



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

**PEDRO EVERSON ALEXANDRE DE AQUINO**

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTICONVULSIVANTE NEUROPROTETOR DE N-METIL-(2S,4R)-TRANS-4-HIDROXI-L-PROLINA ISOLADA DE *Sideroxylon obtusifolium* (HUMB. EX ROEM. & SCHULT.) T.D. PENN.: RELAÇÃO COM O TEOR DE L-PROLINA DA MOLÉCULA**

FORTALEZA

2021

**PEDRO EVERSON ALEXANDRE DE AQUINO**

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTICONVULSIVANTE E NEUROPROTETOR DE *N*-METIL-(2S,4R)-*TRANS*-4-HIDROXI-L-PROLINA ISOLADA DE *Sideroxylon obtusifolium* (HUMB. EX ROEM. & SCHULT.) T.D. PENN. : RELAÇÃO COM O TEOR DE L-PROLINA DA MOLÉCULA

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

Orientadora: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana

FORTALEZA

2021



**PEDRO EVERSON ALEXANDRE DE AQUINO**

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTICONVULSIVANTE E NEUROPROTETOR  
DE *N*-METIL-(2*S*,4*R*)-*TRANS*-4-HIDROXI-L-PROLINA ISOLADA DE *Sideroxylon*  
*obtusifolium* (HUMB. EX ROEM. & SCHULT.) T.D. PENN.: RELAÇÃO COM O TEOR  
DE L-PROLINA DA MOLÉCULA

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

Orientadora: Profa. Dra. Glauce Socorro de  
Barros Viana

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Daniele Macêdo Gaspar  
Universidade Federal do Ceará

---

Prof. Dr. Iri Sandro  
Universidade Federal do Cariri

---

Prof. Dr. Leandro Freitas Oliveira  
Universidade Brazcubas

---

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

## AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Deus pelo dom da vida e por ter me proporcionado diversas coisas maravilhosas. Aos meus pais, Wilson e Lúcia, e meus irmãos, Eveline e Everton pelo imenso apoio, amor e carinho;

A minha orientadora Dra. Glauce, pela inestimável oportunidade de trabalharmos juntos, pela paciência e por todos os ensinamentos que recebi durante esse tempo. Muito obrigado por ser este espelho de pessoa e pesquisadora que nasceu para o ensino e a pesquisa;

Quero agradecer também aos professores do Programa de pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, um programa reconhecido por sua excelência, e que me ajudaram a crescer e amadurecer no âmbito profissional e acadêmico

Às professoras Dra. Cléa, Dra. Daniele, Dra. Silvânia, Dr. David, Dra. Marta, Dra. Kalyne, e todos os quem compõem o laboratório de Neurofarmacologia. Obrigado pela parceria!

Ao professor Dr. Edilberto pela parceria além de ter feito toda a caracterização química e ter cedido o composto utilizado neste trabalho.

Aos meus amigos Amanda, Priscila, Lucas, Gabriel, Ítalo, Talita, Adriano Maia, Erlânia, Tyciane, Jéssica, Juliette, Ana Flávia, Michelle (e todos os outros que fiz durante a pós graduação) pela amizade. Sou muito grato a Deus por ter me mostrado pessoas tão maravilhosas como vocês;

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior – CAPES, pelo suporte financeiro;

E por fim a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram de maneira significativa para a concretização deste trabalho. O meu eterno agradecimento

## RESUMO

Epilepsia é uma doença neurológica crônica caracterizada por convulsões recorrentes, resultante de descargas neuronais excessivas. Considerando que os processos inflamatórios e o estresse oxidativo estão relacionados à sua patogênese, investigamos os possíveis efeitos-anticonvulsivantes de um derivado do aminoácido prolina oriundo de *Sideroxylon obtusifolium*, (também conhecido como quixaba, quixaba-preta, sapotiaba, espinheiro, coronilha) *N*-metil-(2S,4R)-*trans*-4-hidroxi-L-prolina, (NMP) no modelo de convulsões-induzidas por pilocarpina e pentilenotetrazol (PTZ), bem como no modelo de estado-epiléptico(status epilépticus ou SE) usando a pilocarpina via intracerebroventricular- (i.c.v), em camundongos. Em-paralelo foram feitos testes *in vitro* usando linhagem secundária de astrócitos e testes *in silico* de-modelagem molecular (utilizando softwares e modelos computacionais). Para isso, os camundongos foram distribuídos em grupos tratados via oral com NMP (50, 100 e 200 mg/kg) e seus controles (O grupo controle recebeu salina). Os parâmetros comportamentais foram: tempo de latência para a primeira convulsão e tempo de morte. Além disso, imediatamente após a morte, áreas cerebrais foram dissecadas para análises bioquímicas. No modelo de SE, os efeitos da NMP (100 e 200 mg/kg) foram avaliados em testes comportamentais pela caracterização da preservação da-função cognitiva (testes do labirinto em Y e do reconhecimento de objetos). A viabilidade das células do hipocampo foi determinada por coloração de Nissl. Marcadores-adicionais de dano celular foram estudados, como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP); expressão da-molécula adaptadora de ligação de cálcio 1 (Iba-1) e caspase 3, usando, respectivamente-imunofluorescência e análises de western blot. Nossos resultados demonstram que a latência para a primeira-convulsão e latência à morte aumentou nos grupos pré-tratados com NMP, em comparação com os grupos controle. Além disso, as reduções nas concentrações de Dopamina e seu metabólito estriatal observadas no grupo pilocarpina foram parcialmente-revertidas nos grupos NMP. As concentrações de GABA diminuíram e as concentrações de glutamato aumentaram após o uso de pilocarpina, sendo estas alterações também revertidas pela NMP. Da mesma forma, a NMP reduziu significativamente o estresse oxidativo cerebral observado no grupo tratado com pilocarpina. Os aumentos nas expressões hipocampais para IL-6 e IFN-gama, observados após administração de pilocarpina, foram revertidos pelo NMP, bem como o aumento da expressão da GFAP. Já no modelo usando a pilocarpina via icv, a mesma induziu déficits cognitivos, dano celular, aumento da expressão de GFAP, Iba-1 e GAT1 no hipocampo. Essas alterações foram prevenidas pela NMP. Nos ensaios *in vitro* houve proteção da morte celular, menor dano mitocondrial e menor expressão de GFAP nas células tratadas com NMP. Também realizamos experimentos de acoplamento molecular revelando que a NMP se liga ao transportador 1 do ácido aminobutírico (GABA) (GAT1), e a expressão de GAT1 no hipocampo foi também caracterizada. Em conclusão, demonstramos os efeitos anticonvulsivantes e neuroprotetores significativos para NMP que provavelmente estão relacionados com o teor de L-prolina presente nesta fração metanólica (NMP), com as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes deste componente bioativo e /ou a sua interação com GAT-1.

**Palavras-chave:** Efeitos anti-convulsivantes; estresse oxidativo; derivados da prolina; *Sideroxylon obtusifolium*; convulsões induzidas por pilocarpina; neuroproteção

**EVALUATION OF THE ANTICONVULSIVE EFFECT AND NEUROPROTECTOR  
OF N-METHIL- (2S, 4R) -TRANS-4-HYDROXY-L-PROLINE ISOLATED FROM  
*Sideroxylon obtusifolium* (HUMB. EX ROEM. & SCHULT.) T.D. PENN. :  
RELATIONSHIP WITH THE L-PROLIN CONTENT OF THE MOLECULE**

**ABSTRACT**

Epilepsy is a chronic neurological disease characterized by recurrent seizures, resulting from excessive neuronal discharges. Considering that inflammatory processes and oxidative stress are related to their pathogenesis, we investigated the possible anticonvulsant effects of a derivative of the amino acid proline from *Sideroxylon obtusifolium*, (also known as quixaba, black quixaba, sapoteiaba, hawthorn, coronet) - (2S, 4R) -*trans*-4-hydroxy-L-proline, (NMP) in the seizure-induced model of pilocarpine and pentylenetetrazole (PTZ), as well as in the state-epileptic model (status epilepticus or SE) using the pilocarpine via intracerebroventricular- (icv), in mice. In-parallel tests were performed in vitro using secondary lineage of astrocytes and in silico molecular modeling tests (using software and computational models). For this, the mice were distributed into groups treated orally with NMP (50, 100, and 200 mg/kg) and their controls (The control group received saline). The behavioral parameters were: latency time for the first seizure and time of death. Also, immediately after death, brain areas were dissected for biochemical analysis. In the SE model, the effects of NMP (100 and 200 mg/kg) were evaluated in behavioral tests by characterizing the preservation of cognitive function (Y-labyrinth tests and object recognition). The viability of the hippocampus cells was determined by Nissl staining. Additional markers of cell damage have been studied, such as glial fibrillar acid protein (GFAP); expression of the calcium-binding adapter molecule 1 (Iba-1), and caspase 3, using, respectively, immunofluorescence and western blot analyzes. Our results demonstrate that latency to first seizure and latency to death increased in groups pre-treated with NMP, compared with control groups. Besides, the reductions in the concentrations of Dopamine and its striatal metabolite observed in the pilocarpine group were partially reversed in the NMP groups. GABA concentrations decreased and glutamate concentrations increased after using pilocarpine, and these changes are also reversed by NMP. Likewise, NMP significantly reduced brain oxidative stress seen in the pilocarpine-treated group. The increases in hippocampal expressions for IL-6 and IFN-gamma, observed after pilocarpine administration, were reversed by NMP, as well as the increase in GFAP expression. In the model using pilocarpine via icv, it induced cognitive deficits, cell damage, increased expression of GFAP, Iba-1 eGAT1 in the hippocampus. These changes were prevented by the NMP. In in vitro tests, there was protection from cell death, less mitochondrial damage, and less GFAP expression in cells treated with NMP. We also performed molecular coupling experiments revealing that NMP binds to transporter 1 of aminobutyric acid (GABA) (GAT1), and the expression of GAT1 in the hippocampus was also characterized. In conclusion, we demonstrate the significant anticonvulsant and neuroprotective effects for NMP that are probably related to the L-proline content present in this methanolic fraction (NMP), with the anti-inflammatory and antioxidant properties of this bioactive component and/or its interaction with GAT-1.

**Key words:** Anti-convulsive effects; oxidative stress; proline derivatives; *Sideroxylon obtusifolium*; seizures induced by pilocarpine; neuroprotection

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Alvos previstos para NMP com base em sua similaridade química com o banco de dados de medicamentos SwissTargetPrediction.	64
------------	---	----

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Classificação de crises epiléticas segundo a ILAE 2017 versão resumida e estendida	23
Figura 2 – Transmissão GABAérgica e transportadores GATs	28
Figura 3 – Transmissão Glutamatérgica	29
Figura 4 -Estrutura da sinapse tripartite	32
Figura 5 – Modelos <i>in vivo</i> de epilepsia e crises epiléticas	35
Figura 6 – <i>Sideroxylon obtusifolium</i> (Árvore, Folhas, Flores e Frutos).	37
Figura 7 – Estrutura química da <i>N</i> -metil-(2S,4R)- <i>trans</i> -4-hidroxi-L-prolina	38
Figura 8 - Ensaio de viabilidade celular por redução do MTT em astrócitos.	57
Figura 9 - Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT em astrócitos expostos à Pilocarpina.	58
Figura 10 - Análise do acúmulo de EROs citoplasmáticas em astrócitos por citometria de fluxo através do ensaio utilizando o DCFH-DA.	59
Figura 11 - Análise do potencial transmembrânico mitocondrial por citometria de fluxo utilizando a rodamina 123.	60
Figura 12 - Expressão relativa de GFAP em astrócitos tratados com NMP e em seguida submetidos ao desafio com pilocarpina.	61
Figura 13 - Expressão de VDAC em astrócitos em comparação com a expressão de $\beta$ -actina em células expostas à pilocarpina.	61
Figura 14 – Efeito da NMP sobre o Intumescimento mitocondrial isoladas de cérebros de ratos	62
Figura 15 – Alvos moleculares da NMP	66
Figura 16 - Efeitos da NMP em convulsões induzidas por Pilocarpina 400mg/kg (Pilo)	67
Figura 17 – Comparação entre os efeitos anticonvulsivantes apresentados pela substância <i>N</i> -metil- (2S, 4R) - <i>trans</i> -4-hidroxi-L-prolina, padrão de referência (Sigma-Aldrich, USA) e a NMP, em convulsões induzidas por pilocarpina (400 mg/kg).	68
Figura 18 - Comparação do espectro $^1\text{H}$ NMR da NMP com o composto de referência, D ( <i>N</i> -methyl-(2S,4R)- <i>trans</i> -4-hydroxy-L-proline) adquirido da Sigma-Aldrich (99% pureza), mostrando a identidade química entre as duas substâncias.	69

Figura 19 - Efeitos da NMP sobre os níveis de dopamina (DA) e seu metabólito ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), no corpo estriado de camundongos submetidos a convulsões induzidas por pilocarpina (Pilo).	71
Figura 20 - Efeitos da NMP sobre os níveis de GABA e Glutamato no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos submetidos a convulsões induzidas por pilocarpina.	72
Figura 21 - Efeitos da NMP sobre o córtex pré-frontal (CPF), hipocampo e corpo estriado durante as convulsões induzidas por Pilocarpina.	73
Figura 22 - Efeitos da NMP sobre os níveis de peroxidação lípidica no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo e corpo estriado durante as convulsões induzidas por Pilocarpina.	74
Figura 23 - Efeitos da NMP sobre os níveis de glutathione reduzida no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo e corpo estriado durante as convulsões induzidas por Pilocarpina.	75
Figura 24 - Efeitos da NMP sobre os níveis das citocinas inflamatórias: Il-6 e IFN- $\gamma$ em hipocampo e corpo estriado durante as convulsões induzidas por Pilocarpina.	76
Figura 25 - Efeitos da NMP sobre a expressão de GFAP no hipocampo região do giro denteado (GD) durante as convulsões induzidas por pilocarpina.	77
Figura 26 - Efeitos da NMP sobre a expressão de GFAP no hipocampo região CA1 durante as convulsões induzidas por pilocarpina.	78
Figura 27 - Efeitos da NMP sobre a expressão de GFAP no hipocampo região CA3 durante as convulsões induzidas por pilocarpina.	79
Figura 28 - Efeitos da NMP sobre a expressão de GFAP no córtex temporal (CT) durante as convulsões induzidas por Pilocarpina.	80
Figura 29 – Alterações cognitivas promovidas sobre a memória de reconhecimento pela NMP induzidas pela injeção intracerebroventricular (icv) de pilocarpina (Pilo), avaliada pelo teste de reconhecimento de objetos.	81
Figura 30 – Alterações cognitivas promovidas sobre a memória operacional pela NMP induzidas pela injeção intracerebroventricular (icv) de pilocarpina (Pilo), avaliado pelo teste do labirinto em Y em camundongos	82
Figura 31 -Fotomicrografias representativas (ampliação de 10x) mostrando o efeito da NMP sobre a morte de neurônios do hipocampo na região do <i>corpus ammonis</i> CA1 (A), CA3 (B) e giro dentado (DG) (C) em camundongos submetidos à injeção intracerebroventricular (icv) de pilocarpina (Pilo).	83

- Figura 32- Efeitos da NMP sobre a expressão de Iba1, induzidas pela injeção intracerebroventricular (icv) de pilocarpina (Pilo) 85
- Figura 33 - Fotomicrografias representativas (ampliação de 10x) mostrando os efeitos da NMP sobre a expressão de GFAP do hipocampo na região do *corpus ammonis* CA1, CA3 e giro dentado (GD) em camundongos submetidos à injeção intracerebroventricular (icv) de pilocarpina (Pilo). 86
- Figura 34 – Fotomicrografias representativas (ampliação de 10x) mostrando os efeitos da NMP sobre a expressão de Caspase 3 do hipocampo na região do corpus ammonis, CA1, CA3 e giro dentado (GD) em camundongos submetidos à injeção intracerebroventricular (icv) de pilocarpina (Pilo). 87
- Figura 35 -Fotomicrografias representativas (ampliação de 20x) mostrando o efeito da NMP sobre a expressão de GAT-1 no hipocampo daa região: Ammonis CA1 (A), CA3 (B) e giro dentado (DG) (C) em camundongos submetidos à injeção intracerebroventricular (icv) de pilocarpina (Pilo). 88

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Efeitos da <i>N</i> -metil- (2 <i>S</i> , 4 <i>R</i> ) - <i>trans</i> -4-hidroxi-L-prolina de <i>Syderoxylon obtusifolium</i> (NMP) em convulsões induzidas por PTZ (80mg/kg).	70
------------	--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**[K+]<sub>e</sub>**: concentração de potássio extracelular

**[K+]<sub>i</sub>**: concentração de potássio intracelular

**[Na+]<sub>e</sub>**: concentração de sódio extracelular

**[Na+]<sub>i</sub>**: concentração de sódio intracelular

**µg**: micrograma

**µL**: microlitro

**<sup>3</sup>H**: trítio, um dos isótopos radiativos do hidrogênio

**A**: domínio atuador da NKA

**ACh**: acetilcolina

**ACSF**: artificial cerebrospinal fluid, i.e. fluido cerebrospinal artificial

**ADP**: difosfato de adenosina

**AINE**: antiinflamatório não esteroidal

**AMPA**: alfa-amino-3-hidroxi-5metil-4-isoxazolpropionato

**AMPA**: receptor (ionotrópico) de glutamato que sofre agonismo por alfa-amino-3-hidroxi-5metil-4-isoxazolpropionato

**anti-LGI1**: anticorpos anti-proteína 1 rica em leucina inativada em glioma

**AP**: 1) eixo ou coordenada anteroposterior

**Arg**: arginina

**Asp**: 1) ácido aspártico; 2) aspartato

**ATP**: trifosfato e adenosina

**ATPase**: adenosina-trifosfatase, enzima capaz de hidrolisar o trifosfato de adenosina

**AVC**: acidente vascular cerebral

**AVEI**: acidente vascular encefálico cerebral isquêmico

**BDNF**: brain-derived neurotrophic factor, i.e. fator neurotrófico derivado do cérebro

**Ca<sup>2+</sup>**: cátion cálcio

**CADASIL**: cerebral autosomal dominant arteriopathy with cortical infarcts and leukoencephalopathy Arteriopatia autossômica dominante com infartos corticais e leucoencefalopatia

**CEPA**: comitê de ética em pesquisa Animal

**Cl<sup>-</sup>**: ânion cloreto

**CLAE/HPLC**: cromatografia líquida de alta eficiência

**CONCEA:** Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

**CPF:** cortex pré-frontal

**CREST:** calcinosis, Raynaud phenomenon, oesophageal dysmotility, sclerodactyly, telangiectasia, i.e. calcinose, fenómeno de Raynaud, alteração da motilidade esofágica, esclerodactilia e telangiectasia.

**CS:** cauda de Straub

**CTG:** clônica-tônica generalizada

**CTGmáx:** clônica-tônica generalizada máxima

**DA:** doença de Alzheimer

**DBCA:** Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos

**DBS:** deep brain stimulation, i.e. estimulação cerebral profunda

**DE:** dose efetiva

**DE50:** dose efetiva em 50% dos animais testados

**E:** corpo estriado, i.e. caudado-putâmen

**EAAAT:** excitatory amino acid transporter, i.e. simportador de aminoácidos excitatórios dependente de sódio – transportador de aminoácido excitatório

**ECM:** eletrochoque máximo

**ECmín:** eletrochoque mínimo

**ECT:** Esteróide cardiotônico, classe de compostos esteroidais ligantes da NKA

**EEG:** eletroencefalograma

**ELT:** epilepsia do lobo temporal

**EMJ:** epilepsia mioclônica juvenil

**EPC:** epilepsia partialis continua (de Kojevnikov), i.e. – epilepsia parcial contínua

**EPM:** erro padrão da média

**F-:** ânion fluoreto

**FAE:** fármaco antiepiléptico

**FCD:** focal cortical dysplasia, i.e. displasia cortical focal

**f.e.m:** força eletromotriz

**FG:** fast gyration, i.e. broca odontológica de alta velocidade

**fMRI:** functional magnetic resonance image, i.e. imagem por ressonância magnética funcional

**FSP:** flat skull position – posição plana do crânio

**FXyD:** terceira subunidade (gama,  $\gamma$ ) da adenosina-trifosfatase sódio-potássio ativada dependente de magnésio ( $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase, NKA), uma chaperona

**GABA:** gamma-aminobutyric acid, i.e. ácido gama-aminobutírico

**GABAA:** Receptor (ionotrópico) do ácido gama-aminobutírico

**GEPR:** genetic epilepsy prone rat

**GLAST:** glutamate-aspartate transporter, i.e. simportador de glutamato-aspartato dependente de sódio

**Gln:** glutamina

**GLT-1:** glutamate transporter 1, i.e. simportador de glutamato de alta afinidade dependente de sódio

**Glu:** 1) ácido glutâmico; 2) glutamato

**Gly:** glicina

**GSH:** glutathione (reduzida)

**H<sup>+</sup>:** próton, cátion hidrogênio

**HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>:** ânion hidrogenocarbonato, bicarbonato

**HIV:** human immunodeficiency virus, i.e. vírus da imunodeficiência humana adquirida

**Hz:** Hertz, i.e. ciclos/segundo

**i.c.v.:** intracerebroventricular

**i.p.:** intraperitônio

**IBE:** International Bureau of Epilepsy, i.e.

**IC:** intervalo de confiança

**ILAE:** International League Against Epilepsy, i.e. Liga Internacional Contra a Epilepsia

**IP<sub>3</sub>:** inositol-1,4,5-trifosfato; trifosfato de inositol

**JS:** jumping seizure, i.e. crise convulsiva tipo salto, uma forma de crise epiléptica convulsiva procursiva

**K<sup>+</sup>:** cátion potássio

**KA:** kainic acid i.e. 1) ácido caínico; 2) receptor (ionotrópico) de glutamato que sofre agonismo por ácido caínico

**KM:** Krushinsky-Molodkina, uma cepa de *Rattus norvegicus* selecionada artificialmente para o fenótipo susceptível a crises epilépticas reflexas audiogênicas por pesquisadores russos nos anos 1940.

**Li<sup>+</sup>:** cátion lítio

**Lys:** lisina

**M:** 1) Molar, mol/L; 2) Hélice transmembrana

**mA:** miliAmpère

**MDA:** malondialdehyde, i.e. dialdeído malônico, produto final e marcador de lipoperoxidação, constiuente majoritário entre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**MELAS:** mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, stroke-like episodes, i.e. encefalopatia mitocondrial, acidose láctica e episódios tipo AVC

**MERF:** myoclonic encephalopathy with ragged red fibers, i.e. encefalopatia mioclônica com fibras vermelhas “esfarrapadas”

**Mg<sup>+2</sup>:** cátion magnésio

**ML:** eixo ou coordenada mediolateral

**MRS:** magnetic resonance spectroscopy, i.e. espectroscopia por ressonância magnética (de Voxel único ou múltiplo)

**myk:** 1) alelo Myshkin

**N:** 1) nitrogênio; 2) domínio ligador de nucleotídeo da NKA

**Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>ATPase:** adenosina-trifosfatase sódio-potássio ativada dependente de magnésio, bomba de sódio da família das ATPases tipo P

**Na<sup>+</sup>:** cátion sódio

**nAChR:** receptor nicotínico da acetilcolina

**NARP:** Neuropatia, ataxia e retinite pigmentosa

**NCX:** natrium-calcium exchanger, i.e. trocador iônico sódio-cálcio

**NH<sub>4</sub><sup>+</sup>:** cátion amônio

**NIH:** National Institutes of Health

**NINDS:** National Institutes of Neurological Disorders and Stroke

**NKA:** adenosina-trifosfatase sódio-potássio ativada dependente de magnésio, bomba de sódio da família das ATPases tipo P

**nm:** nanometro

**NMDA:** 1) *N*-metil-D-aspartato 2) receptor (ionotrópico) de glutamato

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>:** nitrito

**°GL:** Graus Gay-Lussac (concentração de álcool etílico em porcentagem volumétrica)

**OMS:** Organização Mundial de Saúde

**PO:** pós-operatório

**PTZ:** pentilenotetrazol

**PVPI:** iodo-polivinilpirrolidona

**RE:** reflexo de endireitamento

**REDOX:** redução-oxidação

**s.c.:** via subcutânea

**SCA:** spinocerebellar ataxia, i.e. ataxia espinocerebelar de início na infância

**SE:** status epilepticus

**SEC:** status epilepticus convulsivo

**SENC:** status epilepticus não convulsivo

**SERCA:** sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase, i.e. cálcio-adenosina-trifosfatase do retículo sarcoplasmático

**SNC:** Sistema nervoso central

**SPECT:** single photon emission computadorized tomography, i.e. tomografia computadorizada por emissão de fóton único, uma técnica de imagenologia funcional

**T:** tálamo

**t1:** primeiro marco temporal da definição operacional de status epilepticus de 2015

**t2:** segundo marco temporal da definição operacional de status epilepticus de 2015

**TBARS:** thiobarbituric acid reactive substances, i.e. substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TCE:** trauma crânio-encefálico

**TCG:** (crise epiléptica) tônico-clônica generalizada

**THB:** transtorno do humor bipolar

**TMS:** transcranial magnetic stimulation, i.e. estimulação magnética transcraniana

**TSC:** tuberous sclerosis complex, i.e. complexo esclerose tuberosa

**Tyr:** tirosina

**U:** Unidade(s)

**v:** volume

**vídeo-EEG:** vídeo-eletroencefalografia

**VL:** ventrículo cerebral lateral

**V<sub>máx</sub>:** velocidade máxima

**VNS:** vagus nerve stimulation i.e. estimulação vagal

**WAR:** Wistar audiogenic rat, uma variante da cepa albina Wistar de Rattus norvegicus

**WBT:** whole body twitch, i.e. sacudidela mioclônica de corpo inteiro (tipo sobressalto ou “startle”)

**WDS:** wet dog shake, i.e. sacudidela tipo “cão molhado”

**WFN:** World Federation of Neurology

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>22</b>
1.1.	Epilepsia: conceito, epidemiologia e classificação	22
1.2.	O papel da transmissão glutamatérgica, gabaérgica e dopaminérgica nas crises convulsivas	26
1.3.	Estresse oxidativo, inflamação e papel da glia nas crises epiléticas	30
1.4.	Tratamento farmacológico: drogas anticonvulsivantes	32
1.5.	Modelos pré-clínicos para estudo da epilepsia e desenvolvimento de fármacos	33
1.6.	<i>Sideroxylon obtusifolium</i> : considerações etnobotânicas e efeitos medicinais	35
1.7.	Atividades Biológicas da <i>N</i> -metil-(2S,4R)- <i>trans</i> -4-hidroxi-L-prolina	37
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>40</b>
3.1.	Objetivo geral	40
3.2.	Objetivos específicos	40
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>42</b>
4.1.	Material vegetal e isolamento de <i>N</i> -metil-(2S,4R)- <i>trans</i> -4-hidroxi-L-prolina (NMP) de <i>Sideroxylon obtusifolium</i>	42
4.2.	Ensaio <i>In vitro</i>	42
4.2.1.	<i>Cultura de astrócitos</i>	42
4.2.2.	<i>Tratamento de células</i>	42
4.2.3.	<i>Ensaio de viabilidade celular</i>	43
4.2.4.	<i>Ensaio de citometria de fluxo</i>	43
4.2.5.	<i>Produção de espécies de oxigênio reativa citoplasmática (ROS)</i>	43
4.2.6.	<i>Potencial transmembrana mitocondrial (<math>\Delta\Phi_m</math>)</i>	44
4.2.7.	<i>Isolamento Mitocondrial</i>	44
4.2.8.	<i>Intumescimento mitocondrial</i>	44
4.3.	Estudo <i>in silico</i>	45
4.3.1.	<i>Ferramentas Computacionais para possíveis alvos de Drogas</i>	45
4.3.2.	<i>Predição de alvo</i>	45
4.3.3.	<i>Modelagem e cálculos de acoplamento molecular: Comparando a interação de NMP e Tiagabina com GAT-1</i>	45

4.4.	Ensaio in vivo	46
4.4.1.	<i>Animais</i>	46
4.4.2.	<i>Modelo de indução de convulsão aguda</i>	46
4.4.2.1.	Modelo de convulsões induzidas por pilocarpina e pentilenotetrazol (PTZ)	46
4.4.3.	<i>Determinação dos conteúdos de dopamina (DA) e ácido 3,4-di-hidroxifenilacético (DOPAC) em corpo estriado de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzida por pilocarpina</i>	47
4.4.4.	<i>Determinação dos conteúdos de GABA e Glutamato em cérebros de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzida por pilocarpina</i>	47
4.4.5.	<i>Determinação do conteúdo de nitrito em cérebros de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzida por pilocarpina</i>	48
4.4.6.	<i>Determinação de peroxidação lipídica (substâncias reativas de ácido tiobarbitúico, TBARS) em cérebros de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzida por pilocarpina</i>	48
4.4.7.	<i>Determinação da concentração cerebral de glutathiona reduzida (GSH) em cérebros de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzida por pilocarpina</i>	49
4.4.8.	<i>Imunoensaios para expressão de (IFN-<math>\gamma</math>) e Interleucina 1 (IL-1) em hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzida por pilocarpina</i>	49
4.4.9.	<i>Ensaio imunohistoquímico para expressão de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzida por pilocarpina</i>	50
4.5.	Modelo de estado epiléptico através da administração de pilocarpina via intracerebroventricular (i.c.v.)	50
4.5.1.	<i>Cirurgia estereotáxica para aplicação de pilocarpina ou aCSF (líquido cerebro-espinhal artificial) no ventrículo lateral esquerdo do cérebro</i>	50
4.5.2.	<i>Testes Comportamentais Realizados no 15º Dia Pós-Operatório</i>	52
4.5.2.1.	Teste do Reconhecimento de Objeto (NOR)	52
4.5.2.2.	Teste do labirinto em “Y” (Y-maze)	52
4.5.3.	<i>Eutanásia e Coleta dos tecidos</i>	52
4.5.4.	<i>Coloração de Nissl</i>	53
4.5.5.	<i>Imunohistoquímica para GAT-1</i>	54
4.5.6.	<i>Western Blot para GAT-1 e Iba-1</i>	54
4.5.7.	<i>Imunofluorescência para GFAP</i>	55

4.6.	Análise Estatística	55
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>57</b>
5.1.	Resultados <i>in vitro</i>	57
5.1.1.	<i>Ensaaios de viabilidade celular</i>	57
5.1.2.	<i>Ensaaios por citometria de fluxo</i>	58
5.1.2.1.	Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) citoplasmáticas	58
5.1.2.2.	Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial (PTM)	59
5.1.3.	<i>Avaliação da expressão de GFAP e VDAC em cultura secundária de astrócitos por Western Blot</i>	60
5.1.4.	<i>Intumescimento de mitocôndrias (Mitochondrial Swelling)</i>	62
5.2.	Resultados <i>in silico</i>	63
5.2.1.	<i>Predição de alvo e acoplamento molecular para NMP</i>	63
5.3.	Resultados <i>in vivo</i>	67
5.3.1.	<i>Efeitos de NMP em convulsões induzidas por pilocarpina</i>	67
5.3.2.	<i>Efeito da NMP no modelo de convulsão induzida por Pentilenotetrazol</i>	69
5.3.3.	<i>Determinações de conteúdo de dopamina (DA) e seu metabólito ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) no corpo estriado de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina</i>	70
5.3.4.	<i>Determinação do conteúdo de glutamato e GABA nas áreas cerebrais: córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HP) e corpo estriado (CE) de camundongos submetidos à convulsão por pilocarpina</i>	71
5.3.5.	<i>Efeitos dos tratamentos com NMP no conteúdo de nitrito em áreas cerebrais de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina</i>	72
5.3.6.	<i>Efeitos dos tratamentos com NMP sobre a peroxidação de lipídios do cérebro (ensaio TBARS) em áreas cerebrais de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina</i>	73
5.3.7.	<i>Efeitos dos tratamentos com NMP no conteúdo de glutathiona (GSH) em áreas cerebrais de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina</i>	74
5.3.8.	<i>Efeitos dos tratamentos da NMP sobre os conteúdos de IL-6 e IFN-<math>\gamma</math> do hipocampo de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina</i>	75
5.3.9.	<i>Efeitos dos tratamentos com NMP na imunoexpressão de GFAP de áreas do hipocampo e córtex temporal de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina</i>	76

5.3.10. Modelo de Estado epiléptico através da administração de pilocarpina via intracerebroventricular (i.c.v)	80
5.3.10.1.Efeito do tratamento com o NMP sobre camundongos submetidos ao modelo de estado epiléptico no teste do Reconhecimento do Objeto Novo	81
5.3.10.2.Efeito do tratamento com a NMP sobre camundongos submetidos ao modelo de estado epiléptico no teste do labirinto em Y (Y-maze)	81
5.3.10.3.Coloração de Nissl para avaliação da viabilidade neuronal	82
5.3.10.4.Análise da expressão da molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizada 1 (Iba-1) por Western Blot	84
5.3.10.5.Análise da expressão de GFAP por Imunofluorescência	85
5.3.10.6.Análise da expressão de Caspase 3 por Imunofluorescência	87
5.3.10.7.Expressão de GAT1 por imunohistoquímica	88
5.3.10.8.Expressão de GAT-1 por Western Blot	90
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>92</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>99</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>100</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>101</b>
<b>APÊNDICES</b>	<b>117</b>
APÊNDICES 1 - Certificado CEUA	117
APÊNCIDE 2- PUBLICAÇÕES	118
APÊNCIDE 3 - Estudo químico <i>Sideroxylon obtusifolium</i> : qHNMR para a decocção de folhas secas e frações solúveis e residuais subsequentes de metanol após a extração de metanol	120

# 1 INTRODUÇÃO

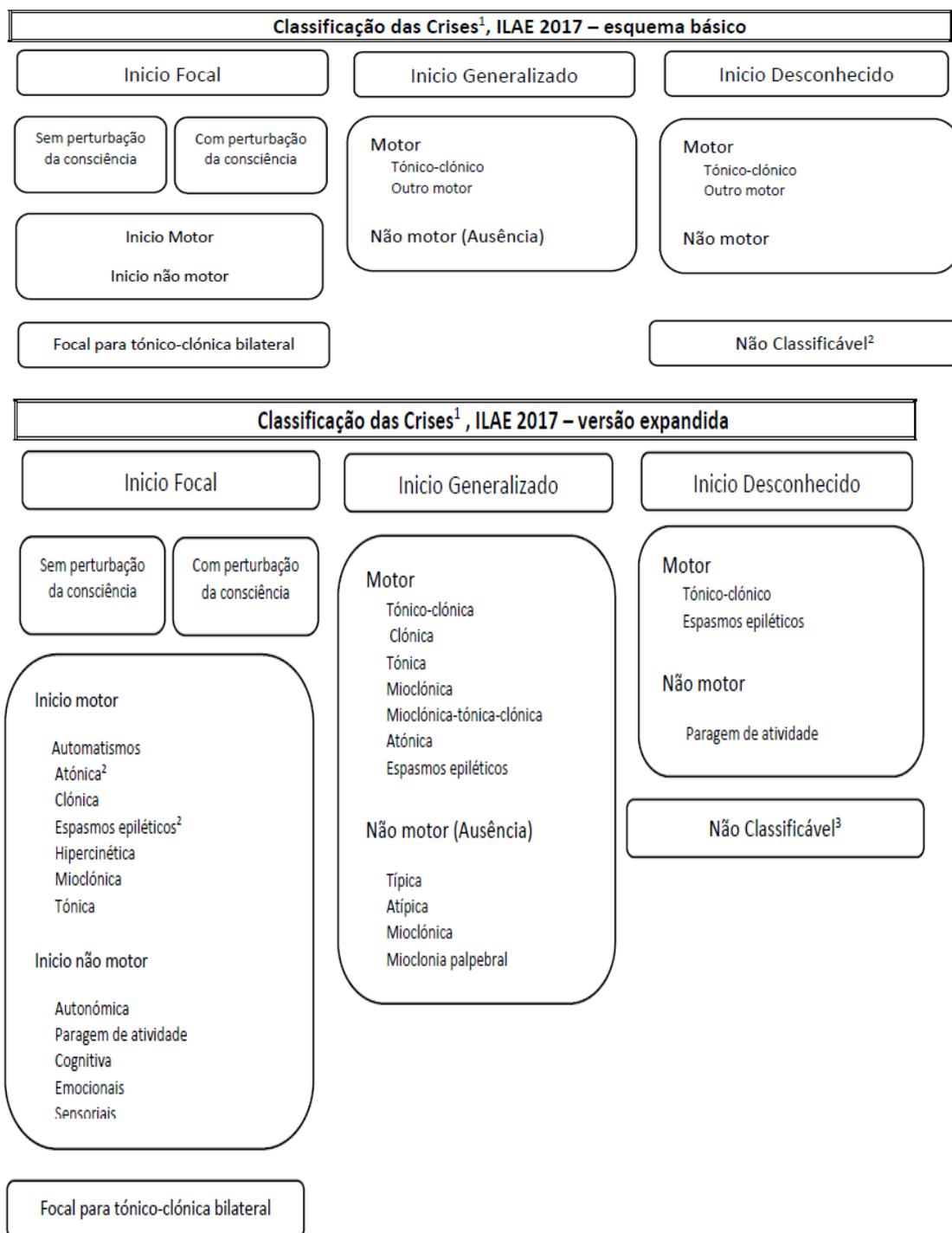
## 1.1. Epilepsia: conceito, epidemiologia e classificação

A Epilepsia é uma doença neurológica crônica bastante comum em todo mundo. Há registros históricos de ocorrência de crises epiléticas desde as antigas sociedades; e em muitos lugares, mesmo nos dias atuais, está associada ao conceito de possessão demoníaca resultando muitas vezes em comportamentos preconceituosos em relação à convivência com os pacientes (ALEXANDRE; LINO; DE LICENCIATURA, 2006). A epilepsia afeta pessoas de todas as idades, raças, classes sociais, e localizações geográficas e se caracteriza por ser caracterizado por uma predisposição duradoura de gerar convulsões e pelas comorbidades cognitivas e psicológicas, gerando muitas vezes consequências sociais por conta dessas recorrentes crises convulsivas (FISHER et al., 2005).

