrações, como demonstrado com a AMI. Vários tipos de colágeno presentes na região sub-endotelial, após injúria, são expostos à superfície vascular e exerce um importante papel na ativação plaquetária os quais são responsáveis pelo reparo da lesão. O colágeno monomérico assim como o colágeno fibrilar pode induzir injúria vascular, mas somente a adesão do colágeno fibrilar resulta em secreção. O colágeno é conhecido por estimular a fosforilação da tirosina protéica celular e a mobilização intracelular de cálcio. A ativação plaquetária estimulada pelo colágeno leva a vários eventos de sinalização, gerados pela interação com o receptor da glicoproteína VI. Recentes estudos sugerem que a agregação plaquetária induzida por colágeno está associada com a liberação de peróxido de hidrogênio que age como um segundo mensageiro, estimulando o metabolismo do ácido araquidônico e da fosfolipase C. Foi demonstrado também que a agregação plaquetária, associada com a liberação de peróxido de hidrogênio, contribui para a ativação da função plaquetária através da mobilização de cálcio e da ativação do inositol (Pignatelli et al, 1998; Hubbard et al, 2003; Aragão et al, 2007).

O ácido araquidônico (AA) é um potente indutor da agregação plaquetária *in vitro*, e esta atividade é devido a conversão para metabólitos biologicamente ativos, como as prostaglandinas, endoperóxidos e tromboxano A₂ (TXA₂), os quais agem em seus receptores. AA é metabolizado

pela via da ciclooxigenase e tromboxano sintase, produzindo TXA₂, um potente vasoconstrictor e que induz também a secreção e agregação. A estimulação de receptores pelo TXA₂ ativa a fosfolipase C e aumenta [Ca²⁺] via proteína Gq, levando a agregação pelo influxo de Ca²⁺. Recentemente, mostrou-se que baixas concentrações de epinefrina potencializam a agregação plaquetária mediada pelo ácido araquidônico. A AMI exerce uma inibição da agregação plaquetária na presença de ácido araquidônico como agonista da ordem de 15 a 27%, não sendo tão potente quanto a inibição observada com ADP e colágeno (Ohkubu et al, 1996; Vezza et al, 2002; Saeed et al, 2004; Aragão et al, 2007).

O efeito antiagregante plaquetário da AMI foi potencializado pelo ácido acetilsalicílico (AAS) mas não pelo dipiridamol. O AAS é um agente antiagregante plaquetário que inibe a ciclooxigenase 1 (COX₁) nas plaquetas e como consequência previne a formação de substâncias pró-agregatórias como o TXA₂. Dipyridamol tem atividade antiplaquetária direta no plasma rico em plaquetas e no sangue quando a ciclooxigenase for bloqueada pelo AAS. O dipiridamol inibe a atividade das fosfodiesterases e adenosina deaminases, aumenta o AMPc e adenosina, e conseqüentemente inibe a agregação plaquetária. Considerando que a AMI potencializa o efeito inibitório do AAS com ADP, foi sugerido que o mecanismo de ação da AMI pode envolver uma grande sensibilização para a ativação de receptores do ADP. Desta forma a AMI inibiu a agregação de plaquetas, na presença de três agonistas, sendo este feito maior com ADP e colágeno. Desta forma a AMI deve exercer atividade antiagregante plaquetária através de mecanismos comum a estes três agonistas. Um mecanismo comum em sinergia entre os vários agonistas plaquetários é através da ativação da cascata de sinalização da ativação do Ca²⁺. Um aumento na concentração de Ca²⁺ intracelular, induzido por um primeiro agonista, prepara a plaqueta para uma resposta funcional a um segundo agonista. Um efeito similar pode explicar parcialmente o mecanismo de ação da alfa e beta amirina na inibição plaquetária (Violi et al, 1991; Saeed et al, 1997; Fernandez et al, 2003; Saeed et al, 2004; Aragão et al, 2007).

1.3.7 AÇÕES NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL

O teste do nado forçado é utilizado para examinar a atividade antidepressiva. Este método é seletivamente sensível para antidepressivos clinicamente efetivos e tratamentos antidepressivos

não farmacológico, como choque eletroconvulsivo e privação do sono REM. Este método pode ser capaz de identificar novas drogas antidepressivas não identificadas pelos testes clássicos, pois antidepressivos atípicos como o iprindol e mianserina, não são detectados nos testes clássicos, mas demonstrou resultado positivo no teste do nado forçado. No teste do nado forçado, o palmitato de beta-amirina, assim como a mianserina e imipramina, diminuíram a duração da imobilidade dos camundongos significativamente durante os 5 minutos de duração do teste, sugerindo que o palmitato de beta-amirina pode ter atividade antidepressiva. Os resultados do estudo do palmitato de beta-amirina no teste do nado forçado levaram a avaliação dos efeitos farmacológicos no sistema nervoso central, nos quais alguns testes são comuns para testar drogas antidepressivas. Na avaliação da atividade locomotora, palmitato de beta-amirina e mianserina, respectivamente, significativamente diminuiu a atividade locomotora e antagonizou a hiperatividade induzida por metanfetamina. O aumento da atividade locomotora induzido por drogas estimulantes psicomotoras como a metanfetamina é mediada pelos sistemas dopaminérgicos e noradrenérgicos e a estereotipia é mediada pelo sistema dopaminérgico. Assim o antagonismo da estimulação locomotora induzida por metanfetamina pelo palmitato de beta-amirina é devido a ação inibitória direta ou indireta nos neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos. Neste estudo o palmitato de beta-amirina não teve efeito na estereotipia induzida por apomorfina e catalepsia induzida por haloperidol conhecido como agente bloqueador dopaminérgico. Isto sugere que a ação do palmitato de beta-amirina pode não estar relacionada a um efeito direto nos receptores dopaminérgicos (Subarnas et al, 1993c).

O palmitato de beta amirina diminui o tempo de imobilidade em camundongos, sugerindo que este composto possui atividade antidepressiva. O palmitato de beta-amirina reduz o aumento do tempo de imobilidade em camundongos tratados com tetrabenazina. Este efeito antagonista do palmitato de beta-amirina na duração da imobilidade induzida por tetrabenazina foi associado a atividade antidepressiva do palmitato de beta-amirina. Outros experimentos, entretanto foram utilizados combinando o palmitato de beta-amirina com outras drogas, no modelo do nado forçado. Os derivados benzoquinolizínicos como a tetrabenazina depleta o cérebro de serotonina e norepinefrina em camundongos e coelhos e produzem efeitos centrais similares aos da reserpina. Tetrabenazina depleta norepinefrina do cérebro, mas libera somente parte da serotonina do cérebro. Os estudos bioquímicos com tetrabenazina relacionado à concentração de serotonina e norepinefrina mostraram que 24 horas após a administração da tetrabenazina na dose de 50

mg/kg, o conteúdo de serotonina do cérebro praticamente voltou a níveis normais, mas o conteúdo de norepinefrina retornou somente a 75% dos valores normais. Foi comprovado também que o conteúdo de norepinefrina no cérebro está acentuadamente diminuído 24 horas após a injeção de tetrabenazina na dose de 100 mg/kg, mas em contraste, os níveis de serotonina retornam a valores da normalidade. A diminuição de norepinefrina no cérebro causada por tetrabenazina é geralmente reconhecida devido a depleção de catecolaminas dos *pools* de estoque. A partir destas evidências foi concluído que o aumento na duração da imobilidade de camundongos 24 horas após a administração da tetrabenazina pode ser devido à diminuição dos níveis de norepinefrina no cérebro. Esta suposição é baseada na descoberta que a imobilidade é sensível a drogas que aumentam a atividade dos neurônios catecolaminérgicos centrais e a redução da imobilidade é causada por mecanismos catecolaminérgicos e não serotoninérgicos (Subarnas, 1992c).

O efeito antagonista do palmitato de beta-amirina na estimulação locomotora induzida por metanfetamina leva a sugerir que este composto pode bloquear os receptores de dopamina ou α_1 -adrenérgicos. Esta conclusão é baseada em estudos prévios mostrando que o efeito da anfetamina na atividade locomotora é antagonizado por um antagonista não-seletivo do receptor de dopamina, o pimozide e também pelo prazosin, um antagonista seletivo α_1 -adrenérgico. A clonidina, agonista α -adrenérgico, diminui a atividade locomotora de camundongos. Esta ação inibitória da clonidina não foi significativamente potencializada pelo palmitato de beta-amirina, sugerindo que o palmitato de beta-amirina pode não estimular os receptores α_2 -adrenérgicos. Esta suposição é baseada na evidência que a redução da atividade locomotora provocada pela clonidina é devido a estimulação dos receptores centrais α_2 -adrenérgicos. Todavia, a ioimbina conhecida como um antagonista α_2 -adrenérgico seletivo não afetou a diminuição na atividade locomotora provocada pelo palmitato de beta-amirina, indicando que a ação inibitória do palmitato de beta-amirina pode não ser devido a estimulação dos receptores α_2 -adrenérgicos. Utilizando a fenilefrina, o palmitato de beta-amirina significativamente antagonizou o efeito da fenilefrina, isto sugere que o palmitato de beta-amirina bloqueia os receptores α_1 -adrenérgicos, pois a estimulação locomotora induzida por fenilefrina é causada pela estimulação dos receptores α_1 -adrenérgicos (Subarnas et al, 1993b).

A potenciação da hipoatividade induzida por palmitato de beta-amirina pelo prazosin pode indicar que a ação inibitória do palmitato de beta-amirina pode estar relacionada com os

receptores α_1 -adrenérgicos. Com a utilização de um agonista do receptor de dopamina, o palmitato de beta-amirina não afetou na estimulação locomotora produzida pela apomorfina, isto indica que o palmitato de beta-amirina pode não ter efeito nos receptores dopaminérgicos D_1 e D_2 , pois os efeitos comportamentais da apomorfina são devido à estimulação dos receptores dopaminérgicos D_1 e D_2 . Desta forma chegou-se a conclusão que os efeitos inibitórios do palmitato de beta-amirina na atividade locomotora de camundongos, pode ser devido a ações inibitórias nos receptores α_1 -adrenérgicos (Subarnas et al, 1993b).

A ausência de efeito do palmitato de beta-amirina na estereotipia e catalepsia pode também sugerir que este composto é desprovido de propriedades anticolinérgicas como drogas anticolinérgicas que são conhecidas por antagonizar a catalepsia induzida por drogas neurolépticas e potencializar a estereotipia induzida por apomorfina e anfetamina. Este composto não apresentou nenhum efeito na hipotermia induzida por reserpina e na ptose induzida por tetrabenazina, o que também sugere que palmitato de beta-amirina pode não possuir efeitos anticolinérgicos. No teste do *head-twitch* induzido por 5-HTP, o palmitato de beta-amirina não afetou a resposta do *head-twitch*, indicando que este composto não possui efeito nos receptores 5-HT₂ nos neurônios 5-hidroxitriptaminérgicos. A mianserina, conhecido como um antagonista da 5-hidroxitriptamina, causou redução no número de *head-twitch* como já reportado por outros autores. Desta forma, foi concluído que os efeitos centrais do palmitato de beta-amirina foi completamente diferente daqueles apresentados pela imipramina, mas foi similar em alguns aspectos a mianserina. Este produto possui propriedades sedativas. A ausência de efeitos do palmitato de beta-amirina em vários testes classicamente utilizados para a pesquisa de drogas antidepressivas, sugere que este composto pode ter atividade antidepressiva com ação semelhante a mianserina (Subarnas et al, 1993a).

Os triterpenos alfa- e beta amirina já foram bastante estudados, principalmente nos últimos anos por pesquisadores brasileiros, destacando-se várias atividades farmacológicas, mas nenhum trabalho foi realizado até então em nível de sistema nervoso central. Os poucos trabalhos existentes e publicados mostrando efeitos no sistema nervoso central foram realizados utilizando um éster da amirina, o palmitato de amirina, como mostrado anteriormente. Assim, com a mistura triterpênica de alfa- e beta-amirina e com seus derivados acetilados foi objeto deste trabalho realizar um estudo detalhado sobre as ações destes triterpenos no SNC com ênfase nos efeitos sedativos, ansiolíticos, antidepressivos e anticonvulsivante.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Doenças relacionadas ao Sistema Nervoso Central tem-se mostrado cada vez mais comuns em meio à sociedade em que vivemos: ansiedade e depressão hoje estão entre as doenças mais comuns da humanidade.

Baseados em informações populares do uso de partes da planta *Protium heptaphyllum* como calmante (Correia, 1984) e ainda baseado em estudos anteriores que demonstram atividade no sistema nervoso central da amirina e de alguns de seus ésteres é que objetivamos avaliar efeitos farmacológicos centrais da mistura isomérica de alfa e beta amirina extraída da resina do *Protium heptaphyllum* onde as atividades ansiolíticas, antidepressivas, anticonvulsivantes pudessem ser investigadas utilizando vários modelos em camundongos.

A atividade farmacológica do acetato de amirina também foi alvo deste estudo onde foram avaliados seus efeitos em nível de Sistema Nervoso Central.

2.2 Específicos

- Investigar as atividades neurofarmacológica da AMI: Atividade ansiolítica, atividade sedativa e atividade antidepressiva propondo um mecanismo de ação para cada um destes efeitos, utilizando modelos farmacológicos adequados e a utilização de drogas com mecanismos de ação já estabelecidos.

- Avaliar a atividade anticonvulsivante da AMI utilizando vários modelos experimentais em camundongos e procurando esclarecer e propor mecanismo pelo qual este efeito acontece utilizando drogas cujo mecanismo de ação já estejam estabelecidos.

- Fazer um estudo neurofarmacológico do acetato de alfa e beta amirina (AcAMI), em protocolo agudo e sub-crônico e com duas vias de administração com ênfase para os efeitos sedativos, ansiolíticos e anticonvulsivante.

- Determinar através de HPLC as concentrações de aminoácidos e monoaminas de áreas cerebrais de camundongos tratados com alfa e beta amirina (AMI) e com o acetato de alfa e beta amirina (AcAMI), procurando fazer uma correlação com seus efeitos centrais.

3. MATERIAL

3.1 Planta

A planta (*Protium heptaphyllum*) foi coletada no mês de setembro de 1999, na cidade do Crato, no estado do Ceará, Brasil. Identificada pelo Prof. A. G. Fernandes e E. Nunes do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, encontrando-se depositada no herbário Prisco Bezerra e catalogada como exsicata de número 28509. A parte da planta utilizada para extração da alfa e beta amirina foi a resina e conseqüentemente a alfa e beta amirina foi utilizada para preparação do acetato de alfa e beta amirina.

3.2 Animais

Camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss, sexo masculino, adulto, pesando entre 20 a 30 g, foram oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os animais foram mantidos em caixas plásticas fechadas em cima com telas de ferro mantidos a uma temperatura média de 24°C, com comida e água sendo oferecida a vontade. Os testes farmacológicos foram realizados sempre no período matinal. Os experimentos foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFC e executados de acordo com o guia de usos e cuidados de animais de laboratório, do *US Department of Health and Human Services, Institute of Laboratory Animal Resources*, Washington DC, 1985.

3.3 Reagentes, soluções e outros

2-Mercaptoetanol – (Sigma, U.S.A.); 5-HIAA – (Sigma, U.S.A.); 5-HT – (Sigma, U.S.A.); Ácido cítrico - (Vetec, Brasil); Ácido Clorídrico - (Vetec, Brasil); Ácido Perclórico (NaH₂PO₄) - (Vetec, Brasil); Água MiliQ; Aspartato – (Sigma, U.S.A.); Bórax - (Vetec, Brasil); Cloreto de Sódio – (Nuclear, Brasil); Cloridrato de Pilocarpina – (Sigma, U.S.A.); Diazepam

ampola – (Cristália, Brasil); DOPAC – (Sigma, U.S.A.); Dopamina – (Sigma, U.S.A.); EDTA - (Vetec, Brasil); Estaurosporina – (Sigma, U.S.A.); Estricnina – (Sigma, U.S.A.); Etanol - (Vetec, Brasil); GABA – (Sigma, U.S.A.); Glicina – (Sigma, U.S.A.); Glutamato – (Sigma, U.S.A.); Hidróxido de sódio - (Vetec, Brasil); Hidróxido de Sódio - (Vetec, Brasil); HVA – (Sigma, U.S.A.); Imipramina – (Novartis, Brasil); Metanol – (Sigma, U.S.A.); Noradrenalina – (Sigma, U.S.A.); O-phtaldialdehyde – (Sigma, U.S.A.); Paroxetina – (Eurofarma, Brasil); Pentilenotetrazol – (Sigma, U.S.A.); Pentobarbital – (Sigma, U.S.A.); Polimixina B 500.000 units – Bedford Labs (Bedford, EUA); Reserpina – (Sigma, U.S.A.); Taurina – (Sigma, U.S.A.); Tirosina – (Sigma, U.S.A.); Triptofano – (Sigma, U.S.A.) e Tween 80 – (Vetec, Brasil)

3.4 Equipamentos

- Agitador de tubos, modelo 251, FANEN, SP, Brasil.
- Balança analítica – *Metler* (Suíça)
- Balança analítica, modelo H5, Mettler, Suíça.
- Balança para animais – Filizola ID-1500 – (Brasil)
- Banho de água agitador – modelo G76 – *New Brunswick Scientific* (U.S.A.)
- Banho Maria, modelo 102/1, FANEN, SP, Brasil.
- Campo Aberto para camundongos
- Centrífuga refrigerada – modelo 215 – *Fanem* (Brasil)
- Centrífuga refrigerada, modelo Marathon 26 KMR, Fisher Scientific.
- Equipamento de HPLC – Cromatografia Líquida da Alta Performance – Detector de fluorescência e eletroquímico (Shimadzu, Japão) constando de bomba de HPLC (LC-10AD), Shimadzu Corp Japão; coluna para catecolaminas (modelo C 18,5 μ m, 250 x 4,6 mm, Shimadzu, Japão); pré-coluna (CLC G-ODS, 4 mm D x 1 cm, Shimadzu, Japão); detector eletroquímico (Modelo L-ECD-6A; Shimadzu, Japão) e Eletrodo de Carbono (Shimadzu); detector de fluorescência (Modelo LE; Shimadzu, Japão); degaseificador (DGU-ZA, Shimadzu, Japão); integrador (C-RGA Chromatopac, Shimadzu, Japão);
- Equipamento para filtração a vácuo (Millipore Apparatus, Bedford, MA, EUA)
- Estufa para secagem, modelo 315 SE FANEM, SP, Brasil.

- Filtros de fibra de vidro GF/B Whatman, Maidstone, England.
- Frascos de vidro para contagem de cintilação, Vials Beckman, Fullerton, CA, USA.
- Freezer -75°C (Modelo ULT 2586 – 3D14, Revco Scientific, Inc. Asheville, N.C., EUA).
- Freezer, modelo ULT 2586-3D14, Revco Scientific, Inc. Asheville, N.C., USA.
- Guilhotina, Harvard, USA.
- Homogeinizadores manuais, Bellico, USA.
- Injetor (Shimadzu Corp., Japão)
- Labirinto em cruz elevado para camundonogs
- Material cirúrgicos
- Medidor de pH, modelo B374 Micronal, SP, Brasil.
- Micropipetas, H.E., Pedersen, Dinamarca.
- Rota rod
- Sonicador (Modelo PT 10-35. Brinkmann Instruments Inc. NY, EUA).
- Unidade Eletrônica (caixa de atividade) – Cat. 7401 (Ugo Basile, Itália)

4. MÉTODOS

4.1 Obtenção da resina do *Protium heptaphyllum*

A resina foi obtida após serem feitas incisões no caule da planta, o que fez com que após alguns dias a planta fosse naturalmente produzindo a resina. Esta foi, então, retirada em quantidade equivalente a 20 g de resina bruta.

4.2 Obtenção da alfa e beta amirina através da resina

A mistura isomérica de alfa e beta amirina (AMI) foi obtida pelo Laboratório de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC), sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Telma Leda Gomes de Lemos, a partir de 20 g de resina fresca. A resina foi então adsorvida em sílica gel e acondicionada em uma coluna contendo sílica gel. A eluição foi feita com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol puro. O eluato clorofórmico, com rendimento de 5,2 g, apresentou-se como um sólido de cor amarelo-claro. Este sólido foi adsorvido em sílica gel e empacotado em coluna contendo sílica gel, após eluição com hexano puro e mistura binária de hexano/acetato de etila, as frações 46 – 48 foram reunidas após análise por cromatografia em camada delgada de sílica gel, fornecendo 450 mg da mistura isomérica de alfa e beta amirina, que foi identificada por espectrofotometria de infravermelho (KBr) ν_{\max} cm^{-1} (3300, 1480 e 1050) e NMR ^1H (500 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) e ponto de fusão entre 179-181°C, de acordo com a literatura (Mahato and Kundu, 1994).

4.3 Acetilação da alfa e beta amirina

A mistura de alfa e beta amirina foi acetilada utilizando procedimento já determinado e conhecido, desta forma 100 mg (0,23 mol) foi tratada com a mistura de Ac_2O /piridina (2:1) na temperatura ambiente por 24h. O produto desta reação foi lavado com uma solução de sulfato de

cobre, 10 mL e extraída duas vezes com (20 mL) de éter etílico. A fase orgânica foi evaporada sob pressão até fornecer (98,6mg, 86%); mp. 192 – 193,5 °C; IR (KBr) ν_{\max} 2949, 1735, 1654, 1370, 1247, 1025. ^{13}C NMR: C-1 (38.4); C-2 (26.6); C-3 (80.9); C-4 (37.7); C-5 (55.2); C-6 (18.2); C-7 (32.8); C-8 (40.0); C-9 (47.5); C-10 (36.8); C-11 (23.6); C-12 (124.3); C-13 (139.6/145.2); C-14 (42.0); C-15 (28.0); C-16 (26.6); C-17 (33.7); C-18 (59.0/47.1); C-19 (39.6/46.8); C-20 (39.6/31.0); C-21 (31.2); C-22 (41.5/37.3); C-23 (28.0); C-24 (15.5); C-25 (15.7); C-26 (16.8); C-27 (23.2); C-28 (28.3); C-29 (17.5/33.3); C-30 (21.2): C=O (170.9) e COCH_3 (38.4). EM: 468, 409, 218, 203, 189. (Matsunaga et al, 1998; Vigar et al, 2002).

4.4 Preparação das amostras e doses utilizadas

As misturas isoméricas de alfa e beta amirina (AMI) e do acetato de alfa e beta amirina (AcAMI) são pós, branco, amorfo, apresentando um leve odor, com baixa solubilidade aquosa, mas solúvel em solventes orgânicos. As misturas foram suspensas com Tween 80 à 0,5% e sonicadas antes do uso e o pH medido foi 6,0. As doses utilizadas variaram dependendo do teste de 2,5 a 50 mg/kg, por vias intraperitoneal e oral.

4.5 Preparação das soluções reagentes para o HPLC

4.5.1 Fase Móvel A para detecção fluorimétrica de aminoácidos em HPLC

Foram utilizados 50 mM de ácido perclórico em 20% de metanol (v/v), ajustado para um pH de 5,5 no volume final de 250 mL.

4.5.2 Fase Móvel B para detecção fluorimétrica de aminoácidos em HPLC

Foi utilizado metanol puro grau HPLC.

4.5.3 Preparo do Reagente de Derivatização

Foram pesados 6,75 mg de *O-Phthaldialdehyde* (OPA) e adicionada em 125 μ L de etanol 99% e em 5 μ L de 2-mercaptoetanol e adicionado em seguida 1,125 mL de tampão borato. Todo este procedimento foi realizado em capela com exaustor. Esta solução de derivatização foi deixada por 24 horas em repouso e em uma temperatura em torno de 20°C. Após este período, a solução foi utilizada no máximo por duas semanas, e após a primeira semana foi adicionado 5 μ L de 2-mercaptoetanol.

O tampão borato foi feito com 1,24 g de bórax em água miliQ num volume final de 50 mL e ajustado o pH para 9,3 com hidróxido de sódio.

4.5.4 Preparo dos padrões dos aminoácidos

Todos os aminoácidos foram preparados na concentração de 2,5 mmol/L ou 2,5 mM. Glutamato, aspartato, glicina, triptofano, taurina, GABA e tirosina foram solubilizados em ácido perclórico 0,1M.

O ácido perclórico foi preparado adicionando 1,8 mL do ácido e completado o volume para 300 mL com água mili-Q.

4.5.5 Fase Móvel para doseamento de monoaminas por HPLC

Ácido cítrico (7,85 g) e cloreto de sódio (146 mg) foram diluídos para um volume final de 200 mL em água miliQ, em seguida o pH foi ajustado com hidróxido de sódio 12,5 M para 3, depois foi colocado 35 mg de SOS e elevado o volume com água miliQ para 235 mL, onde a solução foi filtrada e degaseificada e adicionada então 10 mL de acetonitrila (ACN) e 5 mL de tetrahydrofurano (THF), para um volume final de 250 mL.

4.5.6 Padrões para monoaminas e metabólitos

Solução A. Foram pesados entre 2 a 3 mg de cada uma das substâncias (Noradrenalina, Serotonina, Dopamina, DOPAC, 5-HIAA e HVA) e acrescentada o dobro do peso em volume de ácido perclórico 0,1M (PCA).

Solução B. Foram medidos 50 µL da Solução A e completado para um volume de 10 mL com PCA.

Solução C. Da Solução B foram retirados 50 µL e o volume completado para 1250 mL com PCA.

O ácido perclórico foi preparado adicionando 1,8 mL do ácido e completado o volume para 300 mL com água mili-Q.

ESTUDOS BIOQUÍMICOS

4.5.7 Método de utilização do HPLC

Para determinação dos níveis de catecolaminas e aminoácidos, foi utilizado o equipamento de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). Na cromatografia líquida clássica, um adsorvente (alumina ou sílica) é empacotado em uma coluna e é eluído por um líquido ideal (fase móvel). Uma mistura para ser separada é introduzida na coluna, e é carregada através da mesma por líquido eluente. Se um composto da mistura (soluto) é adsorvido fracamente pela superfície da fase sólida estacionária, ele atravessará a coluna mais rapidamente que um outro soluto que seja mais rapidamente adsorvido. Então, a separação dos solutos é possível se existem diferenças na adsorção pelo sólido. Os detectores eletroquímicos pedem a condutância de eluente, ou a corrente associada com a oxidação ou redução dos solutos. Para ser capaz de detectar, no primeiro caso os solutos devem ser iônicos, e no segundo caso os solutos devem ter a característica de serem relativamente fáceis de se oxidarem ou reduzirem.

Detectores eletroquímicos que medem corrente associada com a redução ou oxidação de soluto são chamados detectores amperométricos ou colorimétricos. Neste estudo, foi utilizado o

tipo amperométrico que reage com uma quantidade muito menor de soluto, em torno de 1 %. Todas as técnicas eletroquímicas envolvem a aplicação de um potencial para um eletrodo (geralmente de carbono vítreo), oxidação da substância que está sendo estudada próximo à superfície do eletrodo, seguindo a amplificação e medida da corrente produzida. As catecolaminas são oxidadas nos grupos de anel hidroxil para conduzir em derivado ortoquinona com a liberação de dois elétrons.

Para análise das monoaminas

Uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 25 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro da partícula de 3µm, da Shimadzu-Japão, foi utilizada. A fase móvel utilizada foi composta por tampão ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico, 0,69 M (SOS), como reagente formador do par iônico, acetronitrila 4% v/v e tetrahidrofurano 1,7% v/v. Dopamina (DA), ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) e noradrenalina (NE) foram eletronicamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6^A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85 V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl.

Para determinação dos níveis de aminoácidos, foi utilizado o equipamento de HPLC com detector de fluorescência. A espectroscopia de fluorescência pode ser usada como um método de detecção específica, e é um dos mais sensíveis para compostos que fluorescem. Fluorescência pode ser desenvolvida em compostos não fluorescentes por reações de derivatização realizadas pré ou pós-coluna.

Para a análise dos aminoácidos

Uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 15 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro de partícula de 3 µm. da Shimadzu-Japão, foi utilizada. A fase móvel foi utilizada em gradiente utilizando duas fases: A- NaH₂PO₄ (50 mM) e metanol (20% v/v), em pH 5,5; B- metanol puro (100 %). Aspartato (ASP), Glutamato (GLU), Tirosina (TIR), Taurina (TAU), Glicina (GLI) e GABA foram detectados usando um detector de fluorescência (Modelo RF-535 da Shimadzu,

Japão) com comprimento de ondas de EX-Wavelength (370 nm) e EM-Wavelength (450 nm). Os cromatogramas foram registrados e quantificados por um computador usando um software da Shimadzu. A quantidade dos aminoácidos foi calculada por comparação da altura dos picos obtidos com a média dos padrões e os resultados foram expressos em $\mu\text{g/g}$ de tecido.

ESTUDOS FARMACOLÓGICOS

4.6 Avaliação da Atividade sedativa, ansiolítica e antidepressiva da AMI

4.6.1 Avaliação da coordenação motora no teste do *rota rod*

Camundongos Swiss machos de 20 a 30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, foram utilizados para determinar a atividade da AMI a nível de SNC, conforme descrito abaixo.

Para avaliar a coordenação motora dos animais após a administração da AMI foi utilizado o teste do *rota rod*, onde os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra de 2,5 cm de diâmetro, elevado a 25 cm do piso, em uma rotação de 12 RPM. Os animais foram selecionados em sessões de 1 min de duração, antes da administração das drogas ou veículo (controle), sendo escolhidos aqueles que permaneceram na barra giratória por este período. Os animais selecionados receberam o tratamento, no dia do teste e foram colocados no *rota rod*, por 1 min. Foi registrado o tempo de permanência na barra giratória (em segundos) e o número de quedas, com três reconduções, no máximo (Dunham and Miya, 1957). Este teste permite avaliar se os tratamentos promovem incordenação motora nos animais por sedação e/ou relaxamento muscular. A AMI nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg, via i.p., foram administradas 30 minutos antes de iniciar o experimento, Tween 80 a 0,5% foi utilizado como controle e o diazepam 1 mg/kg, i.p. foi utilizado como controle positivo no volume de 10 mL/kg. A análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Dunnet* para comparações múltiplas.

4.6.2 Avaliação do tempo de sono induzido por pentobarbital

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, 20 a 30 g, que foram divididos em grupos de 10 a 13 animais identificados como controle (receberam Tween 80 a 0,5%) e tratados (receberam AMI 10 e 25 mg/kg) e aguardado um tempo de 30 minutos e 1 hora, respectivamente para os tratados por via intraperitoneal e via oral. A seguir foi aplicado o pentobarbital sódico (40 mg/kg) por via intraperitoneal, seguindo o método de Ferrine (1974). Iniciado o período de sono, em seus respectivos grupos, os animais foram posicionados em decúbito dorsal em local de adequada observação. Os animais foram observados quanto ao tempo de sono. O período total de observação foi de no máximo 120 minutos. A análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Tukey* para comparações múltiplas.

4.6.3 Determinação da atividade sedativa da AMI no teste do campo aberto em camundongos em modelo sub-crônico

Camundongos Swiss machos de 20 a 30 g, divididos em grupos que variaram de 9 a 15 animais cada, foram utilizados para determinar a atividade da AMI em nível de SNC, conforme descrito abaixo.

Este teste foi feito em uma caixa de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) dividido em 16 quadrantes iguais, sendo utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal, semelhante a **Figura 5** (Archer, 1973). Os principais parâmetros para observação foram: número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea), número de comportamentos de autolimpeza *grooming*, número de levantamentos *rearing*, registrados durante um tempo de 3 minutos, após 1 minuto de habituação. O Teste foi realizado tratando-se os animais todos os dias durante um período de 1 semana, sempre no mesmo horário, no caso a AMI nas doses de 10 e 25 mg/kg, i.p., utilizando-se a solução de Tween 80 0,5% como controle. A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pelo ambiente novo. A análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Dunnet* para comparações múltiplas.

4.6.4 Determinação da atividade sedativa da AMI no teste do campo aberto em camundongos em modelo agudo

Camundongos Swiss machos de 20 a 30 g, divididos em grupos de 8 animais cada, foram utilizados para determinar a atividade da AMI em nível de SNC, conforme descrito abaixo.

Este teste foi feito em uma caixa de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) dividido em 16 quadrantes iguais, sendo utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal, semelhante a **Figura 5** (Archer, 1973). Os principais parâmetros para observação foram: número de cruzamentos com as quatro patas (movimentação espontânea), número de comportamentos de autolimpeza *grooming*, número de levantamentos *rearing*, registrados durante um tempo de 3 minutos, após 1 minuto de habituação. O Teste foi realizado 30 minutos após o tratamento com a droga em estudo, no caso a AMI nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg, i.p., utilizando-se a solução de Tween 80 0,5% como controle e diazepam 1 mg/kg, i.p. como controle positivo. A tendência natural do animal em um ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pelo ambiente novo. A análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Dunnet* para comparações múltiplas.

4.6.5 Avaliação do envolvimento GABAérgico no efeito sedativo da AMI

Uma provável interação existente entre a AMI e o flumazenil, um antagonista competitivo dos benzodiazepínicos, foi verificado utilizando o modelo do campo aberto, conforme descrito no item anterior, em tratamento agudo por via intraperitoneal em camundongos. Os animais utilizados foram camundongos Swiss machos com peso de 20 a 30 g e separado em grupo que variaram de 6 a 13 animais por grupo. Os grupos foram selecionados da seguinte forma: Controle (Tween 80 a 0,5%), AMI 10, AMI 25, Diazepam (DZP) 1mg/kg, Flumazenil 2,5 mg/kg (FLU), DZP+FLU, AMI10+FLU e AMI25+FLU. Todos os grupos foram tratados por via intraperitoneal e 30 minutos depois os animais foram colocados na arena. Os animais tratados com flumazenil receberam 15 minutos depois da AMI. A análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Dunnet* para comparações múltiplas.

4.6.6 Determinação da atividade ansiolítica da AMI no Teste do Labirinto em Cruz elevado (Plus Maze) em camundongos em modelo sub-crônico

Um dos métodos para medir a ansiedade mais utilizado e aceito pela comunidade científica é o labirinto em cruz elevado ou plus maze (Treit, 1985; Anseloni, 1995; Rodgers, 1994; Zangrossi Jr, 1997). Este modelo consiste na utilização de um aparelho composto de dois braços adjacentes abertos e outros dois fechados, conectados por uma plataforma central de 10 cm x 10 cm e dispostos a 50 cm do solo. Os braços abertos e fechados apresentam medidas de 50 cm x 10 cm x 40 cm, medidas estas relacionadas respectivamente ao comprimento, largura e altura (**Figura 5**). Neste modelo, os roedores evitam os braços abertos do labirinto, restringindo a maioria de suas atividades aos braços fechados. Uma atividade relativamente baixa nos braços abertos é indicativa de ansiedade. Em contrapartida, roedores submetidos ao tratamento com ansiolíticos cruzam mais vezes pelos braços abertos e permanecem mais tempo nestes braços quando comparados aos animais controles (Zangrossi Jr, 1997).

Inicialmente todos os camundongos foram tratados durante o período de 1 semana, sempre no mesmo horário, no último dia os camundongos foram tratados e 30 minutos após a administração do respectivo tratamento cada animal foi colocado na plataforma central do labirinto em cruz elevado, com o focinho direcionado para um dos braços fechados. Durante 5 minutos foi avaliado o número de entradas nos braços abertos e fechados, além do tempo de permanência nos respectivos braços. Todo teste foi realizado em uma sala fechada, com temperatura e umidade controlada (23 ± 1 °C), iluminação de pouca intensidade (lâmpada vermelha de 15 W) e ruídos atenuados.

Para o experimento foram utilizados camundongos machos Swiss pesando entre 20 a 30 g, e separado por grupos que variavam de 5 a 10 animais. A AMI foi usada nas concentrações de 10 e 25 mg/kg, Tween 80 a 0,5% como controle e Diazepam 1 mg/kg como controle positivo, todos foram administrados por via intraperitoneal no volume de 10 mL/kg. A análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Dunnet* para comparações múltiplas.



Figura 5 - Fotografias do labirinto em cruz elevado e do campo aberto, instrumentos utilizados para a avaliação da ansiedade experimental em rato e camundongos.

4.6.7 Determinação da atividade ansiolítica da AMI no Teste do Labirinto em Cruz elevado (Plus Maze) em camundongos em modelo agudo

Foram utilizados para a realização deste experimento camundongos Swiss, machos, de 20 a 30 g de peso. Os grupos foram separados em número de 8 a 10 animais por grupo. Uma hora após a administração da droga cada animal foi colocado na plataforma central do labirinto em cruz elevado, com o focinho direcionado para um dos braços fechados. Durante 5 minutos foi avaliado o número de entradas nos braços abertos e fechados, além do tempo de permanência nos respectivos braços (metodologia conforme descrita no item anterior). Todo teste foi realizado em uma sala fechada, com temperatura e umidade controlada (23 ± 1 °C), iluminação de pouca intensidade (lâmpada vermelha de 15 W) e ruídos atenuados.

A AMI foi usada nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg, Tween 80 a 0,5% como controle e Diazepam 1 mg/kg como controle positivo, todos foram administrados por via oral no volume de 10 mL/kg. A análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Dunnet* para comparações múltiplas.

4.6.8 Avaliação do envolvimento GABAérgico no efeito ansiolítico da AMI

O provável sinergismo existente entre a AMI e o flumazenil também foi verificado utilizando o modelo do plus maze, conforme descrito no item 4.6.6, em tratamento agudo por via intraperitoneal em camundongos. Os animais utilizados foram camundongos Swiss machos com peso de 20 a 30 g e separados em grupos que variaram de 5 a 12 animais por grupo. Os grupos foram selecionados da seguinte forma: Controle (Tween 80 a 0,5%), AMI 10, AMI 25, Diazepam (DZP) 1mg/kg, Flumazenil 2,5 mg/kg (FLU), DZP+FLU, AMI10+FLU e AMI25+FLU. Todos os grupos foram tratados por via intraperitoneal. A análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Dunnet* para comparações múltiplas.

4.6.9 Determinação da Atividade Antidepressiva da AMI em camundongos

Este modelo baseia-se no fato que, o roedor, ao ser colocado em uma cube de acrílico com água, apresenta um comportamento desesperado, caracterizado como desespero comportamental. Neste modelo, os roedores são forçados a nadar por cinco minutos em um ambiente sem saída. De princípio o animal apresenta comportamento de fuga e luta, nadando e buscando uma saída deste ambiente. Quando percebe que seu esforço está sendo em vão, o animal, então, apresenta um comportamento de conformismo, tentando se adaptar a esta nova situação aversiva. Neste momento, o animal apresenta uma postura típica de imobilidade, realizando movimentos mínimos necessários para não se afogar. Os usos de drogas que causam depressão, como a reserpina, aumentam o comportamento de conformismo, e, portanto, o tempo em que o animal apresenta-se imóvel no teste. Já as drogas que apresentam efeitos antidepressivos, exacerbam o comportamento de fuga e luta, e desta forma, diminuem o tempo em que o animal apresenta-se imóvel. Também foi constatado que o tempo de imobilização do animal durante o teste está diretamente relacionado com a eficácia clínica das drogas antidepressivas. Isto é, quanto menor o tempo de imobilidade apresentado pelo animal, maior será a eficácia clínica da droga teste (Porsolt et al, 1977).

