



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR
(ÁREA DE CONCENTRAÇÃO NEUROCIÊNCIAS)**

MOISÉS HAMOY

**CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL E ELETROENCEFALOGRÁFICA DAS
CONVULSÕES INDUZIDAS PELO CUNANIOL E ACETATO DE CUNANIOL
EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DE *Clibadium sylvestre*, UM MODELO DE
CONVULSÃO GENERALIZADA EXPERIMENTAL EM RATOS (WISTAR)**

BELÉM-PARÁ

2011

MOISÉS HAMOY

**CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL E ELETROENCEFALOGRÁFICA DAS
CONVULSÕES INDUZIDAS PELO CUNANIOL E ACETATO DE CUNANIOL
EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DE *Clibadium sylvestre*, UM MODELO DE
CONVULSÃO GENERALIZADA EXPERIMENTAL EM RATOS (WISTAR)**

Tese de doutorado apresentado ao
Programa de Pós-graduação em
Neurociência e Biologia Celular do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Pará.

Área de concentração: Neurociências

**Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins
do Nascimento**

BELÉM-PARÁ

2011

Hamoy, Moisés.

Caracterização comportamental e eletroencefalográfica das convulsões induzidas pelo cunaniol e acetato de cunaniol extraídos das folhas de *Clibadium sylvestre*, um modelo de convulsão generalizada experimental em ratos (wistar)

Moisés Hamoy – Belém- PA, 2011.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Pará. Instituto de Ciências Biológicas. Área de Concentração: Neurociências. Linha de Pesquisa:
Epilepsia

MOISÉS HAMOY

CARACTERIZAÇÃO COMPORTAMENTAL E ELETROENCEFALOGRÁFICA DAS CONVULSÕES INDUZIDAS PELO CUNANIOL E ACETATO DE CUNANIOL EXTRAÍDOS DAS FOLHAS DE *Clibadium sylvestre*, UM MODELO DE CONVULSÃO GENERALIZADA EXPERIMENTAL EM RATOS (WISTAR)

**Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Neurociência e Biologia celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.
Área de concentração: Neurociências**

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento

O projeto foi desenvolvido nos Laboratórios de Neuroquímica Molecular e Celular (UFPA), Laboratório de Biofísica Celular (UFPA), Laboratório de Neurofisiologia Eduardo Osvaldo Cruz (UFPA) do Instituto de Ciências Biológicas e Laboratório de Cromatografia Líquida (LABCROL) do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus de Belém

MOISÉS HAMOY

Caracterização comportamental e eletroencefalográfica das convulsões induzidas pelo cunaniol e acetato de cunaniol extraídos das folhas de *Clibadium sylvestre*, um modelo de convulsão generalizada experimental em ratos (wistar)

Banca Examinadora

Prof. Dr^a. Karen da Costa Calaza
Universidade Federal Fluminense -UFF

Prof. Dr. Manoel da Silva Filho
Instituto de Ciências Biológicas (ICB)- UFPA

Prof. Dr. Fernando Allan de Farias Rocha
Instituto de Ciências Biológicas (ICB)- UFPA

Suplente

Prof. Dr. Anderson Raiol Rodrigues
Instituto de Ciências Biológicas (ICB)- UFPA

Julgado em :15/12/2011

Conceito: Aprovado

Dedico esta Tese,

A minha esposa Karla Mika Otake Hamoy e aos meus filhos Akira Otake Hamoy, Maria Klara Otake Hamoy e Tsuyoshi Otake Hamoy, e aos meus pais Felix Hamoy e Maria Lua De Sousa Hamoy vocês são a minha razão de viver, amo muito todos vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter proporcionado este momento em minha vida.

Agradeço à minha família, em especial à minha esposa Karla Mika Otake Hamoy pela compreensão e força nos momentos difíceis, sendo o meu ponto de equilíbrio e refúgio.

Agradeço ao Professor e Orientador Dr. José Luiz Martins do Nascimento, pela dedicação, conhecimento e exemplo no qual tento me espelhar.

Agradeço ao Professor Dr. Manoel da Silva Filho pelo conhecimento e apoio, dedicando parte do seu tempo para direcionar de maneira adequada o trabalho.

Agradeço aos professores Milton Nascimento da Silva e Consuelo Yumiko Yoshioka e Silva e ao mestre Raimundo Negrão Neto pelo apoio do Laboratório de Cromatografia Líquida (LABCROL), na extração de material e análises cromatográficas.

Agradeço ao Professor Dr. Fernando Alan de Farias Rocha, pela dedicação, entusiasmo e humildade.

À Pós- Graduação de Neurociências e Biologia Celular e a Universidade Federal do Pará.

Agradeço ao Professor Luis António Maués, pela amizade e dedicação.

Agradeço pelo apoio ao professor Rômulo Augusto Feio Farias.