De acordo com a ILAE (*International League Against Epilepsy*) a epilepsia pode ser definida como duas ou mais convulsões não provocadas em um intervalo de tempo de menos de 24 horas de distância entre uma convulsão e outra. Uma convulsão não provocada é uma convulsão que ocorre na ausência de fatores precipitantes. Convulsões não provocadas incluem eventos ocorrendo na ausência de reconhecido agente etiológico ou fatores de risco (convulsões idiopáticas e criptogênicas), em pacientes com antecedentes estáveis ou naqueles com anormalidades progressivas do SNC, como tumores cerebrais ou estados degenerativos (BEGHI, 2020).

O início da convulsão pode ser focal (convulsões decorrentes de um hemisfério do cérebro), generalizado (convulsões originárias em ambos os hemisférios simultaneamente) ou desconhecida. As do tipo focal são classificadas de acordo com o nível de consciência utilizando-a como um marcador para saber se está intacta ou alterada. As convulsões focais e generalizadas também são divididas em motoras e não motoras. A (ILAE), através da Comissão de Classificação e Terminologia, elaborou uma classificação operacional de crises epiléticas e essas mudanças têm a finalidade de melhorar a capacidade intuitiva, transparência e versatilidade das classificações, permitindo um melhor diagnóstico. A nova classificação tem uma versão básica e uma versão expandida, dependendo das necessidades e experiência do indivíduo que utiliza a classificação como mostra a figura 1 (FISHER et al., 2017).

Figura 1 - Classificação de crises epiléticas segundo a ILAE 2017 versão resumida e estendida



Fonte: Adaptado (FISHER et al., 2017).

Os autores destacam nesta atualização:

- Para crises focais, a especificação do nível de percepção é opcional. Percepção mantida significa que a pessoa está ciente de si e do meio ambiente durante a crise, mesmo se estiver imóvel.
- Uma crise focal perceptiva corresponde ao termo anterior crise parcial simples.
- Uma crise focal disperceptiva ou com comprometimento da percepção corresponde ao termo anterior, crise parcial complexa, e o comprometimento da percepção em qualquer parte da crise obriga a utilização da denominação crise focal disperceptiva.
- Há a opção de classificar as crises focais perceptivas e disperceptivas em sintomas motores e não motores, refletindo o primeiro sinal ou sintoma da crise.
- Crises devem ser classificadas pela característica proeminente mais precoce, exceto em crises focais com parada comportamental a qual deve ser a característica dominante durante toda a crise.
- O nome crise focal também pode omitir a menção à percepção quando esta percepção não é aplicável ou é desconhecida e então deve-se diretamente classificar a crise pelas características motoras ou não motoras.
- Em crises atônicas e espasmos epilépticos usualmente não se especifica a percepção.
- Crises cognitivas implicam em comprometimento da linguagem ou outros domínios cognitivos ou em características positivas tais como *déjà vu*, alucinações, ilusões ou distorções da percepção.
- Crises emocionais envolvem ansiedade, medo, alegria, outras emoções, ou aparecimento de afeto sem emoções subjetivas.
- Uma ausência é atípica por apresentar início e término gradativos ou alterações no tônus corporal acompanhados de complexos de onda aguda-onda lenta no eletroencefalograma (EEG).
- Uma crise pode ser não classificada por informação inadequada ou incapacidade de colocá-la em outras categorias.

O termo “estado epiléptico” ou *status epilepticus* (SE) é definido como convulsões persistentes ou recorrentes devido a uma falha nos mecanismos de término das

convulsões. O SE é uma convulsão com tempo suficientemente prolongado ou repetido em intervalos breves de modo a produzir uma condição epiléptica duradoura. SE pode ter consequências a longo prazo, incluindo lesão neuronal ou morte e alteração de redes neuronais, dependendo sobre o tipo e duração das convulsões. Um novo diagnóstico classificação de SE foi recentemente proposta (TRINKA et al., 2015).

Nas convulsões do tipo tônico-clônicas bilaterais, tem sido bem aceito que 5 minutos de atividade convulsiva constituem o status e foi demonstrado que as consequências de longo prazo começam aos 30 minutos de status. Dados semelhantes estão faltando para o status epilepticus focal. No entanto, recentemente, a (ILAE) propôs a duração de 10 minutos como um ponto de tempo para o qual o estado epiléptico focal pode ser definido (denominado "ponto t1") e 60 minutos para os quais as consequências a longo prazo podem ocorrer (denominado "ponto t2"). Estes são termos arbitrários que carecem de evidências substanciais no caso de SE focal (CLAASSEN; GOLDSTEIN, 2017; TRINKA et al., 2015).

Segundo Trinka et al. (2015), esta definição é conceitual, com dois pontos temporais: 1) o ponto temporal t1 a partir do qual a crise epiléptica deve ser olhada como "*anormalmente prolongada*" ou "*atividade crítica contínua*" e 2) o ponto temporal t2 a partir do qual há risco de consequências de longo prazo devidas à contínua atividade da crise epiléptica. Tal definição com dois pontos temporais tem duas implicações clínicas (operacionais) claras: t1 determina o tempo no qual o tratamento deve ser iniciado, enquanto que t2 determina o quão agressivo deve ser o tratamento implantado para prevenir consequências de longo prazo tais como alterações cerebrais neurodegenerativas, psicopatologia, dano cognitivo e epilepsia. No caso do SE convulsivo generalizado tônico-clônico, os pontos temporais, respectivamente 5 minutos e 30 minutos, são ambos baseados em pesquisa clínica e experimental e, embora sejam considerados a melhor estimativa baseada em evidências atualmente disponível, ainda assim são uma estimativa incompleta e sujeita a variações. Não estão disponíveis dados estimativos como estes para outros tipos de SE como o convulsivo tipo mioclônico, o convulsivo parcial (focal) nem para os *status* não convulsivos como o *status* de ausência e o *status* sutil, mas pesquisas clínicas e básicas estão sendo feitas neste campo e, na medida em que aumente o conhecimento baseado em evidências sobre tipos específicos de SE, espera-se incorporar tais estimativas à atual definição sem detrimento dos conceitos subjacentes. O domínio de tempo poderá variar consideravelmente entre diferentes formas de SE.

A incidência mediana de convulsões sintomáticas agudas graves é de 100.000 por ano. As convulsões sintomáticas agudas predominam na classe etária mais jovem (menores de 1 ano de idade) e nos idosos. A febre, lesão cerebral traumática, doença cerebrovascular, drogas, infecção e insultos metabólicos estão entre os fatores inerentes mais comuns (FIEST et al., 2017).

A epilepsia afeta mais de 65 milhões de pessoas por ano e a taxa de incidência agrupada de epilepsia foi 61,4 por 100.000 pessoas-ano de acordo com uma meta-análise a incidência foi maior em países de baixa/média renda. Isso pode ser explicado pela diferente estrutura das populações em risco e maior exposição ao risco perinatal. A incidência de epilepsia também é maior em classes socioeconômicas mais baixas em HIC e, dentro da mesma população, pessoas de diferentes origens étnicas (BEGHI; HESDORFFER, 2014).

Cerca de 2-5% das pessoas em todo o mundo já tiveram ou terão pelo menos uma crise epiléptica ao longo da vida; não obstante apenas 33% delas desenvolverão as crises recorrentes que caracterizam a epilepsia. Aproximadamente 50% das pessoas que tem uma crise epiléptica sofrerão recorrência nos dois anos subsequentes (HART, 2012; BEHR et al., 2016)

## **1.2. O papel da transmissão glutamatergica, gabaérgica e dopaminérgica nas crises convulsivas**

A epilepsia do lobo temporal é a forma mais comum de epilepsia. É caracterizada por convulsões espontâneas recorrentes, muitas vezes estando associada à esclerose do hipocampo. As convulsões podem ser caracterizadas como manifestações clínicas resultantes de descargas neuronais anormais, produzindo uma superexcitação dos neurônios, podendo ocorrer também através da quebra do equilíbrio entre os mecanismos de neurotransmissão inibitórios e excitatórios. Os mecanismos de ativação, propagação e manutenção da convulsão são muito estudados, no entanto ainda pouco conhecidos (ANDRADE-VALENÇA et al., 2006; MENDES DE FREITAS, 2011).

O ácido gama- aminobutírico (GABA) é o principal transmissor inibitório no encéfalo e na medula espinhal, exercendo um importante papel no sistema nervoso, pois atuam na prevenção da excitação excessiva e coordenação das atividades das redes de neurônios. A transmissão sináptica inibitória é mediada por canais ionotrópicos

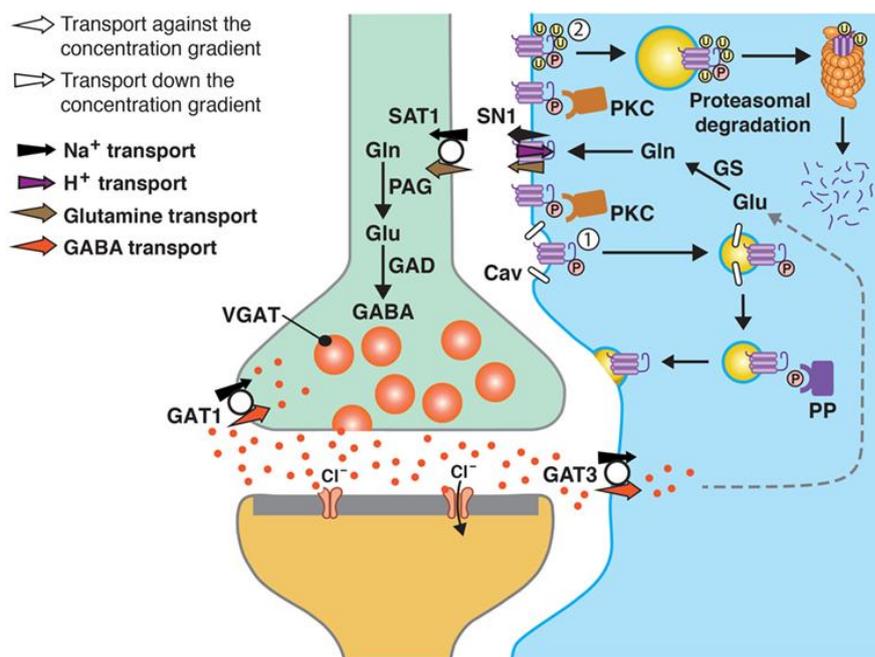
GABAérgicos e glicinérgicos que possuem permeabilidade ao íon-cloreto (KANDEL; DUDAI; MAYFORD, 2014).

O bloqueio do GABA e/ou da neurotransmissão inibitória mediada pela glicina ou o aumento da neurotransmissão excitatória pode induzir atividade neuronal assemelhando-se a mudanças de despolarização. Efeitos semelhantes são vistos com agentes epileptogênicos que atuam nos mecanismos intrínsecos de excitabilidade da membrana subjacente, como aumento da condutância de sódio ou correntes despolarizantes de cálcio ou reduzindo as correntes hiperpolarizantes de potássio. Além disso, acredita-se que a maioria dos medicamentos anticonvulsivante modificam a neurotransmissão excitatória e inibitória por meio de efeitos sobre os canais iônicos dependentes de voltagem, receptores GABA<sub>A</sub> e mediados por glutamato sobre a neurotransmissão excitatória (BERNSTEIN; QUICK, 1999; HIROSE, 2014).

Os transportadores de GABA ou GATs são uma grande família de neurotransmissores que são dependentes da concentração de Na<sup>+</sup>. Eles são encontrados em várias regiões do cérebro e em diferentes tipos de células, como astrócitos. Esses transportadores são os principais responsáveis pela regulação da concentração extracelular de GABA durante a atividade basal e sináptica. Eles são responsáveis por criar gradiente de GABA que é determinado pelo potencial de membrana e pela concentração de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>. Também estão presentes na membrana plasmática dos neurônios e da glia, onde ajudam a definir sua função de regulação da concentração de GABA. A figura 2 mostra um esquema dessa ativação (BERNSTEIN; QUICK, 1999).

Após a liberação dos terminais pré-sinápticos, o GABA é rapidamente removido do espaço extracelular pelos GATs, a fim de manter a homeostasia do GABA e evitar a ativação tônica excessiva destes receptores sinápticos e extra-sinápticos. Além disso, a reversão da função dos GATs pode resultar na liberação adicional de GABA sob certas condições patológicas e fisiológicas (JIN et al., 2011; SCIMEMI, 2014)

Figura 2 – Transmissão GABAérgica e transportadores GATs



O desenho descreve uma sinapse GABAérgica no cérebro, onde o GABA é liberado excitoticamente e atua sobre receptores pós-sinápticos específicos. O sinal é encerrado pela remoção de GABA da fenda sináptica pelo transporte de GABA de volta para o terminal nervoso pelo transportador de GABA da membrana plasmática GAT1. O GABA atua em sinapses inibitórias no cérebro por meio da ligação aos receptores específicos transmembranares na membrana plasmática de ambos os neurônios, pré e pós-sináptico, em processos neuronais. Essa ligação provoca a abertura de canais iônicos para permitir o influxo de íons de carga negativa, como íons cloreto, na célula ou íons potássio, carregados positivamente, para fora da célula. Tal ação resulta numa mudança negativa no potencial transmembranar, normalmente causando hiperpolarização. Os (GAT) são dependentes da concentração de Na<sup>+</sup>. Esses transportadores são os principais responsáveis pela regulação da concentração extracelular de GABA durante a atividade basal e sináptica. Eles são responsáveis por criar um gradiente de GABA que é determinado pelo potencial de membrana e pela concentração de Na<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>. Também estão presentes na membrana plasmática dos neurônios e da glia, que ajudam a definir sua função de regulação da concentração de GABA, pois atuam como receptores que facilitam a reciclagem de GABA no espaço extracelular. GAT1 e GAT3 são os principais transportadores de GABA no cérebro e na medula espinhal, expressos por neurônios e alguns astrócitos Fonte: SCIMEMI (2014).

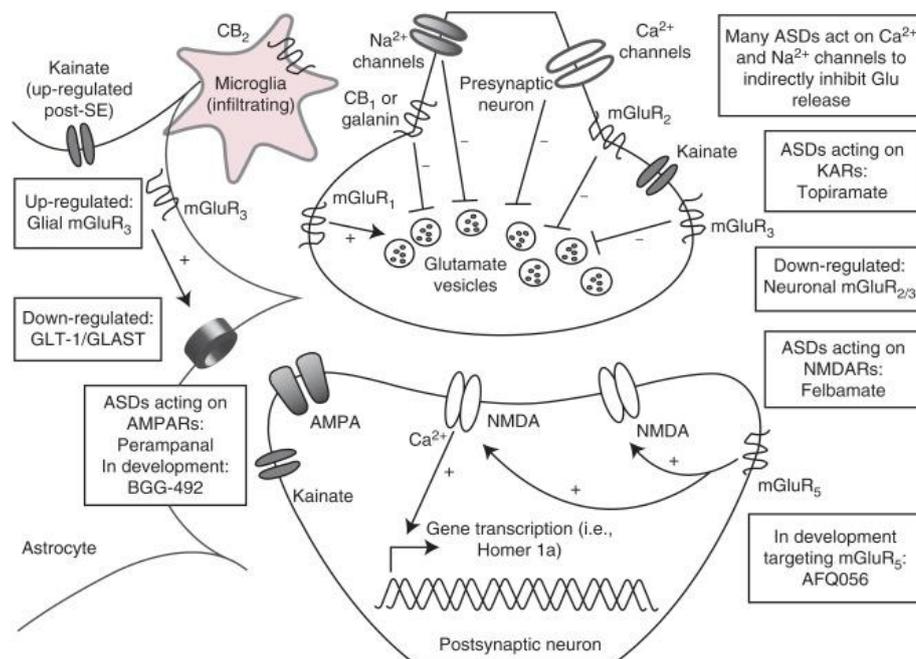
Dentre os transportadores do GABA o GAT-1 merece destaque pois remove o GABA da fenda sináptica. O transportador GABA 1 usa a energia da dissipação de um gradiente de Na<sup>+</sup>, auxiliado pela presença de um gradiente de Cl<sup>-</sup> para translocar o GABA através das membranas neuronais do SNC. Alterações nesses transportadores têm sido relacionado a doenças como epilepsia e esquizofrenia (HASHIMOTO et al., 2008; JIN et al., 2011)

O glutamato é o aminoácido neurotransmissor excitatório predominante do cérebro de mamíferos adultos e é crítico para a execução normal de vários processos. A liberação pré-sináptica de glutamato depende do cálcio na fenda sináptica e é conduzida em resposta à despolarização neuronal. Do mesmo modo que o glutamato, o

neurotransmissor inibitório ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), medeia seus efeitos inibitórios por meio de várias subclasses de receptores ionotrópicos e metabotrópicos (Figura 3). Dentre os receptores ionotrópicos de glutamato pós-sinápticos, os receptores de ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA) são críticos para a neurotransmissão excitatória rápida. Já os receptores *N*-metil-*D*-aspartato (NMDARs) medeiam muitos dos potenciais excitatórios pós-sinápticos lentos, essenciais para o processamento global de informações (BARKER-HALISKI; STEVE WHITE, 2015). O glutamato também pode interagir com um receptor ionotrópico de glutamato, o receptor kainato, que tem um papel menos claramente compreendido na sinalização neuronal podendo incluir a modulação pré e pós-sináptica da neurotransmissão excitatória (BARKER-HALISKI; STEVE WHITE, 2015; LERMA; MARQUES, 2013).

O efeito do glutamato nesses subtipos de receptores estimula, assim, uma série de eventos pré e pós-sinápticos, todos subjacentes à atividade neuronal normal e anormal (ROWLEY et al., 2012).

Figura 3 – Transmissão Glutamatérgica



Para exercer suas funções, o glutamato age em receptores específicos localizados na superfície da membrana celular. Estes receptores são classificados de acordo com as suas propriedades farmacológicas e funcionais, e são divididos em: i) receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA e kainato) são aqueles que quando ativados tornam-se permeáveis a cátions como sódio ( $Na^+$ ) e cálcio ( $Ca^{2+}$ ); ii) receptores metabotrópicos são proteínas transmembrana acopladas a proteínas G que quando ativados promovem a modulação de efetores intracelulares (ativação de segundos mensageiros). O grande número de sinapses glutamatérgicas combinadas com a sua variada distribuição pelas diversas áreas do SNC, torna o cérebro particularmente vulnerável a qualquer modificação nos níveis extracelulares de glutamato. A intensidade da estimulação dos receptores glutamatérgicos é proporcional a concentração do neurotransmissor no fluido extracelular. A sua excessiva liberação e consequente acumulação na fenda sináptica o torna tóxico devido

à excessiva estimulação de seus receptores. Então, é de grande importância para as células neurais que os níveis extracelulares de glutamato sejam mantidos baixos. Como não há evidências sobre a presença de uma enzima que metabolize o glutamato extracelular, o sistema de transporte de glutamato é o mecanismo que a célula realiza para retirar o neurotransmissor do meio extracelular e, assim, interromper a sua ação nos seus receptores pós-sinápticos. Os Transportadores de Aminoácido Excitatório são proteínas que realizam o transporte de glutamato do meio extracelular para o meio intracelular com alta afinidade e dependência de íons sódio. Os transportadores estão presentes na membrana celular de neurônios e células da glia, sendo os últimos considerados quantitativamente mais importantes para manter baixa a concentração extracelular do glutamato Adaptado-de Barker-Haliski, Steve White (2015).

A evidência do papel do glutamato em convulsões e na epileptogênese é demonstrada em diversos modelos animais e humanos durante SE. A liberação de glutamato induzida por SE resulta na superestimulação de receptores de glutamato, incluindo NMDARs, atividade convulsiva sustentada de longo prazo e desenvolvimento de dano cerebral induzido por convulsão. Com SE prolongado, os receptores GABA são internalizados e NMDARs migram para sinapses neuronais, sendo que estes efeitos levam à redução da inibição e hiperexcitabilidade. Essas mudanças induzidas por SE na localização do receptor destacam por que as drogas que têm como alvo a neurotransmissão GABAérgica provavelmente falham em suprimir convulsões associadas a SE sustentado, enquanto o tratamento com antagonistas NMDAR em combinação com agonistas GABA e outros agentes pode muitas vezes atenuar com sucesso SE experimental (BARKER-HALISKI; STEVE WHITE, 2015; GAO et al., 2014; RODRÍGUEZ-MORENO, 2006).

A neurotransmissão dopaminérgica parece estar bem implicada na propagação e manutenção das crises convulsivas induzidas pela pilocarpina. Em modelos animais usando altas doses de pilocarpina, foram observados um aumento na atividade motora e uma concomitante diminuição na dopamina estriatal. O sistema dopaminérgico é particularmente interessante, no que se refere aos seus efeitos no processo convulsivo, já que a ativação dos receptores D1 e D2 produz respostas opostas para a atividade epiléptica. O limiar das convulsões é inversamente proporcional ao conteúdo nigroestriatal de dopamina. A depleção da dopamina aumenta a resistência às convulsões (MENDES DE FREITAS, 2011).

### **1.3. Estresse oxidativo, inflamação e papel da glia nas crises epilépticas**

O estresse oxidativo ocorre quando existe um desequilíbrio entre as substâncias pró-oxidantes e antioxidantes. Mostrou-se estar associado com espécies reativas de oxigênio (ERO), espécies reativas de nitrogênio (ERN) e vias de sinalização do óxido

nítrico (NO), através das quais o NO biodisponível diminui e a produção de ERO e ERN aumenta. Todo este processo é induzido por respostas inflamatórias e processos metabólicos mitocondriais subsequentes geram moléculas de radicais livres altamente reativas. O cérebro humano consome cerca de 20% do oxigênio produzido, sendo este o principal produtor de radicais livres. Maior parte da energia produzida é utilizada para retomar o potencial de repouso das células excitatórias. Nesse sentido, o SNC possui uma grande quantidade de mitocôndrias com o objetivo de suprir essa grande quantidade de energia, tornando-o altamente vulnerável a qualquer disfunção desta organela (BERRA; MENCK; DI MASCIO, 2006).

A descarga anormal que ocorre na epilepsia consome muita energia e isto implica no estresse oxidativo observado, tornando-se um evento emergente na fisiopatologia desta doença (GREWAL et al., 2017). Além disso, alterações relacionadas ao estresse oxidativo podem ser quantificadas através de modelos de vários modelos pré-clínicos de convulsão e SE (GAO et al., 2018; WALDBAUM; PATEL, 2010).

Tanto na epilepsia como em outras doenças neurológicas como doença de Parkinson, doença de Alzheimer, esclerose e isquemia cerebral, e dentre outras, há evidência de elevada quantidade de mediadores inflamatórios em tecidos cerebrais, mostrando o papel da inflamação na fisiopatologia destas doenças (STEPHENSON et al., 2018).

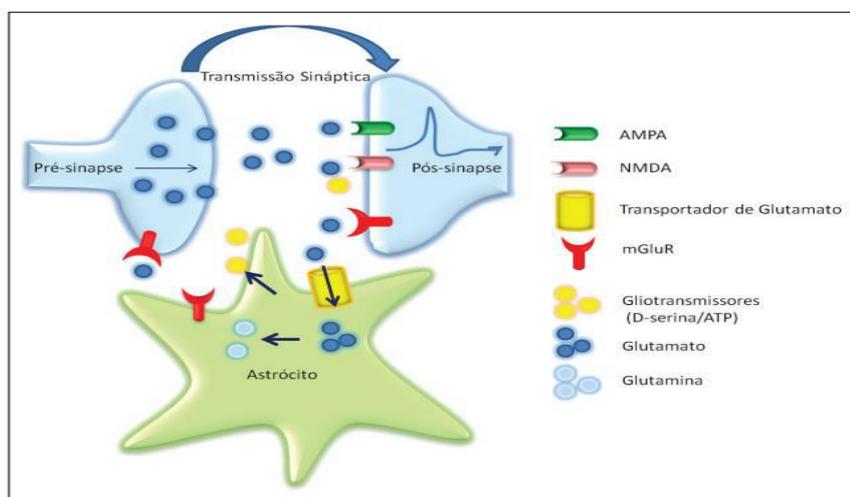
Clinicamente, na epilepsia e nas crises epiléticas, o papel da inflamação na fisiopatologia é hipotético; entretanto o processo inflamatório pode atuar tanto no início de uma crise como na manutenção de um processo epileptogênico. Evidências da existência de uma relação entre crises epiléticas e processo inflamatório já foram encontradas, tais como: boa resposta clínica ao uso de fármacos anti-inflamatórios como terapia coadjuvante nos casos de epilepsia refratária aos tratamentos convencionais; A presença de marcadores inflamatórios como as interleucinas 6 (IL-6), interleucina 1 (IL-1) fator de necrose tumoral (TNF-alfa), entre outras, já foram visto em pacientes com esta doença como também em vários modelos pré-clínicos. As respostas imunes anormais, febre e infecções comuns podem gerar crises epiléticas em decorrência da inflamação associada (GUZZO; PEDRINI; BREIGEIRON, 2020; MARCHI; GRANATA; JANIGRO, 2014).

As células gliais fazem parte do Sistema Nervoso e dentre suas diversas funções destacam-se o auxílio no suporte e as ações no funcionamento do sistema nervoso central. A microglia por exemplo é a célula glial que desempenha o papel imunomodulador no

SNC. Os astrócitos são as células gliais encontradas em maior quantidade no SNC, tendo importância no suporte trófico, metabólico e estrutural dos neurônios. A interação entre os astrócitos e os neurônios em situações fisiológicas é conhecida de longa data (KHURGEL; IVY, 1996).

Os astrócitos expressam muitas citocinas e fatores neurotróficos que podem interferir no metabolismo e na sobrevivência neuronal pois estas moléculas regulam a sinalização sináptica e podem também apresentar influência sobre o desenvolvimento das células neuronais precursoras do SNC. Quando o SNC sofre uma lesão, os astrócitos tornam-se reativos, estado no qual a célula deflagra mecanismos de neuroproteção (DRINGEN; SCHEIBER; MERCER, 2013). A reatividade dos astrócitos é uma característica patológica de vários tipos de epilepsias: focal refratária, epilepsia secundária à isquêmica, traumática, infecciosa ou lesão cerebral. O termo sinapse tripartite se refere ao conceito baseado na presença de uma comunicação entre os astrócitos e neurônios no ambiente sináptico, adicionando o conceito de que glia e sinapse trocam informações como demonstrado na Figura 4 (COULTER; STEINHÄUSER, 2015).

Figura 4 -Estrutura da sinapse tripartite



Liberação de glutamato na fenda sináptica. O receptor metabotrópico tipo II mGluR também está presente pré-sinápticamente e pode limitar a liberação sináptica de glutamato. O astrócito pode liberar diretamente glutamato, regulando a atividade pré- e pós-sináptica. O excesso de glutamato é removido pelos transportadores astrocitários de glutamato. Receptores do tipo AMPA, quando ativados, permitem influxo de sódio e consequente despolarização da membrana neuronal. Os receptores NMDA também são ativados pelo glutamato, juntamente com seu co-agonista, a D-serina (GOMES; TORTELLI; DINIZ, 2013).

#### 1.4. Tratamento farmacológico: drogas anticonvulsivantes

A Primeira geração das drogas antiepilépticas ou anticonvulsivantes foi introduzida/descoberta/desenvolvida entre 1857-1958, e inclui alguns fármacos como o brometo de potássio, fenobarbital, fenitoína, primidona, trimitadiona e etossuximida (SHORVON., 2009). A fenitoína tem mecanismo de ação através do bloqueio de canais de sódio (Na<sup>+</sup>) (ROWAN et al., 2005). A ação do fenobarbital está relacionada ao aumento da ação do GABA, através dos receptores GABA<sub>A</sub> e inibição da ação do glutamato, bloqueando os canais de sódio. No entanto os fármacos de primeira geração apresentam um número significativo de efeitos adversos (LOSHER; SCHMDIT, 2002).

Os fármacos de segunda geração (1960-1975) incluem carbamazepina, valproato, benzodiazepínicos entre outros (SHORVON, 2009). A carbamazepina atua, também, através do bloqueio de canais de Na<sup>+</sup> inibindo descargas repetidas (ROWAN et al., 2005). Valproato produz sua ação dificultando excitação mediada pelo glutamato e bloqueando canais de Na<sup>+</sup> dependentes de voltagem-como também interação nos receptores GABA. Os Benzodiazepínicos aumentam a ação do GABA aumentando a frequência de abertura dos receptores (PORTO et al., 2007). As drogas de terceira geração (a partir de 1980) incluem vigabatrina, lamotrigina, felbamato, gabapentina, topiramato, tiagabina, levetiracetan entre outros (SHORVON, 2009). Vigabatrina aumenta os níveis de GABA, agindo especificamente na enzima gaba transaminase (ROGAWSKI; CAVAZOS, 2015).

A Lamotrigina antagoniza canais de Na<sup>+</sup> dependentes de voltagem (DUPERE et al., 1999). O Felbamato é um modulador do receptor GABAérgico, mas também age inibindo os receptores NMDA (RHO et al. 1994). Gabapentina é um agonista de receptores GABAérgicos (ROGAWSKI; CAVAZOS., 2015). Topiramato age através da potencialização da transmissão GABAérgica e a inativação de canais de Na<sup>+</sup> sensíveis a voltagem e interfere na transmissão glutamatérgica (KWAN et al., 2001). Já Tiagabina possui mecanismo ação através da inibição do transportador de GABA 1, o GAT-1 (GOODMAN; GILMAN, 2012). Os eventos adversos destas drogas representam uma causa importante na descontinuação do tratamento como, também, podem impedir o uso de doses mais eficazes (PERUCCA; GILLIAM, 2012).

### **1.5. Modelos pré-clínicos para estudo da epilepsia e desenvolvimento de fármacos**

Os modelos experimentais ajudam na triagem de drogas antiepilépticas (WHITE, 1997) contribuindo no conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na origem e

manutenção das crises. Modelos *in vivo* ajudam a reproduzir as crises comuns na epilepsia e a maior parte do conhecimento adquirido foi devido ao uso de animais, especialmente roedores, sendo uma importante ferramenta de pesquisa pré-clínica (GRONE; BARABAN, 2015).

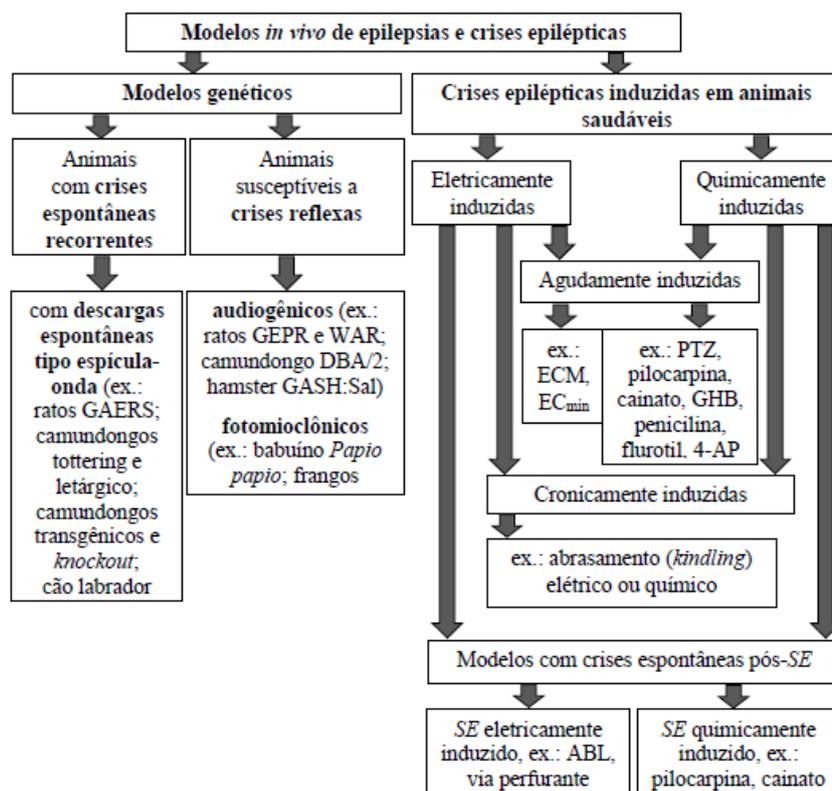
Já foi demonstrado que muitos modelos *in vivo* interferem em diversos sistemas como: sistema gabaérgico, glutamatérgico, colinérgico, dopaminérgico e as vias da glicina; todos envolvidos na fisiopatologia das convulsões (LIMA.,2011). Dentre os modelos agudos, um dos mais utilizados é o da crise convulsiva induzida pelo o Pentilenotetrazol (PTZ), um antagonista competitivo dos receptores GABA<sub>A</sub> pela interação alostérica dos canais de cloreto que promove uma diminuição da ação inibitória no Sistema Nervoso Central (HUANG et al., 2001). A exposição ao PTZ induz uma sequência de comportamentos estereotipados os quais iniciam com movimentos orofaciais e finalizam em convulsões clônicas em roedores (SHORVON, 2009; LOSHER; SCHMIDT, 2011).

Semelhando ao PTZ, a Picrotoxina também induz convulsões agudas por atuar como antagonista dos receptores GABA<sub>A</sub> ou por modulação alostérica do mesmo. Esse agente foi isolado primariamente na planta (*Anamirta cocculus*) (KAILA et al., 2014). A Pilocarpina (Pilo), é um agonista muscarínico colinérgico, isolado das folhas do jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*) (ABREU et al., 2007). A administração de altas doses de pilocarpina (300-400mg/kg) induz convulsões agudas ou desenvolve-*status epilepticus* em roedores (CHO et al., 2015). Acredita-se que o início da atividade convulsiva se deva a inicial ativação de neurônios excitatórios do sistema glutamatérgico, sendo o sistema colinérgico responsável por esta ativação. A alta concentração de glutamato durante o *status epilepticus* mantém a despolarização celular, ocasionando a liberação contínua de cálcio dos estoques intracelulares, gerando assim, lesão da membrana da célula e de organelas podendo induzir a morte celular por excitotoxicidade (TURSKI et al., 1989; CAVALHEIRO et al., 1994).