Os camundongos foram divididos em grupos de 9 a 13 animais tratados por via intraperitoneal (AMI 10 mg/kg, AMI 25 mg/kg, AMI 50 mg/kg) e via oral (AMI 10 mg/kg, AMI 25 mg/kg, AMI 50 mg/kg), o Tween 80 a 0,5%, como grupo controle e 0,5 e fluoxetina 30 mg/kg como controle positivo. Foram submetidos a um pré-teste (para induzir a depressão), 24 horas antes da realização do teste final. No pré-teste cada animal sem tratamento foi acondicionado, durante 15 minutos, em uma cuba de acrílico transparente de 40 cm de altura por 18 cm de diâmetro, contendo 15 cm de água. No teste final, os animais foram tratados e 30 minutos depois os tratado por via i.p e 1 hora depois os tratados via oral, novamente foram colocados em cubas, porém somente por 5 minutos. Durante estes 5 minutos foi avaliado o tempo em que o animal apresentou-se imóvel.

4.6.10 Avaliação da participação noradrenérgica no efeito antidepressivo da AMI

Camundongos Swiss, machos (20 – 30 g) divididos em grupos de 6 a 21 animais cada, foram utilizados para avaliar o efeito sinérgico entre a AMI e as drogas imipramina e reserpina no modelo do nado forçado, segundo o método de Porsolt et al, 1977, conforme descrito anteriormente.

Os grupos de animais tratados foram os seguintes:

Controle; AMI 1 mg/kg; AMI 2,5 mg/kg; AMI 5 mg/kg; Imipramina 10 mg/kg; Imipramina 30 mg/kg; AMI 1 mg/kg + Imipramina 10 mg/kg; AMI 2,5 mg/kg + Imipramina 10 mg/kg; Reserpina 2mg/kg e Reserpina 2mg/kg + AMI 2,5 mg/kg.

Todas as drogas foram administradas por via intraperitoneal e após 30 minutos colocados no aparelho. A imipramina e a reserpina quando associada com a AMI foi administrada 15 minutos antes da mistura triterpênica. Como controle foi utilizado Tween 80 a 0,5%. Todas as doses foram aplicadas no volume de 10 mL/kg. A análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Dunnet* para comparações múltiplas.

4.6.11 Avaliação da participação serotoninérgica no efeito antidepressivo da AMI

Camundongos Swiss, machos (20 – 30 g) divididos em grupos de 9 a 21 animais cada, foram utilizados para avaliar o efeito sinérgico entre a AMI e a droga paroxetina no modelo do nado forçado, segundo o método de Porsolt et al, 1977, conforme descrito em 4.6.9.

Os grupos de animais tratados foram os seguintes:

Controle; AMI 5 mg/kg; Paroxetina 4 mg/kg; Paroxetina 16 mg/kg e AMI 2,5 mg/kg + Paroxetina 4 mg/kg.

Todas as drogas foram administradas por via intraperitoneal, como controle foi utilizado Tween 80 a 0,5%. A paroxetina quando associada com a AMI foi administrada 15 minutos antes da mistura triterpênica. Todas as doses foram aplicadas no volume de 10 mL/kg. A análise estatística utilizada foi a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de *Dunnet* para comparações múltiplas.

4.7 Determinação da atividade anticonvulsivante da mistura isomérica de alfa e beta amirina (AMI)

4.7.1 No modelo indução por pentilenotetrazol (PTZ) com AMI administrada por via oral

Utilizando camundongos Swiss, machos, 25 a 30 g, onde foram divididos em grupos de 6 a 10 animais identificados como controle (receberam tween 80 a 0,5%) e tratados (receberam AMI 5, 10, 25 e 50 mg/kg) e aguardado um tempo de 1 hora. A seguir foi aplicado uma solução de pentilenotetrazol no volume de 10 mg/mL, uma dose de 100 mg/kg, por via i.p., seguindo o método de Czuczwar and Frey (1986). Os animais foram imediatamente colocados em caixas escuras de maneira individual e observados os seguintes parâmetros: 1) início da primeira convulsão ou latência para o primeiro ataque e 2) tempo de morte. O período total de observação foi de no máximo 120 minutos.

4.7.2 Por indução por Pilocarpina com AMI via intraperitoneal

Utilizando camundongos Swiss, machos, 25 a 30 g, onde foram divididos em grupos de 8 a 12 animais identificados como controle (receberam tween 80 a 0,5%) e tratados (receberam AMI 10 e 25 mg/kg) e aguardado um tempo de 30 minutos. A seguir foi aplicado uma solução de cloridrato de pilocarpina na dose de 400 mg/kg, por via intraperitoneal, seguindo o método de Turski et al (1989). Os animais foram imediatamente colocados em caixas escuras de maneira individual e observados os seguintes parâmetros: 1) início da primeira convulsão e 2) tempo de morte. O período total de observação foi de no máximo 120 minutos.

4.7.3 Por indução por estricnina com AMI via intraperitoneal

Camundongos de 25 a 30 g, machos, divididos em grupos de 10 animais, foram pré-tratados com controle (Tween 80 0,5%) e AMI 10 e 50 mg/kg, por via intraperitoneal, 30 minutos

antes da administração de estriçnina 2,5 mg/kg. Imediatamente após o administração da estriçnina os animais foram colocados em caixas escuras individualmente e observados seguintes parâmetros: 1) início da primeira convulsão e 2) tempo de morte. O período total de observação foi de no máximo 120 minutos (Yemitan and Adeyemi, 2005).

4.7.4 Avaliação do envolvimento de proteína quinase no efeito anticonvulsivante da AMI utilizando polimixina B em convulsões induzidas por PTZ, via intraperitoneal

Utilizando camundongos Swiss, machos, 25 a 30 g, estes foram divididos em grupos de 7 a 22 animais identificados da seguinte forma:

Controle (receberam Tween 80 a 0,5%); AMI 5 mg/kg; AMI 10 mg/kg; AMI 25 mg/kg; AMI 50 mg/kg; Diazepam 2 mg/kg; AMI 10 mg/kg + Diazepam 2 mg/kg; Polimixina 10000 ui/kg; Polimixina 25000 ui/kg; Polimixina 25000 ui/kg + AMI 25 mg/kg e Polimixina 10000 ui/kg + AMI 10 mg/kg.

Todos foram tratados por via intraperitoneal, após 10 minutos aplicado a droga associada e aguardado o tempo de 30 minutos para em seguida ser injetada também por via intraperitoneal uma solução de pentilenotetrazol na concentração de 10 mg/mL, na dose de 100 mg/kg, seguindo o método de Czuczwar and Frey (1986). A polimixina e o diazepam associado a AMI foram administrados 10 minutos depois da mistura triterpênica. Os animais foram imediatamente colocados em caixas escuras de maneira individual e observados os seguintes parâmetros: 1) início da primeira convulsão e 2) tempo de morte. O período total de observação foi de no máximo 120 minutos.

4.7.5 Avaliação do envolvimento de Proteína Quinase C no efeito anticonvulsivante da AMI, utilizando estaurosporina, no Modelo de convulsões induzidas por PTZ, via intraperitoneal

Utilizando camundongos Swiss, machos, 25 a 30 g, estes foram divididos em grupos de 7 a 12 animais identificados desta forma:

Controle (receberam Tween 80 a 0,5%); AMI 5 mg/kg; AMI 10 mg/kg; AMI 25 mg/kg; Estaurosporina 3 µg/kg; Estaurosporina 3 µg/kg + AMI 25 mg/kg; Estaurosporina 3 µg/kg + AMI 10 mg/kg e Estaurosporina 3 µg/kg + AMI 5 mg/kg.

Dose utilizada de estaurosporina foi feita levando-se em conta levantamentos bibliográficos com outros estudos semelhantes e através de um pré-teste que utilizou as dose de 3 e 10 µg/kg, chegando-se a conclusão que a menos dose seria mais adequada para o experimento. Todos foram tratados por via intraperitoneal e aguardado o tempo de 1 hora para em seguida ser injetada também por via intraperitoneal uma solução de pentilenotetrazol na concentração de 10 mg/mL, na dose de 100 mg/kg, seguindo o método Czuczwar and Frey (1986). A estaurosporina associada a AMI foi dada 15 minutos depois da mistura triterpênica. Os animais foram imediatamente colocados em caixas escuras de maneira individual e observados os seguintes parâmetros: 1) início da primeira convulsão e 2) tempo de morte. O período total de observação foi de no máximo 120 minutos.

4.8 Avaliação de efeitos comportamentais relacionados ao SNC do Acetato de alfa e beta amirina (AcAMI) em camundongos

4.8.1 Avaliação da atividade exploratória no teste do campo aberto em modelo agudo

A arena do campo aberto foi feita em acrílico de paredes transparentes e fundo preto medindo 30 x 30 x 15 cm, dividida em nove quadrados de áreas iguais. O campo aberto foi utilizado para avaliar a atividade exploratória do animal (Archer, 1973). Os camundongos foram colocados dentro da arena, no quadrado central e deixados livres para explorar espontaneamente o local. Os parâmetros observados foram: deambulação (o número de quadrados cruzados com as quatro patas) o número de *rearing* e o número de *grooming* registrados nos últimos 5 minutos de um teste de duração de 6 minutos. Foram utilizados camundongos Swiss machos de 20 a 30 g de peso e divididos aleatoriamente em grupos de 6 a 20 animais por cada grupo. AcAMI, nas doses de 2,5; 5; 10 e 25 mg/kg tratados por via intraperitoneal, e no modelo agudo, onde os animais receberam apenas uma dose de AcAMI e após o tratamento foi aguardado 30 minutos para que

cada camundongo fosse colocado no aparelho. Uma solução de Tween 80 a 0,5% foi utilizada para tratar o grupo controle.

4.8.2 Avaliação da atividade exploratória no teste do campo aberto em modelo sub-crônico

Foram utilizados camundongos Swiss machos de 20 a 30 g de peso e divididos aleatoriamente em grupos de 5 a 12 animais por cada grupo. Para avaliação dos efeitos do AcAMI administrado por um tempo mais longo, foi utilizado as doses de 10 e 25 mg/kg por via intraperitoneal a cada 24 horas e por 1 (uma) semana, onde no sétimo dia de tratamento foi aguardado 30 minutos após o tratamento para ser inicializado o experimento no aparelho do Campo Aberto e avaliado os parâmetros descritos anteriormente e método semelhante ao do item 4.8.1. O grupo controle foi tratado com uma solução de Tween 80 a 0,5%. O diazepam 1 mg/kg, i.p., foi utilizado como controle positivo.

4.8.3 Avaliação da atividade ansiolítica no teste do labirinto em cruz elevado em modelo agudo

Este teste tem sido altamente validado para avaliar as atividades ansiolíticas e ansiogênicas em roedores (Lister, 1987). O aparelho consiste em dois braços abertos opostos (30 x 5 cm), cruzados por dois braços fechados com as mesmas dimensões, com 25 cm de altura da parede. Os braços são ligados a um espaço central de 5 x 5 cm. O aparelho é elevado em 45 cm acima do chão, com pouca luminosidade na sala. Os camundongos são colocados individualmente no centro do aparelho com o focinho voltado para um dos braços fechados, e número de entradas e tempo de permanência nos braços abertos e fechados são registrados por um tempo de 5 minutos. A entrada dentro de cada braço é definida quando o animal coloca as quatro patas dentro de cada braço. Após cada teste, o aparelho é cuidadosamente limpo com um papel toalha umedecido com uma solução de etanol a 10%. As doses utilizadas de AcAMI foram de 2,5; 5; 10 e 25 mg/kg, administrados por via oral e aguardado um tempo de 1 hora o início do experimento para cada camundongo. O grupo controle foi tratado com uma solução de Tween 80 a 0,5%.

4.8.4 Avaliação da atividade ansiolítica no teste do labirinto para em cruz elevado em modelo sub-crônico

Foram utilizados camundongos Swiss machos de 20 a 30 g de peso e divididos aleatoriamente em grupos de 5 a 10 animais por cada grupo. Para avaliação dos efeitos do AcAMI administrado por um tempo mais longo, foi utilizado as doses de 10 e 25 mg/kg por via intraperitoneal a cada 24 horas e por 1 (uma) semana, onde no sétimo dia de tratamento foi aguardado 30 minutos após o tratamento para ser inicializado o experimento no aparelho do Labirinto em Cruz Elevado e avaliado os parâmetros descritos anteriormente e método semelhante ao do item 4.8.3. O grupo controle foi tratado com uma solução de Tween 80 a 0,5%. O diazepam 1 mg/kg, i.p., foi utilizado como controle positivo.

4.8.5 Avaliação da atividade anticonvulsivante do AcAMI induzido por PTZ em camundongos no modelo agudo

Foram utilizados camundongos Swiss machos de 20 a 30 g de peso e divididos aleatoriamente em grupos de 7 a 25 animais por cada grupo. Os animais foram pré-tratados com AcAMI nas doses de 2,5, 5, 10 ou 25 mg/kg, por via intraperitoneal e 10 e 25 mg/kg, por via oral e aguardado um tempo de 30 minutos para os camundongos tratados por via i.p e 1 hora para os camundongos tratados por via oral para em seguida ser aplicado o agente convulsivante PTZ (100 mg/kg, i.p.). Imediatamente após o tratamento com PTZ os animais foram colocados em caixas individualizadas e observados durante 30 minutos. A latência da primeira convulsão e o tempo de morte de cada animal foram os parâmetros observados. Camundongos que não apresentaram convulsões após 30 minutos de tratados com PTZ foram considerados protegidos. O grupo controle recebeu Tween 80 a 0,5% (Czuczwar and Frey, 1986; Yemitan and Adeyemi, 2005).

4.8.6 Avaliação da atividade anticonvulsivante do AcAMI induzido por Pilocarpina

Foram utilizados camundongos Swiss machos de 20 a 30 g de peso e divididos

aleatoriamente em grupos de 8 a 12 animais por cada grupo. Os animais foram pré-tratados com AcAMI nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg, por via intraperitoneal e aguardado um tempo de 30 minutos onde em seguida foi aplicado o agente pró-convulsivante pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). Imediatamente após o tratamento com pilocarpina os animais foram colocados em caixas individualizadas e observados durante 30 minutos. A latência da primeira convulsão e o tempo de morte de cada animal foram os parâmetros observados. Camundongos que não apresentaram convulsões após 30 minutos de tratados com pilocarpina foram considerados protegidos. O grupo controle recebeu Tween 80 a 0,5% (Tursky et al, 1989).

4.8.7 Avaliação do tempo de sono induzido por pentobarbital

Foram utilizados camundongos Swiss machos de 20 a 30 g de peso e divididos aleatoriamente em grupos de 11 a 14 animais por cada grupo. Este teste foi realizado de acordo com o método de Ferrine et al, 1974. Os camundongos tiveram indução de sono através da administração intraperitoneal de pentobarbital sódico na dose de 40 mg/kg e a duração do sono foi observado para cada animal tratado. Foram tratados grupos de camundongos por via oral e por via intraperitoneal, nas doses de 10 e 25 mg/kg para cada grupo. Os grupos controles receberam solução de Tween 80 a 0,5%.

4.9 Doseamento de aminoácidos e monoaminas de áreas cerebrais de camundongos tratados com AMI e AcAMI

4.9.1 Doseamento de monoaminas realizado em HPLC dos homogenatos do córtex cerebral de camundongos tratados com AMI

Os níveis cerebrais de monoaminas foram estudados em homogenatos a 10% preparados em tampão fosfato de sódio (150 mM; pH 7,4). Para a determinação dos neurotransmissores dopamina (DA), serotonina (5-HT) e seus metabólitos ácido dihidroxifenilacético (DOPAC),

ácido 4- hidroxí-3-metoxi-fenilacético (HVA), ácido 5-hidroxíindolacético (5-HIAA), foi utilizado um equipamento de HPLC da Shimadzu, modelo LCD-6A, com detecção amperométrica. Para a separação das monoaminas, foi usada uma coluna de fase reversa (Shim-Pack CLC-ODS, 25cm). A fase móvel foi preparada com ácido cítrico monohidratado 150 mM, octil sulfato de sódio 67 mM, tetrahydrofurano 2%, acetonitrila 45, utilizando água deionizada. O pH da fase móvel foi ajustado para 3,0 com NaOH 10 mM. A quantificação dos picos obtidos foi feita com o auxílio de uma curva padrão. Valores absolutos foram corrigidos quanto à recuperação das cânulas e expressões de variação em relação aos valores basais.

4.9.2 Doseamento realizado em HPLC de aminoácidos em homogenatos de áreas cerebrais (núcleos da base e hipocampo) de camundongos tratados com AcAMI

Os camundongos foram tratados por um período de 7 dias com solução controle (tween 80 A 0,5%) ou solução de AcAMI a 10 e 25 mg/kg, i.p. Depois deste período, eles foram mortos por deslocamento cervical e as regiões cerebrais foram imediatamente removidas e colocadas em papel alumínio sobre uma placa de petri conservada em gelo. O hipocampo e os núcleos da base foram dissecados para o estudo. Após dissecação, cada área foi pesada e conservada a -70°C até o uso. Foi feito um tampão utilizando um volume de 10% da área cerebral com 0,1 M de ácido perclórico e uma alíquota de 20 μL foi derivatizada com a mesma quantidade de reagente de derivatização (solução alcoólica de *o-phthaldialdehyde* na presença de 2-mercaptoetanol) e, em seguida injetado na coluna do HPLC (*high performance liquid chromatography*), para detecção fluorimétrica por um gradiente de concentração. As concentrações de aminoácidos foram determinadas utilizando curvas padrão para cada aminoácido e os resultados foram expresso em $\mu\text{g/g}$ de tecido (Furst, et al, 1990).

4.9.3 Doseamento de aminoácidos realizado em HPLC dos homogenatos de áreas cerebrais (núcleos da base e hipocampo) de camundongos tratados com AMI

Os camundongos foram tratados durante um período de 7 dias com as soluções controle e

de AMI nas doses de 10 e 25 mg/kg, via intraperitoneal. Após este período os camundongos foram mortos por deslocamento cervical e as regiões cerebrais imediatamente foram removidas e expostas sobre papel alumínio em uma placa de petri com gelo e feita em seguida a dissecação das áreas, onde foram extraídas para estudo, os núcleos da base e o hipocampo. Terminada a dissecação, cada área foi pesada e conservada a -70°C até o uso. O tampão foi feito utilizando um volume de 10% da área cerebral com ácido perclórico 0,1M. Uma alíquota de 20 μL foi derivatizada com a mesma quantidade de Reagente de Derivatização (*o-phthaldialdehyde* em solução alcoólica na presença de 2-mercaptoetanol) e em seguida foi injetada na coluna do HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) para a detecção fluorimétrica por gradiente de concentração. A quantidade dos aminoácidos foi quantificada utilizando as curvas padrões de cada aminoácido. O resultado foi expresso em $\mu\text{g/g}$ de tecido. (Furst, et al, 1990).

5 RESULTADOS

ESTUDOS FARMACOLÓGICOS

5.1 Avaliação da Atividade sedativa, ansiolítica e antidepressiva da AMI

5.1.1 Avaliação da coordenação motora - Teste do *Rota Rod* em camundongos

A avaliação da influência sobre a coordenação motora dos camundongos pela AMI foi testada, dividindo-se os animais em número de 8 por grupo. Estes foram tratados com AMI, controle (Tween 80 a 0,5 %) e diazepam (controle positivo) quando foram analisados os seguintes parâmetros: TP (Tempo de Permanência na barra giratória) e NQ (número de queda na barra giratória).

Em todos os parâmetros analisados a AMI, em nenhuma das concentrações testadas, alterou significativamente o comportamento dos animais, quando comparado ao controle, conforme mostra a **Tabela 1**.

Tabela 1. Efeito da administração da AMI em camundongos no teste Rota Rod em camundongos.

Grupo	TP(s)	NQ
Controle, i.p. (8)	58,8±0,3	1,1±0,3
Diazepam 1 mg/kg, i.p. (8)	52,8±5,3	2,1±0,4
AMI 10 mg/kg, i.p. (8)	49,6±4,7	1,6±0,4
AMI 25 mg/kg, i.p. (8)	53,4±3,9	1,4±0,4
AMI 50 mg/kg, i.p. (8)	51,9±4,7	1,5±0,4

Experimento realizado conforme descrito em materiais e métodos. Valores são a média \pm EPM do número de animais especificado em parêntese. ANOVA e *Dunnnett* como teste *post hoc*. TP = Tempo de permanência. NQ = Número de quedas.

5.1.2 Avaliação do tempo de sono induzido por pentobarbital

A ação hipnótica da AMI, no teste da indução de sono por pentobarbital em camundongos, foi determinada conforme descrito em materiais e métodos.

A **Tabela 2** mostra os valores (média \pm EPM) do tempo de sono apresentado pelos animais, referentes aos grupos controle e tratados com AMI nas doses de 10 e 25 mg/kg, v.o. e também nas doses de 10 e 25 mg/kg, i.p. Os valores de inibição, expressos em percentagem, em relação ao controle, relativos a cada uma das doses de AMI testadas, são também apresentados.

AMI nas doses de 10 e 25 mg/kg, tanto por via oral como por via intraperitoneal prolongou o tempo de sono de camundongos induzido por pentobarbital. O aumento no tempo de sono foi de 83 e 50% para as doses de 10 e 25 mg/kg em animais tratados por via oral e para os camundongos tratados por via intraperitoneal o aumento foi de 48 e 54 %, respectivamente para as dose de 10 e 25 mg/kg.

Tabela 2. Efeito da AMI no tempo de sono induzido por pentobarbital (40 mg/kg, i.p.), em camundongos.

Grupo	Tempo de sono (min)	% de aumento
Controle, v.o. (13)	48,5 ± 4,1	---
AMI 10 mg/kg, v.o. (13)	88,7 ± 3,4	83*
AMI 25 mg/kg, v.o. (13)	72,8 ± 7,3	50*
Controle, i.p. (12)	52,4 ± 5,5	---
AMI 10 mg/kg, i.p. (13)	77,4 ± 3,4	48*
AMI 25 mg/kg, i.p. (10)	80,6 ± 5,9	54*

Experimento realizado conforme descrito em materiais e métodos. Valores são das Médias ± EPM do número de animais especificado em parênteses. *p<0,05 comparado ao controle (ANOVA e *Tukey* como teste *post hoc*).

5.1.3 Determinação da atividade sedativa da AMI no teste do campo aberto em camundongos em protocolo sub-crônico

A ação sedativa da AMI em experimento com administração sub-crônica foi determinada através do Teste do Campo Aberto em camundongos por via intra-peritoneal conforme descrito em Materiais e Métodos.

A **Tabela 3** mostra os valores (média \pm EPM) dos parâmetros medidos neste experimento que foram: o movimento exploratório (ME), o *rearing* e o *grooming*. Os animais foram tratados com AMI nas doses de 10 e 25 mg/kg, i.p. e o controle recebeu Tween 80 a 0,5%.

Em relação ao controle a AMI reduziu a atividade exploratória em 18 e 27%, respectivamente para as doses de 10 e 25 mg/kg. O *rearing* foi levemente alterado e o *grooming* mostrou uma alteração significativa de 43 e 49%, respectivamente para as doses citadas.

Tabela 3. Efeito da AMI administrada em protocolo sub-crônico no teste do campo aberto em camundongos, via intra-peritoneal.

Parâmetros avaliados	Controle	AMI 10 mg/kg	AMI 25 mg/kg
ME	52,3± 2,7 (13)	42,7*± 2,2 (10)	38,2*± 3,9 (13)
<i>Rearing</i>	33,3± 1,6 (13)	23,6*±1,8 (10)	35,8± 2,3 (13)
<i>Grooming</i>	8,5± 0,9 (15)	4,8*± 1,0 (9)	4,3*± 0,6 (13)

Experimento realizado com tratamento sub-crônico de 7 dias por via intraperitoneal como descrito em materiais e métodos. Valores são Médias ± EPM do número de animais por grupo. * p<0,05 comparado ao controle no mesmo tempo de reação (ANOVA e *Dunnnett* como teste *post hoc*). Entre parênteses e abaixo das médias está indicado o número de animais em cada grupo. ME = movimento exploratório.

5.1.4 Determinação da atividade sedativa da AMI no teste do campo aberto em camundongos em protocolo agudo, via oral.

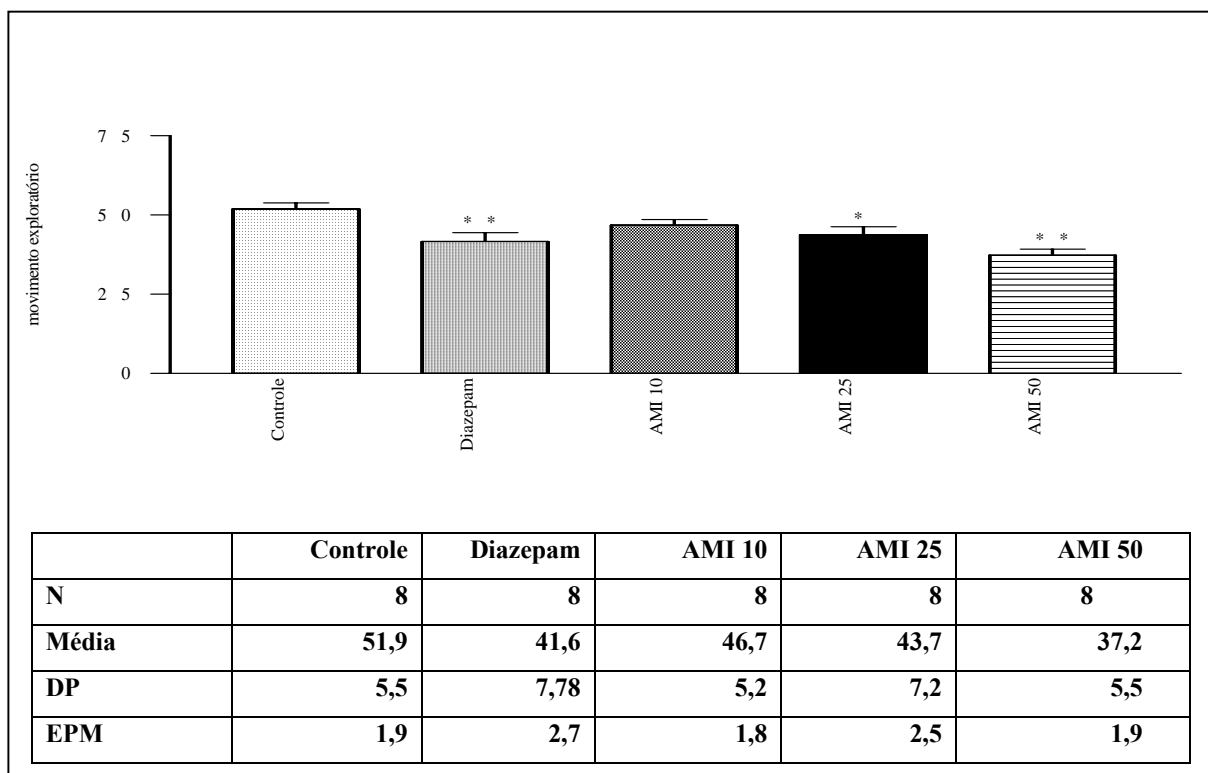
A ação sedativa da AMI em experimento agudo foi determinada através do Teste do Campo Aberto em camundongos por via intra-peritoneal conforme descrito em Materiais e Métodos.

Os animais foram tratados com AMI nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg, v.o. e o grupo controle recebeu Tween 80 a 0,5%, como controle positivo foi utilizado um grupo de animais que foram tratados com diazepam na dose de 1 mg/kg. Os parâmetros avaliados neste experimento foram o ME, o *rearing* e o *grooming*. A AMI nas dose de 25 e 50 mg/kg foi capaz de reduzir o movimento exploratório dos animais em 16 e 28 %, respectivamente. A AMI na dose de 10 mg/kg não foi diferente estatisticamente do controle. O Diazepam reduziu o ME em 20%, conforme mostra a **Figura 6**.

O *rearing* foi alterado somente na dose de 50 mg/kg em 41 % , enquanto o diazepam diminuiu em 64%este parâmetro, conforme **Figura 7**.

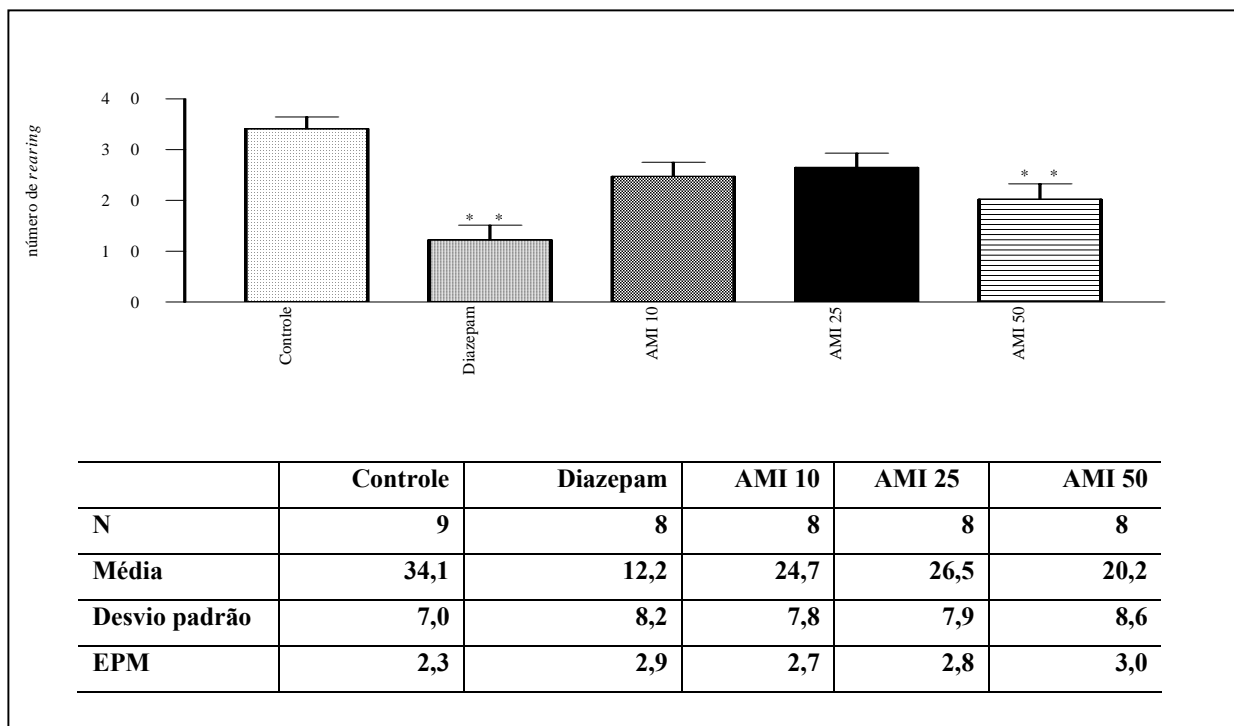
O *grooming* teve alteração significativa de 68, 69 e 74%, respectivamente para as doses de 10, 25 e 50 mg/kg. O diazepam reduziu em 65%, conforme mostra a **Figura 8**.

Figura 6. Alterações no número de cruzamentos provocados pela AMI administrada em protocolo agudo no teste do campo aberto em camundongos, via oral.



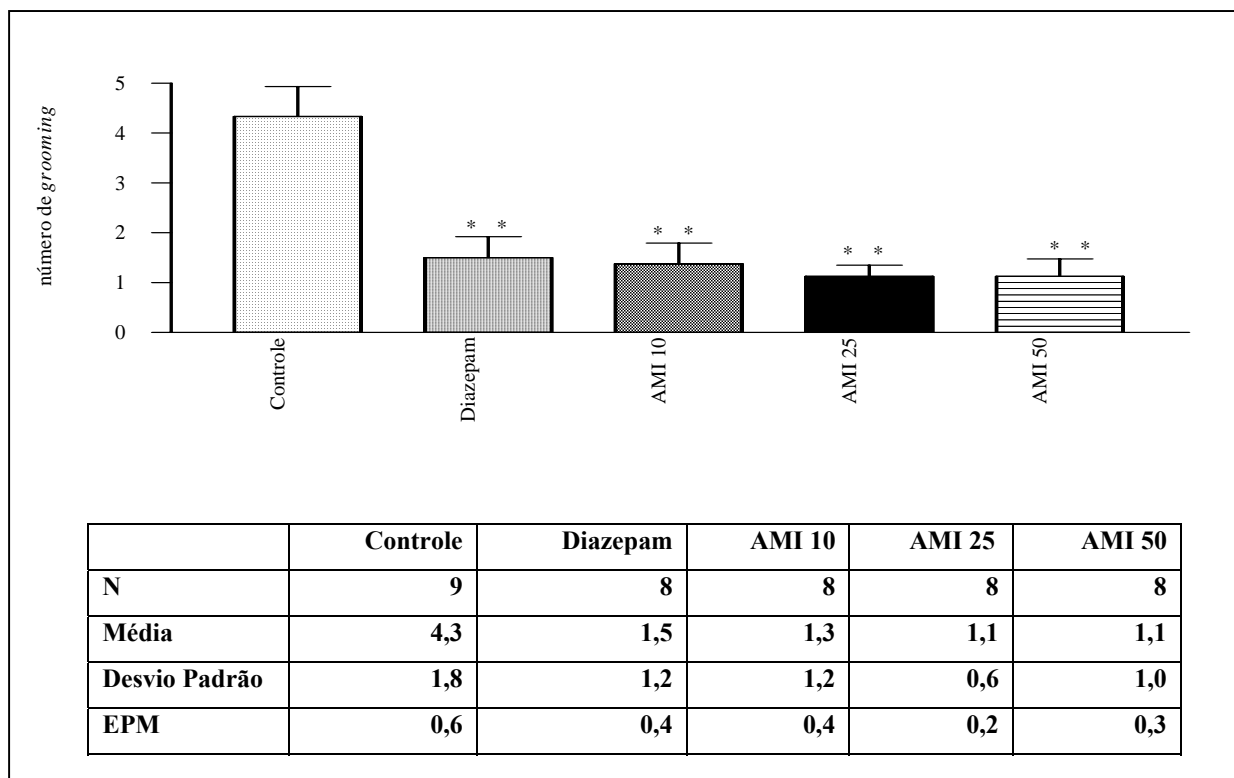
Movimento exploratório no teste do campo aberto, mostrando o efeito sedativo da AMI em camundongos tratados por via oral onde os mesmos receberam apenas uma dose de AMI, conforme descrito em materiais e métodos. O diazepam 1 mg/kg foi utilizado como controle positivo. O grupo controle foi tratado com Tween 80 a 0,5%. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado ao controle. ANOVA e *Dunnet* como teste *post hoc* onde $q = 3,247$ para controle x diazepam; $q = 2,574$ para controle x AMI 25 e $q = 4,633$ para controle x AMI 50. Na análise de variância, $F = 6,047$. N= número de animais por grupo, DP = desvio padrão e EPM = erro padrão da média.

Figura 7. Alterações do *rearing* provocado pela AMI administrada em protocolo agudo no teste do campo aberto em camundongos, via oral.



Número de *rearing* no teste do campo aberto, mostrando o efeito sedativo da AMI em camundongos tratados por via oral onde os mesmos receberam apenas uma dose de AMI, conforme descrito em materiais e métodos. O diazepam 1 mg/kg foi utilizado como controle positivo. O grupo controle foi tratado com Tween 80 a 0,5%. ** $p < 0,01$ comparado ao controle. ANOVA e *Dunnnett* como teste *post hoc* onde $q = 5,692$ para controle x diazepam e $q = 3,609$ para controle x AMI 50. Na análise de variância, $F = 8,764$. N= número de animais por grupo, DP = desvio padrão e EPM = erro padrão da média.

Figura 8. Alterações do *grooming* provocada pela AMI administrada em protocolo agudo no teste do campo aberto em camundongos, via oral.



Número de *grooming* no teste do campo aberto, mostrando o efeito sedativo da AMI em camundongos tratados por via oral onde cada grupo recebeu apenas uma dose de AMI, conforme descrito em materiais e métodos. O diazepam 1 mg/kg foi utilizado como controle positivo. O grupo controle foi tratado com Tween 80 a 0,5%. ** $p < 0,01$ comparado ao controle. ANOVA e *Dunnnett* como teste *post hoc* onde $q = 4,691$ para controle x diazepam; $q = 4,898$ para controle x AMI 10; $q = 5,312$ para controle x AMI 25 e $q = 5,312$ para controle x AMI 50. Na análise de variância, $F = 10,72$. N= número de animais por grupo, DP = desvio padrão e EPM = erro padrão da média.

5.1.5 Avaliação da participação GABAérgica no efeito sedativo da AMI

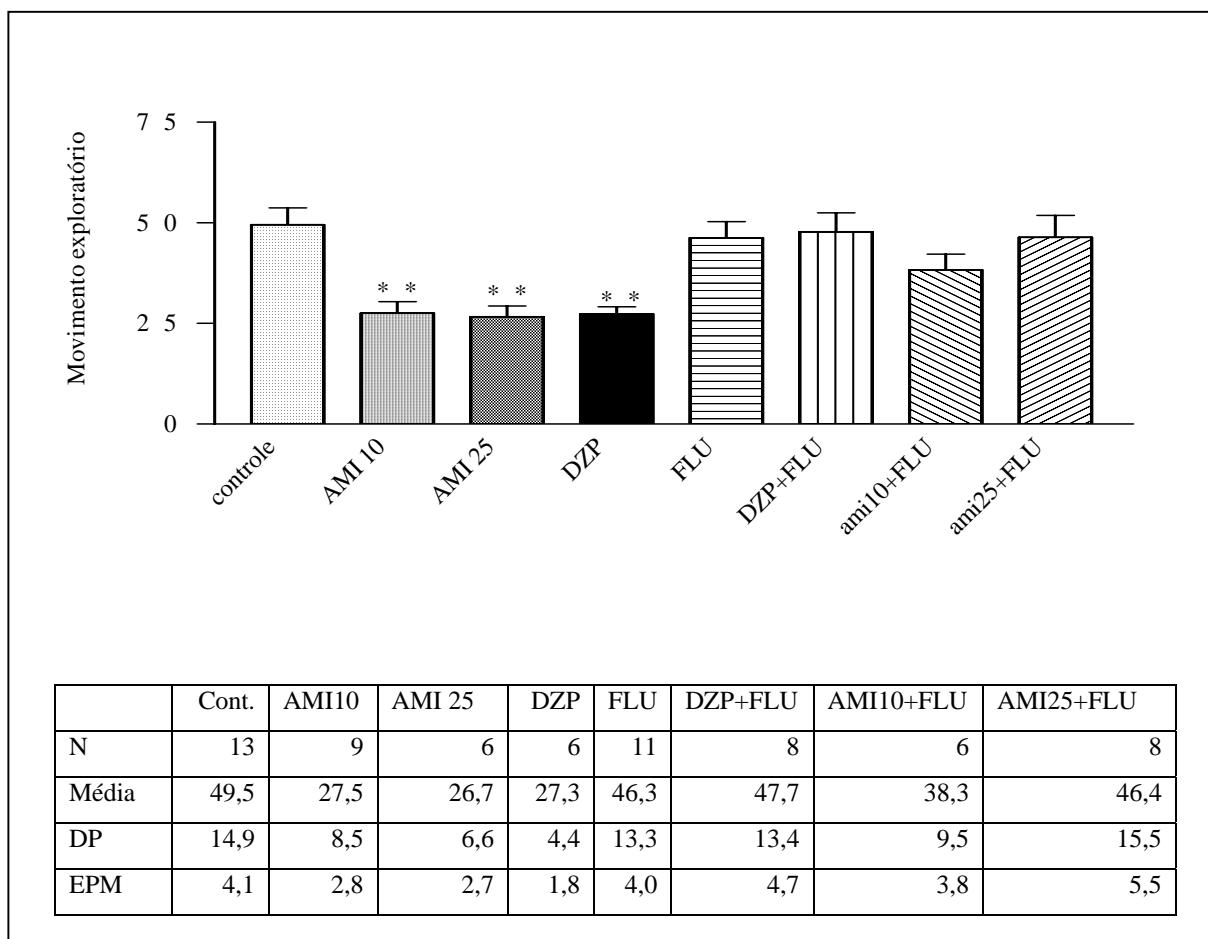
O sinergismo entre a AMI e o flumazenil foi verificado em experimento agudo determinado através do Teste do Campo Aberto em camundongos por via intra-peritoneal conforme descrito em Materiais e Métodos.