Agradeço a todos os Professores e Colegas do Laboratório de Neuroquímica que de alguma forma, em algum momento participaram deste trabalho.

Agradeço a todos os alunos e ex-alunos que me motivaram, e me ensinaram que o aprender é constatar, e que todo momento devemos ter humildade, fé e esperança.

Resumo

A *Clibadium sylvestre* é largamente distribuída na região amazônica, onde é conhecida como cunambi ou cunhambi, e sua ingestão causa embriaguez, ou mesmo morte dos peixes, demonstrando propriedade ictiotóxica. Os compostos existentes nas folhas da *Clibadium sylvestre* são poderosos estimulantes do sistema nervoso central, suas folhas contêm substâncias com potencial convulsivante. As alterações eletroencefalográficas, crise convulsiva e os efeitos de drogas no controle do comportamento convulsivo foram estudados bem como a via metabólica dos componentes acetato de cunaniol e cunaniol. O trabalho foi realizado em ratos wistar machos adultos, tratados com DE₅₀ de 2,92 mg/kg ou DL₅₀ de 3,64 mg/kg de cunaniol a via de administração utilizada foi a intraperitoneal. Após a administração do cunaniol, a evolução das crises convulsivas foram observadas, permitindo classificá-las de acordo com a intensidade de apresentação e relacionar com a concentração plasmática do cunaniol. Os parâmetros eletroencefalográficos, da atuação das drogas no controle das convulsões e a característica cíclica foram determinadas e avaliadas. A análise de plasma obtido por cromatografia líquida após a aplicação das substâncias convulsivantes indicam que o acetato de cunaniol sofre desacetilação dando origem ao cunaniol, droga responsável pelo quadro convulsivo. Dados eletrocorticográficos demonstraram cinco padrões de traçados diferentes durante registro de 4 horas permanecendo com alterações de traçado por 12 horas após aplicação. As drogas utilizadas para prevenir o desencadeamento das convulsões, as mais efetivas foram o Diazepam, o Fenobarbital e a Quetamina. O comportamento convulsivo foi classificado em cinco estágios. Para a ocorrência dos estágios 4 e 5 não houve diferenças estatísticas quanto à concentração plasmática de cunaniol.

Palavra Chave: Cunaniol, convulsão, acetato de cunaniol

Abstract

The *Clibadium sylvestre* is largely distributed in the Amazon region, where is know as cunambi or cunhambi, and its ingestion causes inebriation or even fish's death, demonstrating ichthyotoxic property. The compounds existing in the leaf of *Clibadium sylvestre* are powerful of central nervous system stimulants, its leafs contain potential convulsivant substances. The electroencephalographic changes, seizure and drug effects on seizure behavior control were studied as well as metabolic pathway of compounds cunaniol acetate and cunaniol. The work was performed with adult male Wistar rats, treated with DE_{50} of 2,92 mg/kg or DL_{50} of 3,64 mg/kg of cunaniol, administration route used was intraperitoneal. After cunaniol administration, the seizure evolution was observed, it allows to classify them according to the presentation intensity relate to cunaniol plasma concentration. The eletroencefalografic parameters of the drugs action on the seizure control and the clinic characteristic were determined and evaluated. The plasma analysis obtained by liquid chromatography after the application of convulsivant substances indicates that the cunaniol acetate undergoes deacetylation giving rise to cunaniol, drug responsible for convulsive state. Data electrocorticography has been shown five different patterns of tracks during recording with 4 hours remaining changes outlined by 12 hours after application. Among the drugs used to prevent the onset of seizures, the most effective were diazepam, phenobarbital and ketamine. The convulsive behavior was classified into five stages. For the occurrence of stages 4 and 5 there was no statistical differences regarding plasma cunaniol.