Diversos modelos de epilepsias e de crises epiléticas tem sido descritos e podem enquadrar-se em diversas categorias ex.: modelos com crises espontâneas *versus* modelos com crises induzidas eletricamente ou quimicamente, modelos de crises recorrentes *versus* crises únicas (crônicos *versus* agudos), modelos com crises parciais *versus* crises generalizadas, modelos com crises convulsivas *versus* crises não-convulsivas, modelos de crises autolimitadas *versus status epilepticus*, modelos para *screening* (testagem) de moléculas com atividade antiepilética *versus* modelos para testagem mais avançada de

eficácia contra tipos específicos de crise, modelos relacionados a mecanismo conhecido *versus* modelos sem mecanismo específico ou conhecido, modelos de estímulo limiar *versus* estímulo supra-limiar (Figura 5).

Figura 5 – Modelos *in vivo* de epilepsias e crises epiléticas



Fonte: Adaptado por Lustosa (2016) e Löscher, (2011).

### 1.6. *Sideroxylon obtusifolium*: considerações etnobotânicas e efeitos medicinais

A família Sapotaceae envolve 11 gêneros e cerca de 450 espécies neotropicais com representantes que vão desde a região sul dos Estados Unidos até Paraguai, Uruguai e Chile. Estão presentes em florestas úmidas, mas podem existir em savanas e em zonas semiáridas. No bioma cerrado, ocorrem pelo menos sete gêneros e cerca de 20 espécies, sendo sete do gênero *Pouteria*. Na família, ocorrem espécies hermafroditas e unissexuais como *Manilkara*, *Pradosia* e a maioria das espécies de *Sideroxylon* (GAMA; BARBOSA; OLIVEIRA, 2011).

A família Sapotaceae é uma das angiospermas mais ameaçadas pelo avanço dos desmatamentos (IUCN, 2008). Os representantes da família são árvores ou arbustos, monóicos ou dióicos, produtoras de látex. Suas folhas são alterno-dísticas ou espiraladas

e simples. As flores podem ser reunidas em fascículos axilares, caulifloros ou ramifloros. Quanto ao sexo são bissexuadas ou unissexuadas, com simetria radial e pétalas do tipo gamopétalas. Os estames são adnatos e opostos aos lobos da corola e o gineceu é sincárpico, com ovário súpero (ALVES-ARAÚJO; ALVES, 2010).

A maioria dos representantes da família Sapotaceae possui grande importância econômica, tais como os fornecedores de frutos, madeira, látex, utilizados na medicina popular e ornamentais (MONTEIRO et al., 2007, FELIPPI et al., 2008, PALAZZO et al., 2010).

*Sideroxylon obtusifolium* (Roem & Schult) conhecida como quixabeira, é uma árvore com até 12 m de altura. Geralmente a casca do caule é lisa, mas pode ser sulcada, desprendendo-se em placas escamiformes e côncavas, de cor marrom-acinzentada. Seus ramos possuem espinhos, de 1,5 a 4 cm de comprimento. A casca amarelada e as folhas simples, opostas, com 2 a 5 cm de comprimento. Tem flores pequenas, amarela-claras. O fruto possui, de 1 a 1,5 cm de comprimento, forma ovóide, liso e brilhante, de cor roxo escuro, chegando a preto, quando maduro. A polpa tem sabor doce e látex viscoso. Floresce a partir de janeiro. A maturação dos frutos se dá até março, início do período chuvoso, quando a folhagem começa a se formar novamente (Figura 6) (MARQUES, 2008).

A espécie *S. obtusifolium* possui diversos nomes populares como quixaba, quixabeira, rompe-gibão, coronilha, coca, maçaranduba da praia, miri, sacutiaba, guaraniná, ibirá-niná. A *S. obtusifolium* tem alguns sinônimos científicos como *Bumelia sartorum*, *Bumelia obtusifolia*, *Bumelia excelsa*, *Bumelia buxifolia*, *Bumelia dunantii*, *Bumelia cruegerii*, *Bumelia nicaraguensis* e *Lyciodes buxifolia* (DELFINO et al., 2005, LORENZI; MATOS, 2008).

Na análise química através de cromatografia em camada delgada foram identificados compostos em *S. obtusifolium*, como flavonóides, mono e sesquiterpenos, proantocianidinas condensadas e leucoantocianidinas, triterpenos, esteróides e açúcares. As partes analisadas apresentaram-se semelhantes quanto à presença desses metabólitos, porém, o caule das plantas adultas apresentou uma variedade maior de proantocianidinas condensadas, leucoantocianidinas e açúcares (SILVA, 2008).

Figura 6 – *Sideroxylon obtusifolium* (Árvore, Folhas, Flores e Frutos).



Fonte: acervo do Professor Dr. Edilberto Rocha Silveira- Universidade Federal do Ceará

*Sideroxylon obtusifolium* é muito usada na terapia tradicional. Casca e folhas são usadas para diversas enfermidades como: dores em geral, úlcera duodenal, gastrite, azia, inflamação, lesão genital, cólicas, problemas renais, problemas cardíacos, diabetes, e como expectorante (BELTRÃO et al., 2008, ARAÚJO-NETO et al., 2010).

Esta espécie é usada também para tratamentos de inflamações ovarianas (AGRA et al., 2007) e tratamento de problemas odontológicos (SANTOS et al., 2009). Estudos farmacológicos comprovaram ação anti-inflamatória (ARAÚJO-NETO et al., 2010), hipoglicemiante e anticonvulsivante, fazendo com que *S. obtusifolium* seja considerada uma espécie importante no uso da terapia tradicional (AGRA et al., 2007, BELTRÃO et al., 2008, PEDROSA et al., 2012).

### 1.7. Atividades Biológicas da *N*-metil-(2S,4R)-*trans*-4-hidroxi-L-prolina

Foi identificado a presença de um derivado da L-prolina, a *N*-metil-(2S,4R)-*trans*-4-hidroxi-L-prolina (Figura 7) nas folhas da *Sideroxylon obtusifolium*. popularmente conhecida como quixaba.

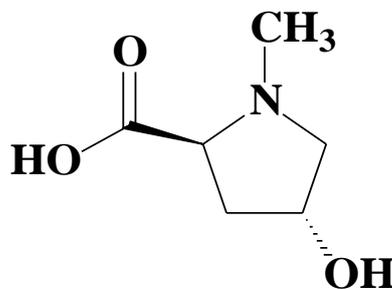
Nosso grupo já vem estudando essa planta há algum tempo, tendo demonstrado previamente atividade antibacteriana do extrato das folhas (MARIA GARCIA LEANDRO et al., 2013) efeito anti-inflamatório e antioxidante (AQUINO et al., 2016), bem como atividade anti-inflamatória e cicatrizante (DE AQUINO et al., 2017, 2019).

Foram demonstrados os efeitos anticonvulsivantes da L-prolina e derivados em associação com a vigabatrina em trabalho publicado há mais de duas décadas, no qual os autores acreditam que este aminoácido possa estar envolvido com o neurotransmissor glutamato, podendo ser um inibidor ou antagonista de receptor, apresentando também interação gabaérgica (SARHAN; SEILER, 1989).

A L-prolina pode atuar como uma molécula de sinalização em plantas modulando funções mitocondriais, e na proliferação de células, influenciando na apoptose e regulando as espécies reativas de oxigênio produzidas pelas mitocôndrias, o que pode ser essencial para a recuperação da planta em momentos de estresse oxidativo (SZABADOS; SAVOURÉ, 2010).

Recentemente publicamos os dados referentes a este estudo mostrando os efeitos neuroprotetores e anticonvulsivantes deste composto (DE AQUINO et al., 2020a, 2020b).

Figura 7 – Estrutura química da *N*-metil-(2*S*,4*R*)-*trans*-4-hidroxi-L-prolina



*N*-metil-(2*S*,4*R*)-*trans*-4-hidroxi-L-prolina

Fonte: própria

## 2 JUSTIFICATIVA

A epilepsia causa sérios impactos na qualidade de vida dos pacientes, principalmente gerando uma série de comorbidades. Aproximadamente, 30% de todos os pacientes não respondem a nenhum tipo de terapia, apresentando mortalidade 2 a 3 vezes maior que a população em geral (KAILA et al., 2014).

Diante disto, novos estudos que visem a melhor compreensão da fisiopatologia dessa doença, e de novos alvos terapêuticos são de fundamental importância e precisam ser estimulados. Isso é possível graças aos modelos experimentais pré-clínicos pois os parâmetros avaliados ajudam na triagem de drogas promissoras. Estudos científicos usando vários modelos experimentais têm demonstrado uma correlação entre convulsões e estresse oxidativo através da presença de marcadores de estresse oxidativo por meio de modelos de convulsão e/ou SE.

A *N*-metil-(2S,4R)-*trans*-4-hidroxi-L-prolina (NMP) é um derivado metilado do aminoácido L-prolina e foi isolada pela primeira vez das folhas de *Sideroxylon obtusifolium* por pesquisadores do nosso grupo, tornando-se então objeto de estudos há quase uma década. Inicialmente enfatizou-se o potencial cicatrizante, anti-inflamatório e antioxidante da planta e da NMP (AQUINO et al., 2017) e posteriormente os estudos concentraram-se nos efeitos anticonvulsivante e neuroprotetor. Como a inflamação e o estresse oxidativo estão envolvidos na epilepsia e estudos prévios com a L-prolina e seus outros derivados mostram efeitos anticonvulsivantes, viu-se a necessidade de investigar esse componente bioativo da *S. obtusifolium* que poderia eventualmente estimular estudos translacionais tornando-se um importante alvo terapêutico para o tratamento da epilepsia

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos: anticonvulsivante e neuroprotetor da fração metanólica - *N*-metil-(2*S*,4*R*)-*trans*-4-hidroxi-*L*-prolina (NMP) oriunda das folhas de *Sideroxylon obtusifolium* em modelos *in vitro in silico* e *in vivo*. –

#### 3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade da NMP em modelo de morte celular induzida por Pilocarpina em cultura de células astrócitárias, bem como verificar o-estresse oxidativo analisando a produção de espécies reativas de-oxigênio e dano mitocondrial por citometria de fluxo;
- Avaliar a expressão proteica dos marcadores relacionados a reatividade astrocitária (GFAP) e dano mitocondrial (VDAC) através de WesternBlot nas culturas secundárias de astrócitos tratadas com NMP e desafiadas com pilocarpina;
- Buscar identificar possíveis predições de ligações da NMP através do estudo de modelagem molecular;
- Quantificar os aminoácidos (GABA e Glutamato) e monoaminas (DOPAMINA e DOPAC) de áreas cerebrais através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) em animais submetidos ao modelo de convulsão aguda induzida por pilocarpina;
- Determinar as alterações neuroquímicas pelos seguintes parâmetros: níveis de malonaldeído (MDA), de nitrito e determinação da concentração da glutathiona reduzida (GSH) em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos após tratamento com NMP e dos grupos-controles após convulsões induzidas por pilocarpina;
- Dosar os níveis de Interleucina 6 e Interferon gama através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) em hipocampos dos animais submetidos ao-modelo de convulsão aguda induzida por pilocarpina;
- Avaliar a expressão proteica dos marcadores relacionados a reatividade astrocitária (GFAP), por meio de imunohistoquímica, nos hipocampos-dos animais submetidos ao modelo de convulsão aguda induzido por pilocarpina;

- Avaliar o efeito neuroprotetor da NMP no modelo de status epiléptico induzido por pilocarpina via intracerebroventricular (i.c.v.) através de coloração histológica para dano neuronal (coloração de Nissl);
- Examinar o efeito sobre a performance cognitiva através de testes de comportamento: reconhecimento de objeto e labirinto em Y no modelo-de *status epiléptico* induzido por pilocarpina via i.c.v.;
- Avaliar a expressão de GFAP, caspase 3, Iba-1, GAT-1 através de técnicas como imunofluorescência, Western Blot e imunohistoquímica, respectivamente, no modelo de status epiléptico induzido por pilocarpina via i.c.v.;

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material vegetal e isolamento de *N*-metil-(2S,4R)-*trans*-4-hidroxi-L-prolina (NMP) de *Sideroxylon obtusifolium*

Folhas da espécie *Sideroxylon obtusifolium* foram coletadas no município de Mauriti, Estado do Ceará, em agosto de 2014. Um espécime de voucher (número 10.648) foi armazenado no "Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima", Universidade Regional do Cariri (URCA), Crato, Ceará, Brasil. O componente bioativo *N*-metil-(2S,4R) -*trans*-4-hidroxi-L-prolina (NMP), foi obtido de acordo com o procedimento descrito por (AQUINO et al., 2017). No apêndice se encontra o documento suplementar referente ao procedimento supracitado, bem como na publicação de uma parte dos dados deste trabalho, encontrada em Aquino et al. (2021).

### 4.2. Ensaio *In vitro*

#### 4.2.1. Cultura de astrócitos

A linhagem de astrócitos foi isolada e atribuída pelo grupo da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) seguindo os protocolos descritos anteriormente (ERUSTES et al., 2016). As células foram cultivadas no meio modificado (DMEM, Invitrogen, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (BSA), 2 mM L-glutamina e antibióticos (100 U/ml penicilina, 100µg/ml estreptomicina - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em condições padrão, mantida a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>, até que a confluência foi alcançada de acordo com a boa prática de cultura celular. Antes de todos os experimentos, as células foram semeadas em placas de 96 poços ou placas de 24 poços (Corning, NY, EUA) a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/ml durante a noite para garantir a adesão e a proliferação.

#### 4.2.2. Tratamento de células

O protocolo de lesão celular utilizado no presente estudo baseou-se no tratamento prévio de astrócitos com pilocarpina (31, 86 mM) por 24h, em concentração tóxica para

50% das células (IC50). Depois, as células foram lavadas com PBS. A NMP foi diluída em tampão de fosfato (PBS) com o objetivo de tratar células em várias concentrações (3,12 a 100 µg/mL) por 24 h e a solução PBS foi usada como controle negativo.

#### ***4.2.3. Ensaios de viabilidade celular***

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio com brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT, Sigma, St Louis, MO, USA). Após o tratamento dos astrócitos com a NMP por 24h, o MTT foi adicionado ao meio cultural em uma concentração final de 2,5 mg/ml e incubado a 37 °C por 4 h. Dentro de células viáveis, o MTT é transformado em formazan. O formazan resultante foi solubilizado adicionando 10% de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e após 17h, as placas foram lidas a 570 nm.

#### ***4.2.4. Ensaios de citometria de fluxo***

Após 24 h de tratamento com a NMP, os astrócitos foram submetidos à análise de citometria de fluxo, para determinar mecanismos de morte celular envolvidos na lesão pilocarpina e no perfil de proteção da droga teste. As células foram centrifugadas e lavadas duas vezes com tampão de ligação (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) para permitir a rotulagem. Finalmente, os grupos experimentais foram analisados em um dispositivo de citometria de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, Nova Jersey, EUA) usando o software CellQuest Pro®.

#### ***4.2.5. Produção de espécies de oxigênio reativa citoplasmática (ROS)***

Com o objetivo de avaliar a produção de oxigênio reativo citoplasmático (ROS), foi utilizada a produção de corante DCFH-DA (2'-7'-diacetato de diclorofluoresceína). Esta é uma molécula lipofílica que cruza livremente a membrana plasmática e sofre a ação de esterase citoplasmática, resultando na formação do substrato DCFH. Espécies de oxigênio reativo citosólico oxidam DCFH, formando a molécula fluorescente DCFH-Ox, exibindo uma cor verde. Os astrócitos foram rotulados com DCFH-DA (100 µM). Após 24 horas de tratamento, as células foram lavadas e analisadas no citômetro de fluxo para formação e acúmulo de espécies de oxigênio reativos considerando-se a média geométrica da intensidade do sinal FL1 em relação ao controle.

#### **4.2.6. Potencial transmembrana mitocondrial ( $\Delta\Phi_m$ )**

A despolarização mitocondrial foi avaliada utilizando rodamina 123 (Rho123) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Rho123 é um fluorocromo cônico em pH fisiológico, que marca seletivamente mitocôndrias em células vivas; sua absorção está correlacionada com  $\Delta\Phi_m$ . As células foram lavadas com PBS e manchadas com Rho123 (10  $\mu\text{g/ml}$ ) por meia hora. Depois disso, as células foram analisadas no citômetro de fluxo para medir a diminuição do acúmulo de Rho123 nas mitocôndrias celulares.  $\Delta\Phi_m$  foi determinado considerando a mudança de dobra na média geométrica da intensidade do sinal FL2 em relação ao controle.

#### **4.2.7. Isolamento Mitocondrial**

Para esse teste foram utilizados 2 ratos adultos da linhagem wistar (CEUA 59/17). As mitocôndrias foram isoladas usando um macerador de tecido e digitonina para liberar mitocôndrias de sinaptosomos. Este procedimento resulta em uma mistura de mitocôndrias sinaptosômicas e não-sinaptosômicas. Resumidamente, o cérebro de rato foi finamente picado e lavado em 4 graus Celsius em um tampão contendo 125mM de sacarose, 250mM manitol, 10mM HEPES, 10mM EGTA, 0,01% BSA (pH 7.2, KOH) e então foi transferido para um macerador de tecido de vidro e homogeneizado. Após isso foi então centrifugado a 2000 x g por 3 minutos para remover células e núcleos ininterruptos. O sobrenadante foi transferido para um tubo frio e centrifugado duas vezes a 12.000 g por 8 min.

A segunda centrifugação foi realizada na presença de 0,1 % de digitonina. O “*pellet*” mitocondrial resultante foi ressuspenso em um tampão desprovido de EGTA. A solução mitocondrial foi exposta à pilocarpina (10 ng/L) e a NMP (10, 50 e 100 ng/L) por um minuto e, em seguida, o protocolo de intumescimento mitocondrial prosseguiu.

#### **4.2.8. Intumescimento mitocondrial**

As mudanças na dispersão de luz devidas à absorção do cálcio e consequente inchaço da mitocôndria, foram medidas como uma diminuição da densidade óptica em 540 nm. As mitocôndrias cerebrais de rato foram incubadas em tampão contendo 150 mM

KCl, 10 mM HEPES, 2 mM succinato, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 µg/mL oligomicina, pH 7.2 (KOH). Para induzir a abertura do poro de transição de permeabilidade mitocondrial, foram adicionados 2 µM Ca<sup>2+</sup>. A diminuição da dispersão de luz foi registrada por 5 minutos.

### 4.3. Estudo in silico

#### 4.3.1. Ferramentas Computacionais para possíveis alvos de Drogas

#### 4.3.2. Predição de alvo

A predição dos alvos biológicos da NMP foi realizada através do *Swiss Target Prediction Server* (BATEMAN et al., 2017). Este servidor estima os alvos macromoleculares mais prováveis de uma pequena molécula, assumida como bioativa. A previsão é baseada em uma combinação de similaridade 2D e 3D com uma biblioteca de 370.000 ativos conhecidos em mais de 3000 proteínas. Os resultados são apresentados em taxas de probabilidade que podem guiar os experimentos subsequentes (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2019).

#### 4.3.3. Modelagem e cálculos de acoplamento molecular: Comparando a interação de NMP e Tiagabina com GAT-1

A estrutura do Transportador de GABA 1 (GAT-1) foi construída pela modelagem através do servidor *Swiss Model*. A sequência primária de GAT1 foi pesquisada no servidor *Uniprot* (BATEMAN et al., 2017). O modelo que apresentava maior sequência de identidade foi selecionado para a etapa de refinamento, no servidor *Galaxy Refine*. O servidor *MolProbity* foi usado para adicionar átomos de hidrogênio e analisar a qualidade das estatísticas da proteína modelada.

A NMP, bem como o bloqueador de GAT-1 tiagabina, foram ancorados em GAT-1 usando o software Glide no modo de precisão extra (XP). Preparamos as estruturas proteicas através de uma ferramenta do Assistente de Preparação de Proteínas, adicionando os átomos de hidrogênio e minimizando a energia, usando o campo de força OPLS-2005.

Os ligantes foram preparados através da ferramenta *LigPrep*, corrigindo a protonação, segundo a Epik, e realizando minimização de energia. As coordenadas da rede proteica foram construídas, com base nas coordenadas do ligante, co-cristalizadas na estrutura utilizada como modelo (do PDB ID 4XP4). O programa Visual Molecular Dynamics (VMD) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996; PAGADALA; SYED; TUSZYNSKI, 2017) foi utilizado para a inspeção visual de poses de acoplamento 3D e para renderizar as imagens moleculares 3D.

#### **4.4. Ensaios in vivo**

##### **4.4.1. Animais**

Os camundongos Swiss machos (25-33 g) foram obtidos do biotério da faculdade de medicina da Universidade Federal do Ceará, mantidos em  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  sob um ciclo claro/escuro de 12/12 h. Comida e água *ad libitum*. Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEUA/UFC) sob o número 59/17.

##### **4.4.2. Modelo de indução de convulsão aguda**

###### **4.4.2.1. Modelo de convulsões induzidas por pilocarpina e pentilenoterazol (PTZ)**

Os camundongos foram pré-tratados via oral (v.o) com NMP nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg ou com água destilada (veículo diluidor). Após uma hora, as convulsões foram induzidas pela administração sistêmica de pilocarpina (400 mg/kg) ou PTZ (80 mg/kg) pela via intraperitoneal (i.p). Em seguida, os animais foram colocados em gaiolas individuais e observados os seguintes parâmetros comportamentais (em segundos): latência à primeira convulsão (tempo decorrido antes da primeira convulsão) e latência até a morte (tempo decorrido até a morte). O evento convulsivo foi caracterizado principalmente pela extensão do membro traseiro e/ou salto descoordenado. Imediatamente após a morte as áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e corpo

estriado) foram dissecadas para testes bioquímicos (AGUIAR et al., 2012; LIMA et al., 2012).

#### ***4.4.3. Determinação dos conteúdos de dopamina (DA) e ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) em corpo estriado de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzida por pilocarpina***

O conteúdo estriatal da DA e seu Metabólito DOPAC foram determinados pelo HPLC. Para isso, foi empregado um detector eletroquímico (modelo L-ECD-6A, de Shimadzu, Japão) acoplado a uma coluna. Os homogenatos foram preparados em 10% HClO<sub>4</sub> e centrifugados a 4°C (25.000x g, 15 min). Os sobrenadantes foram filtrados e 20 µL foram injetados na coluna HPLC (Shim-Pak CLC-ODS, 25 cm), com um fluxo de 0,6 mL/min. Foi preparada uma fase móvel com ácido cítrico monohidrocato (150 mM), Octil Sulfato de sódio (67 mM), 2% tetrahidrofurano e 4% acetonitrila, em água desionizada. O pH da fase móvel foi ajustado para 3.0 com NaOH (10 mM). As monoaminas foram quantificadas em comparação com os padrões, processadas da mesma forma que as amostras. Os resultados foram expressos como tecido ng/g.

#### ***4.4.4. Determinação dos conteúdos de GABA e Glutamato em cérebros de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzida por pilocarpina***

Áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e estriato) foram utilizadas para a determinação das concentrações de aminoácidos. Estas determinações foram feitas pela cromatografia líquida de alto desempenho (RP-HPLC), envolvendo pré-coluna com O-*Phthaldialdehyde* - (OPA).

O sistema Shimadzu RP-HPLC (Japão) consistia em um detector de espectrofluorímetros (comprimentos de onda de excitação e emissão de 350 e 450 nm, respectivamente) juntamente com um integrador. A coluna cromatográfica utilizada foi uma C18 (250 × 4,6 mm, 5µm) com uma taxa de fluxo de 1 mL/min. A fase móvel A teve a seguinte composição: solução 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> em 20% de metanol, pH 5.5 e a fase móvel B foi 100% metanol. Ambas as fases foram preparadas em água ultra pura (sistema Milli-Q) e filtradas através de filtros de 0,22 µm da Millipore.

Uma solução de estoque de 2,5 mM de aminoácidos padrão foi preparada na fase móvel A. Os homogenatos cerebrais de 10% foram preparados em ácido perclórico de 0,1 M, centrifugados ( $25.000 \times g$ , 30 min). Os sobrenadantes foram coletados e filtrados. Para a solução de derivatização, foram dissolvidos 13,5 mg OPA em 250  $\mu$ L etanol, seguido pela adição de 10  $\mu$ L 2-mercaptoetanol, e o volume foi concluído para 2,25 mL com tampão PBS pH 9.3. A solução foi então filtrada através de um filtro de 0,22  $\mu$ m (Millipore) e usada após 24 horas. Para derivatizações, 20  $\mu$ L de aminoácidos padrões ou amostras foram diluídos com 20  $\mu$ L de OPA, e injetados na coluna HPLC, 1 min depois.

#### ***4.4.5. Determinação do conteúdo de nitrito em cérebros de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzida por pilocarpina***

Áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo-e estriato) foram utilizadas para a determinação das concentrações de nitrito. O reagente Griess foi adicionado a uma placa de 96 poços junto com os sobrenadantes dos homogenatos. A absorbância foi medida utilizando-se um leitor de microplacas a 560 nm. Além disso, as mesmas áreas cerebrais dos animais tratados apenas com veículo foram analisadas (grupo de nível basal). Anteriormente, foi gerada uma curva padrão para nitrito, utilizando concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12 e 1,56 nmol/mL (GREEN; GOLDMAN, 1981; RADENOVIC; SELAKOVIC, 2005).

#### ***4.4.6. Determinação de peroxidação lipídica (substâncias reativas de ácido tiobarbitúrico, TBARS) em cérebros de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzida por pilocarpina***

Este método é utilizado para a determinação do malondialdeído (MDA) em amostras biológicas. Embora os principais produtos de peroxidação lipídica sejam MDA e 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE), é um bom biomarcador de estresse oxidativo e um produto final de peroxidação lipídica. As áreas cerebrais foram utilizadas para a preparação de homogenatos a 10% em 1,15% KCl. Em seguida, 250  $\mu$ L do sobrenadante foram adicionados a 1 mL 10% TCA, seguido pela adição de 1 mL 0,6% de ácido tiobarbitúrico (TBA). Após a agitação, essa mistura foi mantida em banho-maria (95-

100°C) por 15 minutos. Em seguida, a mistura foi resfriada no gelo e centrifugada (1500 x g/5 min). O conteúdo TBARS foi determinado em um leitor de placas, a 540 nm, com resultados expressos em  $\mu\text{Mol}$  de tecido por MDA/g. Uma curva padrão com várias concentrações de MDA também foi realizada (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979).

#### ***4.4.7. Determinação da concentração cerebral de glutathiona reduzida (GSH) em cérebros de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzida por pilocarpina***

A determinação da concentração de GSH foi realizada em placa de 96 poços. O ensaio é baseado na reação do reagente Ellman, o 5,5'-ditiobios (ácido 2-nitrobenóico) (DTNB) com o tiol livre, dando um dissulfeto misto mais 2-nitro-5-ácido tiobenóico. A preparação das áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e estriado) foi realizada da seguinte forma: Homogenatos a 10% em tampão fosfato foram adicionados a um eppendorff contendo 50  $\mu\text{L}$  de água destilada e 10  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético L (50%). As amostras foram centrifugadas a 1000 x g por 15 min a 4°C. Os sobrenadantes (60  $\mu\text{L}$ ) foram adicionados às microplacas ELISA resfriadas. A mistura permaneceu resfriada durante todo o tempo. Imediatamente antes das leituras de absorbância (a 412 nm), 102  $\mu\text{L}$  da mistura de tampão Tris HCL e 0,65  $\mu\text{L}$  de 0,01 M DTNB em metanol foram adicionados a cada poço. A concentração de glutathiona reduzida (GSH) foi expressa como tecido  $\mu\text{g/g}$ , com base em uma curva padrão de GSH (SEDLAK; LINDSAY, 1968).

#### ***4.4.8. Imunoensaios para expressão de (IFN- $\gamma$ ) e Interleucina 1 (IL-1) em hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzida por pilocarpina***

A área cerebral testada (hipocampo) foi homogeneizada em 8 volumes de pbs contendo proteases (EMD Biosciences) e centrifugados a (9.000 x g, 5 min). A concentração das citocinas das amostras de 100  $\mu\text{L}$  foi determinada pelo ensaio imunoenzimático ELISA (sistemas de P&D, Minneapolis, MN, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. Os resultados foram expressos tecido  $\text{pg/g}$ .

#### ***4.4.9. Ensaios imunohistoquímicos para expressão de proteína glial fibrilar ácida (GFAP) em hipocampo de camundongos submetidos ao modelo de convulsão induzida por pilocarpina***

Para isso, utilizou-se o método estreptavidina-biotina-peroxidase. As seções de 5µm do hipocampo foram então desparafinadas, hidratadas em xilol e etanol, e imersas em tampão citrato de 0,1 M (pH = 6) sob aquecimento de micro-ondas de 18 min, para recuperação de antígeno. Após o resfriamento à temperatura ambiente por 20 minutos, as seções foram lavadas com uma solução tamponada com fosfato, seguida por um bloqueio de 15 min com uma solução H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3%. As seções foram incubadas durante a noite (4°C) com os anticorpos primários (anti-GFAP) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) e-diluídas na PBS, de acordo com as instruções do fabricante. No dia seguinte, as seções foram lavadas em PBS e incubadas por 30 minutos com o anticorpo de coelho biotilado secundário (anti-IgG), também diluído em PBS (diluição de 1:200). Após a lavagem na PBS, as seções foram incubadas por 30 min com o complexo conjugado streptoavidin-peroxidase (ABC Vectastain® complex, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Após outra lavagem com PBS, as seções foram coradas com 3,3 do cromôgeno diaminobenzidina-peróxido (DAB). As fotomicrografias foram feitas pelo microscópio (Nikon, Japão) para análises, e os dados foram semi-quantificados (como densidades ópticas relativas) com o software Image J, NIH, USA (HSU; RAINE; FANGER, 1981).

#### **4.5. Modelo de estado epiléptico através da administração de pilocarpina via intracerebroventricular (i.c.v.)**

##### ***4.5.1. Cirurgia estereotáxica para aplicação de pilocarpina ou aCSF (líquido cerebro-espinhal artificial) no ventrículo lateral esquerdo do cérebro***

Os camundongos receberam escopolamina via i.p (3 mg/kg) como profilaxia para os efeitos periféricos da ativação muscarínica ocasionada pela pilocarpina. Cinco minutos depois, foram anestesiados com cetamina e xilazina, respectivamente nas doses de :90 e 10 mg/kg i.p. Após a tricotomia na cabeça, os animais foram colocados de forma centralizada em um aparelho estereotáxico eletrônico de precisão de 10 µm (51730M, Stoelting, Wood Dale, IL, EUA), tomando o cuidado de evitar o deslocamento da barra de ouvido.

Os olhos foram mantidos umedecidos com 0,9% de solução salina para evitar ceratite. A desinfecção da pele foi realizada aplicando iodo-polivinilpirrolidona (Povidona, Vick Pharma, São Paulo, Brasil). Em seguida, uma incisão média entre orelhas e olhos, com cerca de 1,5 cm de comprimento, foi feita com um bisturi. A validação da posição plana do crânio de referência foi realizada medindo e notando coordenadas dorsoventral do bregma e lambda. A partir deste ponto, o nível da barra dentária foi reduzido ou elevado, de modo que inclinar o crânio para baixo ou para cima para medir as coordenadas dorsoventrais de bregma e lambda em um ciclo repetido quantas vezes for necessário até que as coordenadas de ambos os pontos craniométricos diferissem entre si, não mais do que 10  $\mu\text{m}$ .

Depois disso, tomando como referência as coordenadas mediolaterais e craniocaudal de bregma, um ponto de 0,5 mm caudal e 1,1 mm lateral do lado esquerdo para bregma foi apontado calota do crânio correspondente à projeção do ventrículo lateral esquerdo do cérebro (PAXINOS; FRANKLIN, 2001). Uma perfuração foi realizada por broca dentária esférica FG 1016 montada em uma peça de mão de baixa rotação (Beltec, LB100) com adaptador de aderência de alta velocidade. Cuidados devem ser tomados para não atingir o córtex subjacente e provocar um eventual sangramento. Em seguida, a ponta da agulha da seringa Hamilton foi colocada no centro da trepanação.

A partir do nível dorsoventral da superfície do crânio naquele ponto, a ponta da agulha foi baixada 2,8 mm. Pilo 300  $\mu\text{g}$  /1  $\mu\text{L}$  diluído em aCSF, ou aCSF (1  $\mu\text{L}$ ) foram injetados lentamente (mais de 1 min). A agulha foi mantida no lugar por 5 minutos para evitar o refluxo através da pista de agulhas. Depois disso, a seringa foi removida, e as bordas da ferida foram montadas juntas por linha de nylon 4-0 em pontos separados (FERRY; GERVASONI; VOGT, 2014).

Os animais foram deixados para recuperação da anestesia em uma almofada térmica de modo a evitar hipotermia, com a porção craniana ligeiramente levantada para evitar obstrução das vias aéreas. Foram injetados via subcutânea, uma solução salina com glicose 5%, aproximadamente 0,5 mL/25 g de peso corporal.

Após recuperação, os animais receberam água destilada, NMP 100, ou 200 mg/kg. Os grupos foram separados em: FO (falso operado), Pilo (Pilocarpina) + água destilada, Pilo + NMP100 e Pilo + NMP200, respectivamente) diariamente, durante 15 dias a partir do primeiro dia pós-operatório. Neste chamado "período silencioso", entre a lesão primária e a manifestação clínica da doença, acredita-se que o processo epileptogênico é que torna os animais epiléticos (CAVALHEIRO; SANTOS; PRIEL, 1996).

#### **4.5.2. Testes Comportamentais Realizados no 15º Dia Pós-Operatório**

##### *4.5.2.1. Teste do Reconhecimento de Objeto (NOR)*

O novo ORT ou NOR é usado para avaliar a memória de reconhecimento, ou seja, memória de curto prazo. Esta tarefa é baseada na tendência inata dos roedores de explorar objetos desconhecidos dentro de seu ambiente. Este teste avalia a capacidade do animal de discriminar entre objetos familiares e novos. Em primeiro lugar, os camundongos foram colocados individualmente a uma caixa de acrílico (30 × 30 × 40 cm) por 5 min.

Após 15 min, os camundongos foram colocados para explorar um conjunto de dois objetos idênticos por 5 min (fase de reconhecimento). Esses objetos eram adequadamente pesados e longos para garantir que os ratos não podiam movê-los nem escalar sobre eles.

Após um intervalo de 5 minutos, os animais voltaram para o mesmo local, com a substituição de um objeto familiar por um objeto novo/desconhecido (fase de teste). Os animais foram autorizados a explorar livremente os objetos novamente por um período de 5 minutos. Um índice de discriminação foi calculado da seguinte fórmula:  $(\text{tempo explorando novo objeto} - \text{tempo explorando objeto familiar}) / (\text{tempo explorando novo objeto} + \text{tempo explorando objeto familiar})$  (DIX; AGGLETON, 1999).

##### *4.5.2.2. Teste do labirinto em “Y” (Y-maze)*

A memória de trabalho e o aprendizado foram avaliados pela taxa de alterações espontâneas nos três braços do labirinto Y (40 × 5 × 16 cm), posicionados em ângulos iguais, como descrito por Sarter, Bodewitz e Stephens (1998). Antes da realização do teste, os braços foram numerados, e o animal foi colocado em um dos braços sendo observado a alternância espontânea das entradas nos outros braços, por 8 minutos. A sequência dos braços em que o animal entrou foi então notada, e as informações analisadas, a fim de determinar o número de entradas de braço sem repetição.