Os animais foram tratados com AMI nas doses de 10 e 25 mg/kg, i.p., o controle recebeu Tween 80 a 0,5%, e ainda os demais grupos: Diazepam 1 mg/kg, Flumazenil, Diazepam + Flumazenil, AMI 10 + Flumazenil e AMI 25 + Flumazenil. Os parâmetros avaliados neste experimento foram o ME, o *rearing* e o *grooming*.

A AMI nas doses de 10 e 25 mg/kg foi capaz de reduzir em 44 e 46 %, respectivamente, o ME dos animais. O Diazepam reduziu o número de cruzamentos ou movimento exploratório (ME) em 45%. O flumazenil administrado sozinho, conforme o esperado, não apresenta diferença em relação ao controle, porém administrado junto com a AMI reverte completamente o efeito da droga testada nas duas concentrações diferente (AMI 10 e 25) e também reverte o efeito do diazepam, conforme detalhado na **Figura 9**.

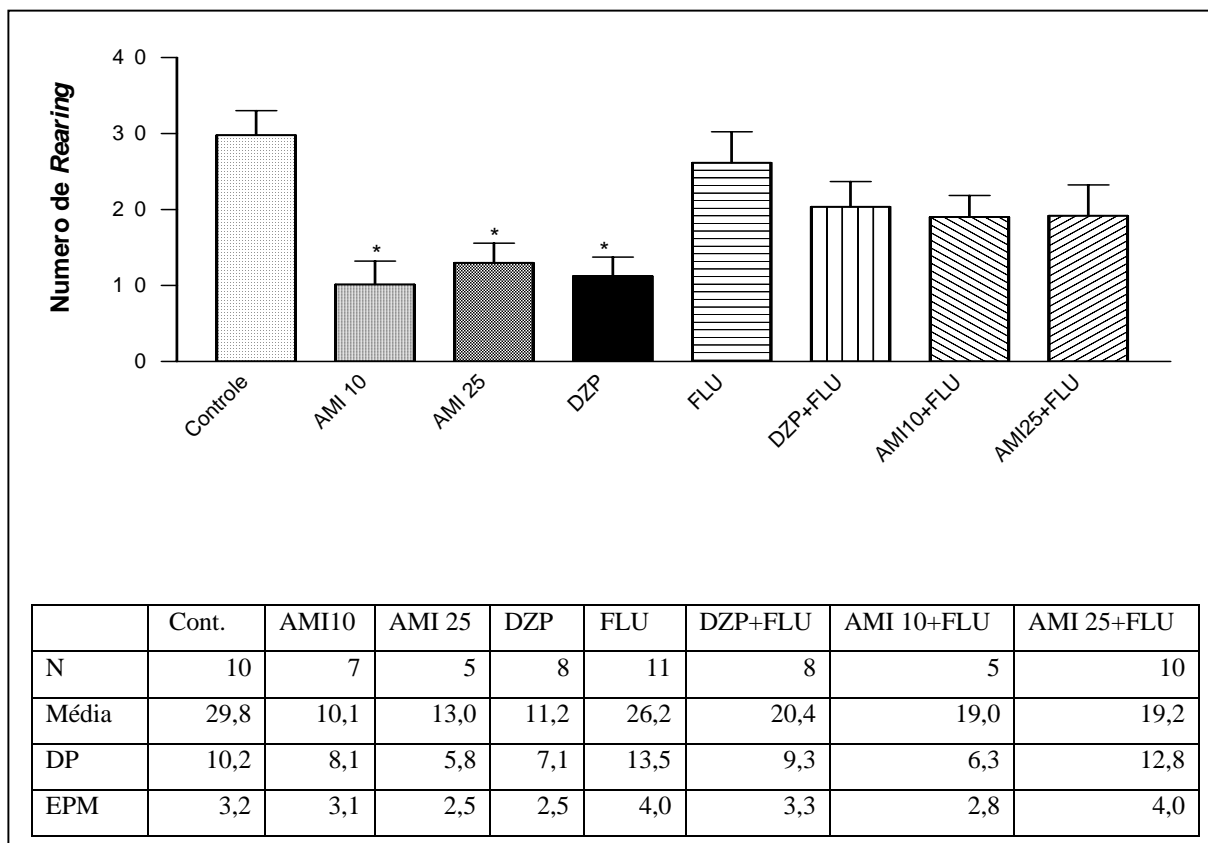
Resultados semelhantes foram também obtidos nos outros dois parâmetros analisados, o *rearing* (**Figura 10**) e no *grooming* (**Figura 11**).

Figura 9. Avaliação do envolvimento GABAérgico no efeito sedativo da AMI medida pelas alterações do movimento exploratório em protocolo agudo no teste do campo aberto em camundongos, via intra-peritoneal.



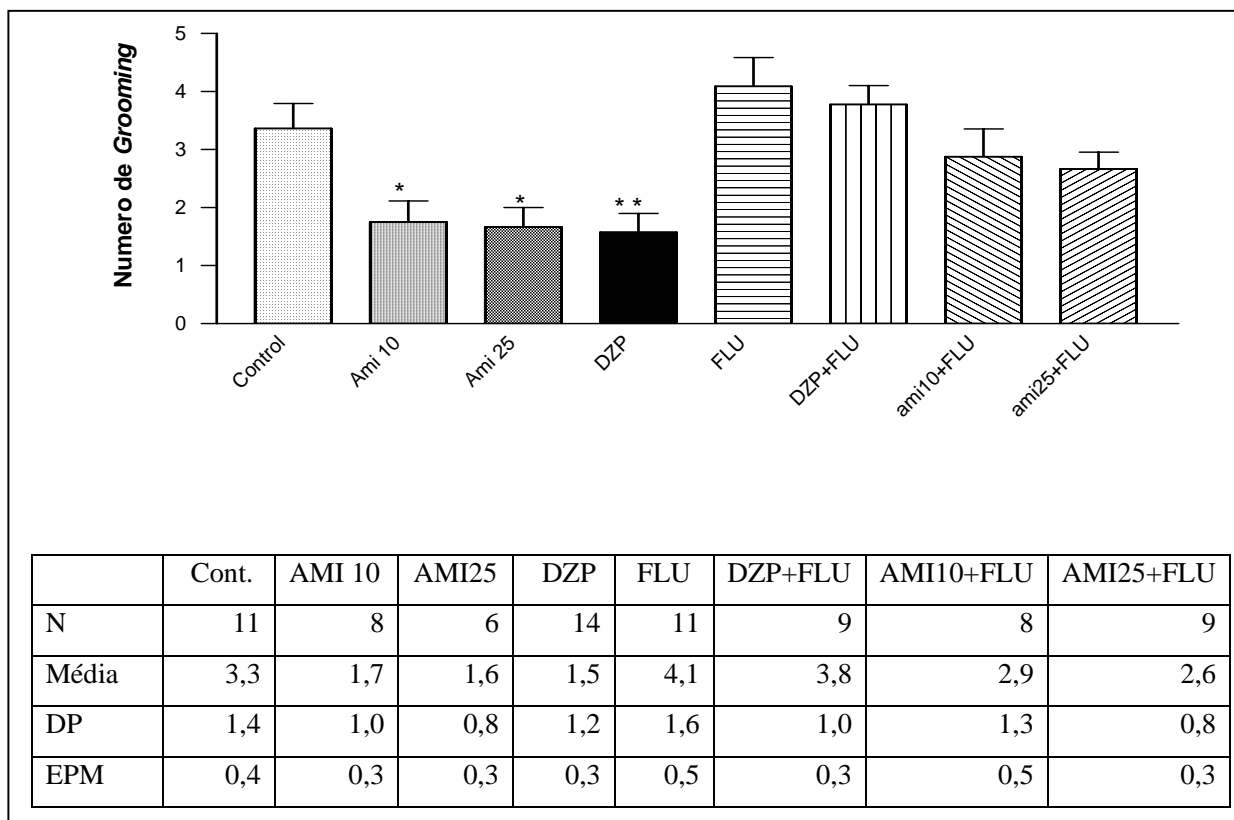
Número de cruzamentos no teste do campo aberto, mostrando o efeito sedativo da AMI em camundongos tratados por via i.p. onde os mesmos receberam apenas uma dose de AMI, conforme descrito em materiais e métodos. O diazepam 1 mg/kg foi utilizado como controle positivo. O grupo controle foi tratado com Tween 80 a 0,5%. ** $p < 0,01$ comparado ao controle. ANOVA e *Dunnnett* como teste *post hoc* onde $q = 4,166$ para controle x AMI 10; $q = 3,808$ para controle x AMI 25; $q = 3,697$ para controle x DZP; $q = 0,6551$ para controle x FLU; $q = 0,3271$ para controle x DZP+FLU; $q = 1,866$ para controle x ami 10+FLU e $q = 0,5785$ para controle x ami25+FLU. Na análise de variância, $F = 5,643$. N= número de animais por grupo, DP = desvio padrão e EPM = erro padrão da média.

Figura 10. Avaliação do envolvimento GABAérgico no efeito da AMI medida pelas alterações no *rearing* em protocolo agudo no teste do campo aberto em camundongos, via intra-peritoneal.



Número de *rearing* no teste do campo aberto, mostrando o efeito sedativo da AMI em camundongos tratados por via ip, onde os mesmos receberam apenas uma dose de AMI, conforme descrito em materiais e métodos. O diazepam 1 mg/kg foi utilizado como controle positivo. O grupo controle foi tratado com Tween 80 a 0,5%. ** $p < 0,01$ comparado ao controle. ANOVA e *Dunnett* como teste *post hoc* onde $q = 3,891$ para controle x AMI 10; $q = 2,992$ para controle x AMI 25; $q = 3,815$ para controle x DZP; $q = 0,8078$ para controle x FLU; $q = 1,938$ para controle x DZP+FLU; $q = 1,923$ para controle x AMI 10+FLU e $q = 2,312$ para controle x AMI25+FLU. Na análise de variância, $F = 3,977$. N= número de animais por grupo, DP = desvio padrão e EPM = erro padrão da média.

Figura 11. Avaliação do envolvimento GABAérgico no efeito da AMI medida pelas alterações no *grooming* em protocolo agudo no teste do campo aberto em camundongos, via intra-peritoneal.



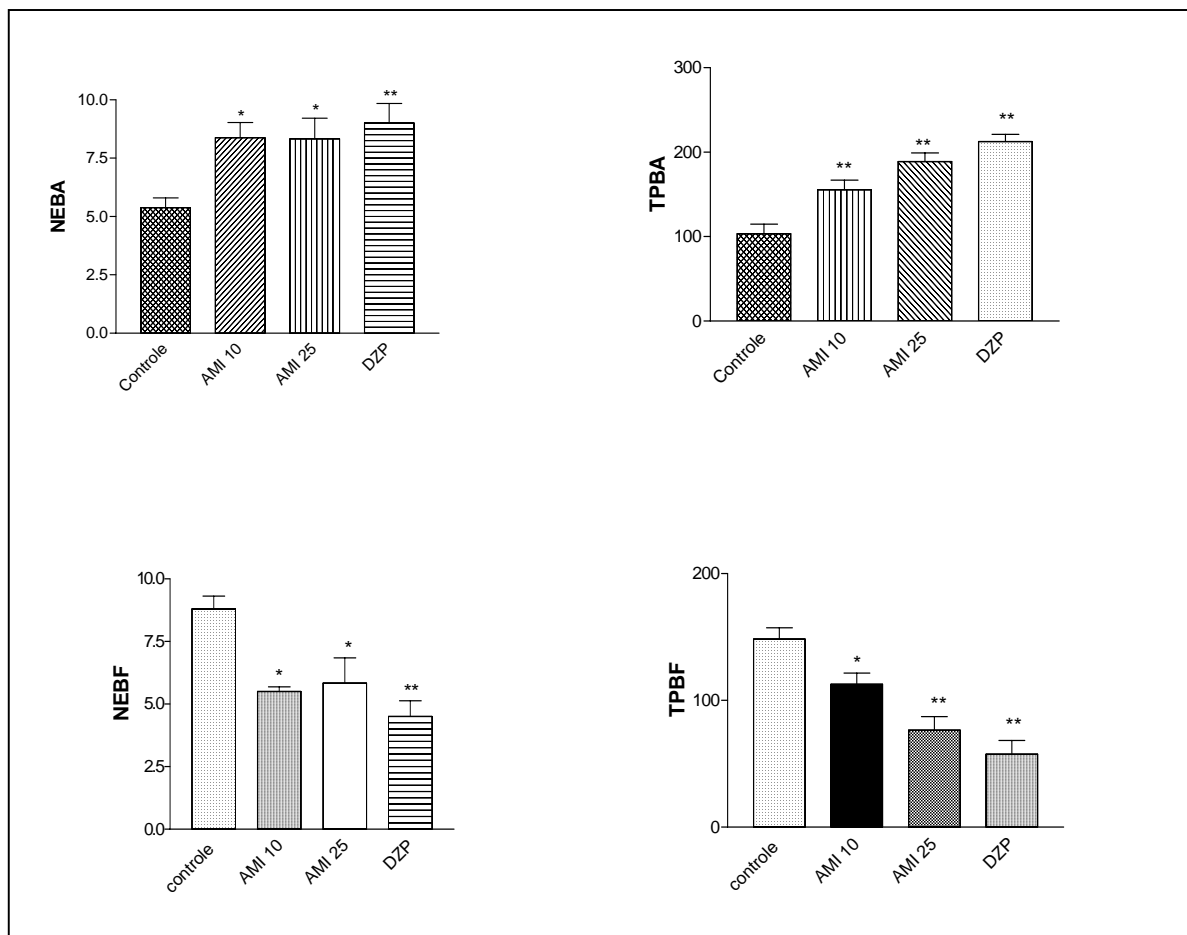
Número de *grooming* no teste do campo aberto, mostrando o efeito sedativo da AMI em camundongos tratados por via ip onde os mesmos receberam apenas uma dose de AMI, conforme descrito em materiais e métodos. O diazepam 1 mg/kg foi utilizado como controle positivo. O grupo controle foi tratado com Tween 80 a 0,5%. ** $p < 0,01$ comparado ao controle. ANOVA e *Dunnnett* como teste *post hoc* onde $q = 2,806$ para controle x AMI 10; $q = 2,702$ para controle x AMI 25; $q = 3,594$ para controle x DZP; $q = 1,378$ para controle x FLU; $q = 0,7445$ para controle x DZP+FLU; $q = 0,8497$ para controle x AMI 10+FLU e $q = 1,253$ para controle x AMI25+FLU. Na análise de variância, $F = 6,352$. N= número de animais por grupo, DP = desvio padrão e EPM = erro padrão da média.

5.1.6 Determinação da atividade ansiolítica da AMI no Teste do Labirinto em Cruz elevado (Plus Maze) em camundongos em protocolo sub-crônico

A ação ansiolítica da AMI em protocolo sub-crônico foi determinada através do Teste do Plus Maze em camundongos por via intra-peritoneal conforme descrito em Materiais e Métodos. Os animais foram tratados com AMI nas doses de 10 e 25 mg/kg, i.p. e o controle recebeu Tween 80 a 0,5% e o diazepam 1 mg/kg foi utilizado como controle positivo.

Conforme os resultados apresentados neste modelo, a AMI aumentou o número de entrada nos braços abertos (NEBA) em 55%, nas duas doses testadas de forma bastante significativa em relação ao controle. O Tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) da mesma forma que o parâmetro anterior foi aumentado de forma significativa em relação ao controle em 50 e 82% respectivamente para as doses de 10 e 25 mg/kg. O parâmetro número de entradas nos braços fechados (NEBF) foi reduzido em 38 e 34%, respectivamente para as doses de 10 e 25 mg/kg em relação ao controle e o tempo de permanência nos braços fechados (TPBF) foi reduzido significativamente em relação ao controle em 24 e 48 %, respectivamente para as doses supracitadas. Todos estes resultados são mostrados na **Figura 12**.

Figura 12. Determinação da atividade ansiolítica da AMI no Teste do Plus Maze em camundongos em protocolo sub-crônico, via intra-peritoneal.



NEBA = número de entrada de braços abertos; TPBA = tempo de permanência nos braços abertos; NEBF = número de entrada de braços fechados; TPBF = tempo de permanência nos braços fechados. As barras representam a média \pm EPM do número de animais por grupo que foi de 5 a 10 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; ANOVA seguido de *Dunnnett* como teste *post hoc* comparado ao grupo controle, tratado com Tween 80 a 0,5%.

5.1.7 Determinação da atividade ansiolítica da AMI no Teste do Labirinto em Cruz elevado (Plus Maze) em camundongos em protocolo agudo via oral.

A ação ansiolítica da AMI em protocolo agudo foi determinada através do Teste do Plus Maze em camundongos por via oral conforme descrito em Materiais e Métodos. Os animais foram tratados com AMI nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg, i.p. e o controle recebeu Tween 80 a 0,5% e o diazepam 1 mg/kg foi utilizado como controle positivo.

Conforme os resultados apresentados neste modelo, a AMI aumentou o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) em 28, 34 e 35%, respectivamente, nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg de forma significativa em relação ao controle. O tempo de permanência nos braços fechados (TPBF) de forma inversa ao parâmetro anterior foi reduzido significativamente em 45 e 49% relação ao controle nas doses de 25 e 50 mg/kg, respectivamente. Estes resultados são mostrados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Atividade ansiolítica da AMI no Teste do Plus Maze em camundongos em protocolo agudo, via oral.

Grupo	NEBA	NEBF	TPBA	TPBF
Controle	10,1 ± 1,0 (10)	7,7 ± 0,9 (10)	154,6 ± 10,9 (10)	102,2 ± 7,9 (10)
Diazepam	16,8* ± 2,8 (9)	5,5 ± 1,3 (10)	217,2** ± 14,4 (10)	59,7** ± 11,1 (10)
AMI 10	12,8 ± 1,2 (10)	6,5 ± 0,8 (10)	198,4* ± 9,4 (10)	73,3 ± 9,1 (10)
AMI 25	9,9 ± 1,4(9)	4,7 ± 0,6 (9)	208,3** ± 10,7 (9)	55,9** ± 6,2 (8)
AMI 50	10,4 ± 1,0 (10)	4,9 ± 0,8 (10)	209,1** ± 11,8 (10)	52,5** ± 5,2 (9)

Experimento realizado tratando-se os animais por via oral 1 hora antes de colocá-los no aparelho conforme descrito em materiais e métodos. Valores são Médias ± EPM do número de animais por grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado ao controle no mesmo tempo de reação (ANOVA e *Dunnnett* como teste *post hoc*). Entre parênteses e ao lado do EPM está indicado o número de animais em cada grupo.

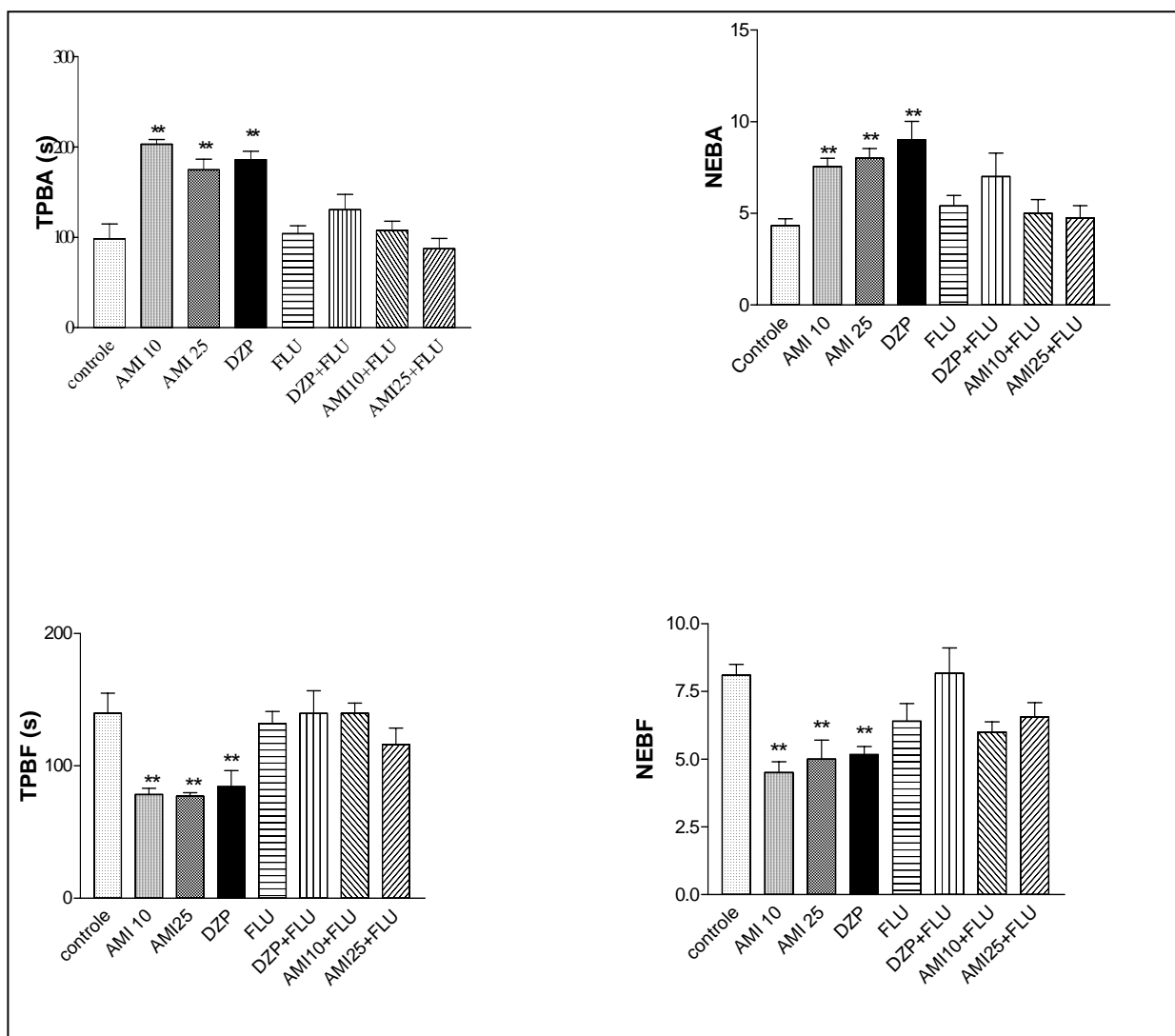
5.1.8 Avaliação da participação GABAérgica no efeito ansiolítico da AMI

Para pesquisar a participação de mecanismos gabaérgicos no mecanismo de ação da AMI em relação a seu efeito ansiolítico, utilizamos o flumazenil, o diazepam e a própria AMI administrados isoladamente ou associados em modelo agudo através do Teste de Labirinto em Cruz Elevado em camundongos por via intra-peritoneal conforme descrito em Materiais e Métodos. Os animais foram tratados com AMI nas doses de 10 e 25 mg/kg, i.p., o controle recebeu Tween 80 a 0,5%, e ainda os demais grupos: Diazepam 1 mg/kg, Flumazenil 2,5mg/kg, Diazepam + Flumazenil, AMI 10 + Flumazenil e AMI 25 + Flumazenil. Os parâmetros avaliados neste experimento foram o NEBA, TPBF, NEBF e TPBF.

Assim como no teste do Campo Aberto, neste experimento a AMI nas doses de 10 e 25 mg/kg foi capaz de demonstrar efeito ansiolítico, aumentando tanto o número de entradas nos braços abertos (NEBA) em 74 e 85%, respectivamente, como também aumentando o tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) em 105 e 77%, respectivamente para as doses supracitadas. As mesmas doses produziram diminuído número de entradas nos braços fechados (NEBF) em 44 e 45%, respectivamente e diminuíram o tempo de permanência nos braços fechados (TPBF) em 44 e 38%, respectivamente para 10 e 25 mg/kg.

O diazepam administrado isoladamente também causou como esperado esse mesmo efeito ansiolítico, alterando de forma similar os mesmos parâmetros. O flumazenil administrado isoladamente não apresenta nenhuma atividade ansiolítica, enquanto que, quando este é administrado em associação com a AMI nas duas doses estudadas e também em associação junto com o diazepam, este consegue reverter o efeito tanto do diazepam como da AMI nas duas doses testadas. Estes resultados são mostrados na **Figura 13**.

Figura 13. Avaliação do envolvimento GABAérgico no efeito da AMI no teste do Plus Maze em protocolo agudo utilizando camundongos, via intra-peritoneal.



NEBA = número de entrada de braços abertos; TPBA = tempo de permanência nos braços abertos; NEBF = número de entrada de braços fechados; TPBF = tempo de permanência nos braços fechados. As barras representam a média \pm EPM do número de animais por grupo que foi de 5 a 12 animais. DZP = diazepam 1 mg/kg, i.p e FLU = Flumazenil 2,5 mg/kg, i.p.** p < 0,01; ANOVA seguido de *Dunnett* como teste *post hoc* comparado ao grupo controle, tratado com Tween 80 a 0,5%.

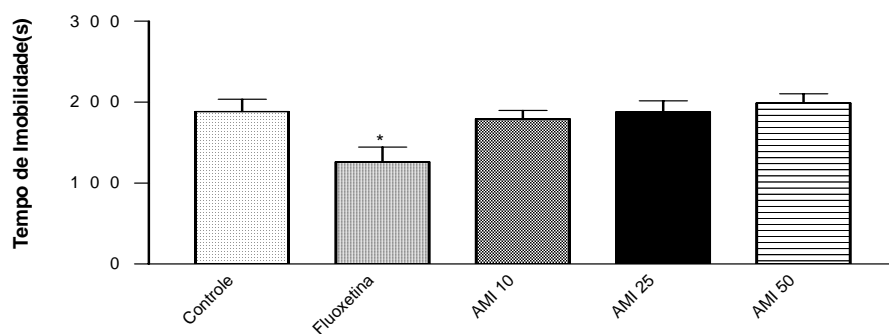
5.1.9 Determinação da atividade antidepressiva da AMI em camundongos

A atividade antidepressiva da AMI em experimento agudo foi determinada através do Teste do Nado Forçado realizado com camundongos, administrando-se a AMI tanto por via oral como por via intraperitoneal, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os animais foram tratados com AMI nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg. O grupo controle recebeu Tween 80 a 0,5% e um grupo recebeu fluoxetina, dose utilizada como controle positivo.

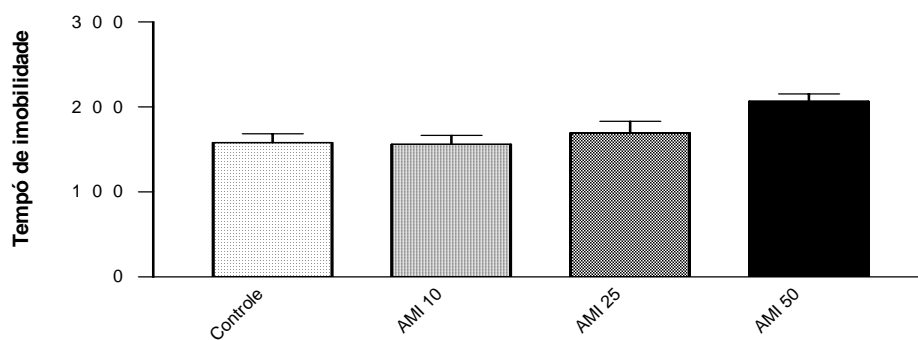
Conforme os resultados apresentados neste modelo, a AMI não apresentou nenhuma diferença significativa em relação ao controle nas duas vias de administração estudadas onde em nenhuma das três doses utilizadas houve diferença significativa em relação ao controle. Estes resultados são mostrados na **Figura 14(a e b)**.

Figura 14. Avaliação do efeito antidepressivo da AMI em modelo do nado forçado utilizando camundongos em protocolo agudo por via oral e intraperitoneal.

A) Via intraperitoneal:



B) Via oral:



As barras representam a média \pm EPM do número de animais por grupo que foi de 9 a 13 animais. * $p < 0,05$; ANOVA seguido de *Dunnnett* como teste *post hoc* comparado ao grupo controle, tratado com Tween 80 a 0,5%.

5.1.10 Avaliação da participação noradrenérgica no efeito antidepressivo da AMI

Para avaliar o envolvimento adrenérgico sobre a atividade antidepressiva da AMI, utilizamos as drogas imipramina e reserpina administradas isoladamente e em associação com a AMI, por via intra-peritoneal conforme descrito em Materiais e Métodos. Os animais foram tratados e separados nos seguintes grupos: Controle (Tween 80 a 0,5%), AMI 1 mg/kg, AMI 2,5 mg/kg, AMI 5 mg/kg, Imipramina 10 mg/kg (IMI10), Imipramina 30 mg/kg (IMI 30), AMI 1 + IMI 10, AMI 2,5 + IMI 10, Reserpina 2 mg/kg (Reserp 2) e Reserp 2 + AMI 2,5. O modelo escolhido foi o Nado Forçado, onde o tempo de imobilidade do animal foi o parâmetro registrado.

A AMI na dose 1mg/kg não se comportou de modo diferente em relação aos controles, mostrando que nesta dose a mistura não apresenta atividade antidepressiva, porém nas doses de 2,5 e 5 mg/kg o tempo de imobilidade do animal foi diminuído em 28 e 55 %, respectivamente. A imipramina nas doses de 10 e 30 mg/kg também reduziu o tempo de imobilidade dos animais em 28 e 64 %, respectivamente. Quando a imipramina na dose de 10 mg/kg foi associada a AMI nas doses de 1 e 2,5 mg/kg, observamos que o tempo de imobilidade dos animais destes grupos diminuíram significativamente em relação ao controle em 44 e 50 %, respectivamente. A reserpina administrada isoladamente apresentou um efeito contrário a imipramina e AMI, aumentando o tempo de imobilidade dos animais em 21%, porém quando administrada em associação com a AMI este tempo de imobilidade retorna aos valores similares ao do grupo controle. Os resultados deste experimento estão registrados na **Tabela 5**.

Tabela 5. Avaliação do envolvimento adrenérgico sobre a atividade antidepressiva da AMI no teste do nado forçado em camundongos tratado de forma aguda e por via intraperitoneal.

Grupo	Tempo de imobilidade (s)	%
Controle (21)	203,5 ± 7,8	-
AMI 1 mg/kg (6)	162,2 ± 17,7	-20
AMI 2,5 mg/kg (9)	145,9 ± 13,2*	-28
AMI 5 mg/kg (10)	91,3 ± 7,8**	-55
IMI 10 mg/kg (6)	145,7 ± 12,6	-28
IMI 30 mg/kg (8)	73,9 ± 13,3**	-64
AMI 1 + IMI 10 (09)	114,9 ± 14,6**	-44
AMI 2,5 + IMI 10 (07)	102,4 ± 8,5**	-50
RESERP 2 mg/kg (07)	246,6 ± 9,8	+21
RESERP 2 + AMI 2,5 (06)	197 ± 13,3*	-3

Os valores são Médias ± EPM do número de animais por grupo. * p<0,05 e **p<0,01 comparado ao controle no mesmo tempo de reação (ANOVA e *Dunnnett* como teste *post hoc*). Entre parênteses ao lado da identificação do grupo está indicado o número de animais em cada grupo.

5.1.11 Avaliação da participação serotoninérgica no efeito antidepressivo da AMI

Para avaliar o envolvimento serotoninérgico sobre a atividade antidepressiva da AMI, foi utilizado a paroxetina administrada isoladamente e em conjunto com a AMI, por via intraperitoneal conforme descrito em Materiais e Métodos. Os animais foram tratados e separados nos seguintes grupos: Controle (Tween 80 a 0,5%), AMI 2,5 mg/kg, Paroxetina 4 mg/kg, Paroxetina 16 mg/kg e Paroxetina 4 mg/kg + AMI 2,5 mg/kg. O modelo escolhido foi o Nado Forçado, onde o tempo de imobilidade do animal foi registrado.

A AMI na dose de 1mg/kg diminui o tempo de imobilidade do animal em 28%, efeito semelhante ao observado com a paroxetina de 16 mg/kg, que reduziu a imobilidade dos animais em aproximadamente 28%. Já com a paroxetina de 4 mg/kg a redução no tempo de imobilidade não foi estatisticamente significativa, apenas 14%. No grupo que recebeu paroxetina 4 mg/kg e AMI 2,5 mg/kg, obtivemos uma redução no tempo de imobilidade idêntico aos valores expressado no grupo que recebeu somente AMI 2,5 mg/kg, onde não foi constatado nenhum efeito adicional. Os resultados deste experimento estão registrados na **Tabela 6**.

Tabela 6. Avaliação do envolvimento serotoninérgico sobre a atividade antidepressiva da AMI no teste do nado forçado em camundongos tratado de forma aguda e por via intra-peritoneal.

Grupo	Tempo de imobilidade (s)	%
Controle (21)	203,5 ± 7,8	-
AMI 2,5 mg/kg (9)	145,9 ± 13,2*	-28
PAROX 4 mg/kg (20)	175,6 ± 17,9	-14
PAROX 16 mg/kg (18)	145,9 ± 6,9**	-28
AMI 2,5 + PAROX 4 (14)	150,4 ± 14,0*	-26

Valores são Médias ± EPM do número de animais por grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado ao controle no mesmo tempo de reação (ANOVA e *Dunnett* como teste *post hoc*). Entre parênteses ao lado da identificação do grupo está indicado o número de animais em cada grupo.

5.2 Determinação da atividade anticonvulsivante da mistura isomérica de alfa e beta amirina (AMI), via oral.

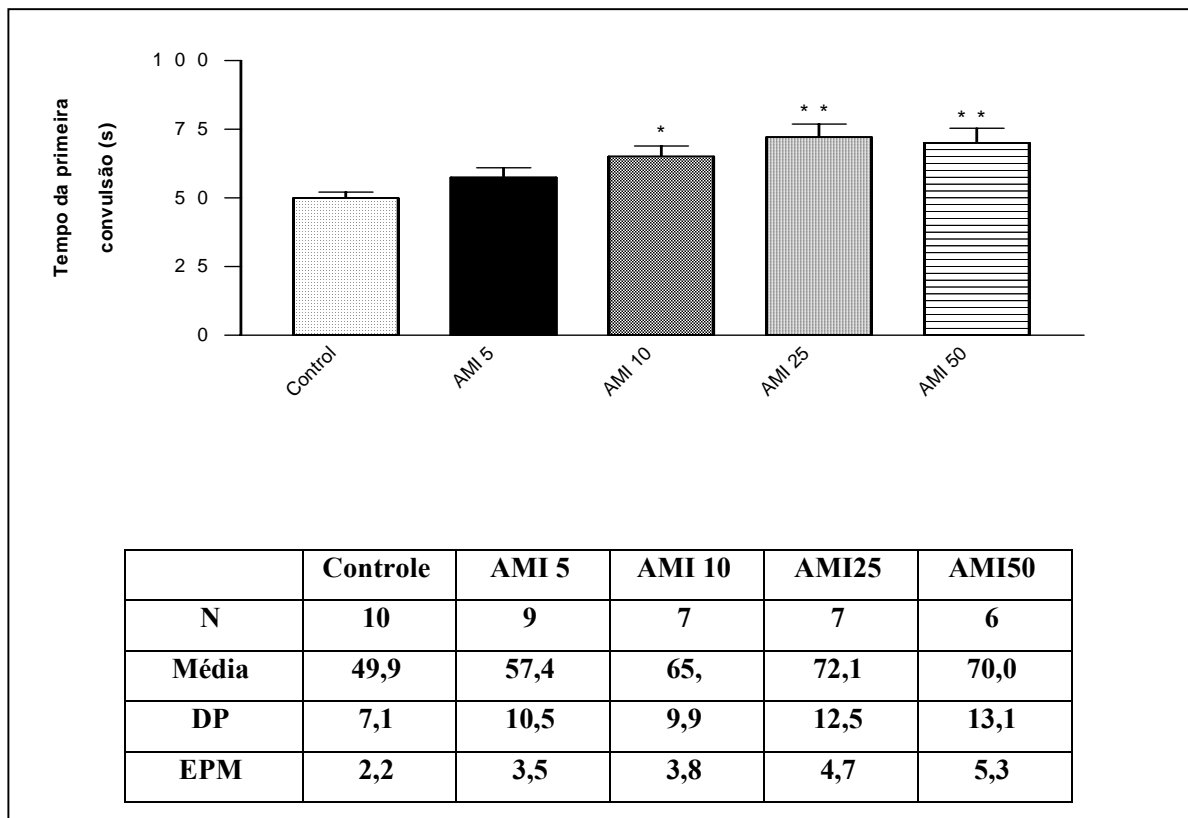
5.2.1 Efeito anticonvulsivante da AMI no modelo de convulsão induzido por pentilenotetrazol em camundongos (protocolo agudo por via oral)

A avaliação do efeito anticonvulsivante da AMI foi estudada neste modelo utilizando como agente químico pró-convulsivante, o Pentilenotetrazol (PTZ). Os animais foram divididos em grupos de 6 a 10 animais onde foram tratados da seguinte maneira: controle (Tween 80 a 0,5 %), AMI 5 mg/kg, AMI 10 mg/kg, AMI 25 mg/kg e AMI 50 mg/kg, por via oral. Foram analisados os seguintes parâmetros: Latência para primeira convulsão e Tempo de Morte, ambos registrados em segundo.

Os resultados demonstraram que no parâmetro latência para primeira convulsão a AMI na dose de 5 mg/kg não foi diferente em relação ao controle, todavia as doses de 10, 25 e 50 mg/kg proporcionaram aos camundongos uma proteção anticonvulsivante significativa de 30, 44 e 40 %, respectivamente, onde possivelmente atinge o efeito máximo com a dose de 25 mg/kg, conforme mostra a **Figura 15**.

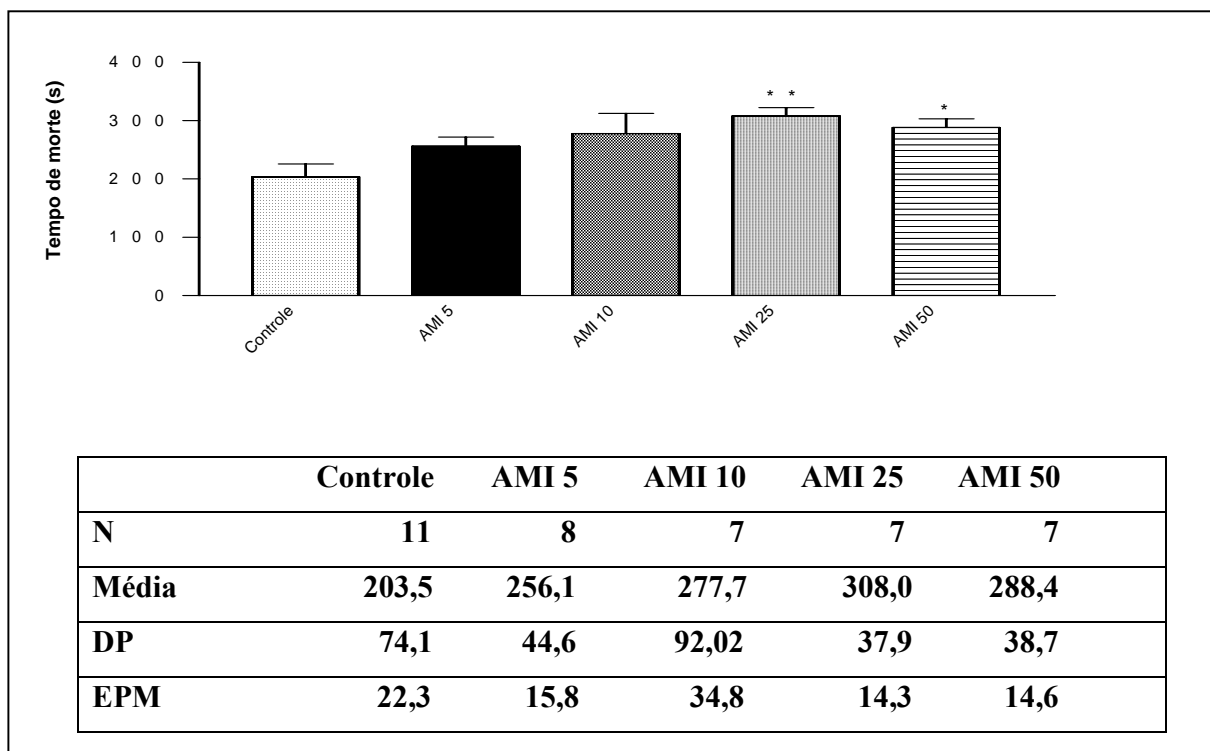
No tempo de morte a AMI via oral conferiu proteção de 51 e 42 % nos grupos de animais tratados com as doses de 25 e 50 mg/kg, respectivamente, conforme mostrado na **Figura 16**.

Figura 15. Alterações na latência para primeira convulsão provocado pela AMI em protocolo agudo no modelo de convulsões com PTZ em camundongos, via oral.



As barras representam a média \pm EPM do número de animais por grupo que foi de 6 a 10 animais. * $p < 0,05$; ANOVA seguido de *Dunnnett* como teste *post hoc* comparado ao grupo controle, tratado com Tween 80 a 0,5%. $F = 6,426$. $q = 1,570$ para Controle vs AMI 5; Controle vs AMI 10 = 2,957; Controle vs AMI 25 = 4,315 e para Controle vs AMI 50 = 3,721. N= número de animais por grupo, DP = desvio padrão e EPM = erro padrão da média.

Figura 16. Alterações no tempo de morte provocado pela AMI em protocolo agudo em modelo de convulsão induzido com PTZ em camundongos, via oral.



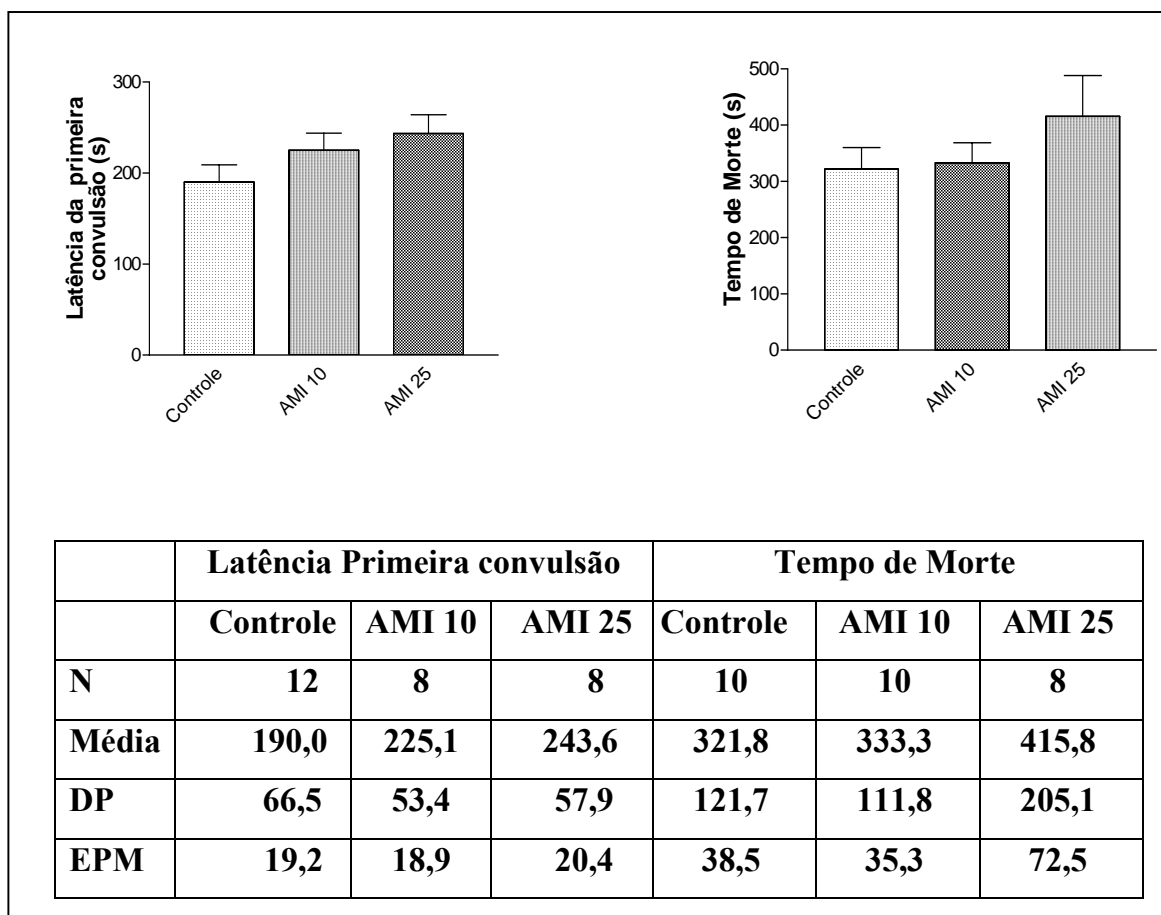
As barras representam a média \pm EPM do número de animais por grupo que foi de 7 a 11 animais. * $p < 0,05$; ANOVA seguido de *Dunnnett* como teste *post hoc* comparado ao grupo controle, tratado com Tween 80 a 0,5%. $F = 3,767$. $q = 1,806$ para Controle vs AMI 5; Controle vs AMI 10 = 2,448; Controle vs AMI 25 = 3,448 e Controle vs AMI 50 = 2,802. N= número de animais por grupo, DP = desvio padrão e EPM = erro padrão da média.

5.2.2 Efeito anticonvulsivante da AMI no modelo de convulsão induzido por pilocarpina em camundongos (protocolo agudo por via intraperitoneal)

A avaliação do efeito anticonvulsivante da AMI foi estudada neste modelo utilizando como agente químico pró-convulsivante, a pilocarpina. Os animais foram divididos em grupos de 8 a 12 animais onde foram tratados da seguinte maneira: controle (Tween 80 a 0,5 %), AMI 10 mg/kg e AMI25 mg/kg, por via intraperitoneal. Foram analisados os seguintes parâmetros: Latência para Primeira Convulsão e Tempo de Morte, ambos registrados em segundo.

Os resultados demonstraram que nos dois parâmetros estudados (latência para primeira convulsão e tempo de morte) a AMI nas doses aplicadas não diferiram significativamente conforme mostra a **Figura 17**.

Figura 17. Efeito anticonvulsivante da AMI no modelo de convulsão induzido por pilocarpina em camundongos (protocolo agudo por via intraperitoneal)



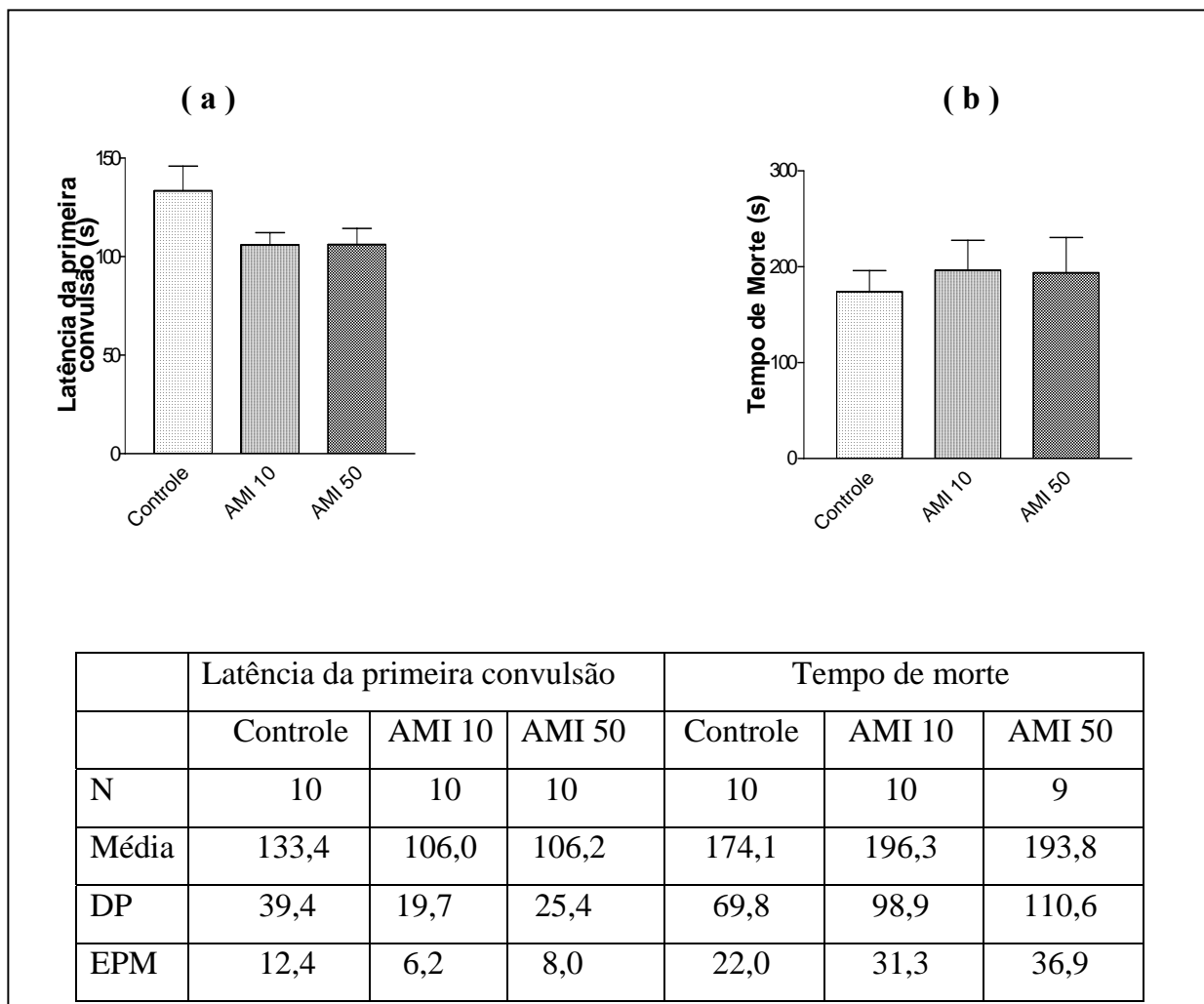
As barras representam a média \pm EPM do número de animais por grupo que foi de 8 a 12 animais. ANOVA seguido de *Dunnnett* como teste *post hoc* comparado ao grupo controle, tratado com Tween 80 a 0,5%. Para Latência Primeira Convulsão temos $F = 2,019$ e $q = 1,268$ para Controle vs AMI 10 e Controle vs AMI 25 = 1,936. Para Tempo de Morte temos $F = 1,044$ e $q = 0,1749$ para Controle vs AMI 10 e Controle vs AMI 25 = 1,347. N= número de animais por grupo, DP = desvio padrão e EPM = erro padrão da média.

5.2.3 Efeito anticonvulsivante da AMI no modelo de convulsões induzido por estriçnina (2,5 mg/kg) em camundongos (protocolo agudo por via intraperitoneal)

A avaliação do efeito anticonvulsivante da AMI foi estudada neste modelo utilizando como agente químico pró-convulsivante, a estriçnina. Os animais foram divididos em grupos 10 animais onde foram tratados da seguinte maneira: controle (Tween 80 a 0,5 %), AMI 10 mg/kg e AMI50 mg/kg, por via intraperitoneal. Foram analisados os seguintes parâmetros: latência para primeira convulsão e tempo de Morte, ambos registrados em segundos.

Os resultados demonstraram que nos dois parâmetros estudados, Latência da primeira convulsão e tempo de morte, a AMI na doses aplicadas não diferiu significativamente do grupo controle conforme mostra a **Figura 18**.

Figura 18. Efeito anticonvulsivante da AMI no modelo de convulsão induzido por estricnina em camundongos (protocolo agudo por via intraperitoneal)



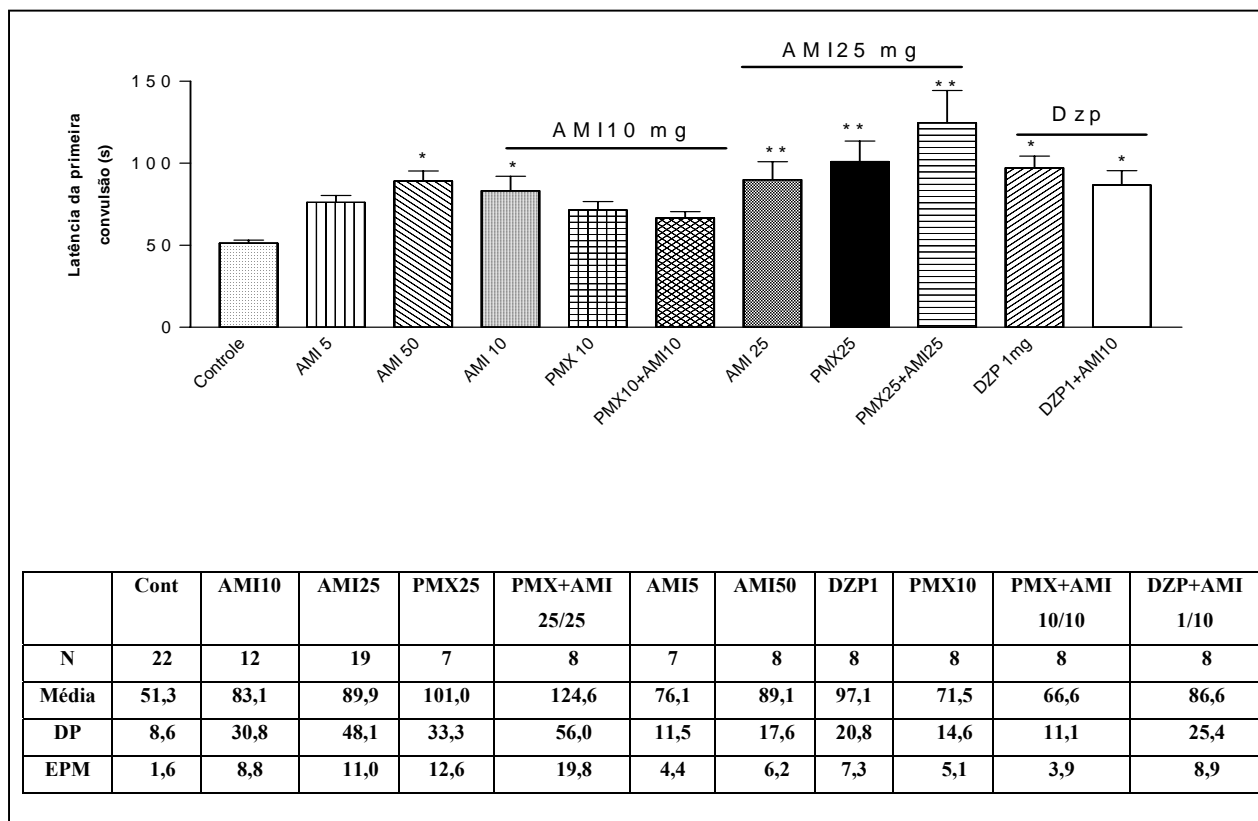
As barras representam a média \pm EPM do número de animais por grupo que foi de 8 a 12 animais. ANOVA seguido de *Dunnnett* como teste *post hoc* comparado ao grupo controle, tratado com Tween 80 a 0,5%. Para Latência para Primeira Convulsão temos $F = 2,872$ e $q = 2,083$ para Controle vs AMI 10 e Controle vs AMI 50 = 2,068. Para Tempo de Morte temos $F = 0,1653$ e $q = 0,5281$ para Controle vs AMI 10 e Controle vs AMI 50 = 0,4556. N= número de animais por grupo, DP = desvio padrão e EPM = erro padrão da média.

5.2.4 Avaliação do envolvimento de proteínas quinases na atividade anticonvulsivante da AMI, utilizando a polimixina B.

Para uma melhor compreensão do mecanismo de ação anticonvulsivante da AMI, foi utilizado um inibidor de proteína quinase, a polimixina B, onde a mesma foi administrada isoladamente e em conjunto com a AMI em diversas concentrações diferentes no modelo de convulsões induzidas por PTZ por via intraperitoneal, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os animais foram tratados e separados nos seguintes grupos: Controle (Tween 80 a 0,5%), AMI 5 mg/kg, AMI 10 mg/kg, AMI 25 mg/kg, AMI 50 mg/kg, polimixina 10.000 ui/kg (PMX 10), polimixina 25.000 ui/kg (PMX 25), AMI 10 + PMX 10, AMI 25 + PMX 25, Diazepam 1 mg/kg, DZP 1 + AMI 10. O diazepam foi utilizado como controle positivo. Os parâmetros avaliados foram: Latência para primeira convulsão e tempo de morte.

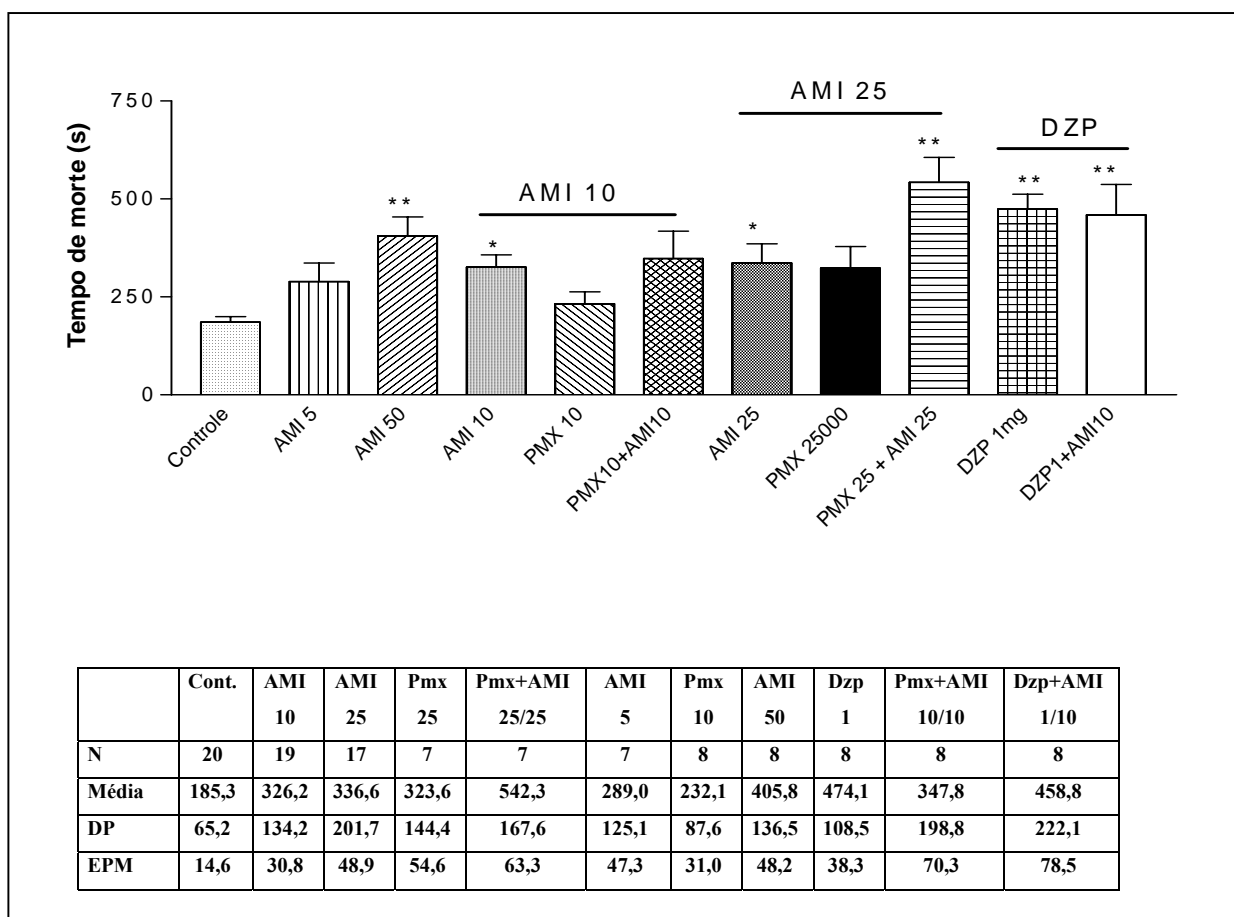
A AMI 5mg/kg apresentou-se diferente em relação ao grupo controle, mostrando que nesta dose não há atividade anticonvulsivante, porém nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg o efeito foi significativo nos dois parâmetros estudados. Os animais tratados somente com polimixina não tiveram proteção significativa na dose de 10.000 ui/kg. Quando administrado associado com a AMI, a polimixina na dose mais baixa não sofreu nenhuma diferença em relação às duas drogas isoladamente. Quando as doses administradas conjuntamente foram de polimixina 25.000 ui/kg e AMI 25 mg/kg, a proteção resultante foi maior que nos grupos tratados com as drogas isoladamente, principalmente no parâmetro tempo de morte, onde tivemos um aumento de aproximadamente 40% no grupo PMX 25 + AMI 25 em relação aos grupos PMX 25 e AMI 25. O diazepam sozinho na dose administrada mostrou-se eficaz em aumentar a latência para primeira convulsão e o tempo de morte comparado ao controle quando administrado junto com a AMI estes efeitos não foram alterados indicando potencialização. Os resultados deste experimento estão registrados na **Figura 19 e 20**.

Figura 19. Avaliação do envolvimento de proteínas quinases no efeito anticonvulsivante da AMI. O parâmetro observado foi a latência para primeira convulsão no modelo de convulsão induzido por PTZ em camundongos, via intraperitoneal.



As barras representam a média \pm EPM do número de animais por grupo que foi de 7 a 22 animais. ANOVA seguido de *Dunnett* como teste *post hoc* comparado ao grupo controle, tratado com Tween 80 a 0,5%. Para Latência para Primeira Convulsão temos $F = 4,839$ e $q = 1,887$ para Controle vs AMI 5; Controle vs AMI 10 = 2,929; Controle vs AMI 25 = 4,067; Controle vs AMI 50 = 3,023; Controle vs PMX 10 = 1,612; Controle vs PMX 25 = 3,781; Controle vs DZP 1 = 3,664; Controle vs PMX10+AMI10 = 1,222; Controle vs PMX25+AMI25 = 5,866 e Controle vs DZP1+AMI10 = 2,823. N= número de animais por grupo, DP = desvio padrão e EPM = erro padrão da média.

Figura 20. Avaliação do envolvimento de proteínas quinases no efeito anticonvulsivante da AMI. O parâmetro observado foi a latência de morte no modelo de convulsão induzido por PTZ em camundongos, via intraperitoneal.



As barras representam a média \pm EPM do número de animais por grupo que foi de 7 a 20 animais. ANOVA seguido de *Dunnnett* como teste *post hoc* comparado ao grupo controle, tratado com Tween 80 a 0,5%. Para Tempo de Morte temos $F = 5,317$ e $q = 1,593$ para Controle vs AMI 5; Controle vs AMI 10 = 2,967; Controle vs AMI 25 = 3,093; Controle vs AMI 50 = 3,554; Controle vs Pmx 10 = 0,7555; Controle vs Pmx 25 = 2,124; Controle vs DZP 1 = 4,656; Controle vs pmx10+AMI10 = 2,619; Controle vs Pmx25+AMI25 = 5,481 e Controle vs DZP1+AMI10 = 4,408. N= número de animais por grupo, DP = desvio padrão e EPM = erro padrão da média.

5.2.5 Avaliação do envolvimento de proteína quinase C na atividade anticonvulsivante da amirina, utilizando a estaurosporina.

Para uma melhor compreensão do mecanismo de ação anticonvulsivante da AMI, utilizamos também um outro inibidor de proteína quinase, mais específico para PKC, a estaurosporina, onde a mesma foi administrada isoladamente e em conjunto com a AMI em diversas concentrações diferentes no modelo de convulsões induzidas por PTZ por via intraperitoneal, conforme descrito em Materiais e Métodos. Os animais foram tratados e separados nos seguintes grupos: Controle (Tween 80 a 0,5%), AMI 5 mg/kg, AMI 10 mg/kg, AMI 25 mg/kg, AMI 50 mg/kg, estaurosporina 3 µg/kg (STP 3), AMI 5 + STP 3, AMI 10 + STP 3 e AMI 25 + STP 3. Os parâmetros avaliados foram: latência para primeira convulsão e tempo de morte.

A AMI 5 mg/kg, não produziu nenhuma proteção significativa nos dois parâmetros estudados. A AMI 10 e 25 mg/kg administrada isoladamente mostrou diferença significativa em relação ao grupo controle com aumento de 28 e 34 % respectivamente para o parâmetro latência para primeira convulsão e 28 e 65% respectivamente para o parâmetro tempo de morte. A estaurosporina isoladamente produziu aumento de 20 e 64%, respectivamente, para os parâmetros latência para primeira convulsão e tempo de morte.

Quando foram analisados os grupos que receberam as duas drogas associadas (AMI e STP) foi observado um aumento e, portanto efeito protetor anticonvulsivante. As associações AMI 5 + STP 3 aumentou em 37 e 92%, a AMI 10 + STP 3 aumentou em 45 e 102 % e a AMI 25 + STP 3 aumentou em 63 e 119%, nos parâmetros estudados latência para primeira convulsão e tempo de morte, respectivamente (**Tabela 7**).

Tabela 7. Avaliação do envolvimento de proteína quinase C no efeito anticonvulsivante da AMI, via intraperitoneal, no modelo de convulsão induzida por PTZ em camundongos.

Grupo	Latência para primeira convulsão (s)	Tempo de Morte (s)
Controle	48,6 ±2,5 (12)	136,0 ±16,0 (10)
AMI 5	57,0 ±2,0 (7)	171,5 ±28,1 (8)
AMI 10	62,1 ±1,4* (10)	214,9 ±20,2* (10)
AMI 25	65,3 ±3,8* (7)	224,6 ±15,7* (8)
STP 3	58,2 ±3,6 (12)	223,3 ±31,3* (7)
STP 3 + AMI 25	79,3 ±6,3** (12)	298,6 ±25,8** (8)
STP 3 + AMI 10	70,2 ±3,9** (12)	275,6 ±8,0** (9)
STP 3 + AMI 5	66,4 ±3,5** (12)	262,3 ±15,85** (7)

Os valores são as Médias ± EPM do número de animais por grupo. * p<0,05 e **p<0,01 comparado ao controle no mesmo tempo de reação (ANOVA e *Dunnnett* como teste *post hoc*). Entre parênteses e abaixo dos valores da média, está indicado o número de animais em cada grupo.

5.3 Avaliação de efeitos comportamentais relacionados ao SNC pela mistura acetato de α - e β -amirina (AcAMI) em camundongos

5.3.1 Avaliação da atividade exploratória no teste do campo aberto em protocolo agudo

A ação sedativa do AcAMI em modelo agudo foi determinada através do Teste do Campo Aberto em camundongos por via intra-peritoneal conforme descrito em Materiais e Métodos.

A **Tabela 8** mostra os valores (média \pm EPM) dos parâmetros medidos neste experimento que foram: o movimento exploratório (ME), o *rearing* e o *grooming*. Os animais foram tratados com AcAMI nas doses de 2,5, 5, 10 e 25 mg/kg, i.p. e o controle recebeu Tween 80 a 0,5%.

Neste experimento o AcAMI não teve um efeito expressivo, não sendo capaz de diminuir significativamente o número de cruzamento e o *rearing*, contudo foi significativamente reduzido nas doses de 5, 10 e 25mg/kg com relação ao grupo controle.

Tabela 8. Avaliação da atividade exploratória do AcAMI no teste do campo aberto com protocolo agudo em camundongos

Grupos	Numero de cruzamentos	<i>Grooming</i>	<i>Rearing</i>
Controle	42,0 ± 1,8 (19)	6,1 ± 1,2 (20)	29,9 ± 2,1 (18)
AcAMI 2,5	36,7 ± 2,3 (07) (-12,6)	5,0 ± 0,8 (06) (-18,70)	31,8 ± 4,9 (06) (+6,30)
AcAMI 5,0	32,0 ± 1,5*(07) (-23,80)	3,8 ± 0,8(06)* (-37,72)	27,1 ± 3,1 (06) (-9,25)
AcAMI 10	45,6 ± 3,9 (07) (+8,50)	2,3 ± 0,4 (06)* (-62,11)	32,8 ± 2,1 (06) (+9,65)
AcAMI 25	37,4 ± 1,8 (07) (-10,9)	2,1 ± 0,5 (06)* (-64,90)	31,5 ± 3,0 (06) (+5,21)

Experimento realizado após tratamento agudo (administrado o AcAMI 30 min antes de colocar os animais no aparelho por via intraperitoneal como descrito em materiais e métodos). Valores são Médias ± EPM do número de animais por grupo, assinalado em parênteses. Abaixo das médias e também entre parênteses estão indicadas as alterações em termos percentuais em relação ao controle. * p<0,05 comparado ao controle no mesmo tempo de reação (ANOVA e *Dunnett* como teste *post hoc*).

5.3.2 Avaliação da atividade exploratória de AcAMI no teste do campo aberto após protocolo sub-crônico em camundongos

A ação sedativa do AcAMI em modelo sub-crônico foi determinada através do Teste do Campo Aberto em camundongos por via intra-peritoneal conforme descrito Materiais e Métodos.

A **Tabela 9** mostra os valores (média \pm EPM) dos parâmetros medidos neste experimento que foram: o movimento exploratório (ME), o *rearing* e o *grooming*. Os animais foram tratados com AcAMI nas doses de 10 e 25 mg/kg, i.p. e o controle recebeu tween 80 a 0,5%. Diazepam 1 mg/kg, i.p. foi utilizado como controle positivo.

Neste experimento diferente do tratamento agudo o AcAMI teve um efeito maior no número de cruzamentos (ME) com reduções significantes de 25 e 56% respectivamente para as doses de 10 e 25 mg/kg. O *grooming* foi reduzido em 41 e 57 % e o *rearing* uma redução de 44 e 27 %, para as doses de 10 e 25 mg/kg. O diazepam reduziu os três parâmetros analisados de forma significativa em relação ao controle.

Tabela 9. Avaliação da atividade exploratória do AcAMI no teste do campo aberto após protocolo sub-crônico em camundongos

Grupos	Número de cruzamentos	Grooming	Rearing
Controle, 7d	53,6 ± 2,5 (12)	8,2 ± 0,9 (11)	35,6 ± 1,3 (10)
AcAMI 10 7d	40,2 ± 1,3** (08) (-25)	4,3 ± 0,6** (09) (-47,5)	19,6 ± 2,7* (09) (-44,9)
AcAMI 25 7 d	39,4 ± 3,9** (05) (-26,5)	3,8 ± 0,8** (06) (-53,6)	25,8 ± 2,1* (06) (-27,5)
DZP 1 7d	23,8 ± 0,9** (10) (-55,6)	3,4 ± 0,8** (10) (-58,5)	26,0 ± 2,0* (06) (-26,9)

Experimento realizado em tratamento crônico de 7 dias por via intraperitoneal como descrito em materiais e métodos. Valores são Médias ± EPM do número de animais por grupo. * p<0,05 comparado ao controle no mesmo tempo de reação (ANOVA e *Dunnet* como teste *post hoc*). O valor entre parênteses abaixo da média, refere-se ao percentual de inibição em relação ao controle. ME = movimento exploratório. DZP = diazepam.

5.3.3 Avaliação da atividade ansiolítica do AcAMI no teste do labirinto em cruz elevado, após administração em camundongos

A ação ansiolítica do AcAMI em experimento agudo foi determinada através do Teste do *Plus Maze* em camundongos por via oral conforme descrito em Materiais e Métodos. Os animais foram tratados com AcAMI nas doses de 2,5, 5, 10 e 25 mg/kg, i.p. e o controle recebeu Tween 80 a 0,5%.

Conforme os resultados apresentados neste modelo, o AcAMI aumentou em 81% o número de entradas nos braços abertos (NEBA) na dose de 25 mg/kg de forma significativa em relação ao controle. O Tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) foi aumentado de forma significativa em relação ao controle em 88 e 97% nas doses de 10 e 25 mg/kg, respectivamente. O parâmetro Número de entradas nos braços fechados (NEBF) foi reduzido pelo o AcAMI de forma significativa na dose de 25 mg/kg em 38%, e no tempo de permanência nos braços fechados (TPBF) sofreu também redução significante de 42 e 46%, respectivamente para as doses de 10 e 25 mg/kg. As doses de 2,5 e 5 mg/kg não foram significantes quando comparadas ao controle. Estes resultados são mostrados na **Tabela 10**.

Tabela 10. Avaliação da atividade ansiolítica do AcAMI no teste do labirinto em cruz elevado em protocolo agudo

	NEBA	NEBF	TPBA	TPBF
Controle, 1h	4,4 ± 0,2 (20)	7,3 ± 0,4 (20)	88,4 ± 7,3 (20)	157,7 ± 6,8 (20)
AcAMI 2,5 1h	4,5 ± 0,7(08) (+2,3)	7,5 ± 1,2 (08) (+2,1)	81,7 ± 12,2 (08) (-7,6)	166,4 ± 6,8 (08) (+5,5)
AcAMI 5 1h	5,87 ± 0,8(08) (+33,4)	6,7 ± 0,7 (08) (-8,16)	114,3 ± 19,1 (08) (+29,2)	137,1 ± 16,3 (08) (-13,1)
AcAMI 10 1h	6,12 ± 0,5(08) (+39,1)	5,8 ± 0,5 (09) (-20,0)	166,5 ± 9,6** (08) (+88,2)	91,5 ± 7,5** (09) (-41,9)
AcAMI 25 1h	8,0 ± 0,4** (08) (+81,8)	4,5 ± 0,5** (09) (-38,1)	174,3 ± 12,5** (10) (+97,1)	85,8 ± 9,9** (09) (-45,60)

Experimento realizado tratando os animais por via oral 1 hora antes de colocá-los no aparelho conforme descrito em materiais e métodos. Valores são Médias ± EPM do número de animais por grupo. * p<0,05 e **p<0,01 comparado ao controle no mesmo tempo de reação (ANOVA e *Dunnnett* como teste *post hoc*). Entre parênteses e ao lado do EPM está indicado o número de animais em cada grupo. Abaixo das médias e também entre parênteses estão indicadas as alterações em termos percentuais em relação ao controle.

5.3.4 Avaliação da atividade ansiolítica no teste do labirinto em cruz elevado em protocolo sub-crônico

A ação ansiolítica do AcAMI em protocolo sub-crônico foi determinada através do Teste do Plus Maze em camundongos por via intra-peritoneal conforme descrito em Materiais e Métodos. Os animais foram tratados com AMI nas doses de 10 e 25 mg/kg, i.p., o controle recebeu Tween 80 a 0,5% e o diazepam na dose de 1mg/kg foi utilizado como controle positivo.

Conforme os resultados apresentados neste modelo, o AcAMI aumentou o número de permanência nos braços abertos (NEBA) na dose de 25 mg/kg de forma significativa em relação ao controle. O Tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e o número de entradas nos braços abertos (NEBA) foram aumentados de forma significativa em relação ao controle nas duas doses testadas, com 10 mg/kg o NEBA aumentou 54% e o TPBA 60% com a dose de 25 mg/Kg o NEBA aumentou 24% e o TPBA 50%. Os parâmetros número de entradas nos braços fechados (NEBF) e tempo de permanência nos braços fechados (TPBF) foram reduzidos também significativamente com as doses utilizadas, com 10 mg/kg o NEBF foi reduzido em 44,6% e o TPBF 32,6%, já com a dose de 25 mg/kg o NEBF foi reduzido 30% e o TPBF 35,6%. O diazepam foi significante em relação ao controle em todos os parâmetros avaliados neste estudo. Estes resultados são mostrados na **Tabela 11**.

Tabela 11. Avaliação da atividade ansiolítica do AcAMI no teste do labirinto em cruz elevado em protocolo sub-crônico

	NEBA	NEBF	TPBA	TPBF
Controle, 7d	5,4 ± 0,4 (08)	8,8 ± 0,5 (10)	103,4 ± 11,3 (09)	148,2 ± 9,0 (10)
AcAMI 10 7d	8,3 ± 0,6* (07) (+54,2)	4,9 ± 0,7* (08) (-44,6)	165,1 ± 20,5** (06) (+59,6)	99,8 ± 17,8* (08) (-32,6)
AcAMI 25 7 d	6,6 ± 0,8 (06) (+24,2)	6,1 ± 0,9* (06) (-30)	154,7 ± 13,6* (06) (+49,6)	95,4 ± 8,7* (05) (-35,6)
DZP 1 7d	9,0 ± 0,8** (08) (+67,5)	4,5 ± 0,6** (08) (-48,8)	212 ± 8,5** (07) (+105,02)	57,5 ± 10,9** (08) (-61,2)

Experimento realizado tratando-se os animais por via intraperitoneal durante 7 dias conforme descrito em materiais e métodos. Valores são Médias ± EPM do número de animais por grupo. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ comparado ao controle no mesmo tempo de reação (ANOVA e *Dunnnett* como teste *post hoc*). Entre parênteses e ao lado do Erro está indicado o número de animais em cada grupo. Abaixo das médias e também entre parênteses estão indicadas as alterações em termos percentuais em relação ao controle.