#### **4.5.3. Eutanásia e Coleta dos tecidos**

Para análise histológica os camundongos foram eutanasiados com cetamina (90 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) ip. A caixa torácica foi cortada longitudinalmente expondo o mediastino. Uma cânula foi inserida no ventrículo esquerdo do coração. Em seguida, os animais foram transcardialmente perfundidos com 0,9% de soro fisiológico (cerca de 60 mL) para lavagem vascular, e posteriormente, com 60 mL de uma solução de 4% de paraformaldeído (PFA) em soro fisiológico.

Os cérebros foram cuidadosamente coletados, pós-fixados por 2h na mesma solução PFA 4% a 4 °C, e depois crioprotetidos em 30% de sacarose diluída em PBS (pH 7.4) por 72 h. Os cérebros foram cortados em um criostat (Leica, Wetzlar, Alemanha) em seções coronais de 10 µm, que foram armazenadas em crioprotetores a -20 °C para uso posterior.

Outros animais tiveram seus cérebros rapidamente dissecados em uma barra de gelo coberta de papel alumínio, sendo retirados os hipocampus inteiros recém-coletados armazenados em Eppendorfs a -80 °C até o momento do experimento.

#### **4.5.4. Coloração de Nissl**

Neste estudo, a viabilidade celular foi analisada pela coloração violeta de cresíl. A coloração violeta cresil é usada para destacar os corpúsculos de Nissl presentes no citoplasma de neurônios viáveis (SCORZA et al., 2005)

As fatias cerebrais de córtex e hipocampo foram mergulhadas em água destilada por 1 min e imersos em uma solução violeta de 0,5% preparada em tampão de acetato (20% acetato de sódio a 2,7% + 80% ácido acético glacial a 1,2%) por 3 min. Foram feitas duas lavagens no tampão de acetato. Em seguida, as seções foram desidratadas em álcool (50%, 70% e 100%). Finalmente, as fatias foram mergulhadas em xilol e montados com Entellan (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA).

Para a quantificação dos neurônios Nissl positivos, fotomicrografias foram feitas com um microscópio (Nikon Elipse E200, Nikon, Shinjuku, Japão) sob uma lente objetiva de ampliação de 10x. Três áreas de cada animal (4 animais por grupo) foram selecionadas aleatoriamente, e a quantificação de neurônios foi realizada utilizando-se o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) nos subcampos hipocampais CA1, CA3 e DG.

Os resultados foram expressos como o número de células viáveis em 10 campos. As células foram consideradas neurônios viáveis quando apresentaram coloração violeta

no citoplasma, bem como aspectos morfológicos normais (células redondas ou ovais com núcleos centralizados).

#### **4.5.5. Imunohistoquímica para GAT-1**

Seções operacionalmente definidas como  $-2,46$  mm a  $-2,92$  mm (caudal) para bregma contendo hipocampo foram escolhidas e fixadas em metanol. Após o resfriamento, as seções foram lavadas quatro vezes com PBS, e realizado o bloqueio de peroxidase endógena com 3%  $H_2O_2$  na PBS (15 min). As seções foram incubadas durante a noite ( $4^\circ C$ ) com os anticorpos primários (anti-GAT-1 1:200, Abcam ab426, Cambridge, Reino Unido) em PBS, de acordo com as instruções do fabricante. No dia seguinte, as seções foram lavadas na PBS quatro vezes, incubadas (30 min) com o anticorpo de coelho biotilado secundário (anti-IgG) na PBS (1:200), lavada quatro vezes na PBS, e incubada (30 min) com o complexo conjugado streptavidin-peroxidase conjugado (Burlingame, CA, EUA). Após a lavagem, as seções foram desenvolvidas com 3,3 diaminobenzidina montadas em lâminas de vidro, desidratadas e cobertas para a análise. Os dados foram semi-quantificados com o software ImageJ, NIH, USA (HSU; RAINE; FANGER, 1981)

#### **4.5.6. Western Blot para GAT-1 e Iba-1**

Os hipocampos foram homogeneizados em tampão de ensaio (RIPA) tampão de lise (25 mM Tris -HCl, pH 7.6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP40; 1% Triton X-100; 1% desoxicolato de sódio; 0,1% dodecil sulfato de sódio) com inibidor de protease (inibidor de 1  $\mu$ L: 100  $\mu$ L RIPA). As amostras diluídas foram transferidas eppendorfs, e sonicadas duas vezes por 5s, e depois liberadas por centrifugação (12.000 rpm, 15 min) a  $4^\circ C$ . A concentração total de proteínas em foi determinada pelo método de ácido bicinchonínico (BCA) de acordo com o protocolo do fabricante (PierceBCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Eletroforese de gel de poli(acrilamida) SDS (10%) foi realizado utilizando-se 20  $\mu$ g de proteína (previamente preparado com tampão amostral de Laemmli e aquecido a  $95^\circ C$  por 5 min). As proteínas foram transferidas para a membrana PVDF, bloqueado com 5% de BSA por 1 h, e incubado durante a noite com o anticorpo policlonal *anti-rabbit* para Iba-1 (1:1000, Biotecnologia de Santa Cruz, Dallas, TX, EUA) ou anticorpo

monoclonal para GAT-1 (1:600, Dako- Japão) ou anti-IgG de  $\alpha$ -tubulina (1:4000; Sigma-Aldrich).

Após a lavagem, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário de cabra (1:1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) ou anticorpo secundário anti-mouse IgG (1:1000, Thermo Scientific) por 90 minutos à temperatura ambiente. O sinal foi detectado usando o sistema ECL (Bio-RAD, Hércules, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, e então as bandas foram capturadas com uma câmera CCD usando o sistema ChemiDoc (Bio-Rad, Hércules, CA, USA). A quantificação densitométrica das bandas foi realizada com o software NIH ImageJ (n = 4/grupo).

#### **4.5.7. Imunofluorescência para GFAP**

As fatias contendo hipocampo, idênticas às citadas, foram lavadas quatro vezes na PBS. Eles passaram por um processo de recuperação de antígeno e foram incubados durante a noite a 4 °C com o anticorpo monoclonal anti-GFAP (1:200, da Santa Cruz, Biotechnology). Depois, as fatias foram lavadas quatro vezes com PBS e depois incubadas por 2 h em temperatura ambiente com o anticorpo IgG anti-mouse de cabra conjugado AlexaFluor-594 (1:400; Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Finalmente, elas foram incubadas com 1  $\mu$ g/mL 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Posteriormente, os cortes foram enxaguados em PBS e as lâminas foram montadas usando o reagente: Prolong Gold Mountant (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). As imagens foram obtidas através do microscópio confocal Zeiss LSM 700 (Carl Zeiss, White Plains, NY, USA) através de uma ampliação de 20 x. Os subcampos hipocampais CA1, CA3 e GD foram identificados de acordo com Paxinos (2001) e quatro a cinco fotomicrografias de cada área para cada grupo foram analisados. O experimentador que tirou as imagens ficou cego para os tratamentos. A intensidade da fluorescência foi semi-quantitativa, utilizando-se o software ImageJ (NIH, USA).

#### **4.6. Análise Estatística**

Após ter passado pelo teste de normalidade: Shapiro-Wilk, os dados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Para análise da citometria

foram usadas as medianas e desvio padrão (DP). Para comprovação estatística entre os grupos experimentais foi utilizada o ANOVA unidirecional (one way) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

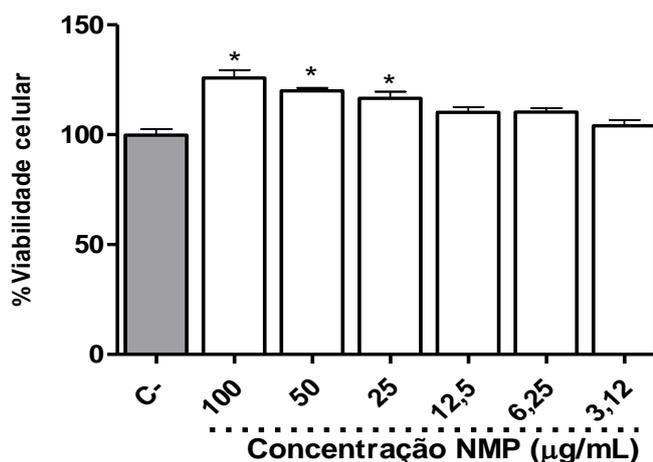
## 5 RESULTADOS

### 5.1. Resultados *in vitro*

#### 5.1.1. Ensaio de viabilidade celular

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade da NMP nos astrócitos, realizou-se o ensaio MTT para identificar uma faixa de concentrações adequadas para trabalho, ou seja, concentrações que não fossem tóxicas. Foi observado que ocorreu um aumento da viabilidade em relação ao controle nas concentrações de 100, 50 e 25.

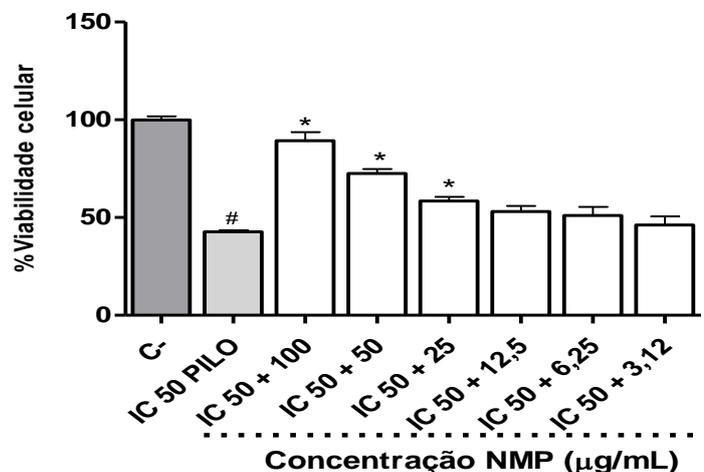
Figura 8 - Ensaio de viabilidade celular por redução do MTT em astrócitos.



Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$ , comparado aos grupos controle (veículo). Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey, C- = Controle negativo; \* $p < 0,05$

Quando os astrócitos foram tratados com a IC50 da pilocarpina por 24 h e, subsequentemente, tratados com NMP, foi possível observar que a pilocarpina isoladamente reduziu a viabilidade celular em aproximadamente 55%, sendo este efeito revertido pela NMP em concentrações maiores que 25 µg/mL, onde observamos uma viabilidade de 58,3% em relação ao grupo controle na concentração de 25 µg/mL. Na concentração de 50 µg observou-se uma viabilidade de 72,5% e na concentração de 100 µg a viabilidade foi de 89,3%; sendo assim essas três concentrações escolhidas para os próximos experimentos.

Figura 9 - Ensaio de viabilidade celular de redução do MTT em astrócitos expostos à Pilocarpina.



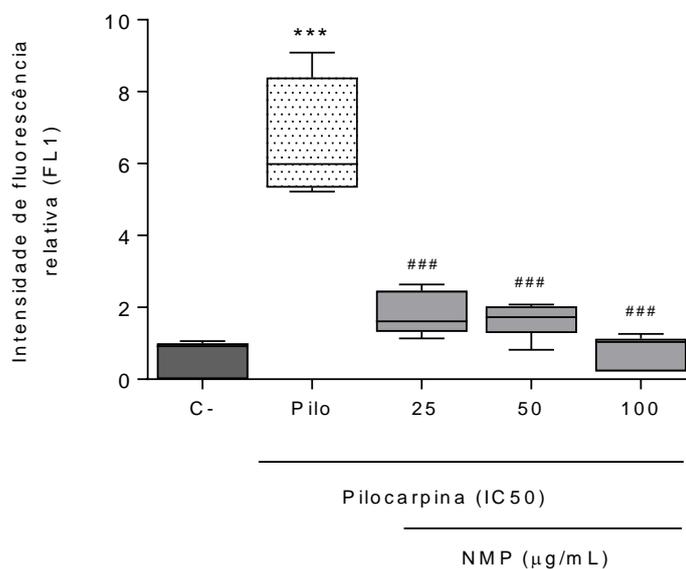
Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$ , comparado aos grupos de controle de veículo. Para análise estatística, foi utilizado ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey, C- = Controle negativo; Pilo = IC50 Pilocarpina # $p < 0,05$  vs C- ; \* $p < 0,05$  vs Pilo.

## 5.1.2. Ensaio por citometria de fluxo

### 5.1.2.1. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) citoplasmáticas

Objetivando analisar o acúmulo de EROs intracitoplasmáticas nos astrócitos, foi realizado o ensaio por citometria de fluxo através da utilização do DCFH-DA (Figura 10). Os resultados demonstram, em termos de intensidade de fluorescência relativa em razão com a média do controle, que a pilocarpina foi capaz de aumentar em 6.7 vezes o acúmulo de ERO em comparação com o controle. Adicionalmente, o tratamento com NMP reduziu esse acúmulo para 27,3% no grupo tratado com 25 µg/mL, para 24,8% no grupo de 50 µg/mL e 12,3% no grupo 100 µg/mL.

Figura 10 - Análise do acúmulo de EROs citoplasmáticas em astrócitos por citometria de fluxo através do ensaio utilizando o DCFH-DA.

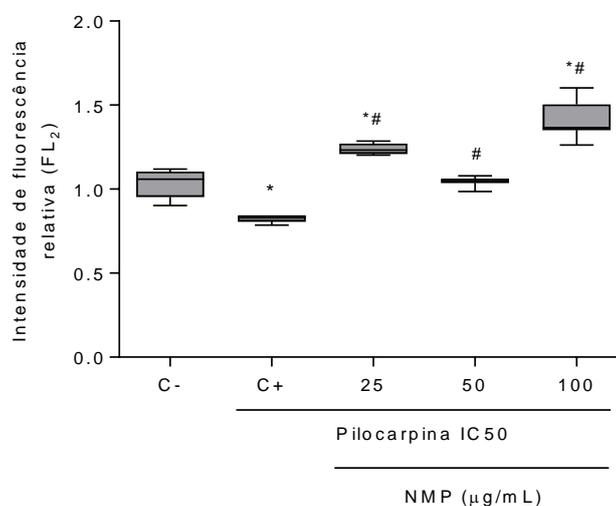


Análise do potencial transmembrânico mitocondrial (PTM) por marcação com DCFH e Histograma representativo do PTM na população de células tratadas com NMP nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectivamente. Os dados são expressos como fluorescência relativa ao controle  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$ . Os dados foram analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. \* $p < 0,05$  vs. controle; # $p < 0,05$  vs. Pilo = IC50 pilocarpina.

#### 5.1.2.2. Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial (PTM)

No sentido de avaliar a alteração do potencial transmembrânico mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) ocasionado pela pilocarpina e, conseqüentemente pelo estresse oxidativo intracelular, foi realizado o ensaio por citometria de fluxo utilizando a rodamina 123. Os resultados estão ilustrados na figura 11. É possível observar que o grupo exposto à pilocarpina reduziu a fluorescência mitocondrial em torno de 20% em comparação com o controle, reduzindo a intensidade de fluorescência em razão com o controle para 0.83. O tratamento com NMP aproximou o  $\Delta\Psi_m$  dos grupos tratados com o do grupo controle. O grupo tratado com prolina 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aumentou a intensidade relativa de fluorescência em 49.3% em comparação com o grupo exposto à Pilocarpina, elevando a intensidade de fluorescência relativa (IFR) para 1.23. Já os grupos tratados com NMP 50 e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  apresentaram IFR de 1.04 e 1.41, respectivamente, significando uma normalização do  $\Delta\Psi_m$  aos mesmos níveis do controle (IFR = 1.0).

Figura 11 - Análise do potencial transmembrânico mitocondrial por citometria de fluxo utilizando a rodamina 123.



Análise do potencial transmembranar mitocondrial por marcação com rodamina 123; e Histograma representativo do potencial transmembranar mitocondrial na população de células a 25, 50 e 100 µg / mL, respectivamente. As linhas pretas representam as células do grupo de controle, as linhas vermelhas representam as células expostas à Pilocarpina, as linhas azuis representam as células tratadas com NMP. Os dados são expressos como fluorescência relativa ao controle  $\pm$  SEM.  $p < 0,05$ . Os dados foram avaliados por ANOVA unilateral com pós-teste de Tukey. \*  $p < 0,05$  vs. controle; #  $p < 0,05$  vs. Pilo = IC50 pilocarpina.

### 5.1.3. Avaliação da expressão de GFAP e VDAC em cultura secundária de astrócitos por Western Blot

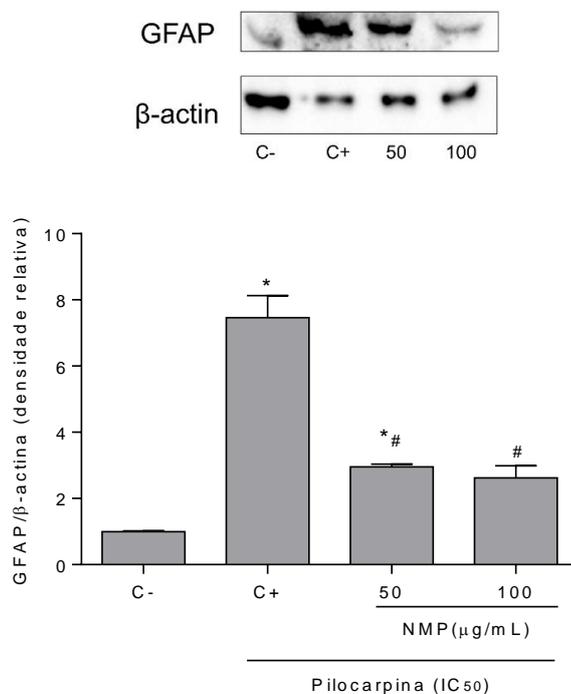
Com o intuito de se avaliar nas células de astrócitos a influência da pilocarpina e do tratamento com NMP, foi feita a análise da expressão de proteínas por Western Blot.

Foram extraídas as proteínas das células não tratadas, referentes ao grupo controle, as células que passaram pelo dano com pilocarpina, chamado grupo controle positivo e aquelas células que, além de serem tratadas com NMP nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, foram submetidas a pilocarpina. Essas concentrações foram escolhidas por terem mostrado efeito protetor no ensaio de viabilidade celular. Dessa forma, foi analisada a expressão do GFAP e VDAC normalizada pela análise concomitante da expressão da proteína constitutiva  $\beta$ -actina, conforme demonstrado nas figuras 12 e 13.

As análises permitiram observar que, nas células tratadas com pilocarpina ocorreu um aumento significativo da expressão do marcador GFAP quando comparados com os do grupo controle. Ademais, o tratamento com a NMP se mostrou capaz de reduzir essa

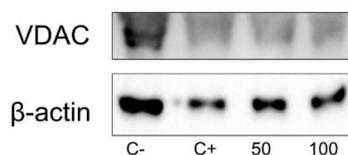
expressão nas duas doses estudadas, indicando uma ação de proteção celular, sendo os mesmos efeitos observados para o marcador VDAC.

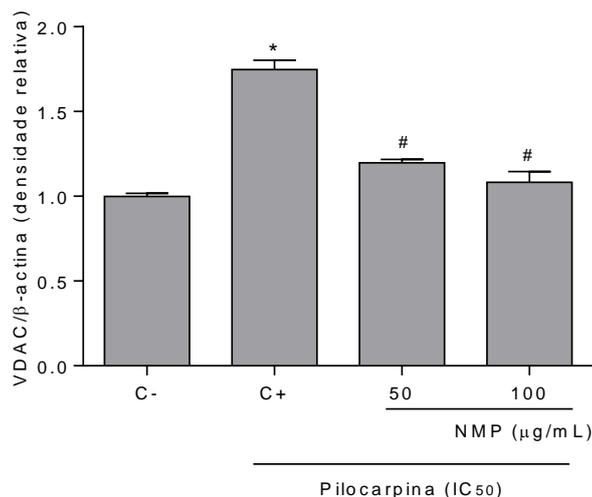
Figura 12 - Expressão relativa de GFAP em astrócitos tratados com NMP e em seguida submetidos ao desafio com pilocarpina.



Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM. Para análise estatística, foi utilizado one way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey, C- = Controle negativo; C+ = Controle Positivo (células sem tratamento e expostas apenas a IC50 de Pilocarpina) \* $p < 0,05$  vs C- ; # $p < 0,05$  vs C+

Figura 13 - Expressão de VDAC em astrócitos em comparação com a expressão de β-actina em células expostas à pilocarpina.





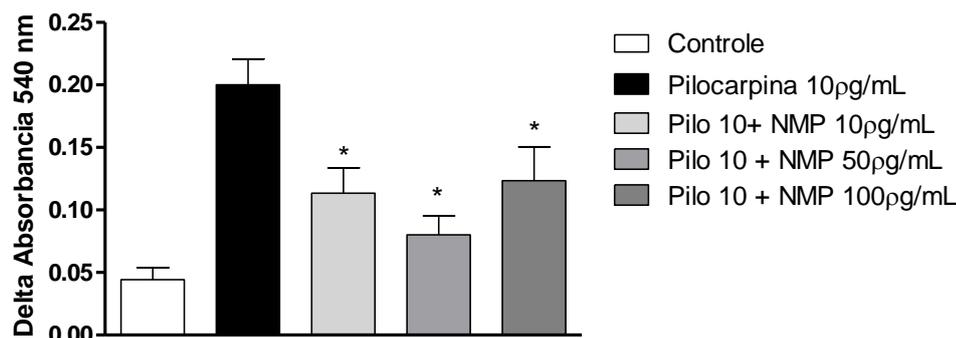
Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM. Para análise estatística, foi utilizado one way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey, C- = Controle negativo; C+ = Controle Positivo (células sem tratamento e expostas apenas a IC50 de Pilocarpina) \* $p < 0,05$  vs C-; # $p < 0,05$  vs C+

#### 5.1.4. Intumescimento de mitocôndrias (Mitochondrial Swelling)

O intumescimento mitocondrial é uma das marcas mais críticas da abertura do poro de transição da permeabilidade mitocondrial (mPTP) e alterações ultraestruturais. A abertura contínua do mPTP promove a despolarização, com liberação de  $\text{Ca}^{2+}$ , descontinuação da fosforilação oxidativa, inchaço da matriz com remodelação da membrana interna e, em última instância, ruptura da membrana externa com liberação de citocromo c e outras proteínas apoptogênicas.

A determinação *in vitro* do intumescimento mitocondrial foi realizada em suspensões de mitocôndrias isoladas por medição das variações de absorvância em 540 nm. O declínio da absorvância indica uma intensificação do edema mitocondrial. Verificou-se que a adição de pilocarpina em suspensões de mitocôndrias isoladas provocava um aumento drástico no edema mitocondrial em comparação com o grupo controle (Figura 14). No entanto, quando a NMP foi adicionada ao pool mitocondrial contendo a mesma concentração de pilocarpina, observou-se uma diminuição significativa no intumescimento mitocondrial em contraste com o grupo da pilocarpina.

Figura 14 – Efeito da NMP sobre o Intumescimento mitocondrial isoladas de cérebros de ratos



Os resultados são mostrados como média  $\pm$  SEM. Para análise estatística, foi utilizado one way ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey, \* $p < 0,05$  vs Pilocarpina.

## 5.2. Resultados *in silico*

### 5.2.1. Predição de alvo e acoplamento molecular para NMP

Para estimar os alvos humanos mais prováveis para efeitos protetores de NMP, submetemos a estrutura química de NMP ao servidor *Swiss Target Prediction*. O algoritmo do servidor previu as proteínas humanas mais prováveis, com base na similaridade da NMP com as estruturas químicas do banco de dados de medicamentos, e classificou as proteínas da maioria para as menos prováveis (Quadro 1). Com base nessa previsão, a proteína GABA transportador 1 (GAT-1) foi reconhecido como o alvo mais provável para NMP, considerando a taxa de probabilidade quantitativa e o número de ativos conhecidos com propriedades químicas semelhantes. De acordo com esses resultados, investigamos então a interação da NMP com o GAT-1, bem como sua expressão em nossos animais.

Em primeiro lugar, construímos a estrutura GAT-1 humana através de uma abordagem de modelagem usando o servidor *Swiss Model*. O modelo foi baseado no receptor de dopamina da *Drosophila melanogaster* (identificador do *Protein Data Bank* 4XP4), que apresentava 45,88% de identidade sequencial e 0,89% de cobertura com o GAT-1 humano. O modelo foi analisado no servidor *MolProbity* e mostrou uma pontuação *molprobity* de 1,35.

A pontuação *molprobity* fornece uma combinação ponderada de log do *clash score*, a pontuação de *Ramachandran* não favorecida, e a porcentagem de rotadores de cadeia lateral ruim, refletindo a resolução cristalográfica na qual esses valores seriam esperados. Análise do lote *ramachandran* do modelo GAT-1 mostrou que 99,06% dos

resíduos estão nas regiões mais favoráveis, o que foi mais do que satisfatório, pois idealmente, 98% dos resíduos devem estar nas regiões favoráveis.

Após a modelagem, foram realizados cálculos de acoplamento molecular para investigar a afinidade vinculante da NMP contra o GAT-1, bem como estudar o possível modo de vinculação e as interações entre eles. NMP ancorado em GAT-1 e apresentou uma pontuação-de encaixe de  $-4,38 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Também realizamos cálculos de acoplamento de tiagabina, um bloqueador GAT-1 que atua como um inibidor de recaptção GABA. Tiagabina se ligou em GAT-1 e apresentou uma pontuação de encaixe de  $-5,13 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ . Nossos dados apontam que a afinidade vinculante e a pontuação de acoplamento de NMP contra GAT1 foi semelhante à da tiagabina. No entanto a tiagabina mostrou menos ligações de hidrogênio com resíduos GAT1 e interações mais hidrofóbicas em comparação com NMP justificando seu escore de acoplamento ligeiramente diferente. Além disso, o mecanismo de ação do NMP é, pelo menos em parte, o resultado de suas propriedades de bloqueio GAT1 (Quadro 1).

**Quadro 1** - Alvos previstos para NMP com base em sua similaridade química com o banco de dados :*Swiss Target Prediction*.

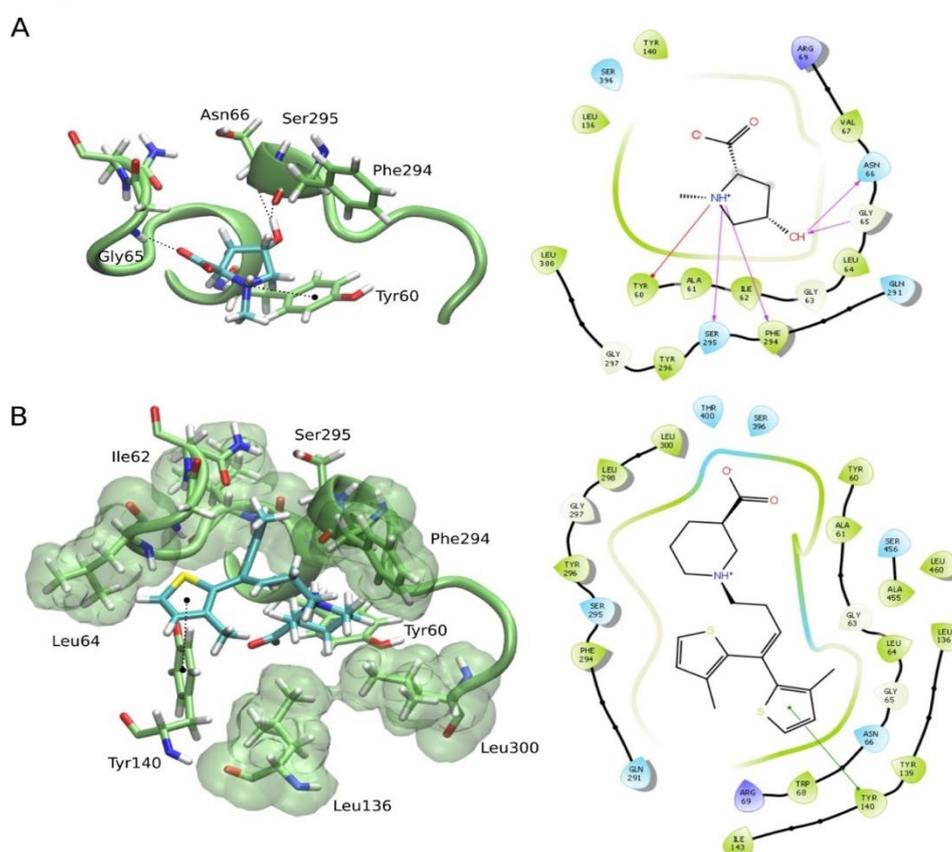
Alvo	UniprotID	Classe alvo	Probabilidade	Ativos conhecidos (3D/2D)
<b>Transportador GABA 1</b>	P30531	Transporte eletroquímico	0.03	5/4
<b>Receptor GABA A lpha-3/beta-2/gama-2</b>	P34903 P47870 P18507	Canal de íons com ligante	0.03	3/0
<b>RECEPTOR GABA A alfa-2/beta-2/gama-2</b>	P47869 P47870 P18507	Canal de íons com ligante	0.03	4/0
<b>Renina</b>	P00797	Protease	0.03	0/13
<b>Egl nove homólogo 1</b>	Q9GZT9	Oxidoreductase	0.02	1/0
<b>Receptor Adenosina A3</b>	P0DMS8	Receptor acoplado à	0.02	2/3

<b>Alvo</b>	<b>UniprotID</b>	<b>Classe alvo</b>	<b>Probabilidade</b>	<b>Ativos conhecidos (3D/2D)</b>
		proteína A G da família A G		
<b>Receptor GABA-B</b>	O75899 Q9UBS5	Receptor acoplado à proteína C G da família	0	8/0
<b>Trombina</b>	P00734	Protease	0	0/8
<b>Hidrolase Leukotriene A4</b>	P09960	Protease	0	0/4
<b>Subunidade receptor GABA rho-1</b>	P24046	Canal de íons com ligante	0	4/0
<b>Phospholipase A2 grupo IIA</b>	P14555	Enzima	0	0/6
<b>Fospholipase A2 grupo V</b>	P39877	Enzima	0	0/3
<b>Integrin alfa-IIb/beta-3</b>	P08514 P05106	Receptor de membrana	0	0/11
<b>Leucina aminopeptidase</b>	P28838	Protease	0	0/5
<b>Receptor de ácido biliar FXR</b>	Q96RI1	Receptor nuclear	0	0/1
<b>Neprilysin</b>	P08473	Protease	0	0/23
<b>Subunidade alfa2/delta do canal de cálcio fechada por tensão 1 (por homologia)</b>	P54289	Subunidade auxiliar do canal de cálcio alpha2delta	0	10/0
<b>Receptor de metastina</b>	Q969F8	Receptor acoplado à	0	0/2

Alvo	UniprotID	Classe alvo	Probabilidade	Ativos conhecidos (3D/2D)
		proteína A G da família A G		
<b>11-beta-hidroxyesteróide desidrogenase 1</b>	P28845	Enzima	0	0/9
<b>Synthase de óxido nítrico, cérebro</b>	P29475	Enzima	0	0/9

Fonte: Dados do autor

Figura 15 – Alvos moleculares da NMP



Formas de ligação previstas para o *N*-metil-(2*S*,4*R*)-*trans*-4-hydroxy-1-proline (NMP) e a molécula de tiagabina, no local de ligação GAT1. **(A)** Interações intermoleculares 3D e 2D de NMP com o modelo GAT1 principal obtido pelo acoplamento na representação 3D. Os laços H são apresentados como linhas tracejadas pretas e as interações hidrofóbicas como superfícies verdes. No diagrama de interação 2D, as ligações de hidrogênio são apresentadas como setas magenta e interação cátion- $\pi$  como setas vermelhas. **(B)** Interações intermoleculares 3D e 2D de tiagabina com GAT1: na representação 3D, a interação  $\pi$ - $\pi$  é apresentada como linhas tracejadas pretas e as interações hidrofóbicas como uma superfície verde. No diagrama de interação 2D, a interação  $\pi$ - $\pi$  é representada como setas verdes.

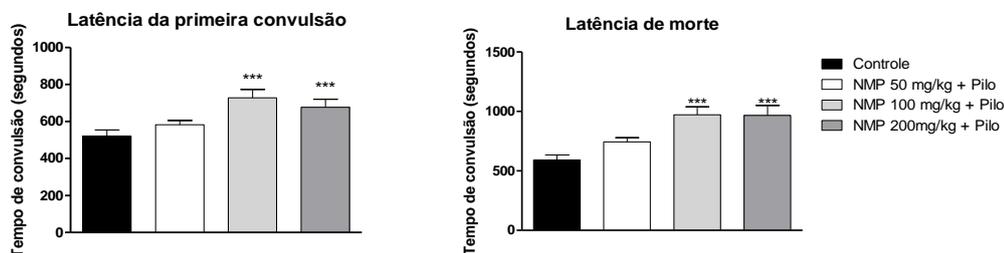
### 5.3. Resultados *in vivo*

#### 5.3.1. Efeitos de NMP em convulsões induzidas por pilocarpina

Neste modelo amplamente utilizado de epilepsia do lobo temporal, dois parâmetros comportamentais foram analisados: a latência para a primeira convulsão e a latência para a morte. Observa-se um aumento do tempo na latência para a primeira convulsão, em relação ao grupo tratado com veículo (grupo Controle Negativo) após o tratamento agudo com NMP, nas doses de 100 e 200 mg/kg, v.o, respectivamente. Nenhuma mudança significativa foi observada com a dose mais baixa (50 mg/kg, v.o.). No entanto, aumentos significativos foram observados na latência para óbito, após os tratamentos com as três doses de NMP (50, 100 e 200 mg/kg), em relação ao grupo Pilo e nenhum percentual de sobrevivência foi observado (Figura 16).

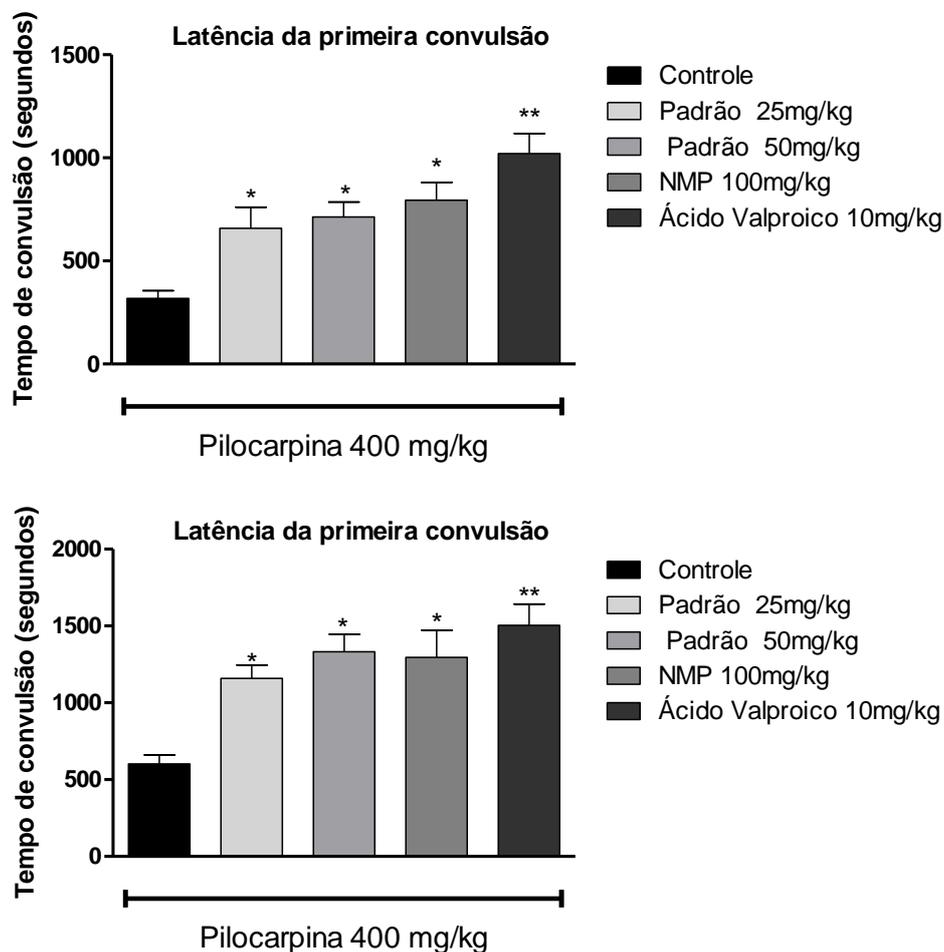
A figura 16 mostra o efeito da *N*-metil- (2S, 4R)-*trans*-4-hidroxi-L-prolina nas doses de 25 e 50 mg/kg (Padrão) e com NMP, nas doses de 100 mg/kg, v.o, Foi observado um aumento da latência de primeira convulsão e do tempo de morte em todas as doses do padrão, sendo o mesmo observado com o ácido valpróico na dose de 10 mg/kg (controle positivo). Os mesmos aumentos significativos foram observados após os tratamentos com a dose de NMP (100 mg/kg), em relação ao grupo Pilo. Não houve diferença estatística comparando-se os grupos com o padrão e a NMP. A figura 18 mostra o espectro da fração e o composto isolado mostrando serem semelhantes.