5.3.5 Avaliação da atividade anticonvulsivante do AcAMI no modelo de convulsão induzido por PTZ em camundongos em protocolo agudo

A avaliação do efeito anticonvulsivante do AcAMI foi estudada neste modelo utilizando como agente pró-convulsivante, o Pentilenotetrazol (PTZ). Os animais foram divididos em grupos de 6 a 25 animais onde foram divididos e tratados da seguinte maneira: Por via intraperitoneal: controle (Tween 80 a 0,5 %); AcAMI 2,5; AcAMI 5 mg/kg; AcAMI 10 mg/kg e AcAMI 25 mg/kg. Por via oral: controle (Tween 80 a 0,5%); AcAMI 10 e AcAMI 25 mg/kg. Foram analisados os seguintes parâmetros: Latência para primeira convulsão e Tempo de Morte, ambos registrados em segundo.

Os resultados demonstraram que o AcAMI na dose de 2,5 mg/kg não se comportou de modo diferente do grupo controle nos dois parâmetros estudados. A dose 5 mg/kg modificou os parâmetros estudados aumentando-os em 42 e 59%, respectivamente para latência para primeira convulsão e tempo de morte. A dose de 10 mg/kg provocou aumento significativo da ordem de 61 e 97 % respectivamente para latência para primeira convulsão e para o tempo de morte. E por último a dose de 25 mg/kg aumentou significativamente em 79 e 127 % respectivamente para latência para primeira convulsão e para tempo de morte.

Por via oral o AcAMI nas duas doses testadas conferiu proteção aos camundongos. Na latência para primeira convulsão as doses de 10 e 25 mg/kg aumentaram este parâmetro em 56 e 77 %, respectivamente. No tempo de morte os aumentos foram de 75 e 93 %, respectivamente para as doses referidas, os resultados estão detalhados na **Tabela 12**.

Tabela 12. Avaliação da atividade anticonvulsivante do AcAMI, no modelo de convulsão induzido por PTZ em camundongos em protocolo agudo.

	Latência da primeira convulsão (s)	%	Tempo de Morte (s)	%
Controle, i.p	53,2 ± 1,9 (25)		185,3 ± 14,5 (20)	
AcAMI 2,5 mg/kg, i.p.	61,2 ± 8, (08)	+15,0	238,3 ± 54,9 (08)	+28,6
AcAMI 5 mg/kg, i.p.	75,3 ± 16,9 (08)	+41,5	294,8 ± 60,8 (08)	+59,1
AcAMI 10 mg/kg, i.p	85,9 ± 6,2* (16)	+61,4	364,9 ± 43,5* (16)	+96,9
AcAMI 25 mg/kg, i.p	95,3 ± 10,4* (10)	+79,1	420,9 ± 31,9* *(10)	+127,2
Controle, v.o	57,4 ± 4,0 (07)		193,7 ± 37,35 (06)	
AcAMI 10 mg/kg, v.o	90,0 ± 9,2 (07)	+56,8	338,6 ± 49,1* (08)	+74,8
AcAMI 25 mg/kg, v.o	101,7 ± 16,1* (07)	+77,17	373,4 ± 42,8* (07)	+92,7

Os dados representam a média ± EPM. Em parênteses está descrito o número de animais. O percentual indica o aumento em relação ao controle. $p < 0,05$, ANOVA seguido do teste de *Dunnett* comparado com o grupo tratado com Tween 80 a 0,5%.

5.3.6 Avaliação da atividade anticonvulsivante do AcAMI, no modelo de convulsão induzido por pilocarpina em camundongos

A avaliação do efeito anticonvulsivante do AcAMI foi estudada neste modelo utilizando como agente químico pró-convulsivante, a pilocarpina. Os animais foram divididos em grupos de 8 a 12 animais e foram tratados da seguinte maneira: controle (Tween 80 a 0,5 %), AcAMI 10 mg/kg, AcAMI 25 mg/kg e AcAMI 50 mg/kg, por via intraperitoneal. Foram analisados os seguintes parâmetros: Latência da primeira convulsão e Tempo de Morte, ambos registrados em segundo.

Os resultados demonstraram que nos dois parâmetro estudados latência da primeira convulsão e latência de morte as dose de AcAMI 10 e 25 mg/kg não provocou nenhuma alteração significativa. A dose de 50 mg/kg, porém conferiu proteção aos camundongos tratados no que se refere aos dois parâmetros analisados de forma significativa em relação ao controle, conforme mostra a **Tabela 13**.

Tabela 13. Avaliação da atividade anticonvulsivante do AcAMI no modelo de convulsão induzido por pilocarpina em camundongos

	Latência da primeira convulsão (s)	%	Tempo de Morte (s)	%
Controle, i.p	190,0 ± 19,2 (12)		321,8 ± 38,4 (10)	
AcAMI 10 mg/kg, i.p	192,6 ± 16,7 (8)	+1,36	282,4 ± 29,0 (08)	-12,24
AcAMI 25 mg/kg, i.p	222,6 ± 28,8 (09)	+17,15	395,0 ± 42,5 (08)	+22,74
AcAMI 50 mg/kg, i.p	326,0 ± 25,8**(11)	+71,57	529,4 ± 39,5**(11)	+64,5

Os dados representam a média ± EPM. Em parênteses está descrito o número de animais. O percentual indica o aumento ou diminuição em relação ao controle. **p< 0,01, ANOVA seguido do teste de *Dunnnett* comparado com o grupo tratado com tween 80 a 0,5%.

5.3.7 Avaliação do efeito do AcAMI no tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos

A ação hipnótica do AcAMI foi determinada através do teste da indução de sono por pentobarbital em camundongos, conforme descrito em materiais e métodos.

A **Tabela 14** mostra os valores (média \pm EPM) do tempo de sono manifestado pelos animais, referentes aos grupos controle e tratados com AcAMI nas doses de 10 e 25 mg/kg, v.o. e também nas doses de 10 e 25 mg/kg, i.p. Os valores de inibição, expressos em percentagem, em relação ao controle, relativos a cada uma das doses de AMI testadas, são também apresentados.

AMI nas doses de 10 e 25 mg/kg, tanto por via oral assim como por via intraperitoneal mostrou efeitos no prolongamento do tempo de sono de camundongos induzido por pentobarbital. O aumento no tempo de sono foi de 54 e 67 % para as doses de 10 e 25 mg/kg em animais tratados por via oral e para os camundongos tratados por via intraperitoneal o aumento foi de 37 e 35 %, respectivamente para as dose de 10 e 25 mg/kg.

Tabela 14. Avaliação do efeito do AcAMI no tempo de sono induzido por pentobarbital em camundongos

	Tempo de sono	%
Controle, i.p	52,4 ± 5,4 (12)	
AcAMI 10 mg/kg, i.p	71,9 ± 5,0* (11)	+37,1
AcAMI 25 mg/kg, i.p	70,6 ± 4,7* (12)	+34,6
Controle, v.o	48,5 ± 4,1 (13)	
AcAMI 10 mg/kg, v.o	74,6 ± 7,4** (14)	+53,7
AcAMI 25 mg/kg, v.o	80,9 ± 4,0** (14)	+66,8

Os dados representam a média ± EPM. Em parênteses está descrito o número de animais. O percentual indica o aumento em relação ao controle. $p < 0,05$, ANOVA seguido do teste de *Dunnnett* comparado com o grupo tratado com tween 80 a 0,5%.

ESTUDOS BIOQUÍMICOS

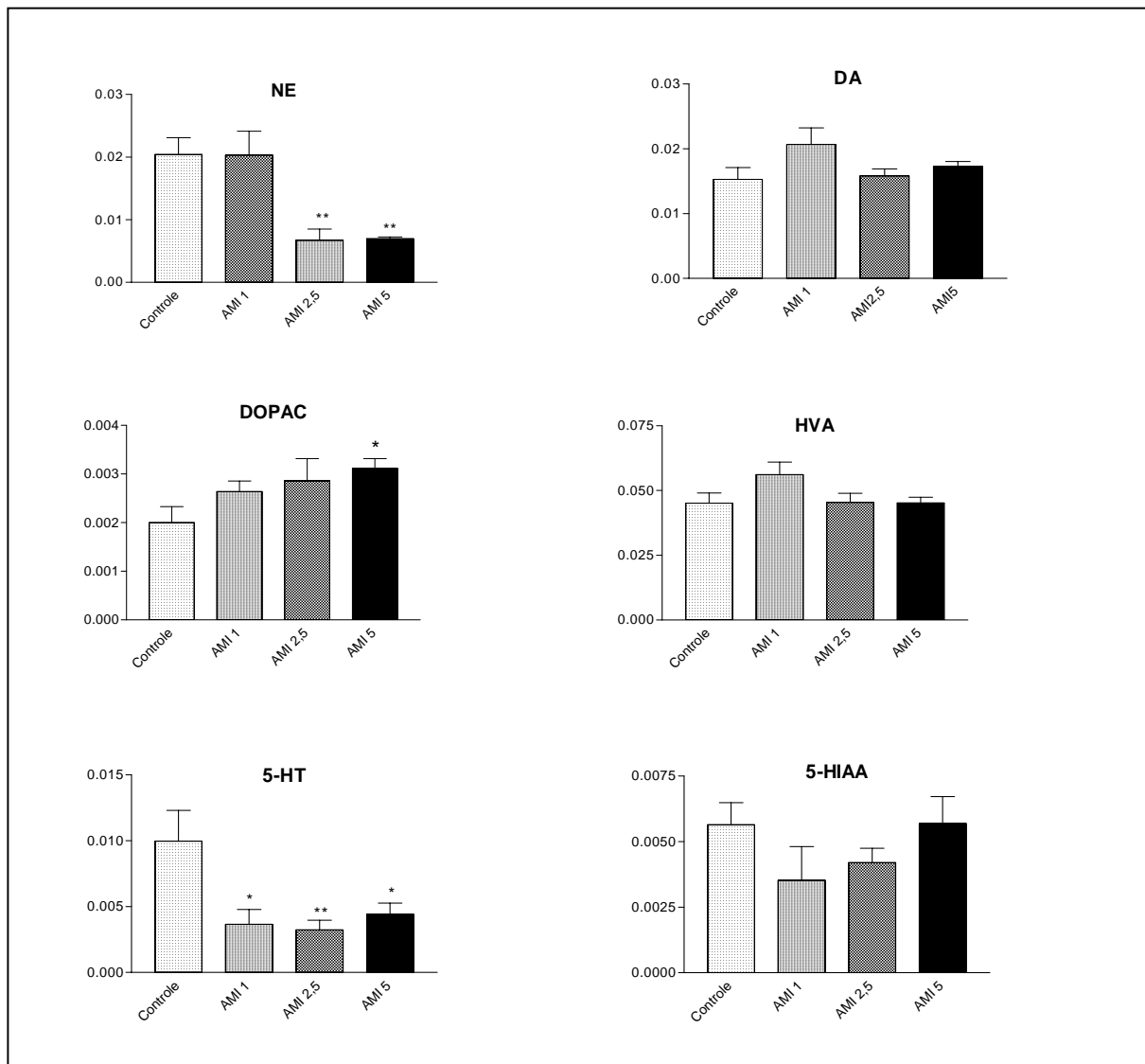
5.4 Determinação das concentrações de AA e de monoaminas hipocampo e núcleos da base em camundongos após o tratamento com AMI (experimento *ex vivo*)

5.4.1 Doseamento realizado através de HPLC de monoaminas em homogenatos de córtex cerebral de camundongos tratados com AMI

Os animais foram tratados com AMI em doses de 1,0; 2,5 e 5,0 mg/kg por via intraperitoneal e depois de 30 minutos foram sacrificados por deslocamento cervical, imediatamente foi dissecado e retirado o córtex cerebral que foi pesado e congelado a – 70 °C até o seu uso, conforme descrito em materiais e métodos.

Os resultados mostraram que a AMI interferiu nas concentrações de monoaminas cerebrais de forma significativa. A noradrenalina sofreu redução de 67 e 66 % nas doses de 2,5 e 5,0 mg/kg, respectivamente. A dose de 1,0 mg/kg não alterou de forma significativa a concentração desta monoamina. A serotonina também foi diminuída de forma significativa nas doses de 1,0; 2,5e 5,0 mg/kg em 63, 68 e 56%, respectivamente. O DOPAC teve um pequeno aumento atingindo níveis de significância estatística na dose de 5,0 mg/kg. As concentrações de dopamina, HVA e 5-HIAA não sofreram nenhuma alteração significativa após a administração aguda da AMI (**Figura 21**).

Figura 21. Doseamento realizado através de HPLC de monoaminas em homogenatos de córtex cerebral de camundongos tratados com AMI



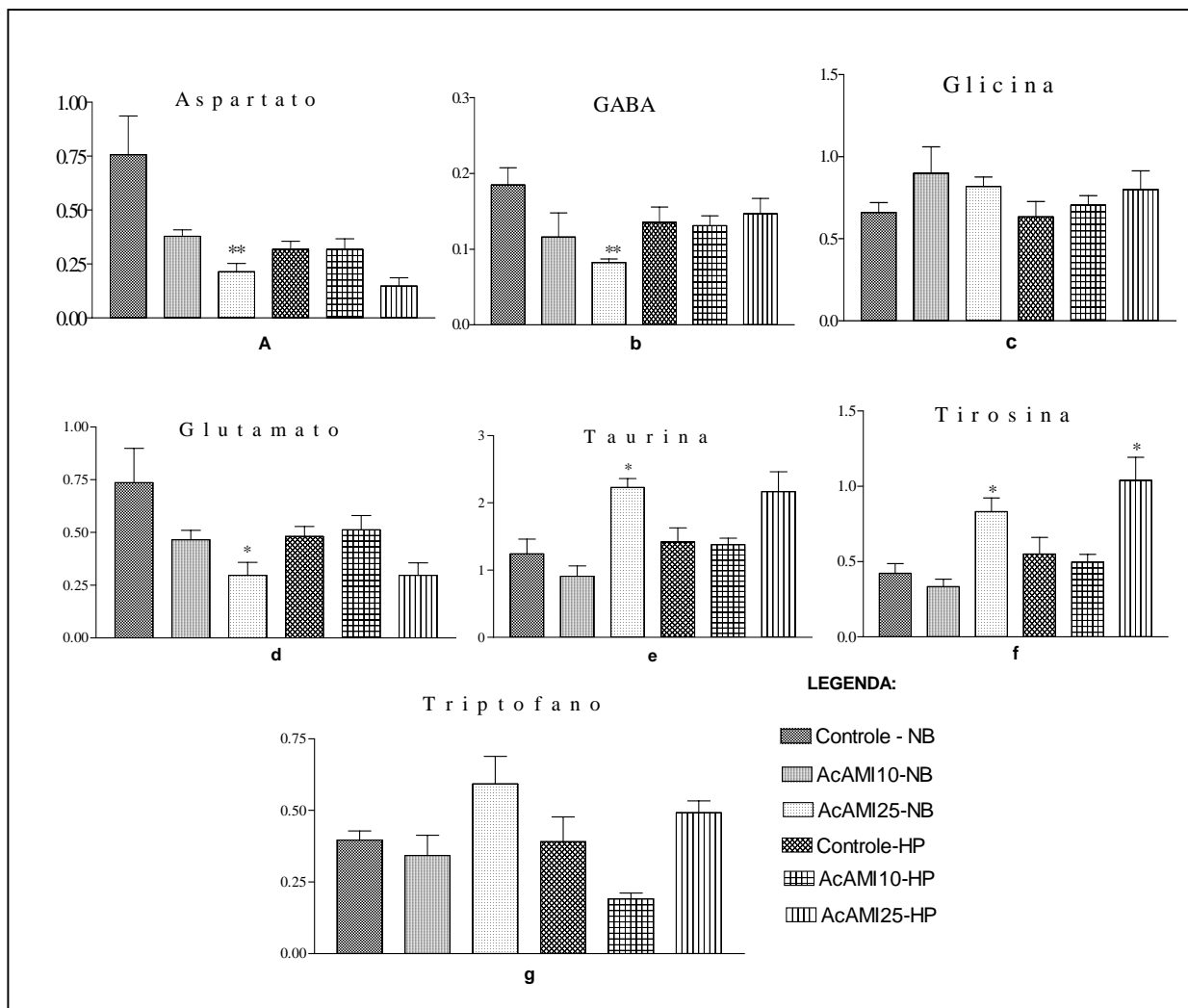
Os grupos contêm de 5 a 14 animais. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$; ANOVA seguido do teste de *Tukey* como teste *post hoc*, comparado ao grupo controle (tratado com Tween 80 a 0,5%). NE = noradrenalina; DA = dopamina; DOPAC = Ácido 3,4 dihidroxifenilacético; HVA = Ácido 3-metoxi-4-hidroxi-fenilacético; 5-HT = Serotonina e 5-HIAA = Ácido 5-hidroxiindolacético. Os valores da coluna Y são expressos em µg/g de tecido.

5.4.2 Determinação das concentrações de aminoácidos por HPLC em núcleos da base e hipocampo de camundongos tratados com AcAMI (experimento *ex vivo*)

Os animais foram tratados por 7 dias com AcAMI , quando foram então sacrificados por deslocamento cervical após 30 minutos da última dose. Os núcleos da base e o hipocampo foram dissecados e armazenados a – 70°C até a utilização para a determinação de aminoácidos através de HPLC, conforme descrito em materiais e métodos.

Na dose de 25 mg/kg AcAMI i.p. por 7 dias alterou as concentrações de alguns dos aminoácidos estudados. No hipocampo o AcAMI na dose de 25 mg/kg apenas modificou de forma significativa a tirosina, provocando um aumento de 89% na concentração deste aminoácido, os demais aminoácidos não sofreram alterações significativas. No núcleo da base o AcAMI na dose de 25 mg/kg provocou alterações mais complexas, enquanto tivemos um aumento significativo nas concentrações de tirosina e taurina da ordem de 97 e 79 %, respectivamente, tivemos também uma diminuição nas concentrações de aspartato, GABA e glutamato na ordem de 72, 55 e 60%, respectivamente. Triptofano e glicina não sofreram alterações significantes nesta área cerebral, os detalhes destes resultados estão mostrados na **Figura 22**.

Figura 22. Doseamento realizado através de HPLC de aminoácidos em homogenatos de núcleos da base e hipocampo de camundongos tratados com AcAMI



Grupos de 5 a 14 animais. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$; ANOVA seguido do teste de *Tukey* como teste *post hoc*, comparado ao grupo controle (tratado com Tween 80 a 0,5%). AcAMI = acetato de alfa e beta amirina, NB = nucleo da base e HP = hipocampo. 10 e 25 = Doses de 10 e 25 mg/kg, i.p. Os valores da coluna Y são expressos em µg/g de tecido.

5.4.3 Doseamento realizado através de HPLC de aminoácidos em homogenatos de áreas cerebrais (núcleos da base e hipocampo) de camundongos tratados com AMI.

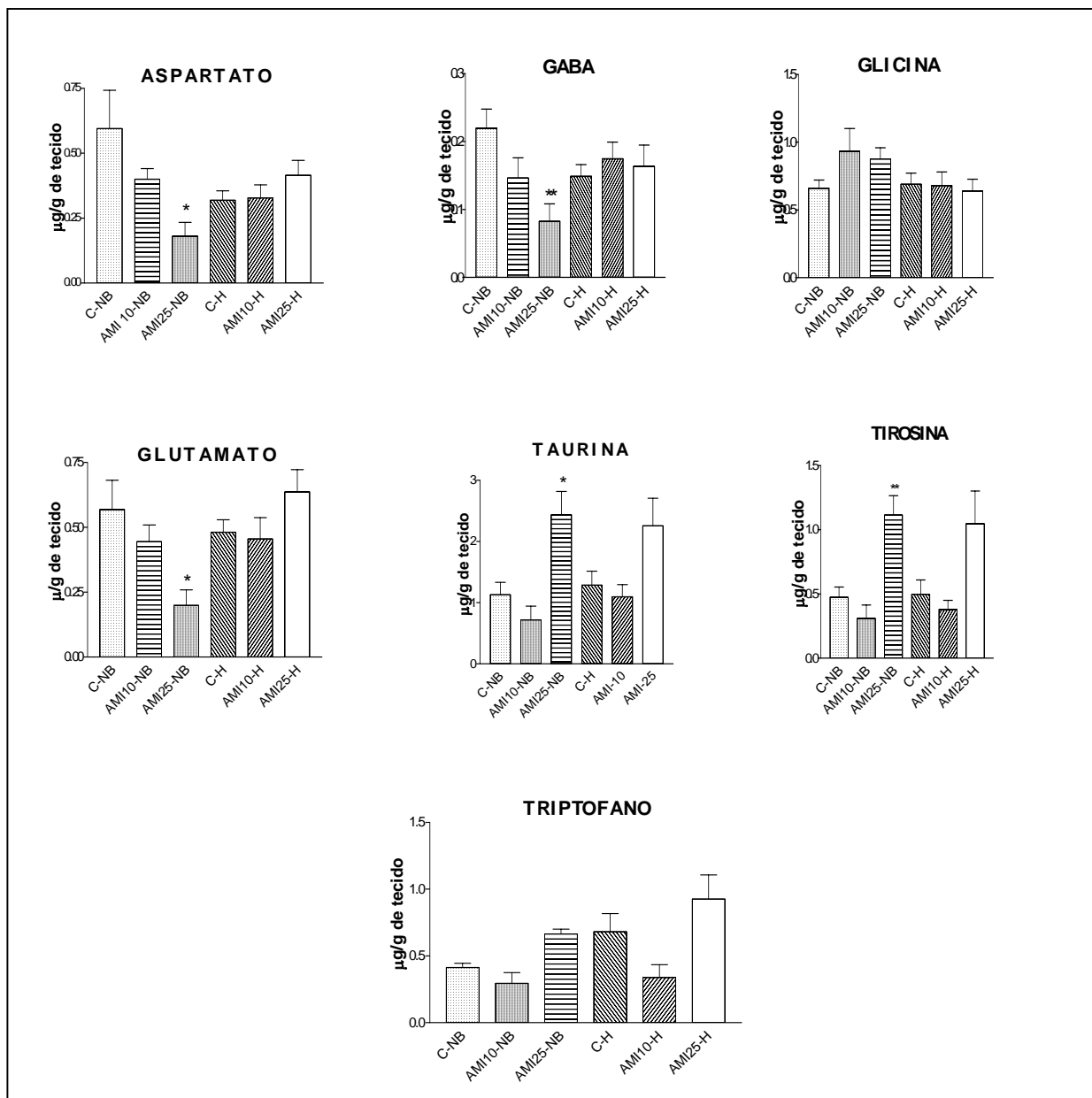
Os animais foram tratados por 7 dias com AMI onde foram sacrificados por deslocamento cervical após 30 minutos da última dose. Os núcleos da base e o hipocampo foram dissecados e armazenados a -70°C até a utilização na determinação de aminoácidos através de HPLC, conforme descrito em materiais e métodos.

A dose de 10 mg/kg de AMI, não provocou alteração significativa nas concentrações dos aminoácidos estudados. A dose de 25 mg/kg a AMI i.p. por 7 dias alterou as concentrações de alguns dos aminoácidos estudados.

No hipocampo a AMI na dose de 25 mg/kg apenas modificou de forma significativa a tirosina, provocando um aumento de 110 % na concentração deste aminoácido, os demais aminoácidos não sofreram alterações significativas.

No núcleo da base a AMI na dose de 25 mg/kg provocou alterações mais complexas, enquanto tivemos um aumento significativo nas concentrações de tirosina e taurina da ordem de 135 e 117 %, respectivamente, tivemos também uma diminuição nas concentrações de aspartato, GABA e glutamato na ordem de 70, 62 e 65%, respectivamente. Triptofano e glicina também não sofreram alterações significantes nesta área cerebral, os detalhes deste experimento estão mostrados na **Figura 23**.

Figura 23. Doseamento realizado através de HPLC de aminoácidos em homogenatos de áreas cerebrais de camundongos tratados com AMI.



Grupos de 5 a 14 animais. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$; ANOVA seguido do teste de *Tukey* como teste *post hoc*, comparado ao grupo controle (tratado com Tween 80 a 0,5%). C = controle, AMI = alfa e beta amirina, NB = núcleos da base e H = hipocampo. 10 e 25 = Doses de 10 e 25 mg/kg, i.p.

6. DISCUSSÃO

6.1 Efeitos sedativos, ansiolíticos e antidepressivos da AMI.

Efeitos sedativos e ansiolíticos da AMI

Moléculas classificadas como triterpênicas como a mistura de alfa e beta amirina são em grande maioria já comprovadamente dotadas de atividade farmacológica, entre estas atividades destacam-se as ações no sistema nervoso central. Ações sedativas são encontradas em outros triterpenos presentes, por exemplo, na *Glaphinia glauca* e *Centella asiatica*, como foi demonstrado no teste de labirinto em cruz elevado em roedores. Os constituintes ativos da *C. asiatica* são essencialmente compostos triterpenóides similar a AMI. Estes triterpenos exibem atividade ansiolítico diminuindo a ansiedade que talvez possa estar associado a mecanismos colinérgicos, embora, o extrato da *C. asiatica* demonstrou exercer aumento nos níveis de GABA em cérebros de rato (Chatterjee et al, 1992; Brinkhaus et al, 2000; Herrera-Ruiz et al, 2005; Wijeweera et al, 2006).

Em outro estudo recente realizado com o ácido ursólico, um triterpeno, extraído da *Nepeta sibthorpii* mostrou que após administração oral de 2,3 mg/kg, provocou redução na capacidade motora de camundongos exercendo forte efeito depressor do SNC, assim como diminuiu a número de letalidade no teste de convulsão induzido por PTZ (Taviano et al, 2007).

O campo aberto foi desenvolvido por Hall (1934) para o estudo da emocionalidade em ratos. O aparelho original consiste de uma arena circular bem iluminada com aproximadamente 1,2 m de diâmetro, circundada por uma parede circular de 0,45 m de altura. Normalmente o procedimento consiste em confrontar o animal com a novidade do ambiente e observar comportamentos como locomoção (número de linhas cruzadas no chão da arena pelo animal), frequência de rearing, tempo de autolimpeza (*grooming*), defecação, tempo gasto para deixar a área central. Os roedores parecem preferir a periferia ao centro do aparelho, normalmente ambulando em contato com as paredes, ou seja, apresentam tigmotaxia. Portanto, assim como no

Labirinto em Cruz Elevado, a tigmotaxia estaria relacionada com a ansiedade no Campo Aberto (Carola et al, 2002; Prut et al, 2003).

Inicialmente, Hall propôs que quando expostos a um ambiente novo, os roedores apresentariam um grau alto de defecação causado por ativação do sistema nervoso autônomo, sendo que inicialmente se propunha que um baixo grau de ambulação também parecia uma resposta de medo dos animais expostos a um ambiente novo. O termo emocionalidade foi utilizado por Hall para expressar o fato de o animal ficar, por exemplo, imóvel quando exposto a um ambiente novo. Nesta linha, vários estudos mostraram uma correlação inversa (negativa) entre ambulação e defecação. Outros autores, entretanto, discordam, já que vários estudos mostraram decréscimo tanto na ambulação quanto na defecação e não uma correlação inversa. Se por outro lado, atividade motora fosse um índice de ansiedade, alta ambulação deveria refletir um baixo grau de ansiedade. Certos benzodiazepínicos, em baixas doses, aumentam a ambulação de animais não familiares com a arena, contudo, da mesma forma como fazem estimulantes motores, que não são ansiolíticos (Carola et al, 2002; Prut et al, 2003).

Tem sido proposto o emprego deste modelo na avaliação da ansiedade, considerando-se que um aumento na ambulação do animal e maior permanência do mesmo na região central seriam indicativos de uma redução da ansiedade. Entretanto, esta proposta tem sido criticada por alguns autores, principalmente pelo fato das medidas avaliadas poderem ser influenciadas por vários fatores outros além da própria ansiedade, como atividade locomotora e exploração. A novidade de uma primeira exposição pode gerar imobilidade ou extrema locomoção na periferia do aparelho (File, 1993)

A diminuição da atividade locomotora é um comportamento relacionado à fuga e normalmente está aumentada quando o animal é colocado em uma situação de estresse, mas é diminuída quando drogas ansiolíticas são administradas. A AMI diminui a atividade locomotora dos animais quando expostos ao teste do campo aberto. Quando esta droga foi administrada por via intraperitoneal e após administração sub-crônica, na qual os camundongos receberam a AMI durante 7 dias seguidos nas doses de 10 e 25 mg/kg. Quando administrado por via oral e de forma aguda a AMI diminuiu a atividade locomotora dos animais nas doses de 25 e 50 mg/kg.

O comportamento de auto-limpeza *grooming* geralmente é aumentado na ansiedade ou presença de medo em roedores e é um índice de adaptação emocional a uma situação de tensão. Drogas ansiolíticas diminuem o *grooming* no teste do campo aberto (Kametani, 1988). A AMI diminuiu o número de *grooming* nas doses de 10 e 25 mg/kg, via i.p, no protocolo sub-crônico, assim como o mesmo efeito foi observado nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg, via oral, quando a droga foi administrada agudamente.

O *rearing* é um aspecto do comportamento exploratório onde o camundongo fica de pé com apenas duas patas é geralmente diminuído quando o animal é colocado diante de uma nova situação ou em condições de stress e pode aumentar quando drogas ansiolíticas são administradas (Johansson and Ahlenius, 1989). Com a administração da AMI em camundongos e colocados no campo aberto para avaliação deste parâmetro, observamos um efeito muito irregular, onde supostamente não haja influência da droga neste parâmetro.

No teste do *rota rod* a AMI via intraperitoneal nas doses que foram de 10 a 50 mg/Kg não causou nenhum déficit muscular ou qualquer alteração na coordenação motora dos animais. Estes dados são reforçados por Oliveira e cols, 2005 que também observou que a AMI não altera a coordenação motora no teste do *rota rod*.

Para melhor esclarecer o efeito sedativo apresentado pela AMI, tanto por via oral como por via i.p., foi utilizado o mesmo modelo do campo aberto associando a AMI e o flumazenil, antagonista competitivo dos receptores BZD, os resultados demonstraram que a AMI nas doses de 10 e 25 mg/kg, via i.p. teve um efeito semelhante ao diazepam e que o flumazenil reverte na mesma proporção tanto os efeitos do diazepam como os efeitos da AMI nas duas doses citadas, sendo estes efeitos observados nos três parâmetros estudados neste modelo do campo aberto (movimento exploratório, *grooming* e *rearing*).

O flumazenil é um derivado imidabenzodiazepina, é um dos vários derivados 1,4-benzodiazepínico com alta afinidade pelo receptor benzodiazepínico que age como antagonista competitivo. Ele é o único antagonista dos receptores benzodiazepínicos utilizado na clínica, onde sua ação consiste em bloquear algumas das ações dos benzodiazepínicos, porém não

antagoniza os efeitos de outros sedativos-hipnóticos no SNC como etanol, opióides e anestésicos gerais. O flumazenil também é utilizado como droga para o diagnóstico de intoxicação pelos benzodiazepínicos. Flumazenil liga-se especificamente aos receptores benzodiazepínicos no cérebro bloqueando os efeitos comportamentais, neurológicos e eletrofisiológicos de vários benzodiazepínicos, mas é desprovido de efeitos farmacológicos (Kleingeist et al, 1998).

Assim, sendo o flumazenil um potente antagonista dos receptores dos benzodiazepínicos, consegue reverter as ações sedativas e outras ações destas drogas tem sido indicado como um antídoto para doses excessivas de benzodiazepínicos, reverteu não somente o efeito do diazepam mas também o efeito da AMI, indicando que estas duas drogas podem apresentar um mecanismo de ação similar que pode envolver os receptores GABA_A onde os benzodiazepínicos possuem um sítio de ligação.

No modelo experimental para avaliação da ansiedade, utilizamos o plus-maze. A ansiedade pode ser caracterizada como a antecipação emocional de uma situação aversiva, de difícil controle e de provável ocorrência. Medo, no entanto, pode ser definido como uma reação a uma situação perigosa real e bem definida e é visto por vários autores como uma entidade independente da ansiedade. Ainda assim, por vezes pode ser difícil uma separação entre as duas. Alguns modelos animais de ansiedade evocam, pela simples exposição do animal a um novo ambiente ou estímulo, comportamentos de medo ou defensivos, análogos a manifestações ansiosas em indivíduos com transtornos de ansiedade. Por exemplo, animais expostos ao labirinto em cruz elevado apresentam um comportamento denominado de avaliação de risco (*risk assessment*), o que pode ser relacionado à hipervigilância, apresentada por indivíduos ansiosos. A avaliação de risco representa uma antecipação de um perigo potencial, sendo um comportamento defensivo de grande valor adaptativo; ainda assim, indivíduos ansiosos parecem mais frequentemente tentar antecipar tal ameaça no intuito de lidar melhor com isto, o que acaba por trazer prejuízos para os mesmos (Ramos et al, 1997; Blanchard et al, 1989).

Um dos modelos mais largamente utilizados na pesquisa da ansiedade em ratos e camundongos, o labirinto em cruz elevado, é baseado em respostas incondicionadas a ambientes potencialmente perigosos. Derivou do trabalho de Montgomery (1955) e a premissa básica é que

ambientes novos evocam curiosidade e medo, criando desta forma, um típico conflito de aproximação/esquiva. Montgomery constatou ainda que ratos apresentavam alto grau de exploração de espaços fechados em comparação aos abertos e numa chance de escolha como num labirinto em Y, preferiam consistentemente os braços fechados. Em seu estudo, Montgomery interpretou a aversão aos braços abertos como sendo gerada pela neofobia (“medo da novidade”, que induziria aversão e curiosidade) e pela elevação do braço aberto (Rodgers et al, 1996).

Os estudos iniciais com o labirinto em cruz-elevado foram realizados por Handley e Mithani quando investigavam uma variedade de agonistas e antagonistas α -adrenérgicos. O aparelho situava-se 70 cm acima do solo e apresentava dois braços fechados, de face um para o outro, e dois braços abertos, também perpendiculares, cada qual medindo 45x 10 cm. Os braços fechados também apresentavam paredes laterais com 10 cm de altura. Os autores constataram que ansiolíticos como diazepam aumentavam a proporção entre entradas nos braços abertos e o total de entradas, ao passo que agentes ansiogênicos como a picrotoxina diminuía esta proporção, concluindo, portanto, que o Labirinto em Cruz Elevado seria um modelo válido de comportamento motivado pelo medo (Handley and Mithani, 1984).

Posteriormente, Lister (1987) validou o modelo para camundongos. Os índices primários de ansiedade no labirinto em cruz elevado eram a frequência de entradas e o total de tempo gasto nos braços abertos. O número de entradas (total de entradas = número de entradas no aberto + número de entradas no fechado) sendo considerado como índice de atividade locomotora. Alguns autores propuseram que a sensibilidade, confiabilidade e validade etológica de um teste melhorariam se a atenção do pesquisador fosse voltada para o que os animais fazem de fato no labirinto e não apenas para os itens primários. Assim, novas medidas foram incorporadas na avaliação comportamental do modelo, a saber, congelamento (*freezing*), defecação, rearing (comportamento exploratório em que o animal estende acima seu corpo e patas dianteiras, apoiado sobre as traseiras), espreitas (*stretched attend postures* - postura em que o animal se estende cautelosamente adiante, sem, no entanto, retirar do lugar suas patas traseiras, voltando em seguida, à mesma posição), retornos aos braços fechados, *grooming* (autolimpeza) e *head dippings* (movimentos exploratórios de cabeça e ombro abaixo do chão dos braços abertos), (Rodgers and Cole, 1994; Rodgers and Johnson, 1995).

Para estudar o possível efeito ansiolítico da AMI, foi utilizado o teste do labirinto em cruz elevado (Plus-maze), e os resultados mostraram que a AMI foi capaz de aumentar de modo significativo o tempo de permanência e o número de entrada nos braços abertos, indicando uma possível resposta ansiolítica. A AMI administrada subcronicamente nas doses de 10 e 25 mg/kg, via i.p. foi capaz de alterar os parâmetros de forma significativa indicando uma atividade ansiolítica. Da mesma forma a AMI administrada por via oral em modelo agudo nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg alterou de forma significativa estes parâmetros no teste do plus-maze.

Procurando esclarecer melhor este efeito ansiolítico provocado pela AMI, foi utilizado o mesmo modelo (plus-maze) desta feita associando-se o flumazenil e a AMI. Os resultados obtidos mostraram que a AMI nas doses de 10 e 25 mg/kg, via i.p., tem um efeito similar ao diazepam, e ambos são antagonizados pelo flumazenil de maneira bastante significativa.

Os resultados obtidos com a administração da AMI em relação aos efeitos sedativos e ansiolíticos apontam que deve existir um envolvimento do complexo receptor GABA_A, semelhante àquele existente para drogas ansiolíticas benzodiazepínicas.

Os benzodiazepínicos são drogas que agem sobre o sistema GABA-BZD-canal de cloreto, aumentando a afinidade do neurotransmissor GABA pelo receptor GABA_A. Os receptores GABAérgico são de três tipos distintos: o receptor GABA_A, o receptor GABA_B e o receptor GABA_C. Os ansiolíticos benzodiazepínicos possuem afinidade pelo subtipo GABA_A, que constitui o maior sistema de inibição neuronal do SNC. Apresenta-se na forma de canal pentamérico de íons cloreto, com sítios de afinidade e ligação para diversas drogas como barbitúricos, anestésicos gerais, neuroesteróides e beta-carbolinas. É composto por subunidades α , β , γ , δ , ϵ , θ e π . A subunidade α tem se mostrado diretamente relacionada à afinidade das drogas benzodiazepínicas ao receptor GABA_A, enquanto que a subunidade γ parece estar diretamente relacionada à eficácia das drogas (Graeff, 1999; Kralic et al, 2002; Korpi et al, 2002).

Os BZDs, ligando-se ao seu sítio específico, aumentam a afinidade do neurotransmissor GABA (ácido γ -aminobutírico), aumentando a frequência de abertura do canal e conseqüente

entrada dos íons cloreto, levando a uma hiperpolarização da membrana, acarretando uma diminuição da atividade neuronal. Os efeitos causados por estas ações dos BZDs são ansiólise, sedação, hipnose, amnésia anterógrada, miorelaxamento e atividade anticonvulsivante. No tratamento da ansiedade, insônia e da abstinência alcoólica, são drogas eficazes, embora causem efeitos indesejáveis como sedação, prejuízo de memória, tolerância ao efeito sedativo (quando do tratamento da insônia) e dependência física (Graeff, 1999; Kralic et al, 2002; Korpi et al, 2002).