Figura 16 - Efeitos da NMP em convulsões induzidas por Pilocarpina 400mg/kg (Pilo)



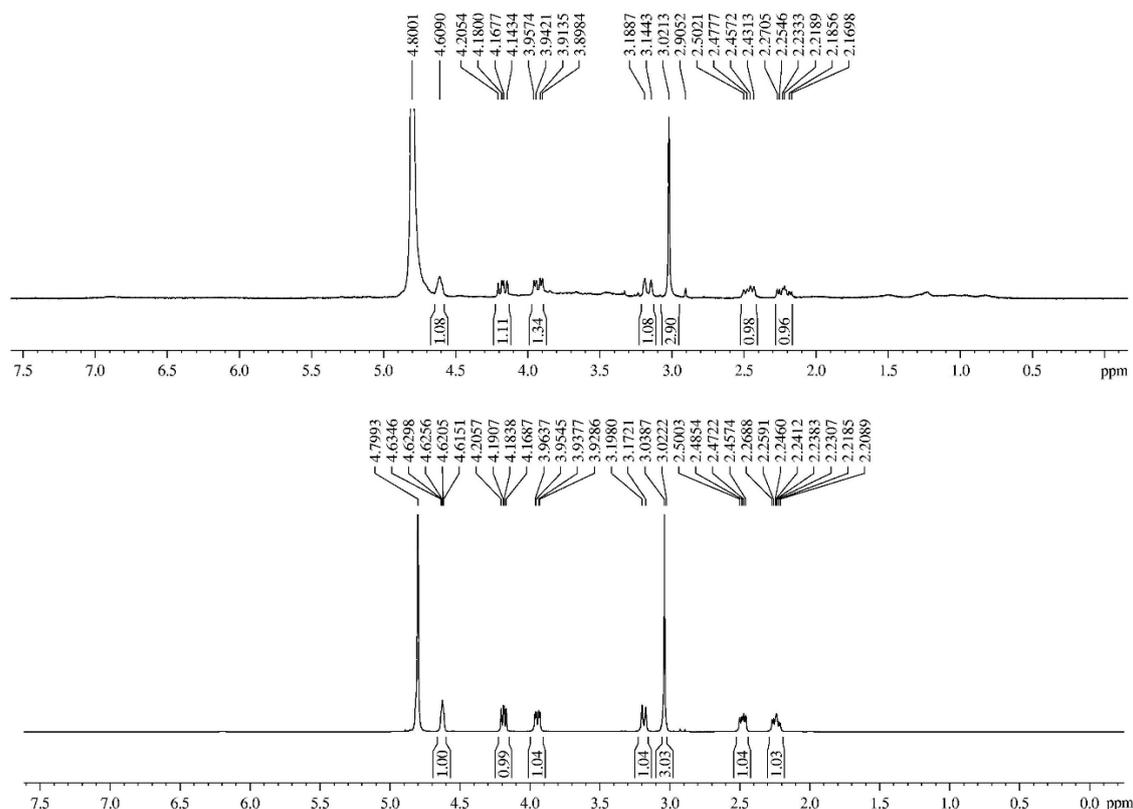
Os animais foram tratados com o padrão *N*-metil- (2S, 4R) -*trans*-4-hidroxi-L-prolina (25 e 50 mg/kg) e com NMP (100 mg/kg) ou água destilada(veículo) v.o. Após 60 minutos foi administrado Pilocarpina (400 mg/Kg), e avaliado a latência de primeira convulsão e de morte. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média) \*\*\*  $p < 0,001$  vs controle (ANOVA e teste de Tukey).

Figura 17 – Comparação entre os efeitos anticonvulsivantes apresentados pela substância N-metil- (2S, 4R) -trans-4-hidroxi-L-prolina, padrão de referência (Sigma-Aldrich, USA) e a NMP, em convulsões induzidas por pilocarpina (400 mg/kg).



Os animais foram tratados com o padrão *N*-metil- (2S, 4R) -*trans*-4-hidroxi-L-prolina (25 e 50 mg/kg) e com NMP (100 mg/kg) ou água destilada(veículo) v.o. Após 60 minutos foi administrado Pilocarpina (400 mg/Kg), e avaliado a latência de primeira convulsão e de morte. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média) \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  vs controle (ANOVA e teste de Tukey).

Figura 18 - Comparação do espectro  $^1\text{H}$  NMR da NMP com o composto de referência, D (*N*-methyl-(2*S*,4*R*)-*trans*-4-hydroxy-L-proline) adquirido da Sigma-Aldrich (99% pureza), mostrando a identidade química entre as duas substâncias.



Fonte: Dados do documento suplementar visto em Aquino (2021).

### 5.3.2. Efeito da NMP no modelo de convulsão induzida por Pentilenotetrazol

Os animais pré-tratados com a dose da NMP de 25mg/kg não sofreram alteração no tempo de latência para a primeira convulsão e tempo de morte, quando comparado ao controle ( $p > 0,05$ ) nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol. Já nos grupos tratados com as doses de 100 e 200mg de NMP ocorreu um aumento significativo no tempo de latência para primeira convulsão (valores). Em relação à latência para primeira convulsão, houve um aumento significativo do tempo de latência de morte dos animais pré-tratados com todas as doses de 50, 100 e 200 mg/kg, em comparação ao grupo controle. Foi utilizado o ácido valpróico na dose de 10 mg/kg v.o como droga referência e uma associação desta com a NMP na dose de 25 mg/kg e houve diferença estatística em todos os parâmetros analisados, se comparado ao controle.

Os animais pré-tratados com NMP 100 e 200 mg/kg apresentaram taxa de sobrevivência de 11,76 e 18,18%, respectivamente. Já o tratamento com ácido valpróico apresentou 19,45% a associação com a NMP 25 mg/kg 25% (Tabela 1).

**Tabela 1** - Efeitos da NMP em convulsões induzidas por PTZ (80mg/kg).

Grupos	Latência de 1 <sup>a</sup> convulsão	Latência de morte	% Sobrevivência
Veículo +PTZ	48,90±(16,38)	284,8±(141,4)	0
NMP 25mg/kg+ PTZ	46,9±(13,44)	334,2±(11,22)	0
NMP 50mg/kg + PTZ	66,91±(16,89)	467,0±(222,5)*	0
NMP 100 mg/kg+ PTZ	73,35±(35,02)*	623,1±(299,5)**	11,76
NMP 200 mg/kg+PTZ	83,45±(22,25)*	821,3±(268,0)**	18,18
Ácido Valp 10mg/kg+PTZ	80,88±(14,99)**	669,3±(486,2)***	19,45
Ácido Valp 10+NMP 25+PTZ	84,25±(30,30)**	952,6±(374,5)***	25

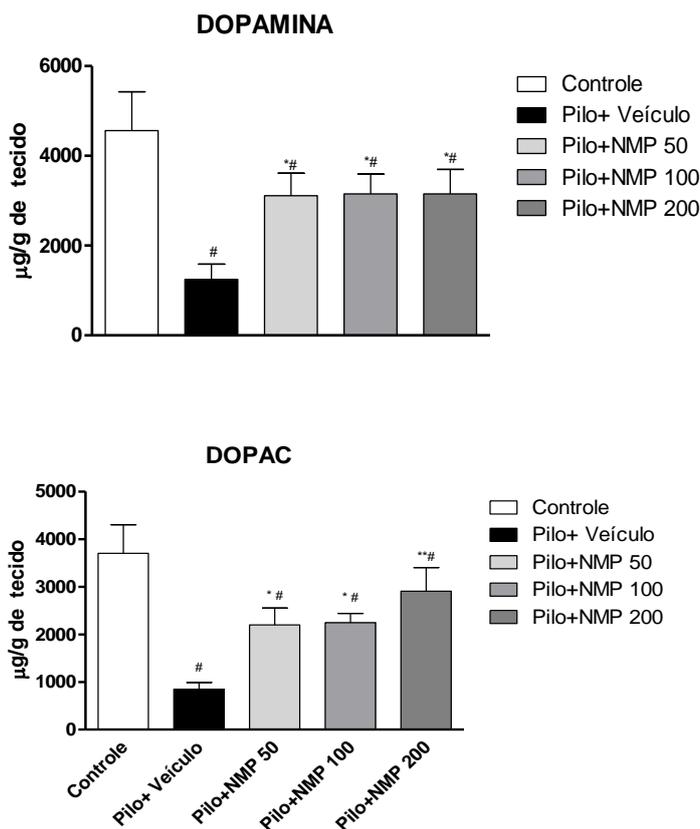
Os animais foram tratados com NMP (25,50, 100 ou 200 mg/Kg), Ácido valpróico 10 mg/kg, NMP 25 mg/kg + ácido valproico 10 mg/kg ou água destilada v.o. Após 60 minutos foi administrado PTZ (80 mg/Kg), e avaliado a latência de primeira convulsão e de morte. Os valores representam a média ± E.P.M. (erro padrão da média) \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\*p < 0,001 vs controle( ANOVA e teste de Tukey).

### 5.3.3. Determinações de conteúdo de dopamina (DA) e seu metabólito ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC) no corpo estriado de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina

Houve redução dos níveis de Dopamina e DOPAC após a convulsão se comparado ao grupo controle (grupo de animais em que não foi administrado pilocarpina). O grupo que recebeu Pilocarpina (Pilo) + veículo diluidor (água destilada) apresentou uma diminuição de 63% no conteúdo de DA estriatal e essa diminuição foi significativamente revertida (41, 19 e 31%), nos grupos tratados com NMP (50, 100 e 200 mg/kg, v.o, respectivamente). Um resultado semelhante foi demonstrado para os níveis de DOPAC,

com uma diminuição de 75% no grupo Pilo+ veículo e apenas 41, 32 e 23% de diminuições, após os tratamentos NMP com as doses de 50, 100 e 200 mg/kg, vo, respectivamente (Figura 19).

Figura 19 - Efeitos da NMP sobre os níveis de dopamina (DA) e seu metabólito ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), no corpo estriado de camundongos submetidos a convulsões induzidas por pilocarpina (Pilo).



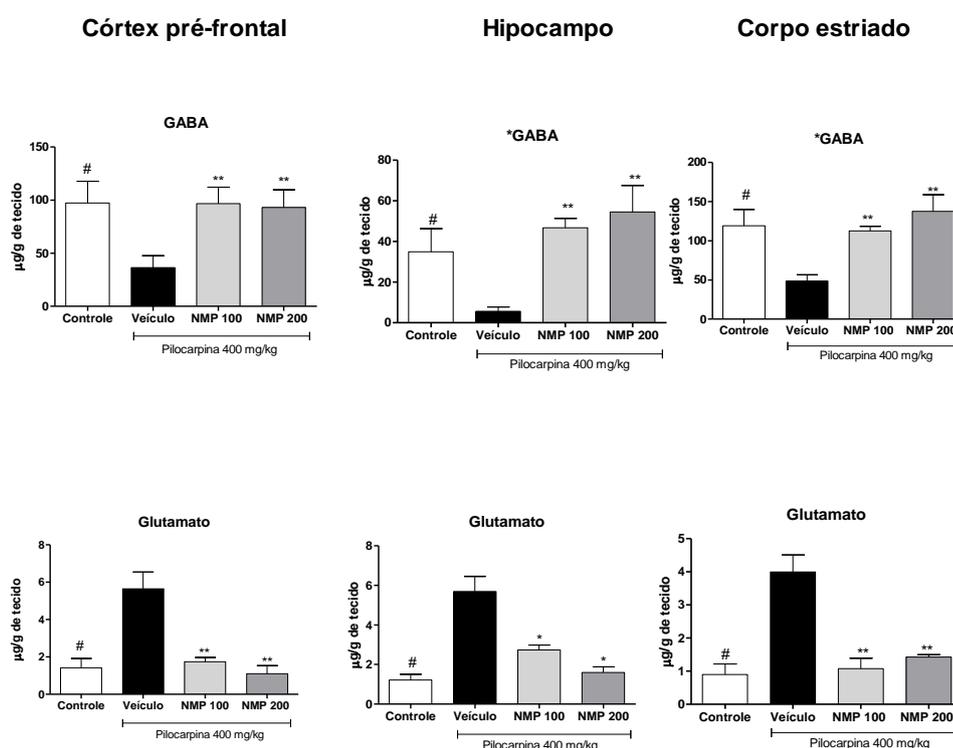
Os animais foram tratados com NMP(50, 100 ou 200 mg/kg) ou água destilada v.o. Após 60 minutos foi administrado Pilo(400 mg/kg),e retirado o corpo estriado e analisado os níveis de Dopamina e DOPAC através de cromatografia líquida de alta eficiência ( HPLC). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média) \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  vs veículo; #  $p < 0,05$  vs controle (ANOVA e teste de Tukey).

#### 5.3.4. Determinação do conteúdo de glutamato e GABA nas áreas cerebrais: córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HP) e corpo estriado (CE) de camundongos submetidos à convulsão por pilocarpina

Foi visto que o grupo tratado apenas com veículo, em relação ao controle (grupo de animais em que não foi administrado pilocarpina) mostrou redução de (62 a 65% no CPF e CE, respectivamente) dos níveis de GABA e uma diminuição ainda maior (84%)

foi demonstrada no HP. Essas alterações foram revertidas após os tratamentos NMP, com as doses de 100 e 200 mg/kg, v.o. Já o contrário foi visto nos níveis de glutamato, apresentando aumentos significativos de: 5,7, 4,7 e 6,6 vezes, no CPF, HP e CE, no grupo veículo, comparativamente aos controles normais. Essas mudanças foram parcialmente revertidas após os tratamentos com NMP, em todas as três áreas testadas (Figura 20).

Figura 20 - Efeitos da NMP sobre os níveis de GABA e Glutamato no córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos submetidos a convulsões induzidas por pilocarpina.



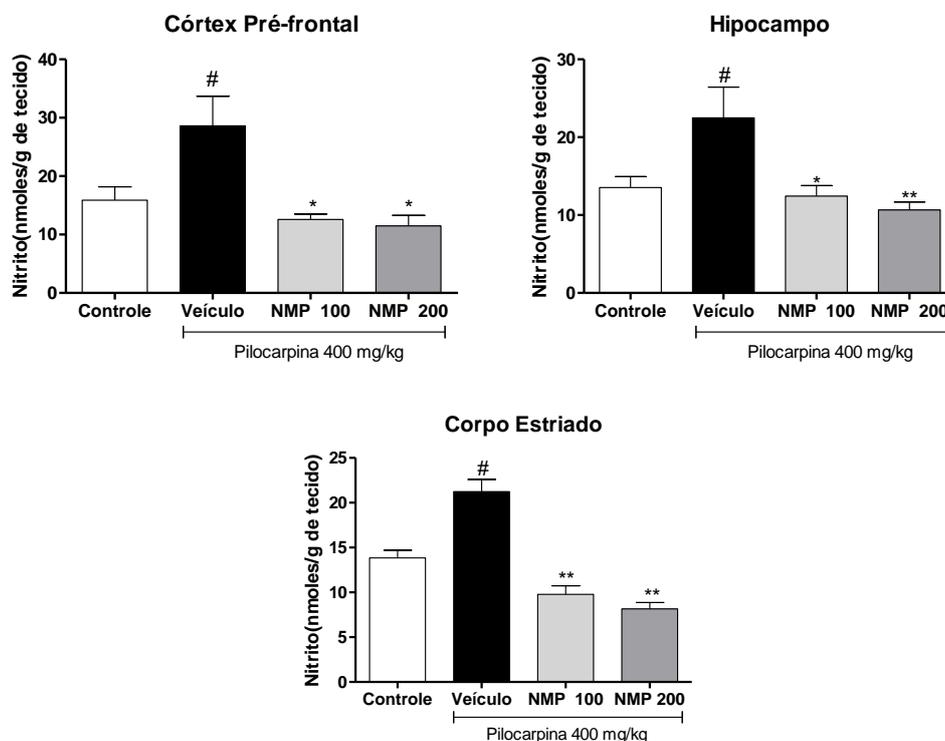
Os animais foram tratados com NMP (50, 100 ou 200 mg/kg) ou água destilada (veículo) v.o. Após 60 minutos foi administrado Pilocarpina (400 mg/kg), e o córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado foram retirados e posteriormente analisados os níveis de GABA e Glutamato através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média) \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  vs veículo; #  $p < 0,05$  vs controle (ANOVA e teste de Tukey).

### 5.3.5. Efeitos dos tratamentos com NMP no conteúdo de nitrato em áreas cerebrais de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina

Determinou-se o conteúdo de nitrato cerebral como um índice de estresse oxidativo, no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo (HP) e corpo estriado (CE). Os dados mostraram aumentos variando de 1,7 a 1,9 vezes, nessas áreas do cérebro no grupo veículo, em relação aos controles normais. Os valores foram quase ou completamente

normalizados após os tratamentos NMP (100 e 200 mg/kg, v.o.) em todos os grupos testados.

Figura 21 - Efeitos da NMP sobre o córtex pré-frontal (CPF), hipocampo e corpo estriado durante as convulsões induzidas por Pilocarpina.

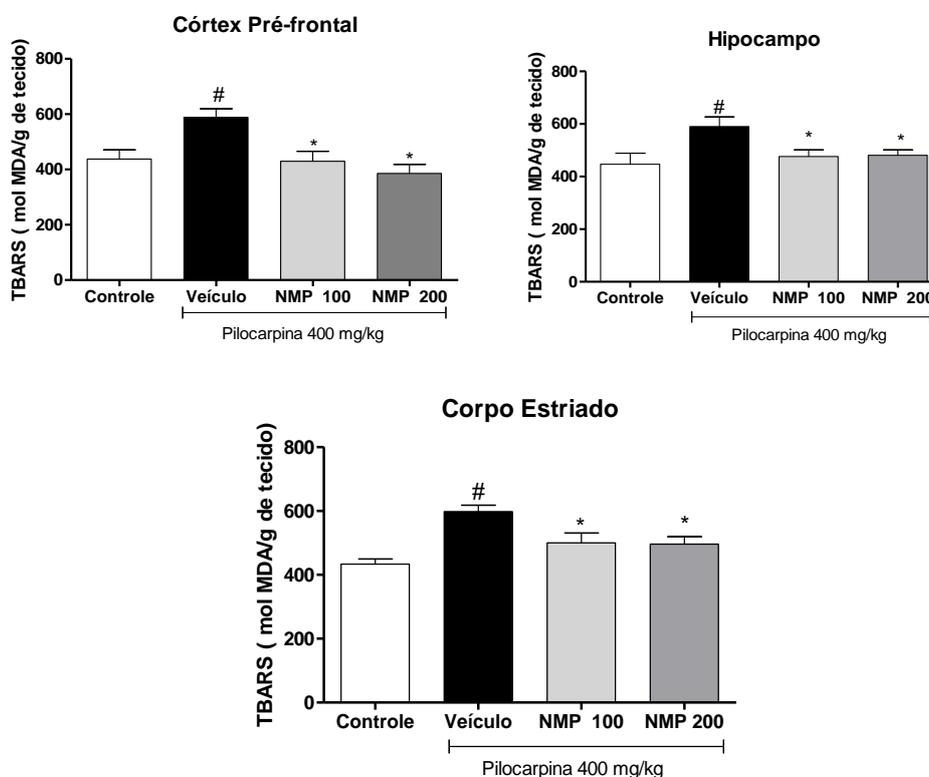


As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) após a administração da pilocarpina, analisados por ANOVA com teste de Tukey como *post hoc*. \* :  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0,01$  quando comparado ao Veículo; #  $p < 0.05$  quando comparado com controle.

### 5.3.6. Efeitos dos tratamentos com NMP sobre a peroxidação de lipídios do cérebro (ensaio TBARS) em áreas cerebrais de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina

A peroxidação lipídica é a degradação oxidativa dos lipídios, atuando como um mecanismo de reação em cadeia de radical livre. Mostramos aumentos de 1,4 a 1,5 vezes dos níveis de MDA no grupo veículo, em comparação com o controle, em todas as áreas do cérebro testadas. Os valores voltaram aos dos controles normais, após tratamentos com NMP, nas doses de 100 e 200 mg/kg, v.o. (Figura 20).

Figura 22 - Efeitos da NMP sobre os níveis de peroxidação lípidica no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo e corpo estriado durante as convulsões induzidas por Pilocarpina.

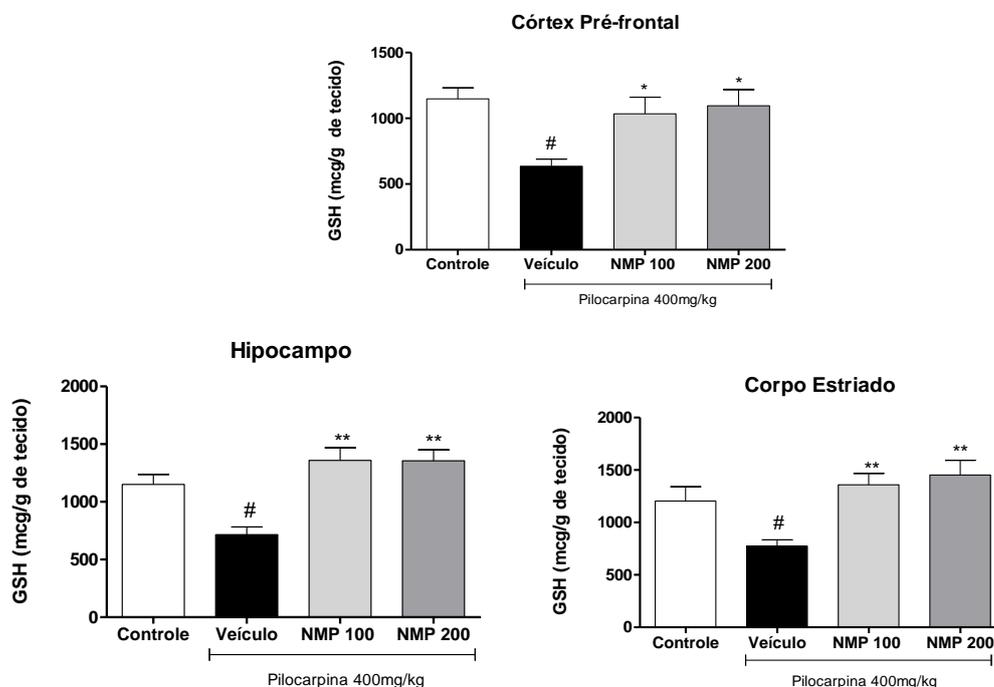


As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) após a administração da pilocarpina, analisados por ANOVA com teste de Tukey como *post hoc*. \* :  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0,01$  quando comparado ao Veículo; #  $p < 0.05$  quando comparado com controle.

### 5.3.7. Efeitos dos tratamentos com NMP no conteúdo de glutathiona (GSH) em áreas cerebrais de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina

Evidenciaram-se diminuições significativas no conteúdo de GSH, variando de 38 a 47% nas áreas do cérebro testadas, no grupo veículo, em relação ao grupo controle. A maior queda foi observada na área do córtex pré-frontal. Nos grupos tratados com NMP, tanto nas doses de 100 como de 200, ocorreu um bloqueio/reversão do efeito da pilocarpina, com níveis de glutathiona similares aos do controle.

Figura 23 - Efeitos da NMP sobre os níveis de glutathiona reduzida no córtex pré-frontal (CPF), hipocampo e corpo estriado durante as convulsões induzidas por Pilocarpina.

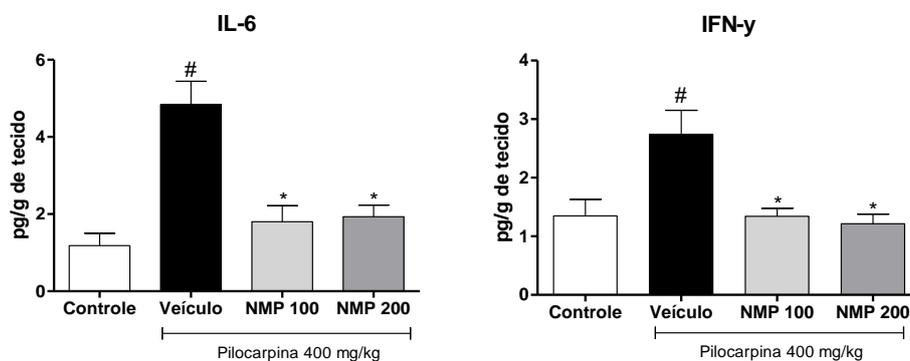


As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) após a administração da pilocarpina, analisados por ANOVA com teste de Tukey como *post hoc*. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0,01$  quando comparado ao Veículo; #  $p < 0.05$  quando comparado com controle.

### 5.3.8. Efeitos dos tratamentos da NMP sobre os conteúdos de IL-6 e IFN- $\gamma$ do hipocampo de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina

A pilocarpina promoveu um aumento de quatro vezes dos níveis de IL-6 e de duas vezes dos níveis de IFN- $\gamma$  nos hipocampos dos animais submetidos a convulsão pela mesma, se comparado ao grupo que não sofreu convulsões (controle). Este aumento foi revertido de maneira significativa nos grupos tratados com NMP nas doses de 100 e 200mg/kg, no entanto não observado do grupo tratado apenas com veículo (Figura 24).

Figura 24 - Efeitos da NMP sobre os níveis das citocinas inflamatórias: IL-6 e IFN- $\gamma$  em hipocampo e corpo estriado durante as convulsões induzidas por Pilocarpina.

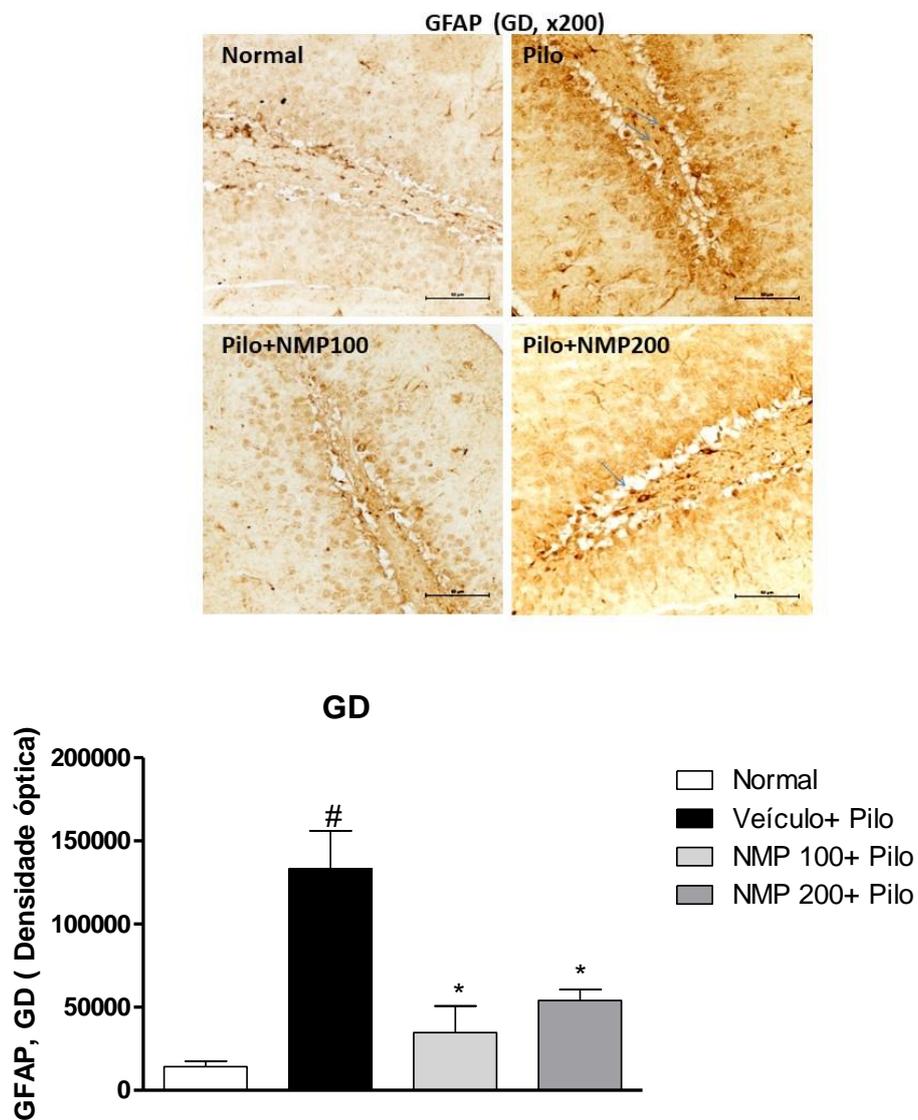


As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) após a administração da pilocarpina, analisados por ANOVA com teste de Tukey como *post hoc*. \* :  $p < 0.05$  quando comparado ao Veículo; #  $p < 0.05$  quando comparado com controle.

### 5.3.9. Efeitos dos tratamentos com NMP na imun expressão de GFAP de áreas do hipocampo e córtex temporal de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina

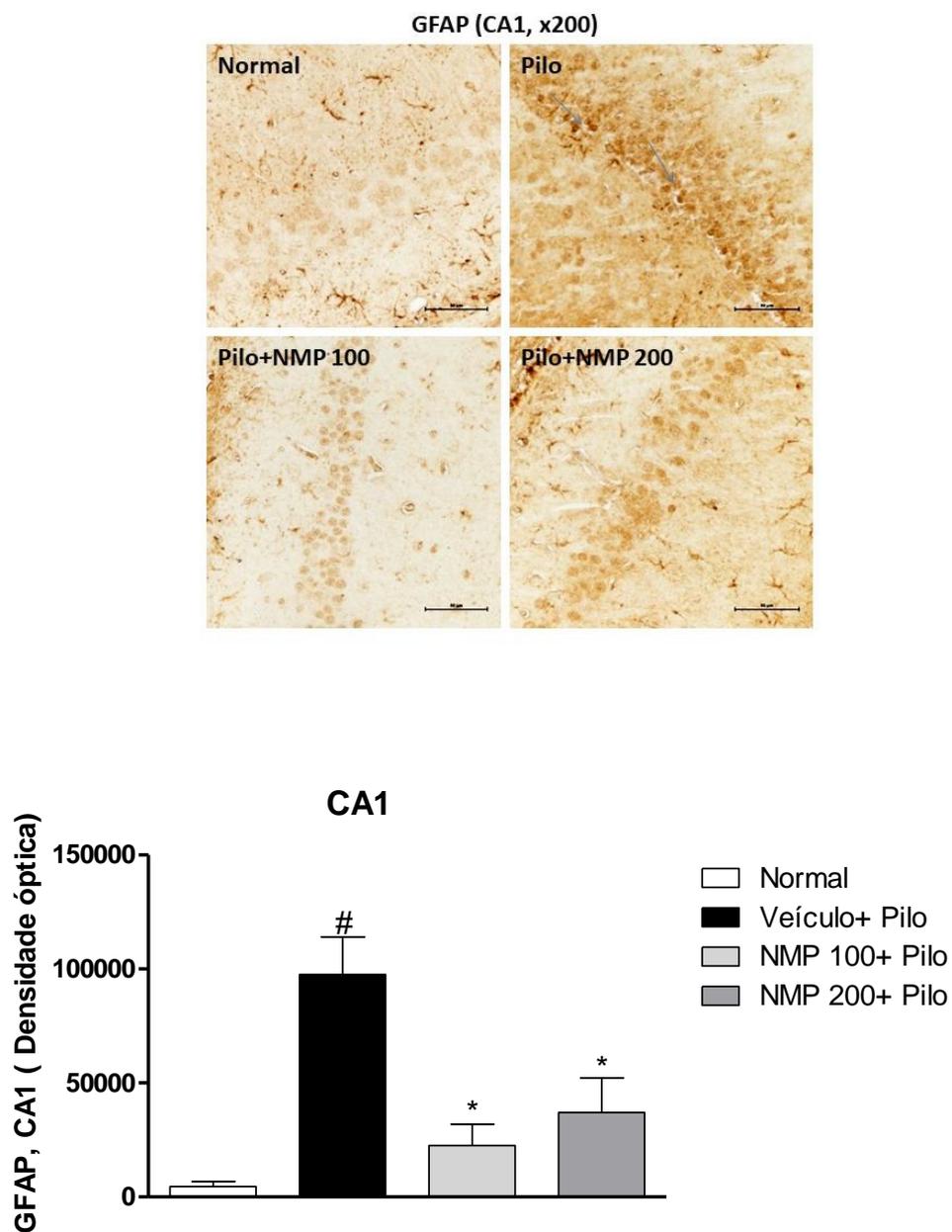
Foi realizado um ensaio de imunohistoquímica para GFAP (proteína glial fibrilar ácida) nas áreas do hipocampo e córtex temporal (CT) e foram vistos aumentos variando de 5 vezes (área CA3) a 8 vezes (área CA1), nos grupos Pilo, em comparação com o grupo normal (animais onde não foi induzida a convulsão), sendo estes aumentos revertidos em relação aos controles na área CA3, após os tratamentos NMP (100 e 200 mg/kg, v.o.). Os aumentos da imunomarcagem foram ainda maiores no giro denteado (GD) que apresentou aumento de quase 11 vezes no grupo Veículo+Pilo, em relação aos controles. Estes aumentos foram atenuados após tratamentos com NMP 100 mg/kg (aumento de cerca de 3 vezes) e 200 mg/kg (aumento de cerca de 4 vezes) (Figuras 25, 26, 27 e 28).

Figura 25 - Efeitos da NMP sobre a expressão de GFAP no hipocampo região do giro denteado (GD) durante as convulsões induzidas por pilocarpina.



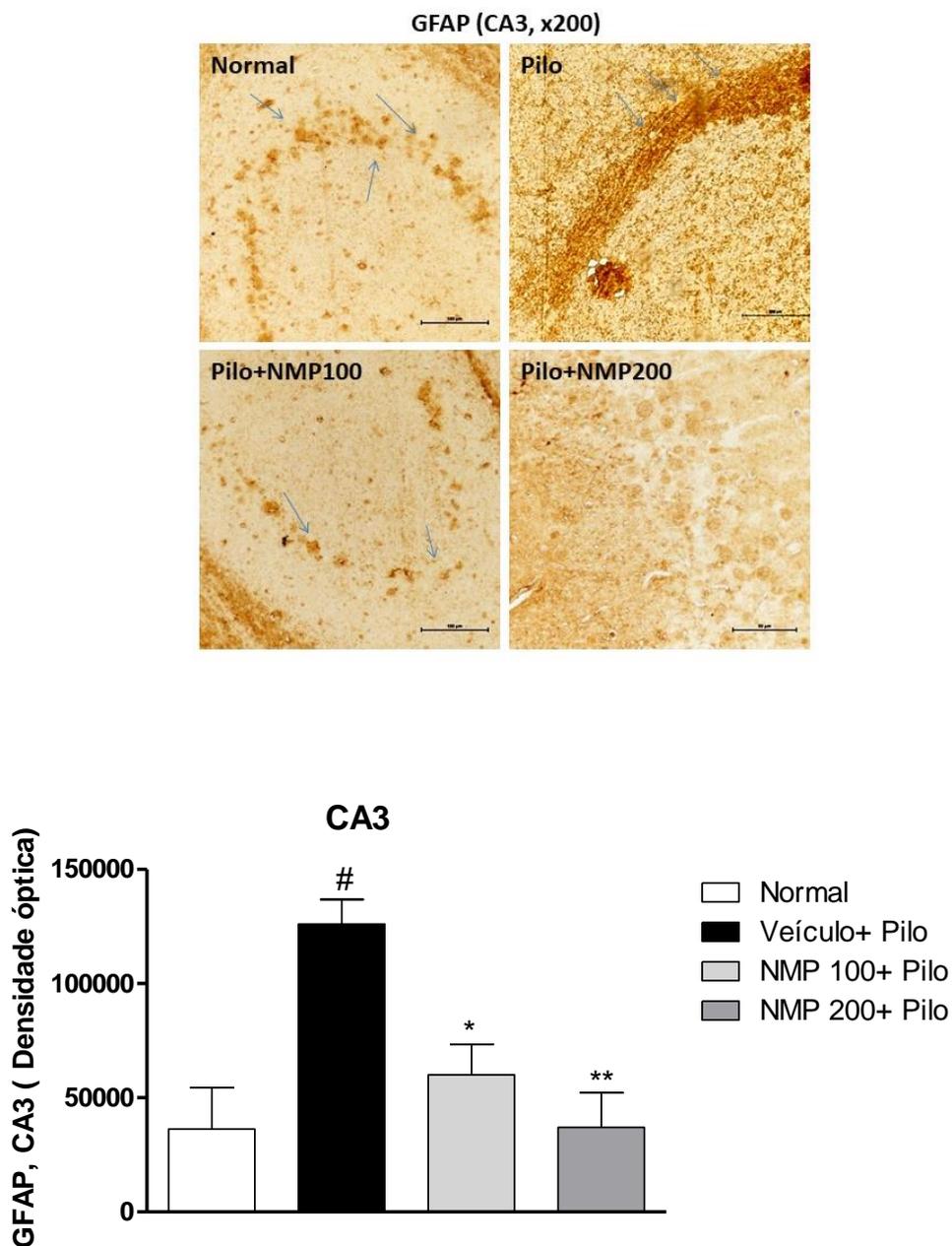
As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) após a administração da pilocarpina, analisados por ANOVA com teste de Tukey como *post hoc*. \* :  $p < 0.05$ , quando comparado ao Veículo, # $p < 0,05$  quando comparado ao controle normal.

Figura 26 - Efeitos da NMP sobre a expressão de GFAP no hipocampo região CA1 durante as convulsões induzidas por pilocarpina.



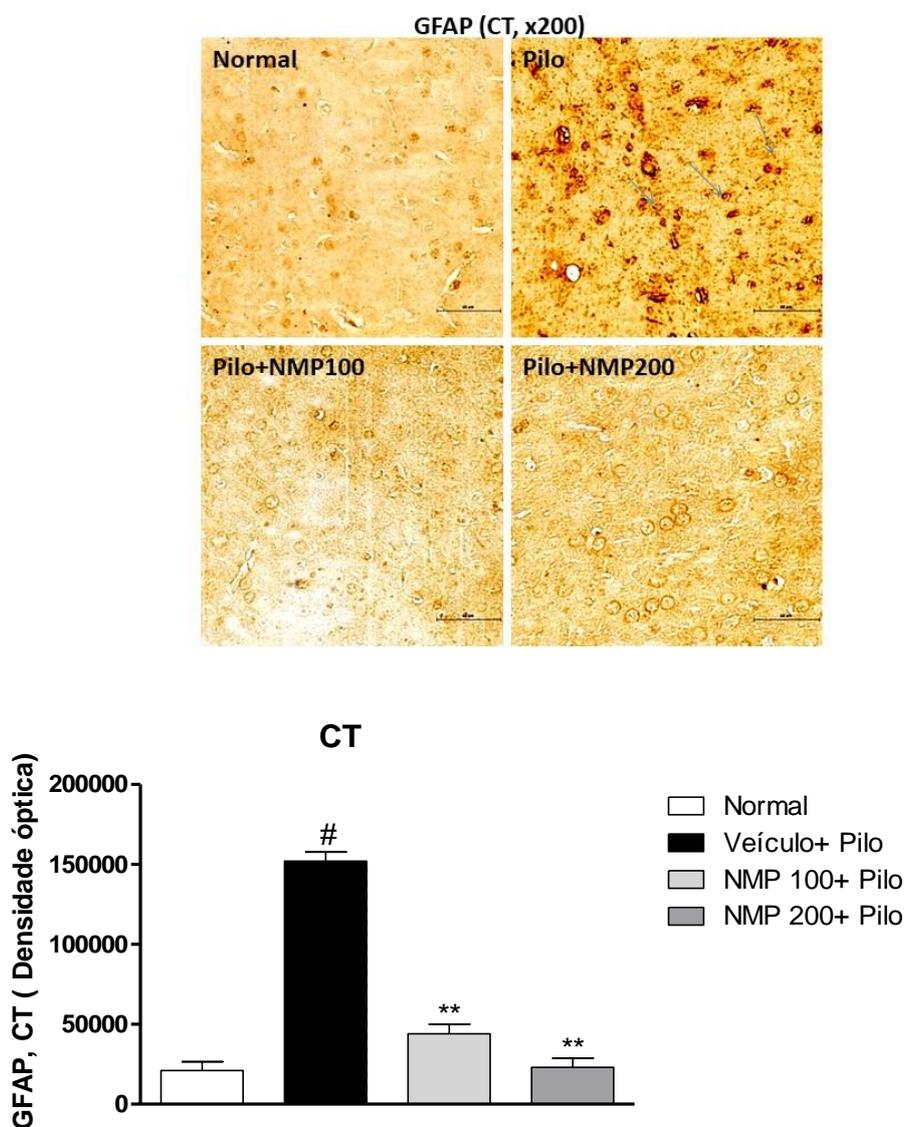
As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) após a administração da pilocarpina, analisados por ANOVA com teste de Tukey como *post hoc*. \* :  $p < 0.05$ , quando comparado ao Veículo, # $p < 0,05$  quando comparado ao controle normal.

Figura 27 - Efeitos da NMP sobre a expressão de GFAP no hipocampo região CA3 durante as convulsões induzidas por pilocarpina.



As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) após a administração da pilocarpina, analisados por ANOVA com teste de Tukey como *post hoc*. \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$ , quando comparado ao Veículo, # $p < 0,001$  quando comparado ao controle normal.

Figura 28 - Efeitos da NMP sobre a expressão de GFAP no córtex temporal (CT) durante as convulsões induzidas por Pilocarpina.



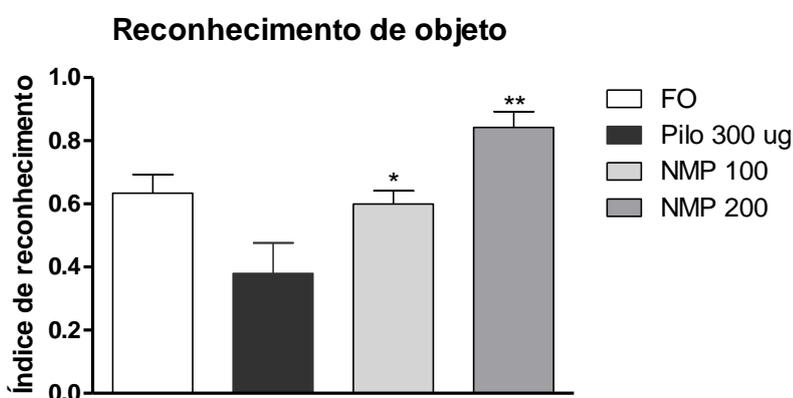
As colunas representam a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) após a administração da pilocarpina, analisados por ANOVA com teste de Tukey como *post hoc*. \*\*:  $p < 0.001$ , quando comparado ao Veículo, # $p < 0,001$  quando comparado ao controle normal.

### 5.3.10. Modelo de Estado epiléptico através da administração de pilocarpina via intracerebroventricular (i.c.v)

### 5.3.10.1. Efeito do tratamento com o NMP sobre camundongos submetidos ao modelo de estado epiléptico no teste do Reconhecimento do Objeto Novo

Três dos 27 camundongos morreram após o tratamento com Pilo (11% de mortalidade), enquanto todos os camundongos do grupo falso operado (FO) sobreviveram. No novo teste de reconhecimento de objeto para memória de curto prazo os animais do grupo Pilo (veículo) exibiram desempenho significativamente prejudicado em comparação com o grupo FO (Figura 29). Por outro lado, o tratamento com NMP em ambas as doses de 100 mg/kg e 200 mg/kg v.o foi capaz de prevenir o comprometimento da memória de curto prazo relacionado à lesão induzida pela pilocarpina, onde o desempenho desses animais tratados com NMP não foi diferente do grupo FO.

Figura 29 – Alterações cognitivas promovidas sobre a memória de reconhecimento pela NMP induzidas pela injeção intracerebroventricular (icv) de pilocarpina (Pilo), avaliada pelo teste de reconhecimento de objetos.



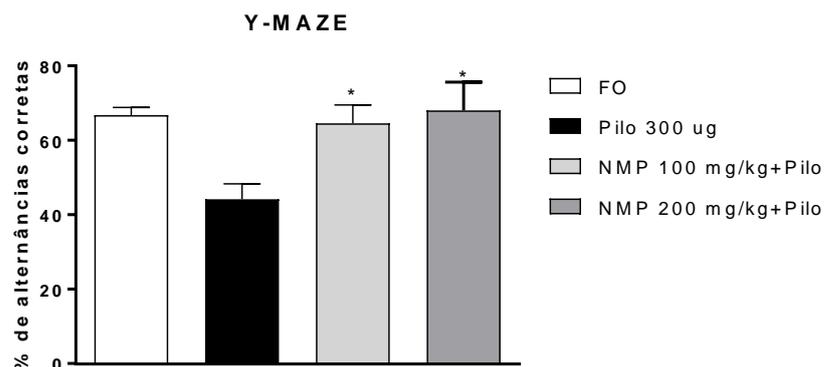
Os animais receberam Pilo (300  $\mu\text{g}$  / 1  $\mu\text{L}$ , icv) e, 24 h após, foram tratados por 15 dias com NMP (100 ou 200 mg/kg, ou com água destilada (veículo). Os testes comportamentais foram realizados 1 hora após a última administração das drogas testadas. \* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  vs veículo (Pilo 300  $\mu\text{g}$ ). ANOVA seguida pelo teste de Dunnett.

### 5.3.10.2. Efeito do tratamento com a NMP sobre camundongos submetidos ao modelo de estado epiléptico no teste do labirinto em Y (Y-maze)

Também se investigou o desempenho comportamental no teste do labirinto em Y, que foi usado para avaliar a memória de curto prazo e a memória operativa. Neste teste, o grupo Pilo exibiu uma porcentagem significativamente reduzida de alternâncias corretas

nos eixos do labirinto em comparação com o grupo F.O. O tratamento com NMP preveniu o comprometimento cognitivo significativamente em ambas as doses (Figura 30), preservando assim o funcionamento da memória do camundongo.

Figura 30 – Alterações cognitivas promovidas sobre a memória operacional pela NMP induzidas pela injeção intracerebroventricular (icv) de pilocarpina (Pilo), avaliado pelo teste do labirinto em Y em camundongos



Os animais receberam Pilo (300  $\mu$ g/1  $\mu$ L, icv) e, 24 h após, foram tratados por 15 dias com NMP (100 ou 200 mg/kg, ou com água destilada (veículo)). Os testes comportamentais foram realizados 1 hora após a última administração das drogas testadas. \* $p < 0,05$  vs. veículo (Pilo 300  $\mu$ g). ANOVA seguida pelo teste de Dunnett.

Embora não tenhamos monitorado os animais em longo prazo, a fim de registrar a ocorrência de crises recorrentes espontâneas, que aparecem principalmente a partir da 2ª semana após a injeção de Pilo, é importante mencionar que notamos um comportamento evidente que consiste em agressividade e hiper-reatividade notáveis em resposta a ruídos e manuseio. Este comportamento é frequentemente relatado em animais com convulsões espontaneamente recorrentes documentadas por gravação de vídeo eletrocorticográfica em vários modelos usando pilocarpina.

### 5.3.10.3. Coloração de Nissl para avaliação da viabilidade neuronal

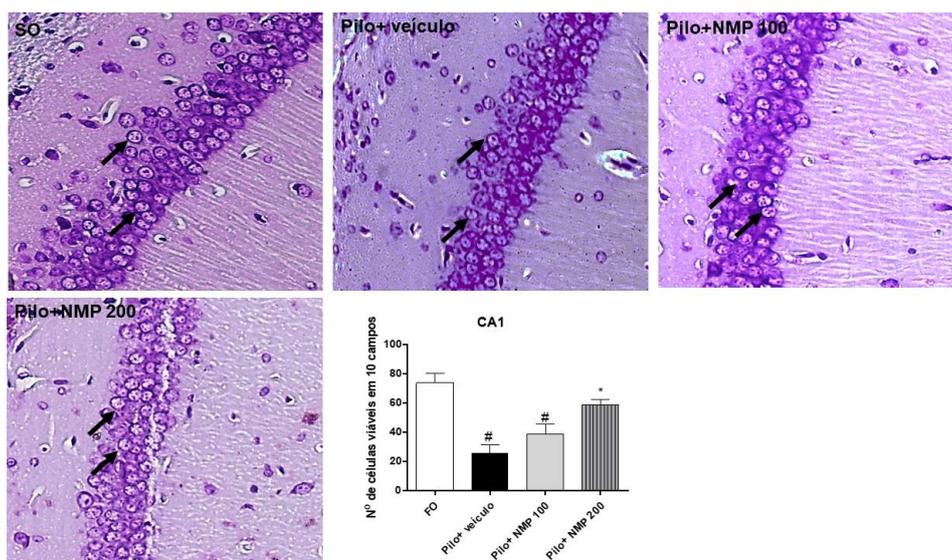
O tratamento com Pilo induziu uma redução notável nos neurônios corados com Nissl da região CA1 do *cornus Ammonis* (CA) (redução de 52%), em comparação com o grupo FO. O tratamento com NMP na dose de 100 mg/kg resultou em valores semelhantes aos do grupo Pilo+ veículo (redução de 43%) e, portanto, não preveniu significativamente a redução dos neurônios piramidais CA1 quando comparado ao grupo FO. Em contraste,

a dose de 200mg/Kg promoveu um aumento significativo no número de células viáveis em reação ao grupo Pilo + veículo.

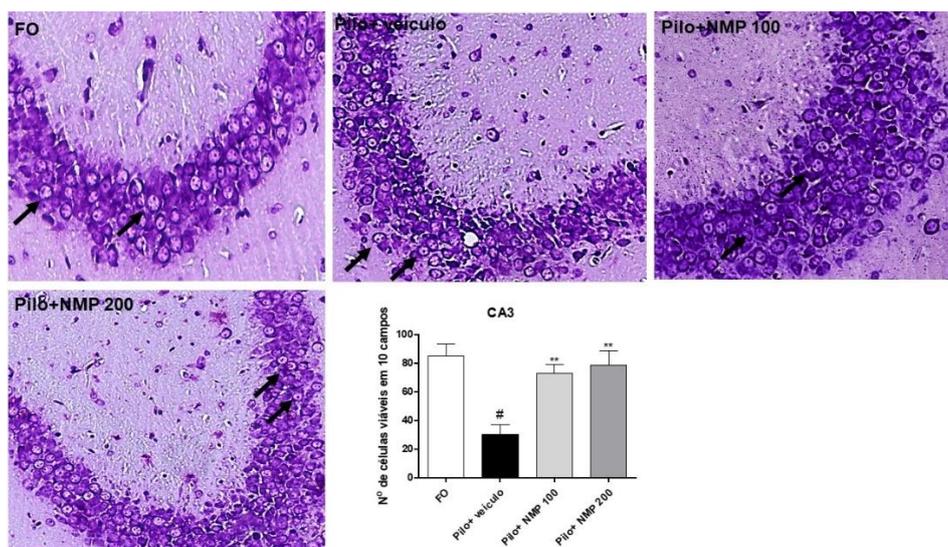
Na região CA3, uma redução de 69% nas células viáveis (indicada pelas setas pretas) foi observada no grupo Pilo+ veículo, em comparação com o grupo FO. O tratamento com NMP, em ambas as doses, limitou a 18% a diminuição do percentual de células viáveis, quando comparado com o grupo Pilo+ veículo. Na área do giro denteado (DG), não houve redução significativa de neurônios na camada granular, evidenciando uma maior resistência dessas células nesta região (Figuras 31A, 31B e 31C).

Figura 31 -Fotomicrografias representativas (ampliação de 10x) mostrando o efeito da NMP sobre a morte de neurônios do hipocampo na região do *corpus ammonis* CA1 (A), CA3 (B) e giro dentado (DG) (C) em camundongos submetidos à injeção intracerebroventricular (icv) de pilocarpina (Pilo).

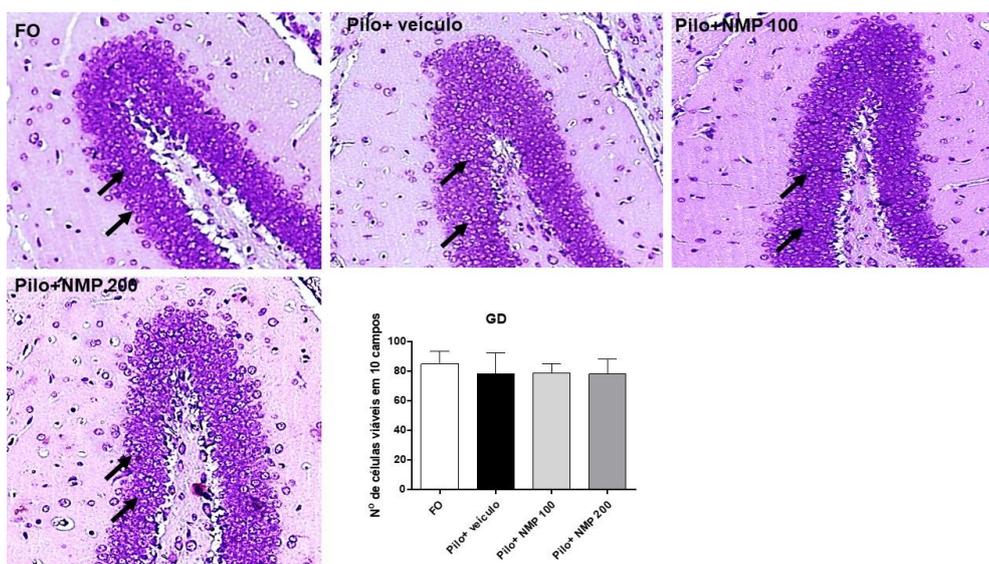
(A)



(B)



(C)

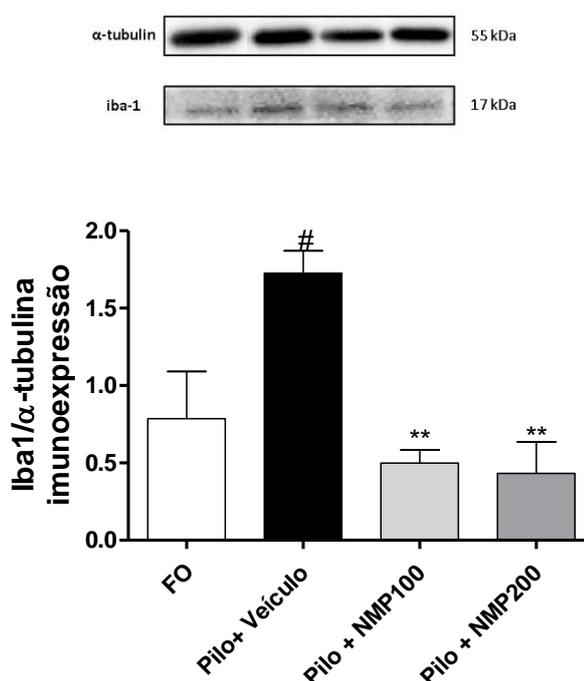


Os animais receberam Pilo (300 µg / 1 µL, icv) e, 24 h após, foram tratados com NMP (100 ou 200 mg/kg ou água destilada por via oral), por 15 dias. O grupo falso-operado (FO) recebeu o veículo, água destilada v.o. Após os testes comportamentais, os animais foram submetidos à eutanásia para análise histológica com violeta cresil (n = 4 animais / grupo, três fatias / animal). Os gráficos de barras mostram o valor médio de células / campos viáveis (10 campos / grupo) #vs. FO, \*p <0,05. vs. Pilo+ veículo, \*\*p <0,01 vs. Pilo+ veículo (ANOVA, seguida pelo teste de Tukey). Setas pretas apontam para os neurônios viáveis. Foram considerados viáveis os neurônios que apresentavam coloração violeta no citoplasma, além de aspectos morfológicos normais (células redondas ou ovais com núcleos centralizados).

#### 5.3.10.4. Análise da expressão da molécula adaptadora de ligação de cálcio ionizada 1 (*Iba-1*) por Western Blot

O western blot para Iba-1 em hipocampus, padronizado para  $\alpha$ -tubulina, mostrou um aumento significativo de 2,2 vezes deste marcador de células inflamatórias no grupo Pilo+ veículo em comparação com o grupo FO. Notavelmente, em ambos os grupos Pilo+NMP100 e NMP200, os valores estavam abaixo do nível basal do grupo FO, embora não significativamente, demonstrando uma reversão completa do efeito da pilocarpina (Figura 32).

Figura 32- Efeitos da NMP sobre a expressão de Iba1, induzidas pela injeção intracerebroventricular (icv) de pilocarpina (Pilo)



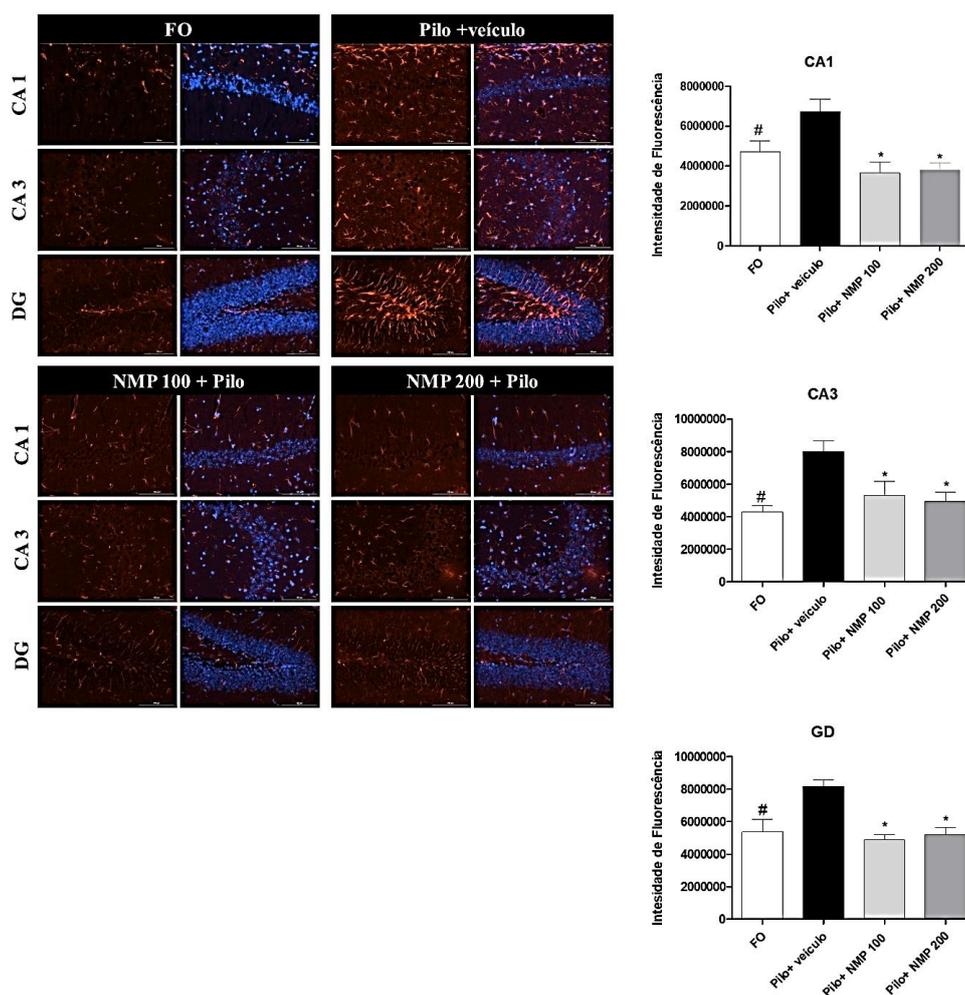
Os animais receberam Pilo (300  $\mu$ g / 1  $\mu$ L, icv) e, 24 h após, foram tratados com NMP (100 ou 200 mg/kg ou água destilada por via oral), por 15 dias. O grupo falso-operado (FO) recebeu o veículo, água destilada v.o. Após os testes comportamentais, os animais foram submetidos à eutanásia para análise histológica com violeta cresil (n = 4 animais / grupo, três fatias / animal). Os gráficos de barras mostram o valor médio de células / campos viáveis (10 campos / grupo) #vs. FO, \*p <0,05. vs. Pilo+ veículo, \*\*p <0,01 vs. Pilo+ veículo (ANOVA, seguida pelo teste de Tukey).

#### 5.3.10.5. Análise da expressão de GFAP por Imunofluorescência

A análise de imunofluorescência para GFAP (Figura 33) mostrou no CA1 um aumento significativo de 1,5 vezes da marcação no grupo Pilo + veículo em comparação com o FO. A intensidade da imunomarcação nos grupos NMP100 e NMP200 foi inferior aos valores encontrados no grupo FO. Dados semelhantes também foram observados no CA3 e no GD, nos quais houve aumento respectivo de duas vezes e 1,8 vezes. Os valores

foram semelhantes aos do grupo FO em ambos os grupos NMP, sem diferença significativa entre os três grupos mencionados, demonstrando reversão dos efeitos promovidos pela pilocarpina em todas as áreas estudadas.

Figura 33 - Fotomicrografias representativas (ampliação de 10x) mostrando os efeitos da NMP sobre a expressão de GFAP do hipocampo na região do *corpus ammonis* CA1, CA3 e giro dentado (GD) em camundongos submetidos à injeção intracerebroventricular (icv) de pilocarpina (Pilo).

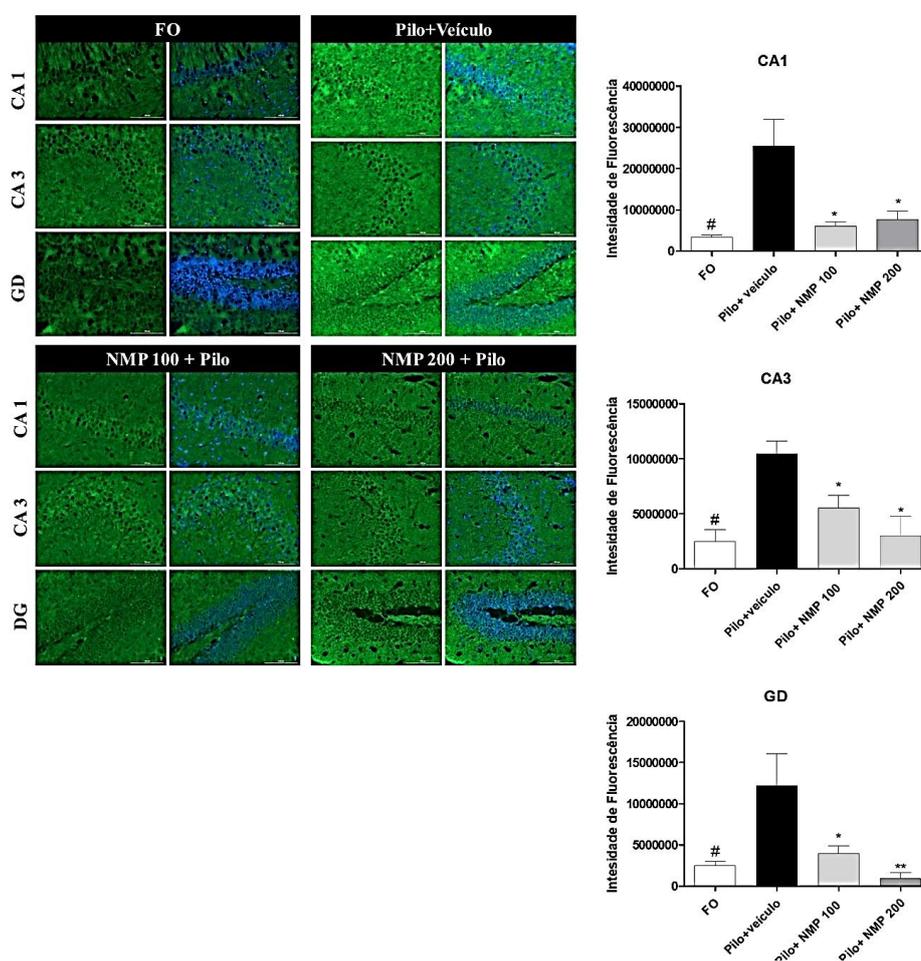


Os animais receberam Pilo (300  $\mu\text{g}$  / 1  $\mu\text{L}$ , icv) e, 24 h após, foram tratados com NMP (100 ou 200 mg/kg, via oral, po), por 15 dias. O grupo sham-operado (FO) recebeu o veículo, água destilada, vo. Após os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados para ensaios de imunofluorescência, realizados com quatro animais por grupo. À esquerda, as fotomicrografias são apresentadas para cada grupo, em campos hipocâmpais mostrando células coradas apenas para GFAP (em vermelho) e núcleos contrastados com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (em azul). A quantificação (barras à direita) refere-se à densidade integrada de fluorescência nos vários subcampos hipocâmpais. #. vs. FO,  $p < 0,05$ ; \*vs. Pilo+veículo,  $p < 0,05$  (one way ANOVA seguida pelo teste de Tukey).

### 5.3.10.6. Análise da expressão de Caspase 3 por Imunofluorescência

Semelhante a expressão de GFAP, na análise de imunofluorescência para Caspase 3 (Figura 34) mostrou no CA1 um aumento significativo de 2,15 vezes da marcação no grupo Pilo + veículo em comparação com o FO. A intensidade da imunomarcação nos grupos NMP100 e NMP200 foi inferior aos valores encontrados no grupo FO. Dados semelhantes também foram observados no CA3 e no GD, nos quais houve aumento respectivo de duas vezes e 1,09 vezes. Os valores foram semelhantes aos do grupo FO em ambos os grupos NMP, sem diferença significativa entre os três grupos mencionados, demonstrando reversão dos efeitos promovidos pela pilocarpina em todas as áreas estudadas.

Figura 34 – Fotomicrografias representativas (amplia o de 10x) mostrando os efeitos da NMP sobre a expressão de Caspase 3 do hipocampo na região do corpus ammonis, CA1, CA3 e giro dentado (GD) em camundongos submetidos   inje o intracerebroventricular (icv) de pilocarpina (Pilo).



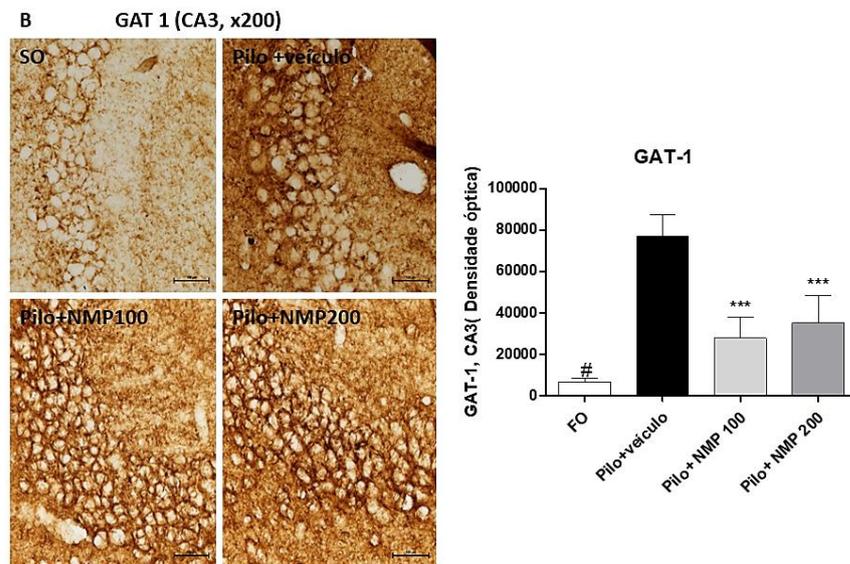
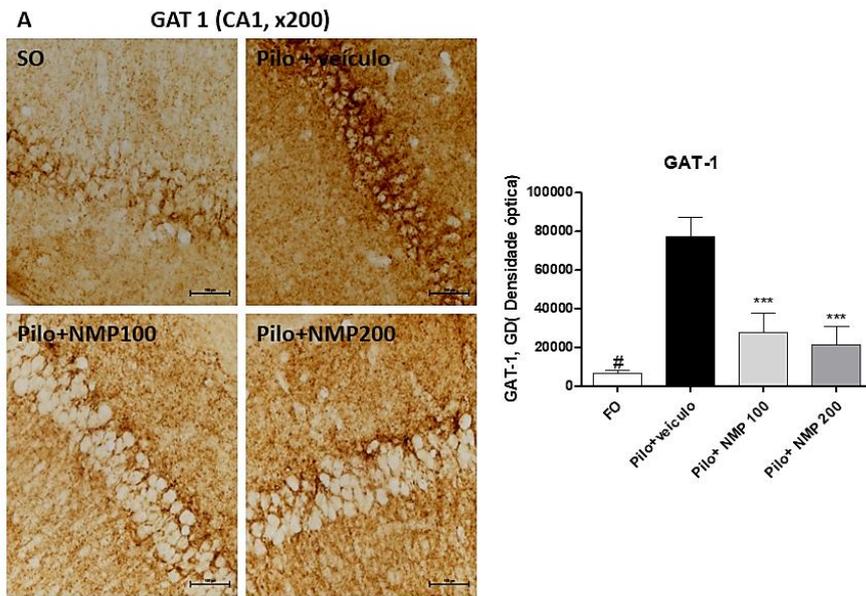
Os animais receberam Pilo (300 µg / 1 µL, icv) e, 24 h após, foram tratados com NMP (100 ou 200 mg/kg, via oral, po), por 15 dias. O grupo falso operado (FO) recebeu o veículo, água destilada, vo. Após os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados para ensaios de imunofluorescência, realizados com quatro animais por grupo. À esquerda, as fotomicrografias são apresentadas para cada grupo, em campos hipocâmpais mostrando células coradas apenas para CASPASE 3 (em verde) e núcleos contrastados com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (em azul). A quantificação (barras à direita) refere-se à densidade integrada de fluorescência nos vários subcampos hipocâmpais. #. vs. FO,  $p < 0,05$ ; \*vs. Pilo+veículo,  $p < 0,05$  (one way ANOVA seguida pelo teste de Tukey).