Os efeitos sedativos e ansiolíticos da AMI foram corroborados pela potencialização no tempo de sono em testes utilizando o pentobarbital em camundongos. O pentobarbital possui curta ação agindo como barbitúrico e é metabolizado por enzimas microssomais principalmente no fígado. Anestesia induzida por barbitúrico é um modelo bastante popular de resposta toxicológica e farmacológica porque não interfere nas mensurações hepáticas, e o pentobarbital é a droga de escolha para este procedimento. A duração no tempo de sono após a anestesia é inversamente proporcional a velocidade do metabolismo da droga. Dentre as muitas variações genéticas e ambientais que interferem no tempo de sono de animais de laboratório estão a idade, sexo, tensão, cobertura, organização, estímulo doloroso e tempo de administração da droga. O tempo de sono é um indicador *in vivo* do metabolismo da droga, onde pode ser realizado com um grande número de animais num curto intervalo de tempo. A ação hipnótica do pentobarbital foi demonstrada por Petty (1995) sendo mediada pelo complexo receptor GABA_A. De acordo com Subarnas e cols. (1993), que mostraram que o palmitato de beta amirina nas doses de 5, 10 e 20 mg/kg, potencializa a narcose induzida por pentobarbital em camundongos. Os dados deste trabalho sugerem que esta potencialização não é um fenômeno dose-dependente, pois os efeitos observados com doses maiores foram menores. O extrato de *Passiflora actinia* uma planta com destacada atividade ansiolítica também prolonga o tempo de sono induzido por pentobarbital. Em estudo recente publicado por este Departamento mostrou-se que a mistura isomérica de alfa e beta amirina, nas doses de 50 e 100 mg/kg, via i.p., potencializa o pentobarbital aumentando o tempo de sono dos animais. O Glutinol, triterpeno isolado da *Scoparia dulcis* (vassourinha) também prolongou o tempo de sono de animais tratados com pentobarbital (Freire et al, 1991; Oliveira et al, 2004).

Efeitos antidepressivos da AMI

Atualmente tem-se estudado muito a ocorrência de produtos naturais que possam ser utilizados como antidepressivos. Em um trabalho recente com o palmitato de beta-amirina extraído da *Lobelia inflata*, foi estudado a ação antidepressiva deste composto utilizando-se vários métodos clássicos de avaliação de drogas antidepressivas como o teste da hipotermia induzida por reserpina, catalepsia induzida por haloperidol e ptose induzida por tetrabenazina. Este composto, porém não apresentou nenhum efeito em nenhum destes testes, tendo assim posteriormente sido utilizado o teste do nado forçado para estudar o mecanismo antidepressivo deste composto. Drogas antidepressoras reduzem o tempo de imobilidade de ratos ou camundongos no teste do nado forçado. Este método é seletivamente sensível para drogas clinicamente efetivas para depressão assim como para tratamentos antidepressivos não farmacológicos como choque eletroconvulsivo e privação do sono REM. Portanto a utilização deste método pode ser responsável pela descoberta de novas drogas antidepressivas, não detectadas nos modelos clássicos. Estando atento para identificar os processos bioquímicos baseados no teste de imobilidade em ratos, *Porsolt et al* sugerem que a imobilidade é sensível a drogas que aumentam a atividade dos neurônios catecolaminérgicos centrais, mas relativamente insensível para aquelas ações primariamente nos neurônios serotoninérgicos centrais. Além disso, já está estabelecido que a redução da duração da imobilidade é devido a mecanismos catecolaminérgicos e não serotoninérgicos (Subarnas, 1992).

O antagonismo da tetrabenazina pelo palmitato de beta-amirina na duração da imobilidade indica que o palmitato de beta-amirina pode ter uma ação estimulante na liberação de norepinefrina agindo nos *pools* de estoque ou nos *pools* recém sintetizados do cérebro. A possibilidade que o palmitato de beta-amirina possa estimular a liberação de norepinefrina foi também demonstrada quando este composto foi administrado em camundongos pré-tratados com um inibidor seletivo da captação de norepinefrina, a desipramina. Neste teste o palmitato de beta-amirina não apresentou efeitos na duração da imobilidade em camundongos pré-tratados com desipramina, indicando que os efeitos do palmitato de beta amirina na imobilidade podem ser

devido à liberação de norepinefrina central. A α -metiltirosina, um inibidor da enzima tirosina hidroxilase que é capaz de bloquear a síntese de amina no cérebro, inibiu o efeito do palmitato de beta-amirina na duração da imobilidade sugerindo que o palmitato de beta-amirina pode preferencialmente liberar a norepinefrina de *pool* representando NE recentemente sintetizadas em relação a norepinefrina já estocada. Esta descoberta foi baseada em estudos prévios mostrando que d-anfetamina seletivamente libera aminas recentemente sintetizadas, pois a d-anfetamina antagoniza o efeito da reserpina e sua ação é bloqueada pela α -metiltirosina. Outros experimentos foram realizados utilizando camundongos tratados com 6-hidroxidopamina para ver os efeitos com o palmitato de beta-amirina. A 6-hidroxidopamina é bem conhecida por causar depleção dos estoques de catecolaminas e destruição de neurônios catecolaminérgicos pré-sinápticos. Neste experimento, desipramina ou nomifensina foram administrados em camundongos antes da administração da 6-OHDA para proteger os neurônios noradrenérgicos e dopaminérgicos da destruição pelo 6-OHDA, pois estas duas drogas são conhecidas como inibidoras seletivas da recaptação de norepinefrina e dopamina, respectivamente. O palmitato de beta-amirina diminuiu a duração da imobilidade significativamente em camundongos tratados com 6-OHDA e pré-tratados com desipramina, mas não mostrou nenhum efeito nos camundongos pré-tratados com nomifensina. Estas evidências levaram a sugestão de que a manutenção da atividade noradrenérgica central pode ser muito importante para o palmitato de beta-amirina induzir seus efeitos na duração da imobilidade. Desta forma, os resultados obtidos com o teste do nado forçado sugerem que o palmitato de beta-amirina pode estimular a liberação de norepinefrina de *pools* onde este neurotransmissor foi recentemente sintetizado. No ensaio de liberação de [³H]norepinefrina, o palmitato de beta-amirina liberou a [³H]norepinefrina de sinaptossomos de cérebro de camundongos. Assim, o palmitato de beta-amirina pode causar a liberação de norepinefrina, enquanto que a redução da duração da imobilidade do animal pode ser devido a um aumento da atividade noradrenérgica, o que presumivelmente pode estar relacionado com a atividade antidepressiva deste composto (Subarnas et al, 1992).

O teste do nado forçado é um teste comportamental que nos dá uma indicação da eficácia clínica de vários tipos de drogas antidepressivas. Atualmente, drogas antidepressivas são conhecidas por agirem através de vários diferentes mecanismos em nível de receptor, provavelmente estimulando caminhos em nível sub-celular (Yildiz et al., 2002).

AMI foi também capaz de diminuir o tempo de imobilidade dos camundongos, nas doses de 2,5 e 5 mg/kg, no teste do nado forçado. Em altas doses (10 e 25 mg/kg), entretanto, os efeitos antidepressivos foram mascarados pelas ações hipnóticas e sedativas da droga. O efeito da AMI foi potencializado pela imipramina, um antidepressivo tricíclico que atua inibindo a recaptação de serotonina e norepinefrina.

Nenhuma alteração foi observada após a AMI ser associada com a paroxetina, um conhecido inibidor seletivo da recaptação de serotonina. Os efeitos da AMI foram totalmente bloqueados pelo pré-tratamento com reserpina, um conhecido inibidor do transporte de catecolaminas vesicular, facilitando assim o estoque de noradrenalina nas vesículas.

Estes resultados sugerem que o efeito antidepressivo da AMI deve-se pelo menos em parte, decorrente de um aumento na atividade noradrenérgica. Ficou demonstrado que o palmitato de beta amirina pode estimular a liberação de norepinefrina de *pools* recentemente sintetizados. Foi demonstrado que o palmitato de beta amirina causa uma liberação de norepinefrina dos sinaptossomos de cérebro de camundongos. Estas descobertas provam que a administração de palmitato de beta-amirina pode provocar uma liberação de norepinefrina. Desta forma, a redução no tempo de imobilidade de camundongos tratados com palmitato de beta amirina pode ser devido a um aumento da atividade noradrenérgica, o que provavelmente pode estar relacionado com a possível atividade antidepressiva deste composto. Além disso, triterpenos extraídos da *C. asiatica* foi demonstrado ser capaz de reduzir os níveis de corticosterona sérico e aumentam as concentrações de 5-HT, NE e DA assim como de seus metabólitos, em cérebro de ratos. Preocupações recentes com o papel da serotonina no tratamento da depressão têm ignorado o papel da noradrenalina e o fato de que estes dois neurotransmissores não atuam de forma isolada. Evidências do papel da noradrenalina na depressão levaram a descoberta que drogas que agem na causa ou aliviam os sintomas da depressão, provocam alterações no metabolismo da noradrenalina. Estudos de depleção e transporte de monoaminas com pacientes tratados e não tratados indicam o papel da serotonina e noradrenalina na depressão. Um número significativo de inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina tem sido muito utilizado como drogas antidepressivas, incluindo desipramina e protriptilina. Entretanto, todas estas drogas têm a

propensão para causar vários efeitos adversos desconhecidos, devido a suas interações não seletivas com receptores muscarínicos, adrenérgicos e histaminérgicos. A eficácia destas drogas é sem dúvida um produto das ações noradrenérgicas, serotoninérgicas e de afinidades não seletivas a receptores (Subarnas et al, 1993; Chen et al, 2001; Brunello et al, 2002).

6.2 Efeitos anticonvulsivante da AMI

Epilepsia é uma das mais comuns patologias neurológicas e afeta aproximadamente 1,65 milhões de pessoas nos EUA e 50 milhões de pessoas em todo mundo e continua a ser um significativo problema clínico. Os medicamentos usualmente disponíveis ainda não controlam adequadamente as convulsões e nem são isentos de efeitos colaterais aparecendo na forma de náuseas, ataxia, parestesia, alterações hematológicas, hirsutismo, ganho de peso, hipertrofia gengival, más formações congênitas, sonolências e inércia mental. Por estas razões, novas drogas antiepilépticas são necessárias para o controle adequado das convulsões apresentando uma menor incidência de efeitos colaterais (Gasior et al, 1997).

A epilepsia é um distúrbio relativamente comum com prevalência em torno de 1% na população em geral e é um termo usado a um grupo de condições crônicas cuja principal manifestação clínica é a ocorrência de convulsões. Apesar da importância do tratamento com Drogas Antiepilépticas (DAE's) tradicionais, entre 20-30% dos pacientes não conseguem obter controle adequado das crises convulsivas ou apresentam efeitos colaterais significativos. Além disso, um expressivo número de pacientes com epilepsia sofre mais danos em decorrência do tratamento que da própria condição epiléptica. Portanto, a elevada toxicidade bem como os efeitos colaterais das DAE's têm motivado a contínua busca de alternativas medicamentosas mais vantajosas. Vários registros mostram a busca incessante, nas plantas medicinais, para a cura ou alívio de moléstias que têm atingido impiedosamente a humanidade. De modo particular aquelas indicadas para o tratamento de doenças com manifestações neurológicas e distúrbios psiquiátricos têm sido alvo de uma grande procura. Um estudo com várias espécies de plantas do Nordeste brasileiro avaliou-as quanto à atividade anticonvulsivante e de acordo com os resultados obtidos os extratos de *Bauhinia outimouta*, *Ximenia americana* e *Rauwolfia ligustrina* apresentaram evidências de atividade anticonvulsivantes (Quintans-Junior et al, 2002).

A epilepsia tem sido, aliás, no Brasil, objeto de estudos de vários e importantes grupos de pesquisa também do ponto de vista farmacológico. Vários triterpenos estão descritos na literatura com atividade anticonvulsivante. Desta forma, a AMI foi estudada em vários modelos de

convulsão nos quais a mesma apresentou boa atividade anticonvulsivante, como discutido adiante.

O monoterpene citronelol presente nos óleos essenciais de várias espécies de plantas aromáticas, também foi estudado quanto a sua ação anticonvulsivante, e os resultados mostraram que o citronelol possui significativo efeito anticonvulsivante provavelmente devido a uma redução da excitabilidade neuronal, principalmente através dos canais de Na⁺ voltagem-dependentes (de Sousa et al, 2006).

A AMI foi testada em três modelos de convulsão induzidos por agentes químicos: o pentilenotetrazol, a pilocarpina, e a estriçnina. Destes modelos, uma neuroproteção foi observada apenas quando a indução das convulsões foi feita com pentilenotetrazol e a AMI foi administrada, o que nos estimulou a procurar identificar por qual mecanismo a AMI estaria conferindo esta neuroproteção, assim utilizamos as drogas polimixina B e estaurosporina para tentar melhor esclarecer este fenômeno.

Para avaliar um possível envolvimento da AMI com receptores e mecanismos colinérgicos, foi utilizado o cloridrato de pilocarpina como agente químico indutor de convulsões em camundongos. A administração sistêmica ou intracerebral com altas doses de cloridrato de pilocarpina, um agonista muscarínico, induzem convulsões em roedores. As convulsões induzidas por pilocarpina são caracterizadas por um desenvolvimento seqüencial de comportamento padrão e na atividade eletroencefalográfica. Hipoatividade, tremor, arranhar-se, bater a cabeça e movimentos mioclônicos oriundos do sistema límbico para então surgir as convulsões mioclônicas com salivação, suspensão, queda e finalmente *status epilepticus*. O prolongamento das convulsões induzidas por pilocarpina é seguido freqüentemente de danos à parte anterior do cérebro. A amígdala, tálamo, córtex olfatório, hipocampo, neocórtex e substância negra são as regiões mais sensíveis aos danos provocados pela epilepsia produzida por pilocarpina. Os gânglios basais encurtam a geração e a propagação das convulsões induzidas por pilocarpina. O caudato, putamen, a substância negra e o núcleo endopenduncular governam a propagação das convulsões induzidas por pilocarpina. As drogas antiepilépticas como diazepam, clonazepam, fenobarbital, valproato e a trimetadiona protegem contra as convulsões induzidas por pilocarpina enquanto a difenilhidantoína e a carbamazepina são ineficazes. A etosuximida e acetazolamida

aumentam a suscetibilidade para ação convulsivante por pilocarpina. O lítio, morfina e aminofilina também aumentam a suscetibilidade de ratos à convulsões por pilocarpina (Turski et al, 1989).

Agonistas muscarínicos administrados com altas doses induzem a produção de convulsões motoras límbicas e estado epiléptico em ratos adultos. O modelo de convulsão com dose alta de pilocarpina (400mg/kg) revela o processo convulsivo através de alterações comportamentais, eletroencefalográficas e pela presença de intensa lesão cerebral, permitindo também o estudo das alterações em nível de receptores, e/ou dos níveis das monoaminas e seus metabólitos. As convulsões produzidas pelos agonistas colinérgicos em animais parecem depender da ativação do receptor muscarínico e do envolvimento dos fosfoinositídeos, sugerindo ações pós-sinápticas. Vários estudos, porém, indicam aumento não somente na atividade colinérgica pós-sináptica, mas na pré-sináptica também. Contudo, como esses achados podem contribuir para explicar a origem e o mecanismo de todo o processo convulsivo, ainda precisam ser melhor determinados. Para esse fim, vários aspectos têm sido observados, a saber: a interferência do sistema de neurotransmissão muscarínico, dopaminérgico, glutamatérgico, e GABAérgico, e o estudo dos segundos mensageiros nas convulsões utilizando pilocarpina 400mg/kg. Tem sido feita outra abordagem que favorece o conhecimento da epilepsia em relação à idade: o estudo das convulsões em animais na fase de desenvolvimento, uma vez que o cérebro imaturo, com suas inervações e densidade de receptores ainda em desenvolvimento, pode ajudar na investigação da origem das convulsões, incluindo a relação entre a ativação do receptor e o processo de transdução de sinal e as possíveis alterações nas concentrações dos neurotransmissores. Várias pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando, em particular, animais de 21 dias de idade, no modelo de convulsão com pilocarpina 400mg/kg. Foi relatado que os animais neonatos apresentam-se vulneráveis as convulsões induzidas por pilocarpina em altas doses e que a atividade convulsiva parece ter características diferentes em função da idade. O agonista colinérgico induz manifestações comportamentais e eletroencefalográficas de estado epiléptico em ratos a partir da segunda semana de vida, e essas alterações são semelhantes às da epilepsia do lobo temporal de humanos (Freitas et al, 2003).

A AMI foi testada nas doses de 10 e 25 mg/kg por via intraperitoneal em tratamento agudo e os parâmetros analisados não foram diferentes em relação ao controle, desta forma não demonstrando proteção significativa aos camundongos tratados com as doses mencionadas, levantando a hipótese de que a AMI não interfere nos mecanismos colinérgicos da epilepsia.

Para avaliar o envolvimento da AMI nos receptores da glicina, um aminoácido inibitório, foi utilizado a estriçnina como agente pró-convulsivante. A estriçnina é um alcalóide proveniente de árvores do gênero *Strychnos*, tendo sido utilizado no passado como estimulante e tônico muscular. Em doses maiores do que aquelas usadas para fins terapêuticos causam extrema excitação do sistema nervoso central e especialmente da medula espinhal, resultando em reflexos nervosos ou convulsões ao mínimo estímulo. A droga é extremamente tóxica e o sintoma principal é a convulsão violenta, começando logo após alguns minutos da ingestão. A morte ocorre frequentemente devido à parada respiratória. Foi demonstrado que a estriçnina tem um mecanismo de ação convulsivante bem definido por agir diretamente antagonizando a inibição da medula espinhal e os reflexos cerebrais provocados pela glicina e assim aumentando os reflexos espinhais (Biggio et al, 1992; Rang et al, 2000).

Efeitos Centrais tais como atividade anticonvulsivante, ansiolítica e analgésica foi demonstrado em várias espécies do gênero *Erythrina*. Um estudo mostrou que o extrato hidroalcoólico da *Erythrina velutina* e da *Erythrina mulungu* tem atividade anticonvulsivante somente no modelo de convulsão induzida por estriçnina, sugerindo que sua possível ação seja no sistema de glicina e uma potencialização do tempo de sono induzido por pentobarbital, sugerindo ação depressora do sistema nervoso central (Vasconcelos et al, 2007).

A AMI foi testada nas doses de 10 e 25 mg/kg por via intraperitoneal em tratamento agudo e não demonstrou proteção significativa aos camundongos tratados com as doses mencionadas, levando a hipótese de que a AMI parece não influenciar nos mecanismos por onde a estriçnina conduz as convulsões, ou seja, nos receptores de glicina.

Como a AMI já havia demonstrado efeito ansiolítico e sedativo, via mecanismo GABAérgicos, foi estudado também a possibilidade dos mecanismos GABAérgicos estarem

envolvidos na ação anticonvulsivante da AMI. O pentilenotetrazol (PTZ) é uma droga ansiogênica, que, em humanos, foi inicialmente utilizada como uma droga convulsivante, sendo constatado posteriormente que, em doses subconvulsivantes, produzia intensa ansiedade e ataques de pânico. A propriedade ansiogênica do PTZ tem sido demonstrada em vários modelos animais, incluindo Labirinto em Cruz Elevado, sendo utilizada em alguns modelos como um estímulo ansiogênico interoceptivo. É interessante notar que animais treinados a reconhecer os efeitos do PTZ, generalizam a resposta comportamental (geralmente a pressão a uma barra) a outras drogas ansiogênicas, como, por exemplo, ioimbina e cocaína. Da mesma forma, outras situações ansiogênicas, como retirada de um benzodiazepínico, assemelham-se a um estímulo induzido pelo PTZ. Em geral, drogas ansiolíticas conhecidas antagonizam tais efeitos com potência similar à relatada clinicamente. Está claro que os efeitos específicos do PTZ são largamente mediados pelo receptor $GABA_A$, embora o mecanismo de bloqueio do receptor pelo PTZ ainda não esteja esclarecido. Sabe-se que o PTZ age via sítio da picrotoxina (situado no interior do canal de cloreto) no complexo receptor $GABA_A$ -benzodiazepínico-canal de cloreto, reduzindo o influxo de íons cloreto. Estudos posteriores com *patch clamp* em receptores $GABA_A$ recombinantes demonstraram que o PTZ e a picrotoxina agem por sobreposição (*overlapping*), mas em sítios diferentes (Jung et al, 2002; Hansen et al, 2004).

Por via oral a AMI nas doses de 10, 25 e 50 mg/kg aumentou a latência para primeira convulsão e o tempo de morte dos camundongos tratados de forma aguda no modelo do PTZ, desta forma conduzindo-nos a levantar a hipótese de que a AMI tem ação anticonvulsivante importante, quando o agente pró-convulsivante tem seus efeitos mediados por $GABA_A$.

Outros estudos também mostram outras drogas de origem vegetal como a wogonina que possuem efeitos anticonvulsivantes que também resultam da potencialização da atividade do GABA (Park et al, 2007)

Como a AMI apresentou seu efeito farmacológico que pode sugerir a ação destas nos receptores $GABA_A$, como mostrado anteriormente com atividades sedativas e ansiolíticas sendo revertidas pelo flumazenil, um antagonista dos benzodiazepínicos, e como em alguns trabalhos verificamos que estes triterpenos são inibidores de proteína quinases, procuramos então

estabelecer uma correlação entre a atividade anticonvulsante da AMI apresentada somente no modelo de indução por PTZ com inibidores de PKC. Desta forma poderemos identificar se a inibição da proteína quinase C altera de que forma a atividade anticonvulsante da AMI.

A ativação de proteína quinase C reduz a potência dos benzodiazepínicos nos receptores GABA_A. A fosforilação destes receptores por PKC modula a função dos receptores GABA_A, sugerindo uma diminuição no acoplamento alostérico entre o benzodiazepínico e os sítios de ligação no receptor GABA_A (Gao and Greenfiel, 2005)

Em recente trabalho publicado sobre as propriedades antinociceptivas da alfa e beta amirina foi sugerido que o mecanismo de ação destes triterpenos envolve a inibição de vias com participação das proteínas quinases A e C (Otuki et al, 2005). A alfa amirina aplicada topicamente de maneira dose-dependente inibiu a ativação de quinases como ERK, MAPK e PKC α (Medeiros et al, 2006).

Estudos farmacológicos com drogas que ativam ou inibem várias isoenzimas da PKC tem identificado a família PKC das quinases serina-treonina como importante na regulação das funções do receptor GABA tipo A. PKC modula a densidade da superfície dos receptores GABA_A, a condutância aos íons cloretos e a sensibilidade do receptor para moduladores alostéricos positivos como neuroesteróides, etanol, benzodiazepínicos e barbitúricos. Recentes estudos usando reagentes seletivos para isoenzimas de PKC em camundongos modificados geneticamente foi usado para identificar um papel importante de três isoenzimas: PKC β _{II}, PKC ϵ e PKC γ em vários aspectos da regulação do receptor GABA_A. Progressos nestas pesquisas trazem perspectivas para áreas terapêuticas e várias áreas de grande importância clínica como a ansiedade. O aumento dos estudos e conseqüentemente melhor compreensão de como a PKC regula o receptor GABA_A e de como as isoenzimas da PKC estão envolvidas, mantém a promessa de desenvolvimento de novos tratamentos para diversas doenças neuropsiquiátricas (Song, 2005)

O isotipo gama da PKC (PKC γ) é um membro clássico da subfamília PKC a qual é ativado por Ca⁺² e diacilglicerol na presença de fosfatidilserina. Fisiologicamente, PKC γ é

ativada por um mecanismo acoplado por intermédio de receptor, seguido pela quebra de fosfolipídio inositol como outras isoformas de PKC, como a PKC α e PKC β . A PKC γ é expressada somente no cérebro e cordão espinhal e sua localização é restrita aos neurônios, enquanto PKC α e PKC β aparecem em muitos tecidos, inclusive no cérebro. No encéfalo a PKC γ é mais abundante no cerebelo, hipocampo e córtex cerebral, onde a existência da plasticidade neuronal tem sido estabelecida. Estudos farmacológicos e eletrofisiológicos têm demonstrado várias funções neuronais incluindo LTP (*long term potentiation*) e LTD (*long term depression*) que especificamente requerem PKC γ . Geração de camundongos deficientes em PKC γ fornece informações a respeito das funções fisiológicas deste isotipo enzimático. Camundongos deficientes em PKC γ modificaram a LTP no hipocampo, exibiram leves deficiências no aprendizado espacial e contextual, exibiram diminuição da coordenação motora devido a inervações múltiplas persistentes das fibras ascendentes nas células de purkinje, mostraram atenuação na ativação dos receptores opióides e diminuíram os efeitos do etanol nos receptores ácido gama-aminobutírico do tipo A (GABA_A). Além disso, um ponto de mutação no gene na PKC γ pode contribuir para retinite pigmentosa e para a síndrome Parkinsoniana (Saito, 2002).

A ativação da PKC reduz a função dos receptores GABA em receptores nativo, tanto em estudos *in vivo* como *in vitro*. Este estudo explorou os efeitos da PKC e de fosfatases na captação de íon Cl⁻ mediada pelos receptores GABA em sinaptossomos cortical cerebral e os efeitos da atividade da PKC na LORR (*loss of righting reflex*) induzido por muscimol em ratos adulto. *In vitro* a função dos receptores GABA_A foi estudada por captação de Cl⁻ induzido por muscimol dentro dos sinaptossomos cortical cerebral e o efeito *in vivo* da influência da PKC na função do GABA_A foi avaliada por injeção intracerebroventricular por 4-beta-forbol-12,13-dibutirato (PDBu) ou calfofostina C seguida pela determinação de LORR induzido por muscimol. Os resultados deste estudo mostraram que adenosina trifosfato (ATP) e PDBu produzem uma redução específica e concentração dependente na captação de Cl⁻ estimulado por muscimol que foi bloqueado por calfofostina C, um inibidor de PKC. Tanto a adenosina difosfatada como 4 α PDBu foram ineficazes (Kumar, 2005).

A fosforilação dos receptores GABA_A por proteína quinase C (PKC) modulam a função dos receptores GABA_A. Entretanto, os efeitos da fosforilação ainda tem sido inconsistentes,

possivelmente devido a variabilidade de neurônios ou de populações dos receptores GABA_A, mas chegou-se a conclusões de que o efeito da PKC foi específico para o sítio de ligação dos benzodiazepínicos, onde não houve alteração na potencialização das correntes do GABA pelo pentobarbital e que a ativação da PKC reduz a aparente afinidade do diazepam em células neuronais sugerindo uma diminuição do acoplamento alostérico dos benzodiazepínicos com seus sítios de ligação no receptor GABA (Gao, 2005).

A PKC também sofre fosforilações antes de ser ativada, o que ocorre durante translocação do citosol para a membrana da célula. Sua ativação e translocação do citosol à membrana plasmática ocorre em resposta a aumento transitório de DAG ou exposição a agentes exógenos, conhecidos como forbol-ésteres. A família PKC inclui 12 isoformas, classificadas em convencionais (cPKC, cálcio-dependentes, ativadas pela fosfatidil-serina e pelo DAG); original (nPKC, cálcio-independentes, reguladas pelo DAG e fosfatidilserina) e atípicas (aPKC, cálcioindependentes, não requerem DAG para ativação, mas fosfatidil-serina para regular sua atividade). O DAG celular é o principal ativador fisiológico da PKC; deriva de múltiplas fontes, incluindo a hidrólise de fosfatidil-inositídeos, metabolismo da fosfatidil- colina por fosfolipases ou síntese de novo. Também é possível que a ativação da via DAG-PKC induzida pela hiperglicemia seja resultado de glico-oxidação, já que existem evidências de que alguns oxidantes, como H₂O₂, podem ativar a PKC.

Vários inibidores de PKC são disponíveis comercialmente, sendo que muitos parecem apresentar uma especificidade questionável. O alcalóide microbiano estaurosporina serviu como base para diversos compostos utilizados atualmente. Para uma avaliação da participação de proteína quinase C, no efeito anticonvulsivante da AMI, foram utilizados duas drogas inibidoras de PKC, a polimixina B e a estaurosporina, que são drogas de reconhecidos efeitos na inibição destas quinases.

As polimixinas foram descobertas no final dos anos 40, e durante muitos anos foram consideradas as drogas de eleição para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*, até serem suplantadas pelo advento dos aminoglicosídeos. São decapeptídeos cíclicos derivados de *Bacillus* spp, sendo descritas polimixinas de A a E. Seu mecanismo de ação não é completamente esclarecido. A polimixina se liga à membrana citoplasmática da bactéria, levando a alterações de

permeabilidade e morte celular. Elas agem como verdadeiros detergentes da membrana citoplasmática bacteriana, sendo antagonizadas por cátions como cálcio e magnésio. A polimixina B foi utilizada em estudo recente, como inibidor de proteína quinase C, para avaliar o efeito protetor das PKC na função cardíaca em coração de coelhos. Em outro estudo a polimixina B, diminuiu a liberação de noradrenalina e aumentou a liberação de NE causada por 12,13-dibutirato de forbol (Zhonghua, 2006).

A AMI aumentou o tempo para primeira convulsão e o tempo de morte nos camundongos tratados por via intraperitoneal com as doses de 10, 25 e 50 mg/kg em modelo de indução de convulsões por PTZ.

Quando foi administrado AMI na dose de 10 mg/kg e após 10 minutos foi administrado a polimixina B 10.000ui/kg por via intraperitoneal nos camundongos não observamos diferenças dos grupos tratados isoladamente com essas drogas. Porém quando as doses foram aumentadas para AMI 25 mg/kg e no caso da polimixina B para 25.000ui/kg, o efeito observado principalmente no parâmetro avaliado, tempo de morte, foi um aumento da significância estatística comparando-se com os grupos tratados isoladamente com as mesmas doses das duas drogas citadas. A figura abaixo fornece uma idéia precisa de o quanto o efeito da AMI foi potencializado pela administração da polimixina B, conforme mostrado detalhadamente no capítulo Resultados. Se for considerado o parâmetro tempo de morte (TM) observamos que o grupo em que foi associado a AMI e a PMX conferiu uma proteção de 135% a mais que a AMI administrada isoladamente, ou seja de 82 para 193 (**Figura 24**).

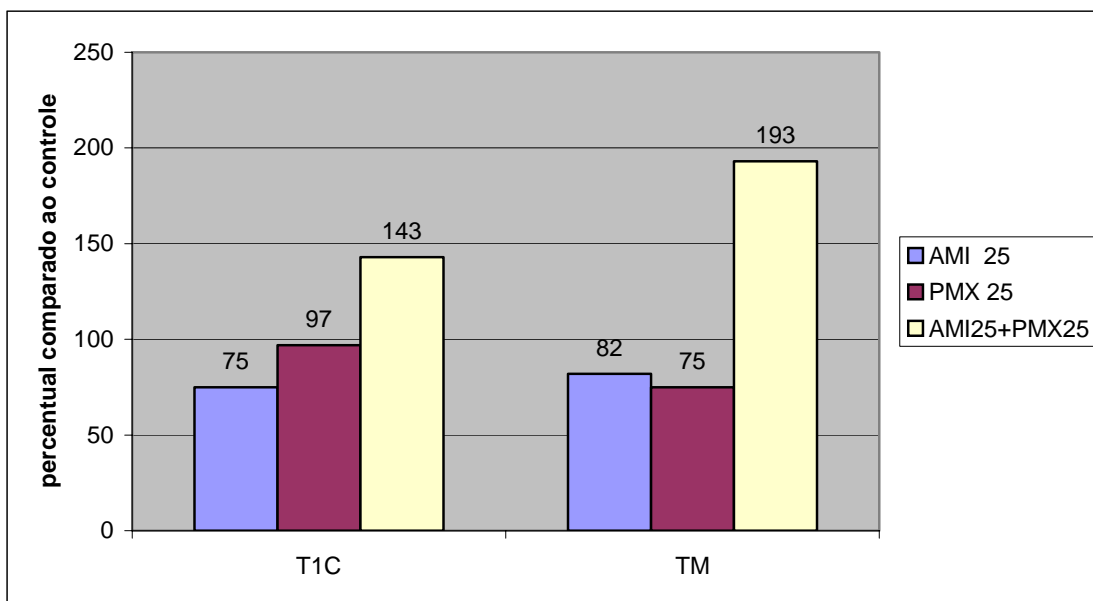


Figura 24. Potencialização do efeito anticonvulsivante de AMI pela PMX (% de efeito com relação a cada droga isoladamente) realizado através do teste de convulsão induzida por PTZ e com dois parâmetros mensurados: tempo para primeira convulsão (T1C) e tempo de morte (TM). O grupo controle que foi considerado como valor de 100%.

Um potente e específico inibidor de proteína quinase C foi descoberto a partir de fungos e *Streptomyces*: Estaurosporina, um alcalóide da *Streptomyces* sp., é o mais potente inibidor de proteína quinase C descrito na literatura com IC_{50} em concentrações nanomolares (10nM). UCN-01 (*7-hydroxy staurosporine*), isolada do *Streptomyces* sp., é um inibidor seletivo de proteína quinase C com atividade antitumoral. A estaurosporina inibe proteínas quinases em baixas concentrações nanomolares. Contudo, este produto natural é pouco seletivo quando usado contra outras proteínas quinases. Atualmente como o objetivo de obter inibidores específicos de PKC, uma série de bisindolilmaleimidias têm sido sintetizadas. Estudos de relação estrutura-atividade permitiu a determinação de subestruturas responsáveis por conferir alta potência e baixa seletividade na molécula da estaurosporina. Vários aminoalquil bisindolilmaleimidias foram descobertos por serem potentes e seletivos inibidores de PKC (IC_{50} valore de 5 to 70 nM). A estaurosporina é uma alcalóide que tem destacada atividade antifúngica e descobriu-se que inibe fortemente a proteína quinase fosfolípídio cálcio dependente (PKC) de cérebros de ratos com IC_{50} de 2,7 nM. Entretanto, ela tem pouco efeito na ligação do 3H-forbol-12,13-dibutirato (PDBu) com a proteína quinase C. A inibição da proteína quinase C foi do tipo não competitiva

com fosfolipídeos. Este composto também mostrou um forte efeito citotóxico no crescimento de células HeLaS3, com valor de $IC_{50} = 4 \times 10^{-12}$ M após 72 de horas de exposição (Tamaoki et al, 1986).

A AMI administrada em conjunto com a estaurosporina eleva o tempo de morte dos animais em relação ao controle e em relação às drogas utilizadas isoladamente. De maneira bastante significativa observamos que a AMI nas doses de 5, 10 e 25 mg/kg, i.p., administrada em associação com o inibidor de proteína quinase C, conferiu uma proteção no teste de convulsão induzida por PTZ, confirmando o pressuposto do envolvimento de mecanismos que envolvam inibição de quinases. Se for considerado o parâmetro tempo de morte (TM) observamos que o grupo em que foi associado a AMI e a PMX conferiu uma proteção de 83% a mais que a AMI administrada isoladamente, ou seja aumentou o tempo de morte de 65 % para 119 % (**Figura 25**).

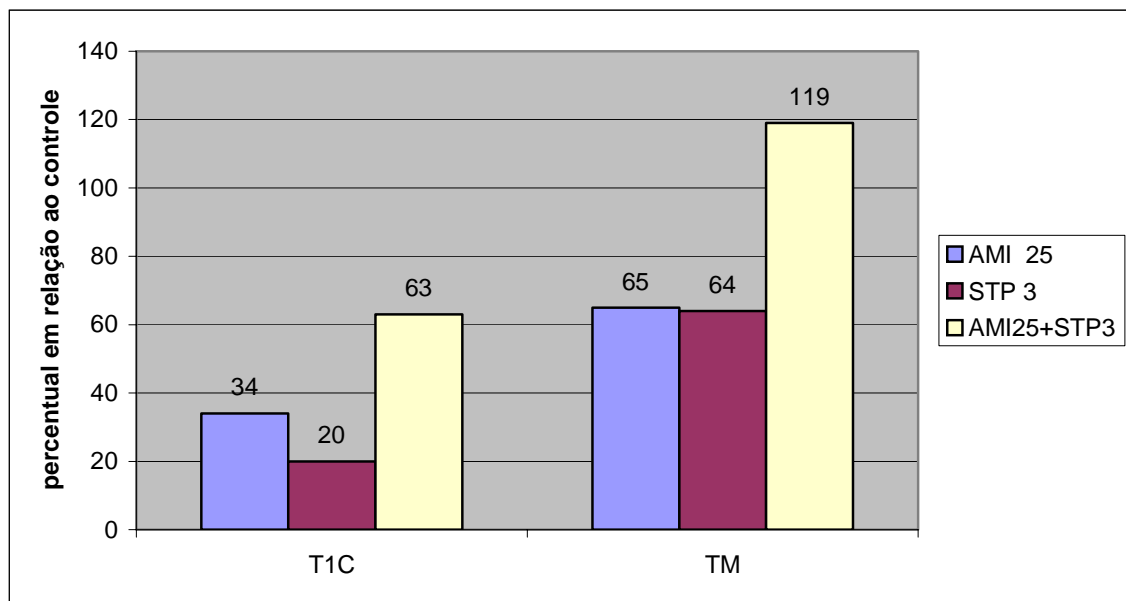


Figura 25. Potencialização do efeito anticonvulsivante de AMI pela STP (% de efeito com relação a cada droga isoladamente) realizado através do teste de convulsão induzida por PTZ e com dois parâmetros mensurados: tempo para primeira convulsão (T1C) e tempo de morte (TM). O grupo controle que foi considerado como valor de 100%.

Desta forma como o efeito de proteção aos danos neurológicos, no caso específico as convulsões, foram potencializados com o uso associados das drogas inibidoras de proteínas quinase C com a AMI, isto levantou a hipótese de que um provável mecanismo de ação da atividade anticonvulsivante demonstrada pela AMI seja através de uma inibição dos mecanismos fisiológicos da proteína quinase C. A inibição de quinases pela mistura triterpênica de amirina já foi descrito na literatura em um recente estudo, onde estes triterpenos inibem processos inflamatórios da pele através da regulação da ativação da PKC α e de MAPKs provavelmente por inibição da atividade transcricional do NF κ B (Medeiros et al, 2006).

Foi mostrado recentemente a correlação entre PKC ϵ e o aumento da função endógena alostérica do GABA $_A$, sugerindo que o benefício clínico da modulação da atividade do receptor GABA $_A$ pode ser realizado tomando como alvo esta quinase. Camundongos PKC ϵ knockout também tiveram redução nos níveis comportamentais no teste do campo aberto e plus maze. PKC ϵ deverá ser considerado brevemente como um potencial alvo na terapia onde se pretenda aumentar a atividade GABAérgica e aumentar desta forma a neurotransmissão inibitória, como no caso da epilepsia e ansiedade (Gordon, 2002).

6.3 Avaliação neurofarmacológica do AcAMI

O acetato de alfa e beta amirina (**Figura 26**) foi obtido a partir da esterificação da mistura isomérica de alfa e beta amirina, onde foi utilizado como material para estudo neurofarmacológico. Para isso foram utilizados vários modelos como campo aberto, plus maze, tempo de sono e modelos de convulsões induzidas quimicamente, todos executados em camundongos e em tratamentos agudo e sub-crônico, onde a droga foi administrada por via oral e via intraperitoneal.