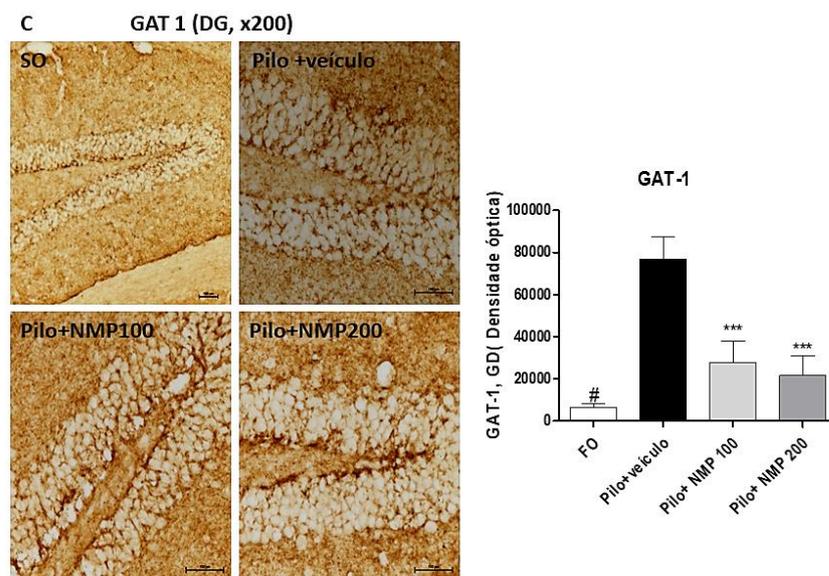
#### 5.3.10.7. *Expressão de GAT1 por imunohistoquímica*

Os achados da imunohistoquímica para GAT1 foram analisados no hipocampo. No subcampo CA1 do hipocampo, a expressão GAT1 no grupo Pilo aumentou quase 12 vezes em comparação com o grupo FO. Esta mudança foi muito menor (respectivamente, 4,6 vezes e 5,3 vezes) nos grupos Pilo + NMP nas doses de 100 e 200 mg/kg, e não diferiu significativamente dos níveis do grupo FO. Em outras palavras, a NMP em ambas as doses preveniu parcialmente o aumento de GAT1 induzido por Pilo icv em CA1 (Figura 35).

Um efeito semelhante foi observado em CA3, onde a marcação de GAT1 aumentou 17 vezes, em comparação com o grupo FO. Embora não seja significativamente diferente do grupo FO, menos aumentos consistentes (três vezes e quatro vezes) foram observados após o tratamento com NMP, respectivamente, nas doses de 100 e 200 mg/kg (Figura 35). Além disso, a região do DG exibiu um aumento de 24 vezes na marcação de GAT1 no grupo Pilo+veículo em comparação com o grupo FO. Embora não seja significativo, um aumento (cerca de três vezes) em comparação com o grupo Pilo+veículo foi observado em ambas as doses de NMP (Figura 35A, 35B e 35C).

Figura 35 -Fotomicrografias representativas (ampliação de 20x) mostrando o efeito da NMP sobre a expressão de GAT-1 no hipocampo daa região: Ammonis CA1 (A), CA3 (B) e giro dentado (DG) (C) em camundongos submetidos à injeção intracerebroventricular (icv) de pilocarpina (Pilo).



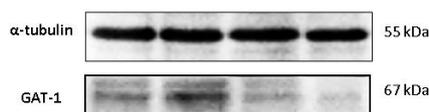


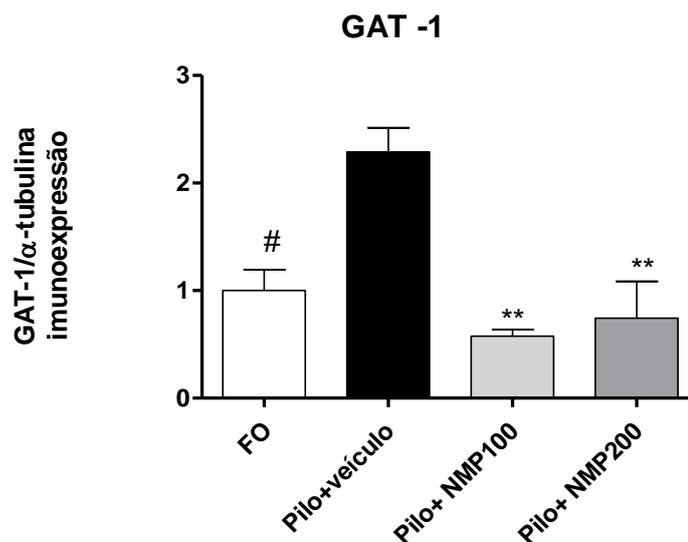
Os animais receberam Pilo (300  $\mu\text{g}$  / 1  $\mu\text{L}$ , icv) e, 24 h após, foram tratados com NMP (100 ou 200 mg/kg, via oral, vo), por 15 dias. O grupo sham-operado (FO) recebeu o veículo, água destilada, vo. Após os testes comportamentais, os animais foram eutanasiados para ensaios de imunohistoquímica, realizados com quatro animais por grupo. À esquerda, as fotomicrografias são apresentadas para cada grupo, em campos hipocâmpais mostrando células marcadas. A quantificação (barras à direita) refere-se à densidade ótica de nos vários subcampos hipocâmpais. #. vs. FO,  $p < 0,001$ ; \*vs. Pilo+veículo,  $p < 0,001$  (one way ANOVA seguida pelo teste de Tukey).

#### 5.3.10.8. Expressão de GAT-1 por Western Blot

Os resultados da análise imunohistoquímica para GAT-1 foram confirmados por experimentos de western blot em hipocâmpos inteiros. O grupo Pilo exibiu um aumento significativo de 1,9 vezes na imunexpressão de GAT1 em comparação com o grupo FO, sendo este efeito revertido nos grupos tratados com NMP em ambas as doses. O grupo Pilo + NMP100 apresentou expressão de GAT1 53% menor em relação ao grupo Pilo + veículo. Não houve diferença significativa entre os grupos FO e Pilo + NMP200 (Figura 36).

Figura 36 - Efeitos da NMP sobre a expressão de GAT-1, induzidas pela injeção intracerebroventricular (icv) de pilocarpina (Pilo)





Os animais receberam Pilo (300 µg / 1 µL, icv) e, 24 h após, foram tratados com NMP (100 ou 200 mg/ kg ou água destilada por via oral), por 15 dias. O grupo falso-operado (FO) recebeu o veículo, água destilada v.o. Após os testes comportamentais, os animais foram submetidos à eutanásia para análise histológica com violeta cresil (n = 4 animais / grupo, três fatias / animal). Os gráficos de barras mostram o valor médio de células / campos viáveis (10 campos / grupo) #vs. FO, \*p <0,05. vs. Pilo+ veículo, \*\*p <0,01 vs. Pilo+ veículo (ANOVA, seguida pelo teste de Tukey).

## 6 DISCUSSÃO

A epilepsia é uma doença neurológica cujos mecanismos envolvidos com a geração de convulsões não são completamente compreendidos, sendo que cerca de 30% dos pacientes são refratários às terapias convencionais. Portanto, a busca por novos medicamentos anti-epilépticos se torna muito necessária. Até agora, os mecanismos de ação mais importantes para a geração de convulsões se concentram na hiperatividade dos sistemas de aminoácidos excitatórios e, níveis insuficientes, recaptação ou desregulação do neurotransmissor GABA ou outros distúrbios nas propriedades das membranas neuronais (LASON; CHLEBICKA; REJDAK, 2013).

No presente trabalho, pela primeira vez, foi utilizada uma fração metanólica rica em *N*-metil-(2S,4R)-*trans*-4-hidroxi-L-prolina (NMP) isolada das folhas de *Syderoxylon obtusifolium*, espécie medicinal utilizada no Nordeste do Brasil devido às suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, entre outras.

Os ensaios com cultura de astrócitos demonstraram que mesmo após a injúria celular com uma concentração citotóxica de pilocarpina, a fração rica em NMP conseguiu recuperar parcialmente a viabilidade no modelo utilizado. Essa recuperação se deu concomitante a uma diminuição pronunciada do acúmulo de EROs intracitoplasmáticas, o que protegeu as mitocôndrias contra a despolarização. Esses dados são relevantes, uma vez que o estresse oxidativo é um dos principais fatores que levam à morte celular devido à oxidação de lipídios de membrana, alteração da função de proteínas e enzimas, danos diretos nos ácidos nucleicos, além da ruptura da cadeia transportadora de elétrons dependente do potencial elétrico mitocondrial, alterando a função da ATP-sintase e portanto o limiar energético da célula (N; V, 2016).

Mostramos que este componente bioativo contendo um derivado do aminoácido L-prolina (NMP), aumentou significativamente a latência para a primeira convulsão e latência de morte, nos modelos de convulsão por pilocarpina e PTZ em camundongos. Modelos experimentais de indução de convulsão em roedores são utilizados com o objetivo de mimetizar as convulsões espontâneas crônicas da epilepsia, a qual envolve alterações nas interações astrócitos-neuronais, relacionadas ao metabolismo mitocondrial e à manutenção e reabastecimento de substratos para o ciclo do ácido tricarboxílico (HADERA et al., 2016).

Um trabalho realizado por Hong et al (2012) descreve que a regulação da homeostase da glutatona (GSH), uma das principais defesas antioxidantes intracelulares,

após o estado epiléptico induzido por pilocarpina pode melhorar o comprometimento cognitivo e inibir a ativação dos astrócitos e os danos oxidativos (HONG et al., 2012).

De fato, a ativação astrocitária pela pilocarpina e o consequente estresse oxidativo estão associados com os mecanismos fisiopatológicos de diversos distúrbios neurológicos. Um estudo anterior demonstrou que a atenuação do processo inflamatório em astrócitos melhora a sinalização cálcio-dependente e a função mitocondrial, repercutindo em melhoras no aprendizado e na memória (XIAN et al., 2019).

Logo, ratifica-se a importância da busca de substâncias que atuem nessas vias melhorando o metabolismo celular no sistema nervoso central. Um trabalho realizado por Sarhan et al (1989) estudou o potencial anticonvulsivante da L-prolina e de alguns de seus derivados, demonstrando que esses compostos apresentam efeitos potencializadores da neurotransmissão inibitória mediada pelo GABA, além de antagonizar os efeitos do glutamato, um dos principais neurotransmissores causadores de excitotoxicidade e estresse oxidativo no sistema nervoso central (SARHAN; SEILER, 1989).

A L-prolina parece participar da prevenção de processos neurodegenerativos. Um estudo envolvendo o uso de tripeptídeos contendo glicina- $\alpha$ -metil-prolina demonstrou propriedades neuroprotetoras através de uma modulação neuroinflamatórias associados ao estresse oxidativo e à produção de óxido nítrico neuronal devido à inibição da resposta inflamatória pela supressão de NF- $\kappa$ B e, conseqüentemente, a expressão de genes inflamatórios como a NOS indutível (iNOS) (CACCIATORE et al., 2016). Num estudo do nosso grupo demonstramos que a NMP possui atividade anti-inflamatória diminuindo a expressão de COX-2, iNOS, TNF- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B no modelo de inflamação periférico de edema de pata (DE AQUINO et al., 2017).

Um estudo com o aminoácido L-prolina mostrou-se eficaz em suprimir convulsões generalizadas e focais, induzidas pela ouabaina em modelos experimentais em roedores (TSUKADA et al., 1974). Com isso surge a hipótese de que a L-prolina pode funcionar como um neurotransmissor ou neuromodulador no cérebro. Previamente, neurônios contendo co-transportadores para L-prolina foram identificados no cérebro de ratos através de imunohistoquímica (TAKEMOTO; SEMBA, 2006). Esses dados corroboram a nossa hipótese de que os efeitos da NMP são derivados do teor de L-prolina presente nessa fração metanólica de *S. obtusifolium*.

A L-prolina parece participar da prevenção de processos neurodegenerativos. Um estudo envolvendo o uso de tripeptídeos contendo glicina- $\alpha$ -metil-prolina demonstrou propriedades neuroprotetoras através de modulação neuroinflamatória associada ao

estresse oxidativo e à produção de óxido nítrico neuronal devido à inibição da resposta inflamatória pela supressão de NF-kB e, conseqüentemente, a expressão de genes inflamatórios como a NOS indutível (iNOS). Mostramos, outrossim, que a L-prolina e a trans-L-prolina apresentam propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória no teste da formalina em camundongos (dados não publicados), reforçando a hipótese de que grande parte dos efeitos observados no presente estudo são devidos ao teor de L-prolina presente na NMP.

Além disso, o sistema dopaminérgico tem mostrado ter um efeito modulador de convulsões que depende dos subtipos dos receptores de dopamina cerebral (BOZZI; BORRELLI, 2013). Evidências indicam que as drogas que estimulam o sistema dopaminérgico, como apomorfina e anfetaminas, bem como drogas antiparkinsonianas, como pergolida e bromocriptina, apresentam efeitos antiepilépticos e anticonvulsivos (BOZZI; BORRELLI, 2006; BOZZI; PROVENZANO; CASAROSA, 2018).

Os neurônios dopaminérgicos também parecem modular a plasticidade sináptica, fenômeno afetado pela atividade convulsiva (HANSEN; MANAHAN-VAUGHAN, 2014). Corroborando com esses achados, mostramos que os corpos estriados dos animais submetidos a convulsões induzidas por pilocarpina, apresentaram diminuição do conteúdo da DA e do DOPAC, efeitos que foram parcialmente revertidos nos grupos tratados com NMP.

O papel neuromodulatório do sistema dopaminérgico ocasiona uma intensa mudança na atividade neuronal e como conseqüência na neurotransmissão excitatória (glutamatérgica) e inibitória (GABAérgica), e esse complexo parece estar desregulado na epilepsia (GUERRIERO; GIZA; ROTENBERG, 2015). No modelo de convulsão induzida por pilocarpina, mostramos diminuição dos níveis de GABA e aumento de glutamato e estes foram revertidos pelos tratamentos de NMP.

O estresse oxidativo e a produção excessiva de EROS estão envolvidos com a iniciação e progressão de crises epiléticas (SHIN et al., 2011). A enzima glutatona (GSH), entre outras funções fisiológicas, está altamente envolvida na proteção cerebral contra EROS (DRINGEN; GUTTERER; HIRRLINGER, 2000). O comprometimento desta enzima tem sido correlacionado a várias doenças neurológicas, incluindo epilepsia (DRINGEN; HIRRLINGER, 2003).

Um grande conjunto de evidências indica um papel para mediadores inflamatórios na epileptogênese (SHIMADA et al., 2014). Observamos aumentos significativos nos níveis de IL-6 e IFN-gama, na presença de convulsões induzidas por pilocarpina no

hipocampo dos animais. Essas mudanças foram atenuadas, após os tratamentos com NMP. Os aumentos dos níveis de citocinas pró inflamatórias, incluindo IL-6 e IFN-gama, foram observados em pacientes epiléticos (SINHA et al., 2008) corroborando nossos achados.

A astrogliose é considerada uma característica importante na epilepsia e também pode estar envolvida no desenvolvimento e persistência de convulsões que resultam em uma hipertrofia proeminente de astrócitos (KHURGEL; IVY, 1996). Mostramos que a pilocarpina aumentou a expressão de GFAP, marcador astrocitário, em todos os modelos usados *in vitro* e *in vivo*. Essas mudanças foram atenuadas pelos tratamentos com NMP.

Corroborando com nossos achados, os aminoácidos como a L-leucina e D-leucina tem demonstrado ação neuroprotetora quando administrados antes do início das convulsões induzidas por ácido kainico e eletrochoque em roedores (HARTMAN et al., 2010; SARHAN; SEILER, 1989).

Mostrou-se que o acúmulo de prolina intracelular em células de mamíferos se correlaciona com a diminuição dos níveis de ROS e o aumento da proteção contra o estresse oxidativo (BECKER; ZHU; NATARAJAN, 2009). A L-prolina melhora a taxa de sobrevivência de mitocôndrias como demonstrado em um estudo *in vitro* (ZHANG et al., 2016). Além disso a L-prolina mostrou capacidade de prevenção dos efeitos nocivos do LPS como a inflamação e estresse oxidativo, entre outros parâmetros, no córtex cerebral e cerebelo de ratos (ANDRADE et al., 2018).

Mostramos que a NMP exerceu atividades anti-inflamatórias e neuroprotetoras no modelo de epilepsia utilizando pilocarpina icv e este efeito foi apresentado não apenas pela NMP, mas também pela L-prolina e *N*-metil (2S, 4R)-*trans*-hidroxi-L-prolina como dito anteriormente, sugerindo que esta atividade de NMP é devido ao seu conteúdo deste aminoácido. A administração via icv de pilocarpina é um modelo de estado epilético muito útil como ferramenta para investigar os mecanismos subjacentes à geração e manutenção de convulsões (FURTADO et al., 2002).

A epilepsia está ligada a muitas comorbidades (DEVINSKY; VAZQUEZ, 1993) e os transtornos comportamentais relacionados incluem depressão, psicose e déficits cognitivos graves, que prejudicam significativamente a funcionalidade de vida do paciente (CORNAGGIA et al., 2006). Mostramos que após a administração via icv de pilocarpina os camundongos apresentaram um déficit acentuado na memória de curto prazo, o que foi evitado pelas duas doses de NMP avaliadas aqui. O ORT é um teste comportamental frequentemente usado para a investigação de vários aspectos da

aprendizagem e memória em camundongos (LUEPTOW, 2017). A pilocarpina também reduziu significativamente o número de alterações espontâneas corretas, em comparação com o grupo FO, conforme avaliado pelo teste Y-maze usado para avaliar a memória de trabalho em camundongos.

Portanto, a NMP, como outros derivados da L- prolina (SARHAN; SEILER, 1989) constituem não apenas uma ferramenta útil para o controle da atividade pró-convulsão, mas também para neutralizar os déficits cognitivos associados à epilepsia que representam um grande fardo para esses pacientes.

Segundo Furtado e colaboradores (FURTADO et al., 2002), a pilocarpina via icv provoca uma neurodegeneração nos subcampos hipocampais, conforme confirmado no presente estudo. Comparativamente, o uso do ácido kainico, induz a neurodegeneração no CA3, deixando o CA1 e o GD quase intactos (VICTOR NADLER; CUTHBERTSON, 1980). Ambas as doses de NMP foram capazes de proteger o subcampo hipocampal CA3, enquanto apenas a dose mais alta foi eficaz no subcampo CA1. Esta observação sugere que os resultados obtidos nos testes comportamentais descritos poderiam ser mais dependentes da proteção no subcampo CA3 hipocampal.

A epilepsia é uma doença neurológica que causa rupturas esporádicas e progressivas da atividade neuronal ou de uma rede neuronal-gliial heterogênea (BINDER; CARSON, 2013). Evidências mostram que a atividade cerebral e a conectividade são drasticamente alteradas durante as convulsões epiléticas. As redes cerebrais são conhecidas por mudar de um estado de repouso equilibrado para um estado hiperativo e hipersíncrono (DIAZ VERDUGO et al., 2019).

Modelos experimentais usando a pilocarpina mostraram-se eficazes em induzir uma ativação anormal de astrócitos e microglia no GD, de três até 20 dias após as convulsões iniciais em ratos (SCHARTZ et al., 2016). O intervalo de tempo do nosso estudo foi dentro do período mencionado de ativação glia e demonstrou que a NMP é capaz de manter tanto os astrócitos quanto microglia no estado de equilíbrio.

A microglia é conhecida por desempenhar um papel crítico na homeostase cerebral, pois são as células imunes residentes no cérebro que desempenham papéis importantes no desenvolvimento e manutenção de circuitos neurais, e a microglia ativada exerce diferentes efeitos sobre a função cerebral (HIRAGI; IKEGAYA; KOYAMA, 2018). A sinalização elevada da via mTOR na microglia causa alterações na homeostase cerebral, e levando à redução da densidade sináptica e degeneração neuronal marcada e proliferação maciça de astrócitos (ZHAO et al., 2018).

No presente trabalho, mostramos que os astrócitos foram ativados no hipocampo de camundongos submetidos à injeção de Pilo via icv. Esses efeitos foram substancialmente diminuídos após tratamentos de camundongos com NMP, em ambas as doses, sugerindo que a NMP exerce um efeito neuroprotetor em camundongos epiléticos. A ativação astrócitária e microglial ocorrem após convulsões e, por essa razão, podem desempenhar um papel importante na epileptogênese (SHAPIRO; WANG; RIBAK, 2008). É importante ressaltar que essas alterações hipocampais manifestaram-se como o aumento das expressões de Iba-1 e GFAP e ocorrem rapidamente após convulsões induzidas por Pilo em ratos, e duram várias semanas (SCHARTZ et al., 2016).

Um aumento das células positivas do Iba-1 também foi demonstrado no hipocampo após indução de estado epilético induzida pela pilocarpina causando alterações na morfologia da microglia (WYATT-JOHNSON; HERR; BREWSTER, 2017). Embora não tenhamos investigado as alterações morfológicas da microglia, os achados sobre a expressão Iba-1 na presença da administração da NMP sugerem uma possível modulação efetiva do composto ativo testado.

As extensões de astrócitos com terminais pré-sinápticos geram uma sinapse tripartite complexa (XU et al., 2019). O fenômeno chamado astrogliose reativa é caracterizado pela hipertrofia dos processos primários e um aumento dramático na expressão de GFAP (STEWARD et al., 1991; STEWARD; KELLEY; SCHAUWECKER, 1997). Vários estudos forneceram evidências convincentes de alterações dramáticas na morfologia e função dos astrócitos na epilepsia, levando à astrogliose reativa (BENNETT et al., 2016; JABS; SEIFERT; STEINHÄUSER, 2008). Todos esses achados sugerem que os astrócitos são atores cruciais na epilepsia, representando assim um alvo importante para os efeitos da NMP.

Nas últimas décadas, métodos computacionais têm sido amplamente utilizados em estudos de desenvolvimento de medicamentos para fornecer várias vantagens em comparação com os métodos tradicionais, importantes para o desenvolvimento de medicamentos, aumentando as taxas de sucesso, menor tempo e custos. Além disso, esses métodos representam um ganho ético, uma vez que reduzem o número de animais e recursos biológicos utilizados em pesquisas experimentais (CHALLAL et al., 2012).

Aqui, em primeiro lugar, aplicamos um algoritmo de previsão de alvos para obter os alvos biológicos mais prováveis para a interação com NMP, o que poderia guiar nossos esforços de pesquisa. Curiosamente, encontramos para NMP vários alvos envolvidos na transmissão GABAérgica, sendo o GAT1 o mais previsto.

Com base nisso, conduzimos uma abordagem de acoplamento molecular para esclarecer melhor o modo de ligação e afinidade da NMP com este transportador. Nossos experimentos mostraram valores de pontuação de encaixe de NMP que eram bastante semelhantes aos da tiagabina, uma droga anticonvulsivante, que tem como mecanismo de ação a inibição do GAT-1 (SCHACHTER, 2001). Apesar de facilitar a indução da despolarização mediada pelo GABA, a tiagabina também aumenta a eficácia da inibição sináptica durante a ativação síncrona de alta frequência de interneurônios inibitórios (JACKSON; ESPLIN; ČAPEK, 1999). Ao elevar os níveis de GABA e a disponibilidade na fissura sináptica, a inibição GAT-1 representa uma abordagem estabelecida para o tratamento da epilepsia e é o alvo potencial para o mecanismo de ação NMP.

Outro possível alvo da NMP pode ser o purinoceptor  $A_3$ , conforme revelado pela nossa análise de previsão. Trata-se de um receptor acoplado à proteína  $G_{i/o}$  ativado apenas em concentrações de adenosina muito altas (ou seja, durante convulsões ou isquemia). O papel de  $A_3$  na epilepsia e ictogênese é mal compreendido e não parece exercer um efeito pro convulsivo unifocal. Sua ativação foi demonstrada para provocar a dessensibilização dos receptores de adenosina  $GABA_A$  e  $A_1$  (anticonvulsivos), bem como para modular a liberação pré-sináptica de glutamato e as correntes  $K^+$  pós-sinápticas, que acredita-se serem os mecanismos de efeito a jusante  $A_3$  (TESCAROLLO et al., 2020).

## 7 CONCLUSÕES

Em conjunto, os dados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- A NMP foi eficaz em prevenir a morte celular (*in vitro*), ocasionada pela pilocarpina, bem como a reduzir a formação de espécies reativas de oxigênio e atrelado a isso, diminuir a disfunção mitocondrial, efeitos observados em cultura secundária de astrócitos e mitocôndrias isoladas;
- A NMP mostrou uma atividade anticonvulsivante nos modelos agudos de convulsão testados como pilocarpina e PTZ, em camundongos;
- Houve alterações neuroquímicas sobre os níveis de Dopamina e de seu metabólito (DOPAC), como também dos aminoácidos GABA e Glutamato, ocasionadas pelas convulsões induzidas pela pilocarpina em camundongos. No entanto o tratamento com a NMP conseguiu revertê-los para os níveis de normalidade;
- Esta ação anticonvulsivante parece estar relacionada a atividade anti-inflamatória, já que a NMP reduziu a expressão de IL-6 e IFN- $\gamma$ , como foi avaliado na análise por imunoensaio e/ou no efeito antioxidante observado na dosagem de nitrito, GSH e MDA em áreas cerebrais, corroborando com os resultados *in vitro*;
- Partindo desse pressuposto foi visto atividade neuroprotetora da NMP no modelo de SE, através de melhoras dos aspectos cognitivos dos animais que receberam pilocarpina via i.c.v. Houve diminuição de morte celular nos mesmos animais como observado na histologia com coloração de Nissil e imunofluorescência para Caspase 3;
- Como já se esperava, diante dos vastos resultados observados na literatura, a pilocarpina ativa as células da glia que estão muito associadas a epilepsia. A NMP diminuiu a expressão de GFAP em todos os protocolos *in vitro* e *in vivo*. O mesmo foi visto na expressão de Iba-1 no modelo de SE, corroborando com os efeitos anti-inflamatórios desse composto;
- Nos testes de predição e modelagem molecular foram demonstradas interações principalmente com o GAT-1 deste derivado da prolina presente na NMP. Confirmando isso vimos uma diminuição da expressão de GAT-1 nos hipocampus dos animais do modelo de SE.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo mostramos pela primeira vez os efeitos neuroprotetores do componente bioativo e derivado da L-prolina, *N*-metil-(2*S*,4*R*)-*trans*-4-hidroxi-L-prolina (NMP) isolado a partir da fração metanólica das folhas de *S. obtusifolium*. Essas propriedades neuroprotetoras de NMP estão certamente associadas com seus efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes que parecem resultar da presença de L-prolina neste componente bioativo.

Assim, os efeitos da NMP não poderiam ser simplesmente atribuídos à inibição do GAT1 e à redução de GABA, vez que poderiam também estar associados a potenciais efeitos modulatórios em diferentes tipos de correntes iônicas presentes em neurônios centrais, astrócitos ou células microgliais. Considerando-se a grande proporção de pacientes epiléticos refratários ao tratamento convencional tornam-se imprescindíveis estudos translacionais focados em drogas com atividades neuroprotetora e que possuam também efeitos anti-inflamatório e antioxidante como é o caso de derivados da L-prolina como a presente no NMP.

**REFERÊNCIAS**

ABREU, I.N.; MAZZAFERA, P.; EBERLIN, M.N.; ZULLO, M.A.; SAWAYA, C.H.F. Characterization of the variation in the imidazole alkaloid profile of *Pilocarpus microphyllus* in different seasons and parts of the plant by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting and identification of novel alkaloids by tandem mass spectrometry. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, v. 21, n. 7, p.1205-1213, 2007.

AGUIAR, C.C.; ALMEIDA, A.B.; ARAÚJO, P.V.; DE ABREU, R.N.; CHAVES, E.M.; DO VALE, O.C.; MACÊDO, D.S.; WOODS, D.J.; FONTELES, M.M.; VASCONCELOS, S.M. Oxidative stress and epilepsy: literature review. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, 2012.

AGRA, M.F.; BARACHO, G.S.; BASÍLIO, I.J.; NURIT, K.; BARBOSA, D.A. Sinopse da flora medicinal do cariri paraibano. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v.4, n. 3, p.323- 330, 2007.

ALEXANDRE, T.; LINO, L. R.; DE LICENCIATURA, T. O DÉFICE DA ATENÇÃO NA EPILEPSIA. **O portal dos psicólogos**, p. 14–25, 2006.

ALVES-ARAÚJO, A.; ALVES, M. Flora da Usina São José, Igarassu, Pernambuco. **Sapotaceae Rodriguésia**, Pernambuco, v.1, n.2, p. 303-318, 2010.

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

ANDRADE, V. S. et al. A Possible Anti-Inflammatory Effect of Proline in the Brain Cortex and Cerebellum of Rats. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 5, p. 4068–4077, 1 maio 2018.

AQUINO, P. et al. Avaliação da atividade anti-inflamatória tópica e antibacteriana do extrato metanólico das folhas de *Sideroxylon obtusifolium*. **Acta Biologica**

**Colombiana**, v. 21, n. 1, p. 131–140, 1 jan. 2016.

ARAÚJO-NETO, V.; BOMFIM, R. R.; OLIVEIRA, V. O. B.; PASSOS, A. M. P. R.; OLIVEIRA, J. P. R.; LIMA, C. A.; MENDES, S. S.; ESTEVAM, C. S.; THOMAZZI, S. M., Therapeutic benefits of *Sideroxylon obtusifolium* (Humb. ex Roem. & Schult.) T.D. Penn., Sapotaceae, in experimental models of pain and inflammation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasil, v.20, n.6. 2010.

BARKER-HALISKI, M.; STEVE WHITE, H. Glutamatergic mechanisms associated with seizures and epilepsy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 8, p. 1–15, 1 ago. 2015.

BATEMAN, A.; MARTIN, M.J.; O'DONOVAN, C.; MAGRANE, M.; ALPI, E.; ANTUNES, R.; BELY, B.; BINGLEY, M.; BONILLA, C.; BRITTO, R. UniProt: The universal protein knowledgebase. **Nucleic Acids Res.** **2017**, *45*, D158–D169.

BECKER, D. F.; ZHU, W.; NATARAJAN, S. Proline metabolism and protection against oxidative stress. **The FASEB Journal**, v. 23, p. 678.7-678.7, 2009.

BEGHI, E. The Epidemiology of Epilepsy. **Neuroepidemiology**, v. 54, n. 2, p. 185–191, 1 mar. 2020.

BEGHI, E.; HESDORFFER, D. Prevalence of epilepsy - An unknown quantity. **Epilepsia**, v. 55, n. 7, p. 963–967, 2014.

BEHR, C. et al. Epidemiology of epilepsy. **Revue Neurologique**, v. 172, n. 1, p. 27–36, 2016.

BELTRÃO, A.E.S.; TOMAZ, A.C.A.; BELTRÃO, F.A.S.; MARINHO, P. In vitro biomass production of *Sideroxylon obtusifolium* (Roem & Schult). **Revista Brasileira de Farmacognosia, Brasil**, v.18, p. 696-698. 2008.

BENNETT, D. et al. **The curated reference collection in neuroscience and biobehavioral psychology**, 1 jan. 2016.

BERNSTEIN, E. M.; QUICK, M. W. Regulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) transporters by extracellular GABA. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 2, p. 889–895, 8 jan. 1999.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Oxidative stress, genome lesions and signaling pathways in cell cycle control. **Quimica Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340–1344, 2006.

BINDER, D. K.; CARSON, M. J. Glial cells as primary therapeutic targets for epilepsy. **Neurochemistry International**. Elsevier Ltd, , 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24021493/>>. Acesso em: 30 jan. 2021

BOZZI, Y.; BORRELLI, E. Dopamine in neurotoxicity and neuroprotection: What do D2 receptors have to do with it?. **Trends in Neurosciences**, v. 29, n. 3, mar. 2006.

BOZZI, Y.; BORRELLI, E. The role of dopamine signaling in epileptogenesis. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 7, 17 set. 2013.

BOZZI, Y.; PROVENZANO, G.; CASAROSA, S. Neurobiological bases of autism–epilepsy comorbidity: a focus on excitation/inhibition imbalance. **European Journal of Neuroscience**, v. 47, n. 6, p. 534–548, 1 mar. 2018.

CACCIATORE, I. et al. Development of glycine- $\alpha$ -methyl-proline-containing tripeptides with neuroprotective properties. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 108, p. 553–563, 27 jan. 2016.

CAVALHEIRO, E.A.; SANTOS, N.F.; PRIEL, M.R. The pilocarpine model of epilepsy in mice. **Epilepsia** 1996, 37, 1015–1019.

CHALLAL, S. et al. Zebrafish bioassay-guided microfractionation for the rapid in vivo identification of pharmacologically active natural products. **Chimia**. v, 66, n.4, 2012.

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

CLAASSEN, J.; GOLDSTEIN, J. N. Emergency Neurological Life Support: Status Epilepticus. **Neurocritical Care**, v. 27, p. 152–158, 1 set. 2017.

CORNAGGIA, C. M. et al. Correlation between cognition and behavior in epilepsy. **Epilepsia**, v. 47, n. SUPPL. 2, p. 34–39, nov. 2006.

COULTER, D. A.; STEINHÄUSER, C. Role of astrocytes in epilepsy. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 5, n. 3, 2015.

DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissTargetPrediction : updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. May, p. 357–364, 2019.

DE AQUINO, P. E. A. et al. The anti-inflammatory effects of *N*-methyl-(2*S*,4*R*)-trans-4-hydroxy-*L*-proline from *Syderoxylon obtusifolium* are related to its inhibition of TNF- $\alpha$  and inflammatory enzymes. **Phytomedicine**, v. 24, p. 14–23, 15 jan. 2017.

DE AQUINO, P. E. A. et al. The Wound Healing Property of *N*-Methyl-(2*S*,4*R*)-trans-4-Hydroxy-*L*-Proline from *Sideroxylon obtusifolium* is Related to its Anti-Inflammatory and Antioxidant Actions. **Journal of Evidence-Based Integrative Medicine**, v. 24, 7 ago. 2019.

DE AQUINO, P. E. A. et al. A proline derivative-enriched fraction from *sideroxylon obtusifolium* protects the hippocampus from intracerebroventricular pilocarpine-induced injury associated with status epilepticus in mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 11, p. 1–22, 1 jun. 2020a.

DE AQUINO, P. E. A. et al. The *N*-Methyl-(2*S*, 4*R*)-trans-4-hydroxy-*L*-proline-Enriched Methanol Fraction from *Sideroxylon obtusifolium* Shows an Anticonvulsant Activity Associated with its Anti-inflammatory/Antioxidant Actions. **Planta Medica International Open**, v. 07, n. 04, p. e158–e169, nov. 2020b.

DELFINO, L.; MASCIADRI, S.; FIGUEREDO, E. Registro de Sideroxylon obtusifolium (Roem. & Schult.) T.D. Penn. (Sapotaceae) en bosques psamófilos de la costa atlántica de Rocha, Uruguay. **Iheringia: Série botânica**. v. 2, p.129-133. 2005.

DEVINSKY, O.; VAZQUEZ, B. Behavioral changes associated with epilepsy. **Neurologic Clinics**, v. 11, n. 1, 1993.

DIAZ VERDUGO, C. et al. Glia-neuron interactions underlie state transitions to generalized seizures. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 1 dez. 2019.

DIX, S.L.; AGGLETON, J.P. Extending the spontaneous preference test of recognition: Evidence of object-location and object-context recognition. **Behav. Brain Res**. 1999, 99, 191–200.

DRINGEN, R.; GUTTERER, J. M.; HIRRLINGER, J. Glutathione metabolism in brain: Metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 16, 2000.

DRINGEN, R.; HIRRLINGER, J. Glutathione pathways in the brain. **Biological Chemistry**, v. 384, n. 4, 1 abr. 2003.

DRINGEN, R.; SCHEIBER, I. F.; MERCER, J. F. B. Copper metabolism of astrocytes. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 5, n. MAR, 2013.

ERUSTES, A.G.; STEFANI, F.Y.; TERASHIMA, J.Y.; STILHANO, R.S.; MONTEFORTE, P.T.; PEREIRA, G.J.S.; HAN, S.W.; CALGAROTTO, A. K.; HSU, Y.; URESHINO, R.P.; BINCOLETTO, C.; SMAILI, S.S. Overexpression of a-synuclein in an astrocyte cell line promotes autophagy inhibition and apoptosis. **Wiley Periodicals, Inc.**, p. 1-12, 2017.

FELIPPI, M.; GROSSI, F.; NOGUEIRA, A.C.; KUNIYOSHI, Y.S. Morfologia da flor, do fruto e da plântula; ontogênese e germinação de *Chrysophyllum gonocarpum* (Mart. & Eichl.). **Florestas**, Brasil, v.38, n.2,p. 229-243. 2008.

FERRY, B.; GERVASONI, D.; VOGT, C. **Stereotaxic Neurosurgery in Laboratory Rodent—Handbook on Best Practices**, 1st ed.; Springer: Paris, France, 2014; pp. 1–198.

FIEST, K. M. et al. Prevalence and incidence of epilepsy. **Neurology**, v. 88, n. 3, p. 296–303, 17 jan. 2017.

FISHER, R. S. et al. Epileptic seizures and epilepsy: Definitions proposed by the International League Against Epilepsy (ILAE) and the International Bureau for Epilepsy (IBE). **Epilepsia**, v. 46, n. 4, p. 470–472, abr. 2005.

FISHER, R. S. et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 58, n. 4, p. 522–530, 1 abr. 2017.

FURTADO, M. D. A. et al. Behavioral, Morphologic, and Electroencephalographic Evaluation of Seizures Induced by Intrahippocampal Microinjection of Pilocarpine. **Epilepsia**. v. 43, 2002.

GAMA, L.U.; BARBOSA, A.A.; OLIVEIRA, P.E. Sistema sexual e biologia floral de *Pouteriarami* flora e *P. torta* (Sapotaceae). **Revista Brasileira de Botânica**. Uberlândia, v. 34, n. 3. 2011.

GAO, J. et al. Glutamate and GABA imbalance promotes neuronal apoptosis in hippocampus after stress. **Medical Science Monitor**, v. 20, p. 499–512, 27 mar. 2014.

GAO, W. et al. Glutathione homeostasis is significantly altered by quercetin via the Keap1/Nrf2 and MAPK signaling pathways in rats. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 62, n. 1, p. 56–62, 1 jan. 2018.

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

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

GREWAL, G. K. et al. Effect of oxidative stress on ABC transporters: Contribution to epilepsy pharmacoresistance. **Molecules**, v. 22, n. 3, 1 mar. 2017.

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

GUERRIERO, R. M.; GIZA, C. C.; ROTENBERG, A. Glutamate and GABA Imbalance Following Traumatic Brain Injury. **Current Neurology and Neuroscience Reports**. v. 15, n. 5, 2015.

GUZZO, E. F. M.; PEDRINI, D. B.; BREIGEIRON, M. K. Inflammatory signs and epileptic crisis in patients admitted in an emergency unit. **Revista gaucha de enfermagem**, v. 41, p. e20190074, 2020.

HADERA, M. G. et al. Modification of Astrocyte Metabolism as an Approach to the Treatment of Epilepsy: Triheptanoin and Acetyl-L-Carnitine. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 1–2, p. 86–95, 3 fev. 2016.

HANSEN, N.; MANAHAN-VAUGHAN, D. Dopamine D1/D5 receptors mediate informational saliency that promotes persistent hippocampal long-term plasticity. **Cerebral Cortex**, v. 24, n. 4, p. 845–858, 2014.

HART. Epidemiology, natural history and classification of epilepsy. **Medicine (United Kingdom)**, v. 40, n. 9, p. 471–476, 2012.

HARTMAN, A. L. et al. Seizure tests distinguish intermittent fasting from the ketogenic diet. **Epilepsia**, v. 51, n. 8, p. 1395–1402, 2010.

HASHIMOTO, T. et al. Alterations in GABA-related transcriptome in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, v. 13, n. 2, p.

147–161, fev. 2008.

HIRAGI, T.; IKEGAYA, Y.; KOYAMA, R. Microglia after Seizures and in Epilepsy. **Cells**, v. 7, n. 4, p. 26, 28 mar. 2018.

HIROSE, S. Mutant GABAA receptor subunits in genetic (idiopathic) epilepsy. In: **Progress in Brain Research**. [s.l.] Elsevier B.V., 2014. v. 213p. 55–85.

HONG, S. et al. The PPARc agonist rosiglitazone prevents cognitive impairment by inhibiting astrocyte activation and oxidative stress following pilocarpine-induced status epilepticus. **Neurological Sciences**, v. 33, n. 3, p. 559–566, jun. 2012.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 577–580, 1981.

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

HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **J. Mol. Graph.** 1996, 14, 33–38.

IUCN - The World Conservation Union. 2008. IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em. Acesso em 02 maio 2016.

JABS, R.; SEIFERT, G.; STEINHÄUSER, C. **Astrocytic function and its alteration in the epileptic brain**. Epilepsia. **Anais...**Blackwell Publishing Inc., 2008

JACKSON, M. F.; ESPLIN, B.; ČAPEK, R. Inhibitory Nature of Tiagabine-Augmented GABA<sub>A</sub> Receptor-Mediated Depolarizing Responses in Hippocampal Pyramidal Cells. **Journal of Neurophysiology**, v. 81, n. 3, p. 1192–1198, 1 mar. 1999.

JIN, X. T. et al. Localization and function of GABA transporters GAT-1 and GAT-3 in the basal ganglia. **Frontiers in Systems Neuroscience**, v. 5, n. JULY 2011, 28 jul. 2011.

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

KANDEL, E. R.; DUDAI, Y.; MAYFORD, M. R. The molecular and systems biology of memory. **Cell**, v. 157, n. 1, p. 163–186, 27 mar. 2014.

KHURGEL, M.; IVY, G. O. Astrocytes in kindling: Relevance to epileptogenesis. **Epilepsy Research**. v. 26, n. 1, 1996.

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

LASOÑ, W.; CHLEBICKA, M.; REJDAK, K. Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 4, p. 787–801, 2013.

LERMA, J.; MARQUES, J. M. Kainate receptors in health and disease. **Neuron**, v. 80, n. 2, p. 292–311, 16 out. 2013.

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

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

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa-SP: Instituto Plantarum, 2008.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs. **Epilepsy Research**, v. 50, p.3-16, 2002.

LÖSCHER, W.; SCHMIDT, D. Modern antiepileptic drug development has failed to 72 deliver: Ways out of the current dilemma. **Epilepsia**, v. 52, n. 4, p. 657–678, 2011.

LÖSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, v. 20, n. 5, p. 359–368, 2011.

LUEPTOW, L. M. Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice. **Journal of Visualized Experiments**, v. 2017, n. 126, p. 55718, 1 ago. 2017.

LUSTOSA, I.R. **Avaliação do Modelo de Status Epilepticus por Ouaraína: da Administração Intracerebroventricular à Análise de Parâmetros Comportamentais e indicadores de dano Cerebral**. Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, 2016.

MARCHI, N.; GRANATA, T.; JANIGRO, D. Inflammatory pathways of seizure disorders. **Trends in Neurosciences**, v. 37, n. 2, 2014.

MARIA GARCIA LEANDRO, L. et al. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DE EXTRATOS METANÓLICO E HEXÂNICO DA CASCA DE *Sideroxylon obtusifolium*. **Revista e-ciência**, v. 1, n. 1, 2013.

MARQUES, J. B. **Comércio e conservação de três espécies vegetais da Caatinga ameaçadas de extinção e de uso medicinal em duas áreas do Cariri oriental Paraibano**. João Pessoa, 2008. Originalmente apresentada como dissertação de

mestrado, Programa Regional de Pós-Graduação em desenvolvimento e Meio AMBIENTE- Universidade Federal da Paraíba / Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa-PB, 2008. Disponível em <  
[http://www.prpg.ufpb.br/prodema/novosite/smartgc/uploads/arquivos/janine\\_barreto.pdf](http://www.prpg.ufpb.br/prodema/novosite/smartgc/uploads/arquivos/janine_barreto.pdf)  
> Acesso em 02 de maio de 2016>.

MENDES DE FREITAS, R. Sistemas de Neurotransmissão Envolvidos no Modelo de Epilepsia: Uma Revisão de Literatura Neurotransmitter Systems Involved in Epilepsy Model: A Literature Review. **Rev Neurocienc**, v. 19, n. 1, p. 128–138, 2011.

MONTEIRO, M. H. D. A.; NEVES, L.J & ANDREATA, R. H. P. Levantamento e distribuição das espécies de Pouteria Aubl. (Sapotaceae) do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v.5, n.2, p.369-371. 2007.

N, K.; V, G. The Dual Function of Reactive Oxygen/Nitrogen Species in Bioenergetics and Cell Death: The Role of ATP Synthase. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, 2016.

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

PAGADALA, N.S.; SYED, K.; TUSZYNSKI, J. Software for molecular docking: A review. **Biophys. Rev.** 2017, 9, 91–102.

PALAZZO, F. M. A.; DIAS-NETO, A. O. ; MONTEIRO, M. H. D. A. ; ANDREATA, R. H. P. Sinopse comentada de Sapotaceae no município de Rio das Ostras (RJ, Brasil). **Pesquisa Botânica**. São Leopoldo: Instituto Anchieta de Pesquisas, v. 61, p.293-306, 2010.

PAXINOS, G.; FRANKLIN, K.B.J. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**, 2nd ed.; Academic Press: San Diego, CA, USA, 2001; pp. 1–264.

PEDROSA, K. M. GOMES, D. S.; LUCENA, C. M.; PEREIRA, D. D. ; SILVINO, G.S.; LUCENA, R. F. P. Uso e disponibilidade local de Sideroxylon obtusifolium

(Roem. & Schult.) T.D. PENN. (Quixabeira) em três regiões da depressão sertaneja da Paraíba, Nordeste do Brasil. **Biofar**, v.12, p. 158-183.2012.

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

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

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

RHO, J.M.; DONEVAN, S.D.; ROGAWSKI, M.A. Mechanism of action of the anticonvulsant felbamate: Opposing effects on N-methyl-D-aspartate and  $\gamma$ -aminobutyric acid A receptors. **Annals Of Neurology**, v. 35, n. 2, p.229-234, 1994.

RODRÍGUEZ-MORENO, A. **Kainate-type glutamate receptors and epilepsy** [5]**Revista de Neurologia** Revista de Neurologia, , 2006.

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

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

ROWLEY, N. M. et al. Glutamate and GABA synthesis, release, transport and metabolism as targets for seizure control. **Neurochemistry International**, v. 61, n. 4, p. 546–558, set. 2012.

SANTOS, E.B. DANTAS, G.S.; SANTOS, H.B.; DINIZI, M.F.F.M.; SAMPAIO, F.C. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, n. 1B, p.321-324. 2009.

SARHAN, S.; SEILER, N. Proline and proline derivatives as anticonvulsants. **General Pharmacology**, v. 20, n. 1, p. 53–60, 1989.

SARTER, M.; BODEWITZ, G.; STEPHENS, D.N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist  $\beta$ -carbolines. **Psychopharmacology (Berl.)**1988, 94, 491–495.

SCHACHTER, S. C. Pharmacology and clinical experience with tiagabine. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 2, n. 1, p. 179–187, 2001.

SCHARTZ, N. D. et al. Spatiotemporal profile of Map2 and microglial changes in the hippocampal CA1 region following pilocarpine-induced status epilepticus. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 6 jul. 2016.

SCIMEMI, A. Structure,function,and plasticity of GABA transporters. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, 17 jun. 2014.

SCORZA, F.A.; ARIDA, R.M.; CYSNEIROS, R.M.; SCORZA, C.A.; ALBUQUERQUE, M.; DE CAVALHEIRO, E.A. Estudo qualitativo da formação hipocampal de animais hipertensos com epilepsia. **Arq. Neuropsiquiatr.** 2005, 63, 283–288.

SHAPIRO, L. A.; WANG, L.; RIBAK, C. E. Rapid astrocyte and microglial activation following pilocarpine-induced seizures in rats. **Epilepsia**. v. 49, 2008.

SHIMADA, T. et al. Role of inflammatory mediators in the pathogenesis of epilepsy. **Mediators of Inflammation**.v. 2014, 2014.

SHIN, E. J. et al. Role of oxidative stress in epileptic seizures. **Neurochemistry International**, v. 59, n. 2, 2011.

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

SILVA, M.D. **Estudo Farmacobotânico de Três Espécies Medicinais da Caatinga em Pernambuco**. Recife, 2008. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Botânica - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2008. Disponível em:. Acesso em: 11 Julho, 2016.

SINHA, S. et al. Do cytokines have any role in epilepsy? **Epilepsy Research**, v. 82, n. 2–3, p. 171–176, dez. 2008.

STEPHENSON, J. et al. Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. **Immunology**. v. 154, n. 2, 2018.

STEWARD, O. et al. Neuronal activity up-regulates astroglial gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 15, p. 6819–6823, 1991.

STEWARD, O.; KELLEY, M. S.; SCHAUWECKER, P. E. Signals That Regulate Astroglial Gene Expression: Induction of GFAP mRNA Following Seizures or Injury Is Blocked by Protein Synthesis Inhibitors. **Experimental Neurology**, v. 148, n. 1, p. 100–109, 1997.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 2, 2010.

TAKEMOTO, Y.; SEMBA, R. Immunohistochemical evidence for the localization of neurons containing the putative transmitter L-proline in rat brain. **Brain Research**, v. 1073–1074, n. 1, p. 311–315, fev. 2006.

TESCAROLLO, F. C. et al. Role of Adenosine in Epilepsy and Seizures. **Journal of**

**Caffeine and Adenosine Research**, v. 10, n. 2, p. 45–60, 1 jun. 2020.

TRINKA, E. et al. A definition and classification of status epilepticus - Report of the ILAE Task Force on Classification of Status Epilepticus. **Epilepsia**, v. 56, n. 10, p. 1515–1523, 1 out. 2015.

TSUKADA, Y. et al. Suppressive Effects of Various Amino Acids against Ouabain-Induced Seizures in Rats. **Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien des Sciences Neurologiques**, v. 1, n. 4, p. 214–221, 1974.

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

VICTOR NADLER, J.; CUTHBERTSON, G. J. Kainic acid neurotoxicity toward hippocampal formation: Dependence on specific excitatory pathways. **Brain Research**, v. 195, n. 1, p. 47–56, 11 ago. 1980.

WALDBAUM, S.; PATEL, M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: A contributing link to acquired epilepsy? **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 42, n. 6, p. 449–455, dez. 2010.

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

WYATT-JOHNSON, S. K.; HERR, S. A.; BREWSTER, A. L. Status epilepticus triggers time-dependent alterations in microglia abundance and morphological phenotypes in the hippocampus. **Frontiers in Neurology**, v. 8, n. DEC, 18 dez. 2017.

XIAN, P. et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes as a nanotherapeutic agent for amelioration of inflammation-induced astrocyte alterations in mice. **Theranostics**, v. 9, n. 20, p. 5956–5975, 2019.

XU, S. et al. Role of Astrocytes in Post-traumatic Epilepsy. **Frontiers in Neurology**, v.

10, 2019.

ZHANG, L. et al. L-proline: A highly effective cryoprotectant for mouse oocyte vitrification. **Scientific Reports**, v. 6, 14 jul. 2016.

ZHAO, X. et al. Noninflammatory Changes of Microglia Are Sufficient to Cause Epilepsy. **Cell Reports**, v. 22, n. 8, p. 2080–2093, 20 fev. 2018.

## APÊNDICES

## APÊNDICES 1 - Certificado CEUA



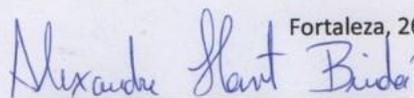
UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 – Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430970 Fortaleza – CE

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação anticonvulsivante e antiepiléptica da fração contendo n-metil-trans-4-hidroxi-l-prolina isolado das folhas de *Sideroxylon obtusifolium*”, protocolo 59/17, sob responsabilidade da Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização, pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de nº 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 22 de fevereiro de 2018.

Vigência do projeto	fevereiro/2018 – fevereiro/2020
Espécie/Linhagem	Camundongo Swiss
Nº de Animais	110
Peso	20 – 30 g
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da UFC



Fortaleza, 26 de fevereiro de 2018.

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá  
Coordenador da CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
ALEXANDRE HAVT BINDÁ

COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO COM  
ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA SIAPE: 1666962

## APÊNCIDE 2- PUBLICAÇÕES

International Journal of  
Molecular Sciences

Article

**A Proline Derivative-Enriched Fraction from *Sideroxylon obtusifolium* Protects the Hippocampus from Intracerebroventricular Pilocarpine-Induced Injury Associated with *Status Epilepticus* in Mice**

Pedro Everson Alexandre de Aquino <sup>1</sup>, Jéssica Rabelo Bezerra <sup>1</sup>,  
 Tyciane de Souza Nascimento <sup>1</sup>, Juliete Tavares <sup>1</sup>, Ítalo Rosal Lustosa <sup>2</sup>,  
 Adriano José Maia Chaves Filho <sup>1</sup>, Melina Mottin <sup>3</sup>, Danielle Macêdo Gaspar <sup>1</sup>,  
 Geanne Matos de Andrade <sup>1</sup>, Kelly Rose Tavares Neves <sup>1</sup>, Giuseppe Biagini <sup>4,5,\*</sup>,  
 Edilberto Rocha Silveira <sup>6</sup> and Glauce Socorro de Barros Viana <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza 60430-270, Brazil; pedroeverson.alexandre@gmail.com (P.E.A.d.A.); jrabelo.b@gmail.com (J.R.B.); tycianesouza13@gmail.com (T.d.S.N.); juliete.tavares@hotmail.com (J.T.); adrianoafilho@hotmail.com (A.J.M.C.F.); daniellesm2000@yahoo.com (D.M.G.); gmatos@ufc.br (G.M.d.A.); kelly.rose@hotmail.com (K.R.T.N.)

<sup>2</sup> PhD Program in Clinical and Experimental Medicine, University of Modena and Reggio Emilia, 41121 Modena, Italy; italo.rosal@gmail.com

<sup>3</sup> Laboratory of Molecular Modeling and Drug Design, LabMol, Faculty of Pharmacy, Federal University of Goiás, Goiás 74605-050, Brazil; melinamottin@gmail.com

<sup>4</sup> Laboratory of Experimental Epileptology, Department of Biomedical Metabolic and Neural Sciences, University of Modena and Reggio Emilia, 41121 Modena, Italy

<sup>5</sup> Center for Neuroscience and Neurotechnology, University of Modena and Reggio Emilia, 41121 Modena, Italy

<sup>6</sup> Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza 60455-970, Brazil; edil@ufc.br

\* Correspondence: gbiagini@unimore.it (G.B.); gbviana@live.com (G.S.d.B.V.)

Received: 23 May 2020; Accepted: 8 June 2020; Published: 11 June 2020



## The *N*-Methyl-(2*S*, 4*R*)-*trans*-4-hydroxy-L-proline-Enriched Methanol Fraction from *Sideroxylon obtusifolium* Shows an Anticonvulsant Activity Associated with its Anti-inflammatory/Antioxidant Actions



### Authors

Pedro Everson Alexandre de Aquino<sup>1</sup>, Ítalo Rosal Lustosa<sup>1</sup>, Caren Nádya Soares de Sousa<sup>1</sup>, Adriano José Mala Chaves-Filho<sup>1</sup>, Francisco Arnaldo Viana Lima<sup>1</sup>, Alan Diego da Conceição Santos<sup>2</sup>, Nilce Viana Gramosa<sup>2</sup>, Edilberto Rocha Silveira<sup>2</sup>, Glaucete Socorro de Barros Viana<sup>1</sup>

### Affiliations

- 1 Laboratory of Neuropharmacology, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil
- 2 Department of Organic and Inorganic Chemistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

### Key words

*Sideroxylon obtusifolium*, Sapotaceae family, pilocarpine-induced convulsions, PTZ-induced convulsions, GABAergic system

received 04.09.2020

revised 26.10.2020

accepted 30.11.2020

### ABSTRACT

Epilepsy is a neurological disorder characterized by recurrent seizures, resulting from excessive neuronal discharges. *Sideroxylon obtusifolium* is used in Brazil for its anti-inflammatory/antioxidant properties, known to be involved with epilepsy. The anticonvulsant effects of the methanol fraction from *S. obtusifolium* leaves, rich in *N*-methyl-(2*S*,4*R*)-*trans*-4-hydroxy-L-proline, were investigated on pilocarpine- and pentylenetetrazole-induced convulsion models. Mice were pretreated with *N*-methyl-(2*S*,4*R*)-*trans*-4-hydroxy-L-proline (50, 100, 200 mg/kg, p.o.) and, 1 h later, by pilocarpine (400 mg/kg, i.p.) or pentylenetetrazole (80 mg/kg, i.p.). The animals were observed for latency to the first convulsion and latency to death. Immediately after death, brain areas from the pilocarpine groups were harvested for biochemical measurements. The la-

## **APÊNCIDE 3 - Estudo químico *Sideroxylon obtusifolium*: qHNMR para a decocção de folhas secas e frações solúveis e residuais subsequentes de metanol após a extração de metanol**

### **1 Introdução**

*Sideroxylon obtusifolium* (Humb. ex Roem. & Schult.) T.D. Penn. (Família Sapotaceae) é uma planta medicinal popularmente conhecida como "quixabeira" e utilizada no Brasil devido as suas atividades analgésicas e anti-inflamatórias já demonstradas em modelos de nocicepção e inflamação (ARAUJO-NETO et al., 2010; DE AQUINO et al., 2017). Além do envolvimento do estresse oxidativo e da neuroinflamação em convulsões epiléticas, também investigamos as possíveis propriedades anticonvulsivantes da fração de metanol rica em *N*-metil-(2S,4R) -*trans*-4-hidroxi-1-proline (NMP) no modelo de convulsões induzidas por pilocarpina em camundongos. Este composto está presente na decocção das folhas de *S. obtusifolium*, e principalmente na fração solúvel de metanol após a extração de metanol. O objetivo das análises atuais é a caracterização química das três frações preparadas a partir das folhas secas de *S. obtusifolium* (decocção, metanol e residual) realizadas por um método quantitativo de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H(qHNMR) a fim de acessar a quantidade de NMP contida em cada fração. qHNMR é um método adequado para a quantificação absoluta de compostos puros (sintetizados ou isolados), bem como para compostos-alvo em misturas.

### **2 Material e métodos**

#### **2.1 Químicos**

Óxido de deutério (D<sub>2</sub>O; 99,9%) e 3-( rimetilsilil) -1- Ácido propano sulfônico sal de sódio (DSS; 97% de pureza) foram obtidos de Sigma-Aldrich®.

#### **2.2 qHNMR análise**

##### ***Amostras***

Para a determinação quantitativa, 5 mg das amostras (decoção, frações residuais) foram dissolvidas em 1 mL de solução DSS preparada em óxido de deutério (1,83 mM). Desta solução, 0,6 mL foi transferido para o tubo NMR para análise posterior.

### ***Espectroscopia NMR***

Espectros H NMR foram registrados utilizando um Avance DRX-500 espectrômetro operando a uma frequência de  $^1\text{H}$  de 499,6 MHz, equipado com uma sonda BBI de 5 mm. Os espectros foram adquiridos sem rotação amostral utilizando os seguintes parâmetros: número de transitórios, 16; largura espectral, 10 ppm; tempo de aquisição, 6,03 s; atraso de relaxamento, 20 s; domínio do tempo, pontos de dados 64K; e temperatura, 298K. O tempo experimental total foi de aproximadamente 7 minutos. O brilho, afinação, correspondência e largura do pulso foram cuidadosamente ajustados para cada amostra.

Os FIDs foram fourier transformados com ampliação de linha (LB) = 0,3 Hz. Os espectros resultantes foram manualmente corrigidos na linha de base e referenciados a ressonância DSS- $\text{d}_6$  (grupos de metila) a 0,0 ppm. Todos os dados foram processados usando o software Topspin 3.1 da Bruker (Bruker BioSpin, Bremen, Alemanha). Para análise quantitativa, utilizou-se a área de pico e os pontos de início e final da integração de cada pico foram selecionados manualmente.

### ***$^1\text{H}$ NMR análise de N-Metil-trans-4-hidroxi-L-proline(NMP) em amostras de *S. obtusifolium****

A concentração(mg/g peso seco) dos compostos nas amostras estudadas, foi determinada utilizando a seguinte equação geral:

$$\text{Content (mg g}^{-1}\text{)} = \frac{I_A \times H_{DSS} \times M_A \times C_{DSS}}{H_A \times I_{DSS} \times W_S \times M_{DSS}}$$

Onde  $I_A$  e  $I_{DSS}$  são o valor integral do sinal dos analitos e DSS- $\text{d}_6$ , respectivamente;  $H_A$  e  $H_{DSS}$  representam o número de prótons de sinal do analito e DSS- $\text{d}_6$ , respectivamente;  $M_A$  e  $M_{DSS}$  correspondem ao peso molecular do analito e DSS-

$d_6$ , respectivamente;  $C_{DSS}$  é a concentração DSS- $d_6$  na solução de estoque; e, finalmente,  $W_S$  é a concentração da amostra por peso ( $g g^{-1}$ ).

### 3 Resultados e incisão D

#### 3.1 – Análise quantitativa de $^1H$ NMRs

O método qHNMR foi utilizado para determinar a concentração *N*-Metil-*trans*-4-hidroxi-*L*-proline (NMP) na decocção das folhas de *S. obtusifolium*, bem como das frações solúveis e residuais de metanol após a extração de metanol. As áreas integrais para a ressonância a 3,07 ppm, relacionadas ao grupo metil ligado ao nitrogênio de NMP foram utilizadas para a quantificação. O espectro  $^1H$  NMR para cada amostra sob investigação, bem como o sinal usado para a quantificação é mostrado na Figura 1. A atribuição de todos os sinais NMP foi realizada utilizando uma combinação de técnicas de NMR 1D e 2D.  $^1H$  e  $^{13}C$ , valores de mudança química obtidos no presente trabalho estão de acordo com os dados publicados anteriormente (DE AQUINO et al., 2017).

Como pode ser observado na Figura 1, a solubilização de todas as amostras em  $D_2O$  foi suficiente para fornecer a resolução necessária para a análise qHNMR, com uma boa separação da linha de base do sinal escolhido para a determinação quantitativa. Para avaliar a seletividade do método, foram realizados experimentos HSQC e COSY revelando que não há contribuição de outros sinais sobrepostos ao sinal selecionado. Além disso, também foram adquiridos espectros de  $^1H$  NMR de  $D_2O$  e o padrão interno (Figura 2).

A quantificação foi baseada no método padrão interno, que é amplamente aceito como a abordagem primária da qNMR (HOLZGRABE, 2010; PAULI; JAKI; LANKIN, 2005; SHAO et al., 2007). A integral do sinal em 0,0 ppm, relacionada a 9 H de três grupos de metila de DSS, foi utilizada na determinação do conteúdo de NMP (BHARTI; ROY, 2012; STERLING et al., 2013). Tal sinal não se sobrepôs a qualquer ressonância dos constituintes nas amostras, além disso, estava próximo das ressonâncias o que é bom para minimizar os efeitos de pulso fora da ressonância (YANG; WANG; KONG, 2012).

O maior teor de NMP, como esperado, foi observado na fração de metanol ( $121,7 \pm 5,1\%$  mg  $g^{-1}$ ), seguido pelo decocção ( $80,3 \pm 5,6\%$  mg  $g^{-1}$ ) e pela fração residual ( $12,4 \pm 4,3\%$  mg  $g^{-1}$ ). A precisão do método qHNMR poderia ser avaliada pelos valores de RSD% das três medidas de replicação que devem ser consideradas como medida do erro

experimental e de processamento. Os valores de RSD% das amostras oscilaram entre 4,3% e 5,6%.

A reprodutibilidade da metodologia foi avaliada por meio da preparação e análise das amostras em três dias diferentes. O teste ANOVA (com o teste de Tukey) para esses dados mostrou uma diferença significativa apenas para amostras de frações residuais ( $p > 0,05$ ); neste caso, a falta de reprodutibilidade pode ser justificada por certas dificuldades enfrentadas durante o procedimento de solubilização da amostra e pelo baixo sinal à taxa de ruído do sinal escolhido para a quantificação. Para as análises quantitativas, utilizou-se um número fixo de transitórios para todos os espectros e, nas concentrações mais baixas, o sinal para a taxa de ruído obtido foi limitado, reduzindo assim a precisão da integração. Essa condição seria superada pelo aumento do número de transitórios.

Para avaliar a robustez do método, o conteúdo MNP também foi determinado utilizando um espectrômetro de diferentes resistências de campo  $B_0$  (300 MHz). A comparação entre os conteúdos foi realizada através do teste de Tukey que revelou diferença significativa apenas para os valores obtidos para a fração residual. Os valores do RSD variaram de 7,5% a 13,5%. Esses dados demonstraram que o método qNMR estabelecido era preciso, confiável, sensível e suficiente para a determinação de conteúdo de MHP na fração de decocção e metanol. Para determinar o teor de NMP na fração residual deve-se utilizar um maior número de transientes.

## Referências

ARAÚJO-NETO, V. et al. Benefícios terapêuticos da *Sideroxylon obtusifolium* (Humb. ex Roem. & Schult.) T.D. Penn., Sapotaceae, em modelos experimentais de dor e inflamação. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 6, p. 933–938, 2010.

BHARTI, S. K.; ROY, R. Quantitative  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 35, p. 5–26, maio 2012.

DE AQUINO, P. E. A. et al. The anti-inflammatory effects of N-methyl-(2S,4R)-trans-4-hydroxy-l-proline from *Syderoxylon obtusifolium* are related to its inhibition of TNF-alpha and inflammatory enzymes. **Phytomedicine**, v. 24, p. 14–23, jan. 2017.

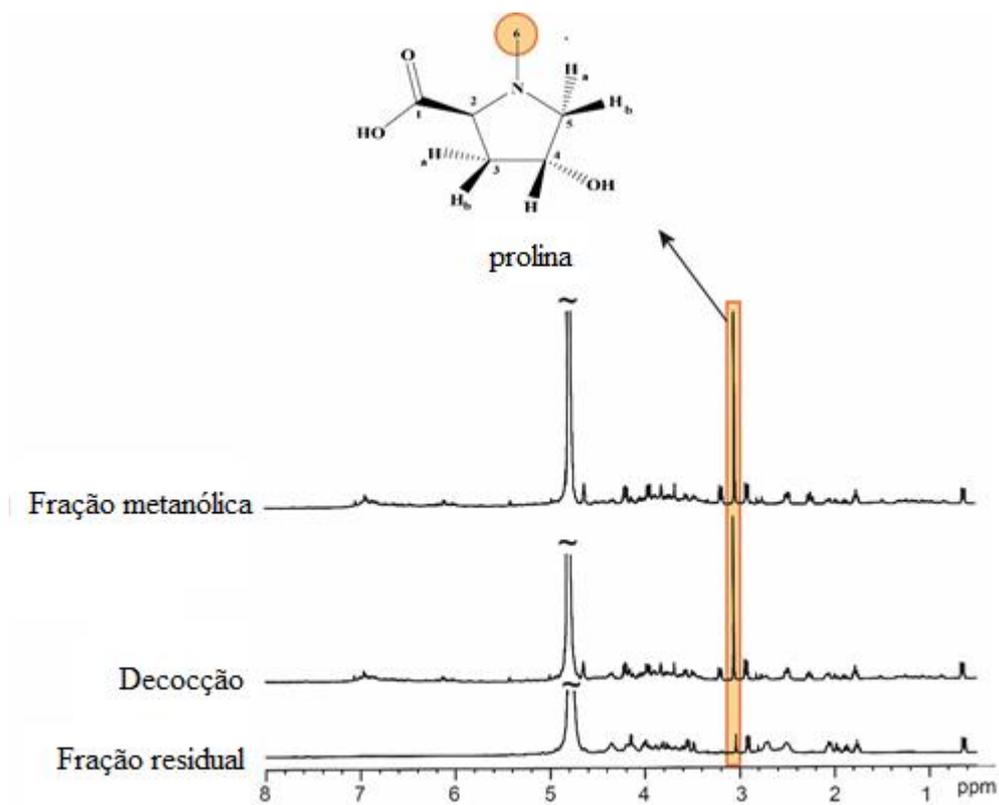
HOLZGRABE, U. Quantitative NMR spectroscopy in pharmaceutical applications. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v. 57, n. 2, p. 229–240, 2010.

PAULI, G. F.; JAKI, B. U.; LANKIN, D. C. Quantitative  $^1\text{H}$  NMR: Development and Potential of a Method for Natural Products Analysis §. **J. Nat. Prod.**, v. 68, n. 1, p. 133–149, 2005.

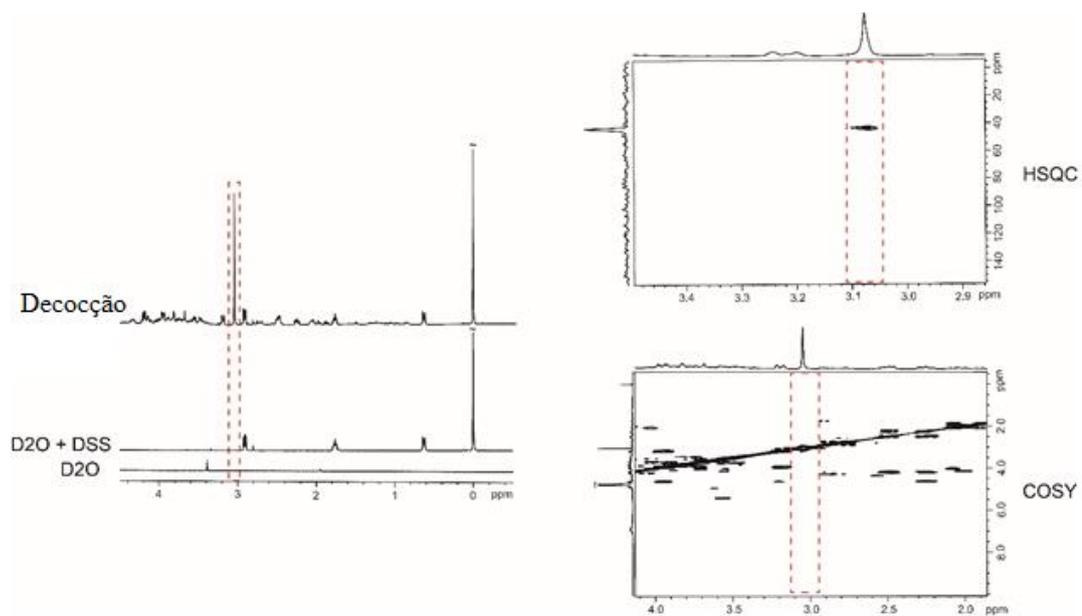
SHAO, G. et al. Calibration by NMR for quantitative analysis: p-Toluenesulfonic acid as a reference substance. **Journal of Chromatography A**, v. 1138, n. 1–2, p. 305–308, jan. 2007.

STERLING, C. et al.  $^1\text{H}$ -NMR Quantification of Major Saccharides in Açai Raw Materials: a Comparison of the Internal Standard Methodology with the Absolute Intensity qNMR Method. **Phytochemical Analysis**, v. 24, n. 6, p. 631–637, nov. 2013.

YANG, M.; WANG, J.; KONG, L. Quantitative analysis of four major diterpenoids in *Andrographis paniculata* by  $^1\text{H}$  NMR and its application for quality control of commercial preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 70, p. 87–93, nov. 2012.



**Figura 1:** Espectros de <sup>1</sup>H NMR de amostras de *S. obtusifolium* (decoção, metanol e frações residuais). A estrutura química do MNP, juntamente com o respectivo sinal utilizado para a análise qHNMR, são retratadas.



**Figura 2:** Espectros de <sup>1</sup>H NMR sobrepostos de D2O, D2O+DSS e decocção, bem como experimentos 2D (HSQC e COSY), utilizados para avaliar a seletividade do método.