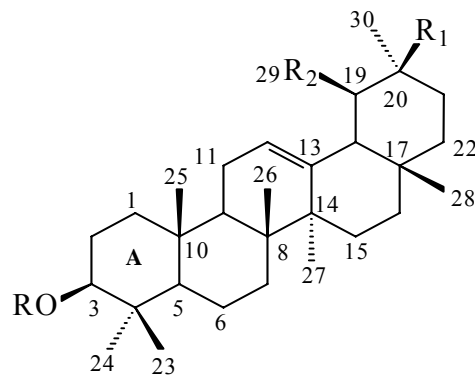


Figura 26. Fórmula estrutural do acetato de α - e β -amirina.

(a) R = COCH₃, R₁ = H, R₂ = CH₃, Acetato de α -amirina e

(b) R = COCH₃, R₁ = CH₃, R₂ = H Acetato de β -amirina.

Enquanto a maioria dos estudos descritos na literatura foi realizada com a mistura triterpênica de alfa e beta-amirina sem nenhuma modificação molecular, neste trabalho foi também utilizado o acetato de alfa e beta amirina (AcAMI) produzido por um processo de esterificação da mistura isomérica de alfa e beta amirina. O AcAMI foi administrado em doses agudas e sub-crônicas em concentrações que variaram de 2,5 a 25 mg/kg, por via intraperitoneal ou via oral. Ficou demonstrado que o AcAMI, assim como a AMI apresenta atividade anticonvulsiva no modelo de convulsões induzidas por pentilenotetrazol, porém este efeito não fica muito evidente quando a convulsão é induzida por pilocarpina, aparecendo somente com altas doses.

O modelo de indução de convulsões por pentilenotetrazol é caracterizado por um aumento na suscetibilidade às convulsões. A partir de uma injeção pode-se ter crises sub-convulsivas culminando até as convulsões tônico-clônicas generalizadas. PTZ é um bloqueador seletivo do complexo ionóforo cloreto do receptor GABA_A e depois de administrações agudas ou repetidas leva a uma diminuição da função GABAérgica e a conseqüente estimulação e modificação na densidade ou sensibilidade de diferentes subtipos de receptores do glutamato em muitas regiões do cérebro. PTZ pode também contribuir para uma variedade de processos bioquímicos, incluindo a ativação de fosfolipase de membrana, proteases e nucleases. Nas convulsões induzidas por PTZ, o AcAMI administrado por via oral ou via intraperitoneal mostrou um significativo aumento na latência para primeira convulsão assim como um aumento na latência do tempo de morte.

O efeito do AcAMI administrado por via oral, apresentou-se com uma intensidade superior ao efeito da AMI administrada pela mesma via e no mesmo modelo, assim nos parâmetros tempo para primeira convulsão a AMI nas doses de 10 e 25 mg/kg aumentou a proteção neurológica em 30 e 44 %, respectivamente, ao passo que o AcAMI este aumento, nas mesmas doses citadas foram de 44 e 77%, respectivamente. No parâmetro tempo de morte, a AMI administrada nas doses de 10 e 25 mg/kg aumentou o prolongamento do tempo de morte dos animais em 36 e 75 %, respectivamente e o AcAMI este prolongamento foi de 51 e 93%, respectivamente. Isto mostra que a mistura triterpênica acetilada (AcAMI) apresentou um melhor desempenho neste modelo quando comparado com a AMI.

O agonista colinérgico, pilocarpina, produz um prolongamento no *status epilepticus* em roedores. A relação existente entre *status epilepticus* e espécies reativas ao oxigênio (ROS) tem sido relacionada no resultado da neurodegeneração provocada por convulsões. A pilocarpina aumenta significativamente os níveis de malondialdeído, um marcador da peroxidação lipídica. Um aumento foi também observado nas atividades da catalase e da superóxido dismutase, duas importantes enzimas antioxidantes. Além do mais foi comprovado que a pilocarpina induz danos oxidativos e aumenta a atividade de enzimas antioxidantes e aumenta também sua expressão no córtex cerebral, que leva a uma excitotoxicidade e morte celular. A pilocarpina induz convulsão através da ativação do sistema colinérgico. Neste modelo, o AcAMI não alterou a latência do

tempo para a primeira convulsão e nem a latência no tempo de morte dos camundongos tratados, a não ser em doses mais altas (50 mg/kg, i.p.).

Substâncias esterificadas podem ser dotadas de atividade farmacológica, como bom exemplo pode ser citado um estudo utilizando um outro éster da amirina, o palmitato de beta amirina, onde foi desenvolvido visando avaliar a ação antidepressiva deste éster triterpênico. Este composto apresentou atividade antidepressiva no teste do nado forçado em camundongos. No experimento que avaliou os efeitos do palmitato de beta-amirina no sistema nervoso central, este composto diminuiu a atividade locomotora e antagonizou a hiperatividade induzida por metanfetamina em camundongos. (Subarnas et al, 1993a).

Um outro trabalho de Subarnas e cols (1993b), também envolvendo o éster da amirina, palmitato de beta-amirina. Este estudo foi realizado utilizando as folhas da *Lobelia inflata* que tem sido utilizada como remédio para asma espasmódica e é comprovadamente rica em alcalóides com esqueleto piperidínico, entre estes alcalóides, a lobelina é o mais importante com atividade farmacológica no sistema nervoso central e no sistema cardiovascular, desta planta foi isolado com sucesso o palmitato de beta-amirina, que demonstrou atividade antidepressiva no teste do nado forçado em camundongos. A descoberta da atividade antidepressiva do palmitato de beta-amirina estimulou o estudo de detalhes farmacológicos deste composto em relação a seus efeitos no sistema nervoso central.

Outras drogas acetiladas também possuem propriedades farmacológicas e em alguns casos com efeitos farmacológicos diferentes da suas moléculas originárias não acetiladas, como é o caso da 6-acetilcodeína, onde a acetilação da morfina na posição do carbono 6 muda sua farmacologia, assim como a codeína, a 6-acetilcodeína é um eficaz analgésico espinhal e suprespinhal, com potência aproximadamente a um terço da codeína. A sensibilidade para a analgesia da 6-acetilcodeína para antagonistas seletivos FNA-beta e naloxonazine confirma sua classificação como opióide mu. Entretanto é diferente de outros analgésicos mu em outros parâmetros. Estudos revelaram que a sensibilidade da 6-acetilcodeína para o alvo antigênico exons 1 e 2 do gene do receptores opióide mu (OPRM), um perfil diferente da codeína e morfina. A analgesia da heroína também é sensível a alvos antigênicos exons 1 e 2, esta analgesia também

é sensível ao antagonista 3-O-metilnaltrexona, enquanto a 6-acetilcodeína não é. Assim a 6-acetilcodeína é um eficaz analgésico opióide mu, com distinto perfil farmacológico (Milo et al, 2006).

Também drogas acetiladas podem influenciar na potência farmacológica das drogas, como é o caso da heroína. O descobrimento da heroína foi feito a partir da acetilação da morfina, o cloridrato de diacetilmorfina, que em estudos farmacológicos mostrou ser mais efetivo que a morfina e codeína. A companhia Bayer iniciou sua produção em 1898, em escala industrial e comercial. Os primeiros resultados clínicos colocaram a heroína como uma promissora droga. Inclusive a heroína foi mais eficaz que a codeína em doenças respiratórias. Por outro lado, foi observado que a repetição da administração da heroína resultava em desenvolvimento de tolerância. Em 1910, foram descobertos os efeitos euforizantes da heroína, descoberto por administração intravenosa. Foi regularizados a produção, o uso e a distribuição por órgãos internacionais (Hosztafi, 2001)

Substâncias naturais triterpênicas também são encontradas na forma acetilada, AKBA (ácido acetil-11-ceto- β -boswelico) é um inibidor da síntese de leucotrienos ativo por via oral, que age diretamente na 5-lipoxigenase, por um mecanismo não competitivo e não redox. Ele é somente um inibidor da síntese de leucotrienos que inibe a atividade da 5-lipoxigenase em um regulador alostérico e não por mecanismos de redução ou mecanismos competitivos. A AKBA liga-se na presença do cálcio a um sítio distinto do substrato que se liga ao sítio da 5-lipoxigenase. O sítio de ligação da AKBA é semelhante ao sítio regulatório de ligação do ácido araquidônico da enzima. Drogas contendo AKBA foi recentemente descritas por diminuírem a excreção de leucotrieno E₄ urinário em pacientes com glioblastoma maligno e em paralelo reduz o edema peritumoral. Em um estudo mais recente foi mostrado que este triterpeno acetilado inibe a indução de TNF α mediado por lipopolisacarídeo (LPS), em monócitos por interação direta com I κ B quinases. O fator de transcrição nuclear NF κ B é muito importante no desenvolvimento e progressão das doenças inflamatórias crônicas, como artrite reumatóide, asma e aterosclerose. O NF κ B é considerado como um alvo promissor na intervenção anti-inflamatória. A expressão de citocinas pró-inflamatórias por monócitos é estreitamente regulada pelos fatores de transcrição como NF κ B. Em monócitos humanos periféricos estimulados por LPS, os triterpenos

pentacíclicos ácido acetil- α -boswelico e ácido acetil-11-ceto- β -boswelico provocam *down-regulation* na expressão de TNF α (Sailer et al, 1998; Syrovets et al, 2005).

Substâncias também podem ser ativadas após uma acetilação. Compostos aromáticos N-substituídos podem ser metabolizados em várias espécies a derivados N-acetilados que são sujeitos a uma possível transformação enzimática, incluindo hidrólises e N,O-acetiltransferência. Este processo pode tanto potencializar ou melhorar as respostas biológicas destes derivados N-substituídos. Diminuições dos níveis dos metabólitos como as arilhidroxilaminas pode, em alguns sistemas, reduzir a probabilidade de aparecimento de efeitos biológicos adversos. Por outro lado, ácido arilhidroxâmico produzido por acetilação da arilhidroxilaminas podem aumentar seu potencial para ativação metabólica por N,O-acetiltransferência. Em coelhos, ratos e outras espécies a N-acetiltransferase acetil CoA dependente é também capaz de ativar ácido arilhidroxâmico por N,O-acetiltransferência. Estas enzimas organotriofosfatadas éster-resistentes, presente no citossol, podem utilizar ácido arilhidroxâmico como doador de acetil em reações de acetil-transferase e aparentemente são capazes de ativar o ácido arilhidroxâmico devido a sua habilidade para O-acetilar o arilhidroxilamine (King and Glowinski, 1983).

A AMI apresenta efeitos centrais, que incluem sedação, ansiólise, antidepressivos e anticonvulsivantes, assim em modelos experimentais semelhante aos usados no estudo da AMI, executamos o estudo do AcAMI. Para estudar os efeitos sedativos utilizamos como modelo o campo aberto.

Para avaliar a atividade sedativa do AcAMI, foi utilizado o teste do Campo Aberto. Foi demonstrado que o AcAMI não foi eficaz quando administrado de forma aguda por via oral e por via intraperitoneal, nas duas doses testadas (10 e 25 mg/kg). Recentes estudos reportaram que a mistura de alfa e beta amirina (3 a 200 mg/kg, v.o.) não provocou nenhuma alteração significativa no tempo de sono induzido por pentobarbital, nem alterou a atividade exploratória e a coordenação motora no teste do campo aberto e rota rod, respectivamente, indicando ausência de efeitos sedativos e anomariedades na coordenação motora em camundongos (Oliveira et al, 2004; Lima-Júnior, et al, 2006).

Foi observado que a administração sub-crônica do AcAMI (uma vez ao dia, durante 7 dias), apresentou uma atividade sedativa, nas doses de 10 e 25 mg/Kg, i.p., alterando todos os parâmetros estudados no teste do campo aberto, como o número de cruzamentos, o número de *rearing* e número de *grooming*, similarmente ao diazepam utilizado como controle positivo. Estes resultados coincidem com outros dados que demonstraram uma diminuição significativa na atividade locomotora de camundongos tratados com o palmitato de beta amirina, nas doses de 2,5 a 10 mg/kg e que indicam uma propriedade sedativa destes ésteres da amirina.

Esta atividade sedativa quando comparado com o mesmo modelo experimental onde foi utilizado a AMI, mostrou que a atividade das duas misturas apresentava comportamentos idênticos quando o protocolo de administração das drogas foi sub-cronicamente, mas a administração aguda mostrou que o AcAMI possui um menor efeito sedativo quando comparado com a AMI nas mesmas doses.

A avaliação da atividade ansiolítica do AcAMI foi feita realizando o teste do labirinto em cruz elevado (*plus maze*). De acordo com estudos anteriores, o efeito ansiolítico é sugerido quando a droga aumenta a entrada nos braços aberto sem alterar o número total de entrada nos braços. Camundongos tratados de forma aguda ou sub-crônica com o AcAMI alterou todos os parâmetros estudados, e significativamente aumentou o número de entradas, assim como o tempo de permanência nos braços abertos, indicando uma potente atividade ansiolítica. Assim como comprovado também que a mistura de alfa e beta amirina (AMI) exerce potente atividade sedativa, ansiolítica e antidepressiva. Atividade esta da AMI que provavelmente envolve mecanismos noradrenérgicos e gabaérgicos, como já discutido anteriormente e que também provavelmente estas alterações nestes neurotransmissores podem estar relacionados com os efeitos do AcAMI demonstrados nestes modelos.

É conveniente ressaltar que embora a atividade sedativa do AcAMI se assemelhou àquela da AMI, o estudo da atividade ansiolítica no modelo do *plus-maze* revelou que o AcAMI mostra-se muito mais potente que AMI, no parâmetro tempo de permanência nos braços abertos (TPBA), onde na dose de 10 mg/kg enquanto a AMI elevou este tempo em 28%, o AcAMI elevou em 88%, e na dose de 25mg/kg a AMI elevou o mesmo parâmetro em 34%, o AcAMI elevou para

97%. Mostrando que o grupamento acetila, que é a única diferença estrutural na molécula, contribui para um maior efeito ansiolítico.

No tempo de sono induzido por pentobarbital o AcAMI foi capaz de aumentar o tempo de sono dos animais depois de uma administração por via oral e por via intraperitoneal em ambas as doses estudadas. Drogas conhecidas por diminuir a latência do sono ou aumentar o tempo de sono são consideradas depressoras do sistema nervoso central (Willianson et al, 1996). O neurotransmissor inibitório GABA é um alvo molecular de drogas sedativas e hipnóticas e existem vários sítios de ligação no receptor GABA-A no cérebro (Doble, 1999). De forma similar a AMI, mecanismos envolvendo a neurotransmissão GABAérgica podem provavelmente exercer um papel na potencialização do tempo de sono induzido por barbitúricos, assim como observado no AcAMI. Os efeitos das duas misturas triterpênicas (AMI e AcAMI) quando comparadas apresentaram-se de forma semelhante, nas duas vias de administração utilizadas.

Diante dos resultados ficou claro que o AcAMI, tem um menor efeito sedativo que a AMI, porém possui atividades ansiolíticas e anticonvulsivantes que sugerem ser de maior intensidade que os mesmos efeitos descritos para a AMI, este efeito mais intenso do AcaMI, está relacionado com a diferenças químicas estruturais da molécula, onde o grupamento acetato diminui a polaridade desta droga, o quê provavelmente pode facilitar as passagens através de barreiras biológica, como por exemplo a barreira hemato-encefálica.

6.4 Doseamentos de aminoácidos e monoaminas de áreas cerebrais de camundongos tratados com AMI e AcAMI

O papel dos aminoácidos como neurotransmissores e suas funções no sistema nervoso central, tem sido foco de um grande número de pesquisas nos últimos anos. Desta forma, procuramos estudar a influência da AMI e do AcAMI administrado de forma sub-crônica e por via intraperitoneal nas concentrações dos aminoácidos mais pesquisados recentemente, que são glutamato (GLU), aspartato (ASP), ácido gama-aminobutírico (GABA), glicina (GLI), taurina (TAU) e triptofano (TRI) (Danbolt, 2000).

O glutamato está envolvido em vários aspectos normais e anormais de funcionamento do cérebro, assim como de vários órgãos periféricos. É considerado como sendo o maior mediador do sinal excitatório no sistema nervoso central de humanos e está provavelmente envolvido em vários aspectos normais de funcionamento do cérebro, que incluem cognição, memória e aprendizado. O glutamato também desempenha papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso central, incluindo indução ciática e migração, diferenciação e morte celular. Muitos neurônios e células gliais tem receptores para glutamato em suas membranas. O glutamato tem também um importante papel em órgãos periféricos e tecidos e em células endócrinas (Danbolt, 2000).

O cérebro contém grande quantidade de glutamato (em torno de 5 – 15 mmol por kg, dependendo da região), mas somente uma pequena fração deste glutamato esta normalmente presente nos fluidos extra-celulares. A distribuição deste aminoácido no cérebro está em um dinâmico equilíbrio, que é altamente sensível a mudanças no suprimento energético. O glutamato está continuamente sendo liberado do interior das células e é continuamente removido do meio extra-celular. Este aminoácido exerce um papel na sinalização celular por agir nos receptores do glutamato. Estes receptores estão localizados na superfície das células que possuem sua expressão gênica. É a concentração de glutamato do meio extra-celular que determina a extensão de estimulação destes receptores. A ativação excessiva dos receptores de glutamato é nociva e o glutamato torna-se tóxico em concentrações elevadas. Por outro lado, o glutamato é geralmente

considerado não tóxico no meio intracelular, mas este aminoácido pode ser completamente inerte dentro da célula. O glutamato pode servir como um mensageiro intracelular em células pancreáticas e parece participar na regulação da expressão dos transportadores de glutamato presentes na superfície celular. O glutamato pode ser removido do inteiro espaço extra-celular porque os receptores de glutamato foram descobertos em vários elementos celulares, como dendritos, nervo terminal, corpo neuronal e também em células da glia. Não existe nenhuma enzima no meio extra-celular que possa metabolizar o glutamato, conseqüentemente, somente existe o rápido caminho de metabolização do glutamato que é através da recaptação pelos transportadores de glutamato, sendo desta forma responsável pela manutenção das baixas concentrações de glutamato no meio extra-celular. (Danbolt, 2000).

O glutamato liberado das células pode ser utilizado para vários propósitos (síntese proteica, metabolismo energético, fixação da amônia) ou ser usado como transmissor. No terminal nervoso é que ele desenvolve a função de neurotransmissor. O glutamato é transportado para dentro da vesícula sináptica por um transportador veicular de glutamato e subseqüentemente liberado por exocitose. Há evidências plausíveis de que o glutamato possa ser liberado diretamente do citossol para o exterior através de proteínas de membrana. Nos astrócitos, o glutamato recaptado do fluido extra-celular, pode ser transformado em glutamina dentro do neurônio (Trist, 2000). Há evidências de que os receptores de glutamato estejam envolvidos no desenvolvimento e manutenção da hipersensibilidade a dor (Trist, 2000).

Como principal neurotransmissor excitatório, o glutamato desenvolve um papel importante no início e na propagação das crises convulsivas, mesmo quando a origem da convulsão não é glutamatérgica. Mecanismos glutamatérgicos apresentam-se como importantes na patogênese de algumas formas de epilepsia. Pacientes com vários tipos de epilepsia tiveram elevado nível de glutamato de forma relevante e foi também revelado que pacientes conscientes e com crises parciais de epilepsia tiveram aumento de glutamato, imediatamente antes da crise. Uma grande estimulação nos receptores ionotrópicos de glutamato levam a convulsões. De fato a epilepsia foi um dos primeiro alvos para os antagonistas dos receptores de NMDA. Algumas doenças e morbidades como a encefalopatia por hipóxia-isquêmica (HI), uma complicação grave da asfixia perinatal, está associada ao glutamato e ao aspartato. Drogas antiepilépticas como a

lamotrigina possuem como mecanismo de ação a inibição da liberação de glutamato (Papazisis and Kallaras, 2007).

A ativação de PKC pelo éster de forbol induz um aumento na liberação de glutamato. Já está bem estabelecido que a ativação da PKC por éster de forbol leva a um aumento na liberação de neurotransmissores em cortes de hipocampo de ratos e em sinaptossomos de cérebro humano, e também potencializa as correntes excitatórias pós-sinápticas. Trabalhos sugerem que a PKC pode ser altamente ativa no desenvolvimento do *status epilepticus* e de algum modo bloqueia a inibição da liberação de glutamato induzido pela ativação do receptor Y_2 . A fosforilação de substratos mediado por proteína quinase A e C está relacionado com um largo espectro de eventos neuronais, incluindo diferenciação neuronal, processo de crescimento e regeneração neuronal, neurotoxicidade induzida por glutamato e liberação de neurotransmissores (Silva et al, 2007).

Camundongos tratados durante 7 dias seguidos com AMI e AcAMI na dose de 25 mg/Kg, por via intraperitoneal tiveram seus cérebros dissecados e realizado o doseamento do aminoácido excitatório glutamato nas áreas do hipocampo e núcleos da base. Os resultados mostraram que para a região do hipocampo, enquanto o grupo tratados com AMI não apresentou nenhuma diferença importante em relação ao grupo controle tratado somente com Tween 80, 05%, o grupo tratado com AcAMI apresentou uma característica diferente da apresentada pela AMI com uma importante diminuição comparado ao controle. Nos núcleos da base tanto a AMI como o AcAMI provocaram reduções estatisticamente significantes nas concentrações do glutamato. Em trabalho recém publicado um estudo com o extrato da raiz de *Panax ginseng*, foi capaz de modular a liberação de aminoácidos dos neurônios (Naval et al, 2006).

A região cerebral dos camundongos que mais sofreu influência da após a administração da AMI e do AcAMI foi os núcleos da base (NB), que são um conjunto de estruturas encefálicas constituído pelo núcleo caudado, putamen, globo pálido, núcleo subtalâmico e substância negra. Estas estruturas controlam a atividade motora por meio da regulação de impulsos neuromotores que facilitam sua atividade tônica, auxiliando o planejamento e a execução de movimentos

seqüenciados como, por exemplo, a marcha humana. Os NB enviam e recebem sinais excitatórios do córtex sensorio-motor e também do cerebelo e do próprio tálamo. A principal função dessas estruturas é manter a prontidão de neurônios corticais, principalmente na área motora suplementar (AMS), para organizar e liberar seqüências de movimentos ou programas motores, em momentos adequados dentro de uma seqüência de movimentos auto-gerados. Durante a aprendizagem de movimentos e mesmo em movimentos bem aprendidos, os NB exercem importante função relacionada à formulação do comportamento adaptativo. Outra função importante é a de liberar e finalizar programas motores que sejam adequados para a aquisição de uma meta, como, por exemplo alcançar e segurar um objeto. Sua função também está relacionada à manutenção desse movimento durante sua execução e que pode ser observado pelas variações na velocidade e na amplitude do movimento. Desta forma, a atividade dos NB libera o córtex para outras ações concomitantes durante movimentos (Freund, 2002).

O aminoácido aspartato também foi quantificado das regiões cerebrais de camundongos tratados com AMI e AcAMI. É um aminoácido não essencial em mamíferos, tendo uma possível função de neurotransmissor excitatório no cérebro. Como tal existe indicações que o ácido aspártico possa conferir resistência à fadiga. É também um metabólito do ciclo da uréia e participa na gliconeogênese. Junto com o glutamato é um dos dois aminoácidos tendo carga negativa em pH fisiológico. Em mamíferos, o aspartato é degradado *in vivo* a oxaloacetato. Este metabólito é também o precursor da síntese do aspartato. A enzima responsável por esta reação é a aspartato aminotransferase que, como o nome indica, transfere um grupo amina do glutamato para o oxaloacetato para formar aspartato (o outro produto da reação é o α -cetogluturato). Este processo ocorre na matriz mitocondrial. O aspartato pode então sair da mitocôndria e participar no ciclo da uréia, servindo de precursor para o metabólito argininosuccinato. Através deste processo, o aspartato serve de precursor para a síntese de outro aminoácido, a arginina. O aspartato também serve de precursor na síntese de purinas e pirimidinas. O aspartato (a base conjugada do ácido aspártico) estimula os receptores NMDA, apesar de não ser mais potente que o neurotransmissor glutamato. Ele funciona como um neurotransmissor excitatório no cérebro e como excitotoxina (Philip et al, 2005).

A administração de AMI e também de AcAMI provocaram uma diminuição nas concentrações do aminoácido excitatório aspartato na região do núcleo da base de cérebros de camundongos. Contudo, não foi verificado o mesmo efeito no hipocampo. Este efeito foi significativo em relação a população controle que não fez uso dos triterpenos e apresentou-se de forma semelhante a redução de glutamato, outro aminoácido neurotransmissor excitatório.

A taurina é um aminoácido endógeno abundantemente presente no cérebro e tem várias funções fisiológicas incluindo proteção contra excitotoxicidade celular, modulação da excitabilidade celular, inibição de fosforilação de proteína, modulação da homeostase de cálcio e regulação da osmolaridade celular. A taurina é também muito importante para o desenvolvimento do sistema nervoso. Muitas evidências têm mostrado que a taurina exerce funções fisiológicas e regulação do desenvolvimento neural no mínimo através da ativação dos receptores de glicina e /ou dos receptores GABA_A (Tang et al, 2007).

A taurina é um aminoácido condicionalmente essencial, pois não é utilizado na síntese de proteínas, mas uma proporção é encontrada livre ou na forma de peptídeos simples. A taurina tem demonstrado ser essencial em certos aspectos no desenvolvimento dos seres humanos, e estudos *in vitro* de várias espécies têm demonstrado que baixas concentrações de taurina está associada com várias lesões patológicas, incluindo cardiomiopatia, degeneração retinal e retardo no crescimento, especialmente se a deficiência acontecer na fase de desenvolvimento. As ações metabólicas da taurina incluem: conjugação do ácido biliar, detoxificação, estabilização da membrana, osmoregulação e modulação dos níveis de cálcio celular. Clinicamente, a taurina, tem sido utilizada com variado grau de sucesso no tratamento de uma grande variedade de condições patológicas, que incluem: doenças cardiovasculares, hipercolesterolemia, epilepsia e outros tipos de convulsões, degeneração macular, mal de Alzheimer, doenças hepáticas, alcoolismo e fibrose cística (Birdsall, 1998).

Após o tratamento com AcAMI as concentrações de taurina no núcleo da base foram aumentadas, enquanto que nenhuma alteração foi vista nas concentrações de glicina. A taurina é um aminoácido que existe em grande concentração no cérebro e está relacionado com a neuromodulação inibitória e osmoregulação. O aumento dos níveis de taurina leva a uma redução nas frequências das crises epiléticas, estabilização da membrana e no balanço nos níveis de

glutamato, como demonstrado em modelos animais (Hilgier et al, 1996).

A glicina é o principal NT inibidor do tronco cerebral e medula espinhal. Tem também propriedades excitatórias, uma vez que ligando-se ao receptor NMDA, aumenta a sua sensibilidade para o GLU. Não é sintetizado pelo organismo, mas tem origem dietética. A sua inativação dá-se por recaptação neuronal. Possui apenas um receptor, o qual é um canal permeável ao Cl⁻. Ao nível da medula espinhal, a glicina é libertada por interneurônios inibitórios chamados de células de Renshaw. Estas células são ativadas por colaterais dos motoneurônios e inibem o motoneurônio responsável pela sua ativação. Estas células e a glicina são assim importantes porque limitam a ativação dos motoneurônios e permitem o relaxamento muscular. Daqui se depreende que um déficit de glicina provoque um aumento da rigidez muscular e morte por paralisia espástica dos músculos respiratórios. É precisamente o que acontece na intoxicação por estricnina (substância utilizada para matar ratos e que inibe o receptor da glicina) e o tétano (situação em que há infecção por uma bactéria que produz uma toxina capaz de inibir a secreção de glicina). A glicina é um aminoácido simples e essencial para os processos metabólicos do organismo. Pesquisas que datam de duas décadas atrás relatam seu papel importante como neurotransmissor inibitório do SNC. Altas concentrações de glicina foram descobertas no cordão espinhal e regiões supra-espinhais. Funcionando como neurotransmissor a glicina está localizada nos terminais pré-sinápticos detectada por pesquisas autoradiográficas e imunohistoquímica. Sinaptossomos derivados da medula espinhaç, cordão espinhal e cerebelo exibem liberação de glicina cálcio-dependente estimulado por potássio. Outras evidências que dão suporte ao papel da glicina como neurotransmissor inibitório foram obtidas usando pesquisas eletrofisiológicas que demonstraram a capacidade da glicina em causar hiperpolarização pós-sináptica por aumento da condutância do íon cloreto (Larson and Beitz, 1988).

Baseado na capacidade da estricnina antagonizar os efeitos da glicina, vários papéis fisiológicos da glicina tem sido descobertos através dos sintomas manifestados com a estricnina, os quais são caracterizados por mioclonus espinhal, resposta dolorosa a estimulação sensorial, distorção visual e percepções auditivas. Estes efeitos da estricnina sugerem que os receptores de glicina são importantes nas funções sensoriais, motoras e vias da nocicepção. Associado ao papel de transmissor, concentrações elevadas de glicina foram descobertas em pessoas com epilepsia, e

a remoção destas, como tratamento para convulsões de difícil tratamento, a redução de glicina está associada com um aumento de rigidez. O papel da glicina na etiologia da epilepsia é especialmente importante, pois as convulsões estão associadas com um aumento excessivo das vias excitatórias e a inibição destas vias neuronais é a principal via de tratamento. É interessante ressaltar que evidências foram apresentadas da existência de dois receptores de glicina, o clássico sítio inibitório sensível a estriçnina e um novo sítio insensível a estriçnina. A existência de receptores de glicina tem sido estudada utilizando técnicas para diferenciar a localização no SNC de sítios de ligação da glicina e da estriçnina. Mais importante é que estudos *in vitro* demonstraram que a glicina potencializa os efeitos despolarizantes do N-metil-D-aspartato (NMDA) (Larson and Beitz, 1988).

A administração de AMI e de AcAMI em camundongos durante um período de 7 dias seguidos não provocou nenhuma alteração nos níveis do aminoácido inibitório glicina nas regiões cerebrais estudadas (núcleos da base e hipocampo).

O triptofano é um aminoácido que se destaca dos demais por duas peculiaridades. Primeiro, pertence ao grupo dos aminoácidos essenciais e, segundo, é um dos menos abundantes na dieta. Essas características são importantes quando levamos em conta o amplo papel que seus produtos finais desempenham no equilíbrio fisiológico normal, e a facilidade com que a produção destes pode ser afetada quando interrompida a escassa oferta do substrato aminoácido. Dentre esses produtos destaca-se a 5-HT. Uma vez absorvido, o triptofano pode ser levado para o sistema nervoso central (SNC) onde será convertido em 5-HT, ou poderá permanecer na periferia. O triptofano destinado ao SNC terá seu primeiro obstáculo na barreira hematoencefálica. A baixa permeabilidade desta ao triptofano exige que este utilize a proteína transportadora de aminoácidos neutros grandes num processo de transporte ativo. O triptofano não é o único representante desse grupo e sua vaga no transportador será disputada com os demais aminoácidos (Oldendorf and Szabo, 1976).

Por mais de 35 anos, tem-se estudado o triptofano em psiquiatria. Um dos primeiros trabalhos publicados data de 1958. Nele foi administrado triptofano a sete pacientes esquizofrênicos que simultaneamente recebiam inibidores da monoaminoxidase (IMAO), notando-se um efeito euforizante nesses sete doentes. Três anos depois, Hess e Doefner

demonstraram que a administração de triptofano junto aos IMAO aumentava os níveis cerebrais de serotonina em ratos. Ainda na mesma década, foi demonstrado que o triptofano era capaz de induzir tal aumento mesmo sem a concomitância dos IMAO. No entanto, somente em 1970 foi comprovado que a administração de triptofano era capaz de aumentar os níveis líquidos de serotonina em seres humanos (Lauer et al, 1958; Eccleston et al, 1970).

A administração de AMI e de AcAMI em camundongos durante um período de 7 dias seguidos também não provocou nenhuma alteração significativa nos níveis do aminoácido inibitório glicina nas regiões cerebrais estudadas (núcleo da base e hipocampo).

O GABA é o principal neurotransmissor inibitório do cérebro, estando presente em 25% das sinapses do SNC. Está presente também na retina e é o mediador responsável pela inibição pré-sináptica. É formado por descarboxilação do glutamato. A sua inativação é feita por recaptação neuronal e também por degradação enzimática através da transaminação a succinato. O GABA tem três tipos de receptores que diferem quanto à sua distribuição e via de transdução de sinal: GABA_A tem distribuição difusa e é ionotrópico ($\uparrow\text{Cl}^-$). GABA_B tem distribuição difusa e é metabotrópico ($\uparrow\text{K}^+$, $\downarrow\text{AMPC}$, $\downarrow\text{Ca}^{2+}$). GABA_C presente apenas na retina e é ionotrópico ($\uparrow\text{Cl}^-$). A função inibitória do GABA tem várias implicações nomeadamente patológicas e terapêuticas. O déficit de GABA por inibição da enzima responsável pela sua síntese provoca uma doença caracterizada por rigidez e espasmos musculares dolorosos. Em termos terapêuticos, vários fármacos utilizados na prática clínica atuam potencializando o efeito inibitório do GABA. São eles, os benzodiazepínicos utilizados com ansiolíticos, hipnóticos e antiepiléticos e os barbitúricos utilizados como antiepiléticos e anestésicos. Ambos ligam-se a sítios específicos do receptor GABA_A favorecendo a sua ativação pelo GABA. Outro exemplo de um fármaco que atua através da ativação de um receptor GABAérgico (neste caso tipo B) é o baclofeno utilizado como relaxante muscular, sobretudo por via intratecal, no tratamento de doenças com rigidez muscular (tétano, secção medular).

A administração de AMI e de AcAMI em camundongos diminuiu não somente as concentrações de glutamato e aspartato, mas também as concentrações do GABA (este é sintetizado a partir do glutamato) na região do núcleo da base. Estudos realizados com

sinaptossomos de tecidos cerebrais de pacientes com epilepsia de lobo temporal, mostrou redução nas concentrações de glutamina e GABA assim como na razão glutamina/glutamato.

Os dados apresentados e envolvidos nas alterações no balanço entre aminoácidos excitatório e inibitório podem ser um fator pelo qual a administração de AMI contribui para a neuroproteção como visto anteriormente.

A tirosina é convertida em levodopa pela enzima tirosina hidroxilase. Alguns resíduos de tirosina podem ser fosforilados, com adição de um grupo fosfato, por proteínas quinases. Neste estado fosforilado a tirosina é conhecida como fosfotirosina. A fosforilação da tirosina é considerada um importante passo nos sinais de transdução e na regulação da atividade enzimática. A fosfotirosina pode ser detectada através de anticorpos específicos. Resíduos de tirosina podem também ser modificado pela adição de um grupo sulfato, um processo conhecido como sulfatação da tirosina. A sulfatação da tirosina é catalizada pela tirosilproteína sulfontransferase (TPST). Assim como os anticorpos fosfotirosina mencionado acima, anticorpos também têm sido recentemente descobertos para detectar sulfotirosina. Tirosina é também precursor de hormônios da tireóide, como a tiroxina e triiodotironina, o pigmento melanina e as catecolaminas biologicamente ativas, dopamina, norepinefrina e epinefrina. A tirosina não é completamente sintetizada pelos animais, embora ela possa ser produzida pela hidroxilação da fenilalanina se esta estiver em concentrações abundantes. A tirosina hidroxilase é a enzima limitante envolvida nas sínteses de catecolaminas como a dopamina, norepinefrina e epinefrina. A L-tirosina é em alguns casos recomendada para o tratamento de baixo peso corporal, doença de Parkinson, depressões clínicas, distúrbios do déficit de atenção e fenilcetonúria, entretanto um estudo tem revelado que ela não tem nenhum impacto na tolerância ao exercício físico (Molnar et al, 2005)

A AMI e o AcAMI aumentaram significativamente as concentrações de tirosina nas duas áreas cerebrais analisadas (núcleos da base e hipocampo). O aumento da tirosina nas duas áreas estudadas pode estar relacionado com o efeito antidepressivo apresentado pela AMI antes da esterificação. Este efeito antidepressivo parece envolver o sistema noradrenérgico, mas ao que tudo indica não envolve o sistema serotoninérgico, conforme discutido anteriormente. Isto está associado ao fato de que nenhuma alteração foi demonstrada nos níveis de triptofano, um

precursor da serotonina.

As catecolaminas e seus metabólitos também foram objetos deste estudo, assim a AMI foi administrada em camundongos e a partir do córtex cerebral destes animais estas aminas foram quantificadas. Um desequilíbrio das catecolaminas no organismo pode resultar em condições patológicas de depressão, ansiedade e outras morbidades no sistema nervoso central.

As catecolaminas norepinefrina e dopamina são derivadas do aminoácido tirosina e partilham de uma via biosintética comum. A norepinefrina foi um dos primeiros neurotransmissores descoberto e é abundante tanto no sistema nervoso central quanto no sistema nervoso periférico. É o principal neurotransmissor do sistema nervoso simpático, onde têm efeitos profundos na função cardiovascular e atividade em outros tecidos e órgãos. Neurônios noradrenérgicos são abundantes na medula espinhal e projetam-se extensamente no cérebro. Classicamente, neurônios do sistema nervoso noradrenérgico são responsáveis em promover a vigília e o despertar e media respostas para o stress. Corpos celulares dopaminérgicos são mais abundantes na medula espinhal e a ativação das vias dopaminérgicas têm profundos efeitos no rendimento motor e media o estado motivacional (Weinshenker and Szot, 2002).

A AMI na concentração de 2,5 e 5 mg/kg, administrada por via intraperitoneal mostrou uma redução nos níveis de noradrenalina, quantificada do córtex cerebral de camundongos através de HPLC.

Alterações na concentração de 5-HT também foram observadas após a administração de AMI nas doses de 1, 2,5 e 5 mg/kg, onde este neurotransmissor teve um significativo decréscimo em relação ao grupo controle. A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é um importante neuromodulador que está envolvido em muitos aspectos da função neural, incluindo a regulação da ansiedade, depressão, apetite, sono e ritmo circadiano. Inclusive, uma classe de antidepressivos é denominada de inibidores da recaptação de serotonina (SSRIs), que age exatamente inibindo a recaptação de 5-HT. Também é bem conhecido que os diferentes efeitos celulares da 5-HT são mediados por vários receptores de 5-HT (Sigeng et al, 2007).

Desta forma, a quantificação das monoaminas e dos aminoácidos foram importantes para explicar, pelo menos parcialmente, os efeitos no SNC apresentados pela AMI e pelo AcAMI nos modelos comportamentais. A diminuição nas concentrações de aminoácidos excitatórios como o aspartato e o glutamato e um aumento da taurina que está relacionado com neuromodulação inibitória, podem justificar os efeitos depressores do SNC da AMI e do AcAMI como as atividades sedativas, ansiolíticas e anticonvulsivante.

Já o aumento das concentrações de tirosina, precursoras de monoaminas cerebrais como a noradrenalina e dopamina, tanto nos núcleos da base como no hipocampo provocado pela administração de AMI e AcAMI talvez possa está relacionado com a atividade antidepressiva destas drogas mostradas no teste do nado forçado.

O AcAMI parece exercer um efeito mais intenso do que a AMI, pois estes efeitos foram evidenciados não só nos núcleos da base, mas também no hipocampo, principalmente a inibição dos aminoácidos aspartato e glutamato.

O doseamento de monoaminas do córtex cerebral não forneceu elementos que justifiquem a teoria monoaminérgica no efeito antidepressivo da AMI.

7. CONCLUSÕES

1. No teste do campo aberto, utilizado para avaliar a atividade sedativa, AMI administrada por via oral ou intraperitoneal, de modo agudo ou sub-crônico (7 dias) em camundongos, diminuiu tanto a atividade exploratória quanto o *grooming*. Estes dados indicam que a droga apresenta efeito sedativo e interfere também com a neurotransmissão dopaminérgica sem, contudo interferir na coordenação motora dos animais, avaliada pelo teste do *rota rod*;
2. No teste do campo aberto, a administração em camundongos da associação de AMI e flumazenil, antagonista BZD competitivo, reverteu os efeitos sedativos da AMI, sugerindo que, pelo menos em parte, estes efeitos são de natureza gabaérgica;
3. AMI aumentou de modo significativo a duração do sono, no modelo de sono induzido por pentobarbital, sugerindo também efeito sedativo;
4. No teste do labirinto em cruz elevado, utilizado para a avaliação de atividade ansiolítica, AMI aumentou o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, assim como uma redução no número de entradas e no tempo de permanência nos braços fechados, efeitos totalmente revertidos pelo flumazenil. Estes dados indicam que a AMI apresenta efeito ansiolítico e confirmam os efeitos da droga, anteriormente descritos no teste do campo aberto;
5. Em doses menores e que não causaram sedação (<10 mg/kg), AMI apresentou também efeito antidepressivo, avaliado pelo teste do nado forçado. Experimento realizado com a associação de AMI e imipramina, antidepressivo tricíclico, que age bloqueando os mecanismos de recaptação de NE e 5-HT, mostrou que o efeito antidepressivo da AMI foi potencializado. Além disso, na presença de reserpina, droga que causa depleção de monoaminas no SNC, os efeitos antidepressivos de AMI não foram evidenciados. Finalmente, como não se observou nenhum efeito sinérgico quando da associação de AMI com paroxetina, um bloqueador seletivo da recaptação de serotonina, conclui-se que o efeito antidepressivo de AMI tem como alvo principal a neurotransmissão noradrenérgica e não a neurotransmissão serotoninérgica;

6. A atividade anticonvulsivante de AMI foi avaliada nos modelos de convulsões induzidas por PTZ, pilocarpina e estriçnina. A AMI foi eficaz no modelo de PTZ, sugerindo que age no complexo receptor $GABA_A$ -BZD. Além disso, a atividade anticonvulsivante da AMI foi potencializada com a presença de estaurosporina e polimixina B, inibidores não seletivos de PKC e que inibem também, as convulsões tônicas induzidas por NMDA;
7. Estudos *ex-vivo*, em córtex cerebral de camundongos tratados com a AMI, mostraram que esta reduziu de modo significativo as concentrações de NE e de 5-HT, o que constituiu um dado inesperado, visto que, devido ao efeito antidepressivo da droga, seria de se esperar um aumento nas concentrações desta monoaminas. Contudo, os chamados antidepressivos “atípicos” não satisfazem totalmente os critérios previstos na hipótese monoaminérgica da depressão. Assim, a mianserina atua via receptores centrais do subtipo α -2 ; a tianeptina aumenta a captação de 5-HT e o trazodone é considerado um agonista de receptores 5-HT_{1A}. Além disso, a mirtazapina é um potente antihistamínico cujo mecanismo de ação parece envolver antagonismos de receptores 5-HT₂ e α -adrenérgico;
8. Estudos *ex vivo* de hipocampo e núcleos da base, em camundongos tratados com AMI, mostraram que esta droga reduziu a concentrações de aspartato, glutamato e GABA e aumentou as concentrações de taurina, nos núcleos da base. Tanto no hipocampo, quanto nos núcleos da base, AMI aumentou os níveis de tirosina (aminoácido precursor da NE). Estes dados podem justificar, pelo menos em parte, as atividades ansiolítica e anticonvulsivante da droga;
9. O derivado acetilado de AMI, AcAMI administrado sub-cronicamente em camundongos causou sedação, como avaliado no teste do campo aberto. AcAMI também apresentou atividade ansiolítica, tanto após a administração aguda, quanto sub-crônica. Nestes testes, AcAMI mostrou-se mais eficaz do que AMI;
10. AcAMI apresentou ainda atividade anticonvulsivante, tendo sido mais eficaz no modelo de convulsões induzidas por PTZ. AcAMI aumentou de modo significativo o tempo de sono

barbitúrico. As alterações demonstradas nas concentrações de aminoácidos, no hipocampo e núcleos da base, foram semelhantes aquelas observadas nos estudos *ex vivo* realizados com AMI;

11. Por fim, a mistura triterpênica de alfa e beta-amirina apresenta várias ações no SNC, com destaque para as atividades aniolíticas/sedativa, antidepressiva e anticonvulsivante. Vários experimentos mostraram o envolvimento da neurotransmissão GABAérgica (complexo canal de cloreto/receptor GABAA-BZD), a participação de proteínas quinases (principalmente PKC) e alterações (reduções) nos níveis de aminoácidos excitatórios (glutamato e aspartato), além do aumento nas concentrações de taurina, considerado como aminoácido neuroprotetor, que podem explicar, em parte, o mecanismo de ação e o perfil farmacológico da droga.

Contudo, alguns pontos ainda não foram esclarecidos de modo satisfatório, como é o caso da atividade antidepressiva. Assim, é possível que outros mecanismo possam estar envolvidos com os efeitos da alfa- e beta-amirina no SNC.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; YAMANOUCHI, S.; TAKIDO, M.; KUMAKI, K.; TAMURA, T. Triterpene alcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1255-1260, 1996.

ANSELONI, V. Z.; MOTTA, V.; LIMA, G.; BRANDÃO, M. L. Behavioral and pharmacological validation of the elevated plus-maze constructed with transparent walls. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, p. 597-601, 1995.

ARAGAO, G.F. **Atividade antiinflamatória, antiagregante plaquetária e Central da mistura isomérica de α - e β -amirina extraído do *Protium heptaphyllum* Aubl. March. 2004.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Fortaleza – CE.

ARAGAO, G.F.; CARNEIRO, L.M.V.; FROTA-JUNIOR, A.P.; BANDEIRA, P.N.; LEMOS, T.L.G.; VIANA, G.S.B. Antiplatelet activity of α - and β -amyrin, isomeric mixture from *Protium heptaphyllum*. **Pharmaceutical Biology**, v.45, p.343-349, 2007.

ARCHER, J. – Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim Behav**, v.21, n.2, p. 205-235, 1973.

BANDEIRA, P.N. **Contribuição ao Estudo Químico de Plantas do Nordeste Brasileiro – *Protium heptaphyllum* March. e *Protium tenuifolium* Engl. 2003.** Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Ceará, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Fortaleza – CE.

BHALLA, T.N.; GUPTA, M.B.; BHARGAVA, K.P. Antipyretic and analgesic activity of some natural products. **Ind J Pharmac**, v.3, p.194-196, 1971.

BIGGIO, G.; CIBIN, M.; DIANA, M.; FADDA, F.; FERRARA, S.D.; GALLIMBERTI, L.; GESSA, G.L.; MEREU, G.P.; ROSSETTI, Z.L.; SERRA, M. Suppression of voluntary alcohol intake in rats and alcoholics by gamma hydrobutyric acid: a non-GABAergic mechanism. **Biochemical Psychopharmacology**, v.47, p.281–288, 1992.

BIRDSALL, T.C. Therapeutic applications of taurine. **Altern Med Rev**, v.3, p.128-136, 1998.

BLANCHARD, D.C.; HORI, K.; RODGERS, R. J.; HENDRIC, C. A.; BLANCHARD, R. J. Attenuation of defensive threat and attack in wild rats (*Rattus rattus*) by benzodiazepines. **Psychopharmacology**, v. 97, p. 392-401, 1989.

BRINKHAUS, B.; LINDNER, M.; SCHUPPAN, D.; HAHN, E.G. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. **Phytomedicine**, v.7, p.427-428, 2007.

BRUNELLO, N.; MENDLEWICZ, J.; KASPER, S. The role of noradrenaline and selective noradrenaline reuptake inhibition in depression. **Eur Neuropsychopharmacol**, v.12, p.461-75, 2002.

CAROLA, V.; D'OLIMPIO; BRUNAMONTI, E.; MANGIA, F.; RENZI, P. Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behavior in inbred mice. **Behavioral Brain Research**, v.134, p.49-57, 2002.

CHATTERJEE, T.K.; CHAKRABORTY, A.; PATHAK, M.; SENGUPTA, G.C. Effects of plant extract *Centella asiatica* (Linn.) on cold restraint stress ulcer in rats. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.30, p.889-891, 1992.

CHEN, B.; DOWLATSHAHI, D.; MACQUEEN, G.M.; WANG, J.F.; YOUNG, L.T. Increased hippocampal BDNF immunoreactivity in subjects treated with antidepressant medication. **Biol Psychiatry**, v.50, p.260-265, 2001.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil**, Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v.1, p.82, 1984.

COSTA, A.F. **Farmacognosia**, 5ª Ed. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, p.773-877, 1994.

CZUCZWAR, S.J.; FREY, H.H. Effect of morphine and morphine-like analgesics on susceptibility to seizures in mice. **Neuropharmacol**, v.25, p.465-469, 1986.

DANBOLT, C.N. Glutamate uptake. **Progress in Neurobiology**, v.65, p.1-105, 2001.

DE SOUSA, D.P.; GONCALVES, J.C.R.; QUINTANS-JUNIOR, L.; CRUZ, J.S.; ARAUJO, D.A.M.; DE ALMEIDA, R.N. Study of anticonvulsant effect of citronellol, a monoterpene alcohol, in rodents. **Neuroscience Letters**, v.401, p.231-235, 2006.

DE SOUSA, M.M.; MADEIRA, A.; BERTI, C.; KROGH, R.; YUNES, R.A.; CECHINEL-FILHO, V. Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea péscaprae* (L) R. Br. **Journal of Ethnopharmacology**, v.69, p.85-90, 2000.

DEAKIN, J.F.W.; GRAEFF, F.G. 5-HT and mechanisms of defense. **J Psychopharmacol**, v.5, p.305-315, 1991.

DELLA-LOGGIA, R.; TUBARO, S.; SOSA, S.; BECKER, H.; SAAR, S.T.; ISAAC, O. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. **Planta Medica**, v.60, p.516-520, 1994.

DIENER, A.C.; LI, H.; ZHOU, W-X.; WHORISKEY, W. J.; NES, W. D. & FINK, G. R. sterol methyltransferase 1 controls the level of cholesterol in Plants. **The Plant Cell**, v.12, p.853-870, 2000.

DOBLE, A. New insights into the mechanism of action of hypnotics. **J Psychopharmacol**, v.13, p.11-20, 1999.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **J Amer Pharm Assoc**, v.46, p.208-210. 1957.

ECCLESTON, D.; ASHCROFT, G.W.; CRAWFORD, T.B. Effect of tryptophan administration on 5-HIAA in cerebrospinal fluid in man. **J Neurol Neurosurg Psychiatry**, v.33, p.269-272, 1970.

EKIMOTO, H.; IRIE, Y.; ARAKI, Y.; HAN, G.Q.; KADOTA, S.; KIKUCHI, T. Platelet aggregation inhibitors from the seeds of *Swietenia mahagoni*: inhibition of *in vitro* and *in vivo* platelet-activating factor-induced effects of tetranortriterpenoids related to swietenine and swietenolide. **Planta Medica**, v.57, p.56-58, 1991.

FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.42, n.3, 2006

FERNANDEZ, L.E.; PADIAL, L.R. Antiaagregacion Plaquetária. Quando está indicado um antiagregante oral distinto al acido acetilsalicílico (AAS)? **Boletín Farmacoterapéutico de Castilla La Mancha**. Vol. IV. No. 02. Ano 2003.

FERRINI, R.; MIRAGOLI, G.; TACCARDI, B. Neuropharmacological studies on SB 5833, a new psychotherapeutic agent of the benzodiazepine class. **Arzneimittel-Forschung**, v.24, p.2029-2032, 1974.

FILE, S. E. The interplay of learning and anxiety in the elevated plus-maze. **Behavioral Brain Research**, v. 58, p. 199-202, 1993.

FRANSCICHETTI, I.M.; MONTEIRO, R.Q.; GUIMARÃES, J.A.; FRANCISCHETTI, B. Identification of glycyrrhizin as a thrombin inhibitor. **Biochem Biophys Res Commun**, v.235, p.259-263, 1997.

FREIRE, S.M.; TORRES, L.M.; ROQUE, N.F.; SOUCCAR, C; LAPA, A.J. Analgesic activity a triterpene isolated from *Scoparia dulcis* L (Vassourinha). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.86, p.2149-2151, 1991.

FREITAS, R.M.; SOUSA, F.C.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; FONTELES, M.M.F. Alterações agudas dos níveis de neurotransmissores em corpo estriado de ratos jovens após estado epiléptico induzido por pilocarpina. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, Brasil, v. 61, p.430-433, 2003.

FREUND, H.J. Mechanisms of voluntary movements. **Parkinsonism & Related Disorders**, v.9, p.55-59, 2002.

FRISCHKORN, C.G.B.; FRISCHKORN, H.E. Cercaricidal Activity of Some Essencial Oils of Plants from Brazil, **Naturwissenschaften**, v.65, p.480-483, 1978.

FÜRST, P.; POLLACK, L.; GRASER, T.A.; GODEL, H.; STEHLE, P. Appraisal of four pre-column derivatization methods for the high-performance liquid chromatographic determination of free amino acids in biological materials. **Journal of Chromatography A**, v.499, p.557-569, 1990.

GAO, L; GREENFIELD, L.J. Activation of protein kinase C reduces benzodiazepine potency at GABA_A receptors in NT2-N neurons. **Neuropharmacology**, v.48, p.333-342, 2005.

GASIOR, M.; CARTER, R. B.; GOLDBERG, S.R.; WITKIN, J.M. Anticonvulsant and behavioral effects of neuroactive steroids alone and in conjunction with diazepam. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.282, p.543-553, 1997.

GOMEZ, M.A.; SAENZ, M.T.; GARCIA, M.D.; AHUMADA, M.C.; DE LA PUERTA, R. Cytostatic activity against Hep-2 cells of methanol extracts from *Viscum cruciatum* Sieber parasitic on *Crataegus monogyna* Jacq. and two isolated principles, **Phytotherapy Research**, p.240–242, 1997.

GORDON, J.A. Anxiolytic drug targets: beyond the usual suspects. **J Clin Invest**, v.110, p.915-917, 2002.

GOTTSTEIN, N.; EWINS, B.A.; ECCLESTON, C.; HUBBARD, G.P.; KAVANAGH, I.C.; MINIHAINE, A.M.; WEINBERG, P.D.; RIMBACH, G. Effect of genistein and daidzein on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. **British Journal of Nutrition**, v.89, p.607-616, 2003.

GRAEFF, F.G. Medicamentos Ansiolíticos. **Fundamentos de Psicofarmacologia**, Atheneu, São Paulo, 1999.

GUIMARÃES, A.C., “Estudo químico e biológico das folhas de *Protium strumosum* (DALY), *Protium grandifolium* (ENGL), *Protium llewelynii* (MACBR), *Protium hebetatum* (DALY) e *Protium altsonii* (SANDW).”, 98F, **Tese (Mestrado em Química Orgânica), Universidade do Amazonas – UA**, Manaus – AM, 1997.

HANDLEY, S. L.; MITHANI, S. Effects of α -adrenoceptor agonists and antagonists in a maze exploration model of “fear” motivated behavior. **Naunyn-Schmiedeberg’s Archives in Pharmacology**, v. 327, p.1-5, 1984.

HANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Central nervous system stimulants and psychotomimetic drugs. Editors, **Pharmacology** (4th ed.), Churchill Livingstone, p. 604–613, 2000.

HANSEN, S.L.; SPERLING, B.B.; SÁNCHEZ, C. Anticonvulsant and antiepileptogenic effects of GABA_A receptor ligands in pentylenetetrazole-kindled mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v.28, p.105-113, 2004.

HASMEDA, M.; KWEIFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.; POLYA, G.M. Selective inhibition of eukaryote protein kinases by anti-inflammatory triterpenoids, **Planta Medica**, v.65, n.1, p.14-18, 1999.

HILGIER, W.; OLSON, J.E.; ALBRECHT, J. Relation of taurine transport and brain edema in rats with simple hyperammonemia or liver failure. **J Neurosci Res**, v.45, p.69-74, 1996.

HOSZTAFI, S. The history of heroin. **Acta Pharm Hung**, v.71, p.233-242, 2001.

HUBBARD, G. P.; STEVENS, J. M.; CICMIL, M.; SAGE, T.; JORDAN, P. A.; WILLIAMS, C. M.; LOVEGROVE, J. A; GIBBINS, J. M. Quercetin inhibits collagen-stimulated platelet activation through inhibition of multiple components of the glycoprotein VI signaling pathway. **J. Thromb Haemost**, v. 1, n. 5, p. 1079-1088, 2003.

JOHANSSON, C.; AHLENIUS, S. Evidence for the involviment of 5-HT_{1A} receptors in the mediation of exploratory locomotor activity in the rat. **J Psychopharmacol.**, v. 3, p. 32-35; 1989.

JUNG, M.E.; LAL, H.; GATCH, M.B. The discriminative stimulus effects of pentylentetrazole as a model of anxiety: recent developments. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v.26, p.429-439, 2002.

KAMETANI, H. Analysis of age-related-changes in stress-induced grooming in the rat – differential behavioral profile of adaptation to stress. **Ann NY Acad Sci**, v.525, p.101-113, 1988.

KING, C.M.; GLOWINSKI, I.B. Acetylation, deacetylation and acyltransfer. **Environ Health Perspect.**, v.49, p.43-50, 1983.

KLEINGEIST, B.; BOCKER, R.; GEISSLINGER, G.; BRUGGER, R. Isolation and Pharmacological Characterization of Microsomal Human Liver Flumazenil Carboxylesterase. **J Pharm Pharmaceut Sci**, v.1, p.38-46, 1998.

KORPI, E.R.; GRÜNDER, G.; HARTMUT, L. Drug interactions at GABA_A receptors. **Progress in Neurobiology**, v.67, p.113-159, 2002.

KRALIC, J.E.; O'BUCKLEY, T.K.; KHISTI, R.T.; HODGE, C.W.; HOMANICS, G.E.; MORROW, A.L. GABA_A receptor α -1 subunit deletion alters receptor subtype assembly, pharmacological and behavioral responses to benzodiazepines and zolpidem. **Neuropharmacology**, v.43, p.685-694, 2002.

KROGH, R.; KROTH, R.; BERTI, C.; MADEIRA, A.O.; SOUZA, M.M.; CECHINEL-FILHO, V.; DELLE-MONACHE, F.; YUNES, R.A. Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., **Pharmazie**, v.54, n.6, p.464-466, 1999.

KUMAR, S.; KHISTI, R.T.; MORROW, A.L. Regulation of native GABA_A receptors by PKC and protein phosphatase activity. **Psychopharmacology**, v.183, p.241-247, 2005.

KWEIFIO-OKAI, G.; BIRD, D.; FIELD, B.; AMBROSE, R.; CARROL, A.R.; SMITH, P.; VALDES, R. Anti-inflammatory activity of a *Ghanaian* antiarthritic herbal preparation: III., **J Ethnopharmacology**, v.46, n.1, p.7-15, 1995.

KWEIFIO-OKAI, G.; CARROL, A.C. Antiarthritic effect of *Alstonia boonei* triterpenes. p.19-23.1992

KWEIFIO-OKAI, G.; DE MUNK, F.; RUMBLE, B.A.; MACRIDES, T.A.; CROPLEY, M. Antiarthritic mechanism of amyirin triterpenes, **Res Commun Mol Pathol Pharmacol**, v.85, n.1, p.45-55, 1994.

KWEIFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.A. Antilipoxygenase activity of amyirin triterpenes, **Res Commun Chem Pathol Pharmacol**, v.78, n.3, p.367-372, 1992.

LARSON, A.A.; BEITZ, A.J. Glycine Potentiates Strychnine-Induced Convulsions: Role of NMDA Receptors. **The Journal of Neuroscience**, v.8, p.3822-3828, 1988.

LAUER, J.W.; INSKIP, W.M.; BERNSOHN, J.; ZELLER, E.A. Observation on schizophrenic patients after iproniazid and tryptophan. **AMA Arch Neurol Psychiatrs**, v.80, p.122-130, 1958.

LIN, H.C.; DING, H.Y.; CHANG, W.L.; Two new fatty diterpenoids from *Salvia miltiorrhiza*. **J Nat Prod**, v.64p.648-650, 2001.

LING, H.C.; KING, M.L.; CHEN, C.F.; HSU, K.P.; SU, M.H.; LIN, M.H. Structure activity relationship of some triterpenoid and their derivatives as anticancer agents, **Chin Med J**, v.29, p.308-315, 1982.

LISTER, R. G. Interaction of RO15-4513 with diazepam, sodium pentobarbital and ethanol in a hole board test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 28, p. 75-79, 1987.

MAHATO, S.B.; KUNDU, A.P. ^{13}C NMR Spectra of pentacyclitriterpenoids – A compilation and some salient features, **Phytochemistry**, v.37, n.6, p.1517-1575, 1994.

MAHATO, S.B.; SEN, S. Advances in triterpenoids research, **Phytochemistry**, v.44, n.7, p.1185-1236, 1997.

MAKABE, H.; MARU, N.; KUWABARA, A.; KAMO, T.; HIROTA, M. Anti-inflammatory sesquiterpenes from *Curcuma zedoaria*. **Nat Prod Res**, v.20, p.680-685, 2006.

MATSUNAGA, S.; TANAKA, R.; AKAGI, M. Triterpenoids from *Euphorbia maculate*. **Phytochemistry**, p.535–537, 1998.

MEDEIROS, R.; OTUKI, M.F.; AVELLAR, M.C.W.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **European Journal Pharmacology**, v.559, p. 227-235, 2007.

MEEI-JEN, L.; TIANG-SHUNG, W. Triterpenoids from *Rubia yunnanensis*. **J Nat Prod**, v.65, p.1283-1287, 2002.

MILO, S.; ANSONOFF, M.; KING, M.; ROSSI, G.C.; ZUCKERMAN, A.; PINTAR, J.; PASTERNAK, G.W. Codeine and 6-acetylcodeine analgesia in mice. **Cell Mol Neurobiol**, v.26, p.1011-1019, 2006.

MIRANDA, A.L.; SILVA, J.R.; REZENDE, C.M.; NEVES, J.S.; PARRINI, S.C.; PINHEIRO, M.L.; CORDEIRO, M.C.; TAMBORINI, E.; PINTO, A.C. Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from *Himatanthus sucuuba*, **Planta Medica**, v.66, n.3, p.284-286, 2000.

MOLNAR, G.A.; WAGNER, Z.; MARKO, L.; KO-SZEGI, T.; MOHAS, M.; KOCSIS, B.; MATUS, Z.; WAGNER, L.; TAMASKO, M.; MAZAK, I.; LACZY, B.; NAGY, J.; WITTMANN, I. Urinary ortho-tyrosine excretion in diabetes mellitus and renal failure: evidence for hydroxyl radical production, **Kidney Int.**, v. 68, p. 2281-2287, 2005.

MONTGOMERY, K. C. The relation between fear induced by novelty stimulation and exploratory behaviour. **J Comp Physiol Psychol**, v. 48, p. 254-260, 1955.

- NAM, N. H. Naturally occurring NF-kB inhibitors. **Mini Rev Med Chem**, v.6, p.945-951, 2006.
- NAVAL, M.V.; GOMEZ-SERRANILOS, M.P.; CARRETERO, M.E.; DE ARCE, C. Value of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in the determination of *Panax ginseng* radix extract effect in cultured neurons. **Journal of chromatography A**, v.1121, p.242-247, 2006.
- NAVARRETE, A.; TREJO-MIRANDA, J.L.; REYES-TREJO, L. Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. **J Ethnopharmacol**, v.79, p.2134-2139, 2002.
- OHKUBU, S.; NAKAHAT, N.; OHIZUMI, Y. Thromboxane A₂ - mediated shape change: independent of Gq-phospholipase C – Ca²⁺ pathway in rabbit platelets. **Br J Pharmacol**, v.117, p.1095–1104, 1996.
- OLDENDORF, W.H.; SZABO, J. Amino acids assignment to one of three blood-brain Barrier amino acid carriers. **Am J Physiol**, v.230, p.94-98, 1976.
- OLIVEIRA, F.A.; COSTA, C.L.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; CAVALCANTE, I.J.; LIMA, A.F.; LIMA JR, R.C.; SILVA, R.M.; CAMPOS, A.R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.; Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.98, p.103-108, 2005a.
- OLIVEIRA, F.A.; COSTA, C.L.S.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C; CAVALCANTE, I.J.M.; LIMA, A.F.; LIMA JR., R.C.P.; SILVA, R.M.; CAMPOS, A.R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by α - and β -amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. **Life Sciences**, v. 77, p.2942-2952, 2005b.
- OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA JUNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C.; FLORÊNCIO, M.G.; LIMA-JUNIOR, R.C.P.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Gastroprotective effect of the mixture of α - and β -amyrin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. **Planta Med**, v.70, p.780-782, 2004a.
- OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA JUNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.C.; FLORÊNCIO, M.G.; LIMA-JUNIOR, R.C.P.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats.

Pharmacological Research, v.49, p.105-111, 2004b.

OTUKI, M.F.; FERREIRA, J.; LIMA, F.V.; MEYRE-SILVA, C.; MALHEIROS, A.; MULLER, L.A.; CANI, G.S.; SANTOS, A.R.S.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Antinociceptive properties of mixture of α -amyrin and β -amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v.313, p.310-318, 2005.

PAPAZISIS, G.; KALLARAS, K.; KAIKI-ASTARA, A.; POURZITAKI, C.; TZACHANIS, D.; DAGKLIS, T.; KOUVELAS, D. Neuroprotection by lamotrigine in a rat model of neonatal hypoxic-ischaemic encephalopathy. **Int J Neuropsychopharmacol**, v.26, p.1-9, 2007.

PARK, H.G.; YOON, S.Y.; CHOI, J.Y.; LEE, G.S.; CHOI, J.H.; SHIN, C.Y.; SON, K.H.; LEE, Y.S.; KIM, W.K.; RYU, J.H.; KO, K.H.; CHEONG, J.H. Anticonvulsant effect of wogonin isolated from *Scutellaria baicalensis*. **European Journal of Pharmacology**, v.574, p.112-119, 2007.

PERNET, R. Phytochimie des Burseraceae, **Lloydia**, v.35, n.3, p.280-287, 1972.

PHILIP, E.C.; MATTHEW, T.G.; PHILLIP, J.S.; ALEXANDER, R.J.; HONGJIE, Y.; AMANDA, L.J.; JAMES, P.S.; STEPHEN, F.T.; DAVID, J.A.; WYLLIE. Structural Features of the Glutamate Binding Site in Recombinant NR₁/NR_{2A} N-Methyl-D-aspartate Receptors Determined by Site-Directed Mutagenesis and Molecular Modeling. **Molecular Pharmacology**, v.67, p.1470-1484, 2005.

PIGNATELLI, P.; PULCINELLI, F. M.; LENTI, L.; GAZZANIGA, P. P.; VIOLI, F. Hydrogen peroxide is involved in collagen-induced platelet activation. **Blood**, v. 15, n. 91, p. 484-490, 1998.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFÂNIO, R.A. PRODUTOS NATURAIS: ATUALIDADE, DESAFIOS E PERSPECTIVAS. **Quim Nova**, v.25, p.45-61, 2002.

PINTO, S.A.; PINTO, L.M.; CUNHA, G.M.; CHAVES, M.H.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Anti-inflammatory effect of α -, β -amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. **Inflammopharmacology**. 2007.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives of International Pharmacodynamic and Therapeutics** v.229, p.327-336, 1977.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open-field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal of Pharmacology**, v.60061, p.1-31, 2003.

QUITANS-JÚNIOR, L.J.; ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, C.G.M.; AGRA, M.F.; SOUSA, M.F.V.; BARBOSA-FILHO, J.M. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro, **Acta Farm Bonaerense**, v.21, p.179-184, 2002.

RAJIC, A.; KWEIFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.; SANDEMAN, R.M.; CHANDLER, R.M.; POLYA, G.M. Inhibition of serine proteases by anti-inflammatory triterpenoids, **Planta Medica**, v.66, n.3, p.206-210, 2000.

RAMESH, N., VISWANATHAN, M.B., SARASWATHY, A., BALAKRISHNA, K., BRINDHA, P., LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. Phytochemical and antimicrobial studies on *Drynaria quercifolia*, **Fitoterapia**, v.72, p. 934-936, 2001.

RAMOS, A.; BERTON, O.; MORMEDE, P.; CHAUOFF, F. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behavioral Brain Research**, v. 85, p. 57-69, 1997.

RIBEIRO, J.E.L.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. **Flora da Reserva Ducke**, 19ª edição, Inpa, p. 534-542, 1999.

RODGERS, R. J.; COLE, J. C. The elevated plus-maze: Pharmacology, Methodology and Ethology. **Ethology and Psychopharmacology**. John Wiley & Sons, Nova York, v. 9, p. 43, 1994.

RODGERS, R. J.; COLE, J.C. The elevated plus-maze: Pharmacology, methodology and ethology. In: COOPER, S. J.; HENDRIE, C. A. (Ed.). **Ethology and psychopharmacology**. Chichester: John Wiley and Sons, p. 9-44, 1994.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J. Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 52, p. 297-303, 1995.

RODGERS, R. J.; JOHNSON, N. J.; COLE, J. C.; DEWAR, C. V.; KIDD, G. R.; KIMPSON, P. I. I. Plus-maze retest profile in mice: Importance of initial stages of trial and response to post-trial cholinergic receptor blockade. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 54, p. 41-50, 1996.

SAEED, M.A.; SABIR, A.W. Irritant potential of some constituents from the seeds of *Caesalpinia bonducella* (L.) Fleming. **J Asian Nat Prod Res**, v.5, p.35-41, 2003.

SAEED, S.A.; GILANI, A.H.; MAJOO, R.U.; SHAN, B.H. Anti-thrombotic and anti-inflammatory activities of protopine. **Pharmacol Res**, v.36, p.1-7, 1997.

SAEED, S.A.; RASHEED, H.; FECTO, F.A.W.; ACHAKZAI, M.I.; ALI, R.; CONNOR, J.D.; GILANI, A. Signaling mechanisms mediated by G-protein coupled receptors in human platelets. **Acta Pharmacological Sinica**, v.25, p.887-892, 2004.

SAILER, E.R.; SCHWEIZER, S.; BODEN, S.E.; AMMON, H.P.T.; SAFAYHI, H. Characterization of an acetyl-11-keto- β -boswellic acid and arachidonate-binding regulatory site of 5-lipoxygenase using photoaffinity labeling. **Eur J Biochem**, v.256, p.364-368, 1998.

SAITO, N.; SHIRAI, Y. Protein kinase C γ (PKC γ): function of neuron specific isoform. **J Biochem**, v.132, p.683-687, 2002.

SIGENG, CHEN.; GEOFFREY, C.O.; KATHRYN, L.C.; DAVID, B.E. Serotonin stimulates mitochondrial transport in hippocampal neurons. **Mol Cell Neurosci**, v.36, p.472-483, 2007.

SILVA, A.P.; LOURENÇO, J.; XAPELLI, S.; FERREIRA, R.; KRISTIANSEN, H.; WOLDBYE, D.P.; OLIVEIRA, C.R.; MALVA, J.O. Protein kinase C activity blocks neuropeptide Y-mediated inhibition of glutamate release and contributes to excitability of the hippocampus in *status epilepticus*. **FASEB J.**, v.21, p.671-681, 2007.

SONG, M.; MESSING, R.O. Protein kinase C regulation of GABA_A receptors. **Cell Mol Life Sci**, v.62, p.119-127, 2005.

SPESSOTO, M.A.; FERREIRA, D.S.; CROTTI, A.E.; SILVA, M.L.; CUNHA, W.R. Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubuginosa* (Melastomaceae). **Phytomedicine**, v.10, p.606-609, 2003.

SUBARNAS A.; TADANO, T.; OSHIMA, Y.; KISARA, K.; OHIZUMI, Y. Pharmacological properties of β -amyrin palmitate, a novel centrally acting compound, isolated from *Lobelia inflata* leaves, **J Pharm Pharmacol**, v.45, n.6, p.545-550, 1993a.

SUBARNAS, A.; TADANO, T.; KISARA, K.; OHIZUMI, Y. An alpha-adrenoceptor-mediated mechanism of hypoactivity induced by β -amyrin palmitate, **J Pharm Pharmacol**, v.45, n.11, p.1006-1008, 1993b.

SUBARNAS, A.; TADANO, T.; NAKAHATA, N.; ARAI, Y.; KINEMUCHI H.; OSHIMA, Y.; KISARA, K.; OHIZUMI, Y. A Possible mechanism of antidepressant activity of β -amyrin palmitate isolated from *Lobelia inflata* leaves in the forced swimming test, **Life Sci**, v.52, n.3, p.289-296, 1993c.

SUBARNAS, A.; USHIMA, Y.; SIDIK.; OHIZUMI, Y. An antidepressant principle of *Lobelia inflata* L. (Campanulaceae). **J Pharm Sei**, v.81, p.620-621, 1992.

SUSUNAGA, G.S. “Estudo químico e biológico da resina produzida pela espécie de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae)”, 163f, (**Dissertação de Mestrado em Química Orgânica**), **Universidade do Amazonas – UA**, Manaus – AM, 1995.

SYROVETS, T.; BUCHELE, B.; KRAUSS, C.; LAUMONNIER, Y.; SIMMET, T. Acetyl-Boswellic acids inhibit lipopolysaccharide-mediated TNF- α induction in monocytes by direct interaction with I κ B kinases. **J Immunol**, v.174, p.498-506, 2005.

TAMAOKI, T.; NOMOTO, H.; KATO, Y.; MORIMOTO, M.; TOMITA, F. Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/ Ca^{++} dependent protein kinase. **Biochem Biophys Res Commun**, v.135, p.397-402, 1986.

TANG, Z.Q.; LU, Y.G.; CHEN, LIN. Developmental stability of taurines's activation on glycine receptors in cultured neurons of rat auditory cortex. **Neuroscience Letters**, 2007.

TAVIANO, M.F.; MICELI, N.; MONFORTE, M.T.; TZAKOU O GALATI, E.M. Ursolic acid plays a role in *Nepeta sibthorpii* Benthams CNS depressing effects. **Phytother Res**, v.21, p.382-385, 2007.

TREIT, D. Animal models for the study of anti-anxiety agents: a review. **Neuroscience and Bio-behavioral Reviews**, v. 9, p. 203-222, 1985.

TRIST, D.G.; Excitatory amino acid agonist and antagonists: pharmacology and therapeutic applications. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v.74, p.221-229, 2000.

TURSKI, L.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, W.A.; BORTOLOTTI, Z.A.; CALHEIRO, E.A. The pilocarpine seizure model may be of value in designing new therapeutic approaches to epilepsy. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis (The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable. **Synapse**, v.3, p.154-171, 1989.

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

VEZZA, R.; MEZZASOMA, A. M.; VENDITTI, G.; GRESELE, P. Prostaglandin endoperoxides and thromboxane A2 activate the same receptor isoforms in human platelets. **Thromb Haemost**, v.87, p.114-121, 2002.

VIGAR, V.A.; HYDAYAT, H.; JAVID, H.; AMIR, R.J.; ISHFAG, A.B.; AMSHA, Y.; CHOUDDARY, M.I.; AHSANA, D.H. New Bioactive Diterpenoid from *Euphorbia decipens*, **Z. Naturforschung**, v.57, p.1066-1071, 2002.

VIOLI, F.; PRATICO, D.; IULIANO, L.; BALSANO, F. Dipyridamole potentiates the inhibition of platelet aggregation by aspirin (in human platelet rich plasma and whole blood). **Lipid Mediat**, v.4, p.61-67, 1991.

WEINSHENKER, D.; SZOT, P. The role of catecholamines in seizure susceptibility: new results using genetically engineered mice. **Pharmacology & Therapeutics**, v.94, p.213-233, 2002.

WIJEWEERA, P.; ARNASON, J.T.; KOSZYCKI, D.; MERALI, Z. Evaluation of anxiolytic properties of Gotukola (*Centella asiatica*) extracts and asiaticoside in rat behavioral models. **Phytomedicine**, v.13, p.668-676, 2006.

WILLIANSO, E.; OKPAKO, D.; EVANS, F.J. Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material, Wiley, Chichester. 1996.

YANG, Y.L.; CHANG, F.R.; WU, C.C.; WANG, W.Y.; WU, Y.C. New ent-kaurane diterpenoids with anti-platelet aggregation activity from *Annona aquamosa*. **J Nat Prod**, v,65, p.1462-1467, 2002.

YEMITAN, O.K.; ADEYEMI, O.O. CNS depressant activity of *Lecaniodiscus cupanioides*. **Fitoterapia**, v.76, p.412-418, 2005.

YILDIZ, F.; ULAK, G.; ERDEN, B.F; GACAR, N. Anxiolytic-like effects of 7-nitroindazole in the rat plus-maze test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.65, p.199–202, 2000.

ZANGROSSI JR., H. Modelos Animais de Ansiedade. In: HETEM, L.A.B.; GRAEFF, F.G. (Ed.). **Ansiedade e transtornos de ansiedade**. Rio de Janeiro: Científica Nacional, p. 85-120, 1997.

ZHANG, X.; CHEN, R.K.; NIU, J.L. Protective effect of protein kinase C on heart function: an experiment with isolated rabbit hearts. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v.86, v.1122-1124, 2006.

9. ANEXOS

9.1 Trabalhos publicados referentes ao estudo farmacológico da mistura triterpênica de alfa- e beta-amirina extraída do *Protium heptaphyllum* pelo autor desta tese.

ARAGAO, G.F.; CARNEIRO, L.M.V.; FROTA-JUNIOR, A.P.; VIEIRA, L.C.; BANDEIRA, P.N.; LEMOS, T.L.G.; VIANA, G.S.B. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl) March. **Pharmacology, biochemistry and Behavior**, v.85, n.827-834, 2006.

ARAGAO, G.F.; CARNEIRO, L.M.V.; FROTA-JUNIOR, A.P.; BANDEIRA, P.N.; LEMOS, T.L.G.; VIANA, G.S.B. Evidence for excitatory and inhibitory amino acids participation in the neuropharmacological activity of the isomeric mixture of alpha- and beta-amyrin acetate. Submetido a **Planta Medica** em 11/07.