Key words: Cunaniol, seizures, cunaniol acetate

LISTA DE ABREVIATURAS

CA- Corno de Ammon ou hipocampo

CE₅₀- Concentração efetiva mediana

CCVU- Coluna cromatográfica em sílica gel por via úmida

CCDC – Cromatografia em camada delgada comparativa

DE₉₇- Dose efetiva 97%

EBH - Extrato bruto hexânico

EBDM - Extrato bruto diclorometânico

EBM - Extrato bruto metanólico

ECoG – Eletrocorticograma

E - Estágios da convulsão

g- grama

GABA - Ácido Gama Amino Butírico

HPLC - Cromatografia líquida

mA – mileamper

mg - miligrama

µv – microvoltes

NMDA- N-metil D-aspartato

RMN- Ressonância magnética nuclear

RPM – Rotações por minuto

s - segundos

SNC- Sistema nervoso central

PTZ- Pentilenotetrazol

LISTA DE TABELAS

| | Pag. |
|--|-------------|
| Tabela 1. Rendimento de extrato bruto obtido das folhas de <i>Clibadium sylvestre</i> | 28 |
| Tabela 2. Dados de RMN ¹ H (300 MHz, CDCl ₃) e RMN ¹³ C (75 MHz, CDCl ₃) para S ₃ (Acetato de cunaniol) | 34 |
| Tabela 3. Relação entre as características clínicas dos estágios convulsivos e a concentração plasmática de cunaniol (N= 4)..... | 62 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pag. |
|---|------|
| Figura 1 - Aspecto das flores e folhas da <i>Clibadium sylvestre</i> ... | 6 |
| Figura 2 - Estrutura molecular do cunaniol e acetato de cunaniol. Peso molecular de 214,2 e 256,3, respectivamente (cunaniol R= H e Acetato de cunaniol R= COOH)..... | 6 |
| Figura 3 - Obtenção dos extratos brutos das folhas de <i>Clibadium sylvestre</i> , extratos em ordem crescente de polaridade | 30 |
| Figura 4 - Fracionamento do extrato hexânico das folhas de <i>Clibadium sylvestre</i> | 31 |
| Figura 5 - Procedimento anestésico e fixação do animal no estereotáxico | 40 |
| Figura 6 - incisão cirúrgica longitudinal demonstrando a linha do Bregma | 40 |
| Figura 7 - posicionamento dos eletrodos em Bregma 0,96, para acesso ao córtex | 41 |
| Figura 8 - Posicionamento após a perfuração do crânio, posição lateral de 2 mm e dorso-ventral de 2 mm. | 41 |
| Figura 9- Coordenada estereotáxica e posicionamento do eletrodo no córtex motor..... | 42 |

| | |
|--|----|
| Figura 10 - Metabolismo plasmático do acetato de cunaniol em cunaniol..... | 52 |
| Figura 11- Registro da atividade de campo elétrico no córtex motor de ratos após a aplicação de cunaniol por via intraperitoneal, com duração de 4 horas..... | 55 |
| Figura 12- Registro eletrofisiológico da atividade no cerebelo de ratos após a aplicação de cunaniol por via intraperitoneal, com duração de 1,5 horas..... | 56 |
| Figura 13- Padrões de ondas observados em registros de ECoG em ratos sob o efeito do cunaniol (representativo de quatro animais)..... | 59 |
| Figura 14- Registro eletroencefalográfico do córtex motor de ratos, traçado indicando atividade basal (A), registro obtido 12 horas após aplicação de cunaniol (B) e registro obtido 24 horas após aplicação de cunaniol (C)..... | 60 |
| Figura 15- Relação entre o comportamento convulsivo presente em cada estágio e as alterações no traçado electrocorticográfico..... | 64 |
| Figura 16 - Registro electrocorticográfico após aplicação de 30 mg/kg de fenobarbital com duração de 30 minutos (A), continuação do registro electroencefalográfico após aplicação de cunaniol em dose letal, demonstra a eficácia do fenobarbital no controle das convulsões (B)..... | 65 |

| | |
|---|----|
| Figura 17 – Registro eletrocorticográfico após a aplicação de 100 mg/kg de quetamina via intraperitoneal, com duração de 30 minutos (A), continuação do registro após a aplicação do cunaniol em dose de 3, 64mg/kg, com duração de 30 minutos (B)..... | 68 |
| Figura 19- Registro eletroencefalográfico obtido após aplicação de escopolamina na dose de 10 mg/kg via intraperitoneal, com duração de 60 minutos, observar o aumento da amplitude e frequência após aplicação de cunaniol na dose de 3,64 mg/kg..... | 72 |
| Figura 20- Registro eletrocorticográfico obtido após aplicação de 20 mg/kg de xilazina via intraperitoneal com duração de 30 minutos (A), continuação do registro após aplicação de 3,64 mg/kg via intraperitoneal de cunaniol, o registro demonstra a eficácia da xilazina no controle das convulsões (B)..... | 74 |
| Figura 21- Registro eletrográfico no córtex motor de ratos durante crise convulsiva desencadeada pela aplicação intraperitoneal de cunaniol, e atividade eletrocorticográfica registradas após administração de diazepam (A) e do fenobarbital (B) no controle das convulsões..... | 79 |
| Figura 22 - Registro eletrográfico no córtex motor de ratos durante crise convulsiva desencadeada pela aplicação intraperitoneal de cunaniol, e após administração de quetamina (A) e xilazina (B) no controle das convulsões..... | 80 |
| Figura 23- Trechos das respostas eletrofisiológicas (100 segundos de registro) obtidas do padrão basal e dos tratamentos: (A) Basal; (B) Cunaniol; (C) Cunaniol +Diazepan; (D) Cunaniol + Fenobarbital; (E) Cunaniol + Quetamina..... | 81 |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1.IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DA EPILEPSIA | 7 |
| 1.2.IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DE MODELOS EPILÉPTICOS..... | 10 |
| 1.2.1. Modelo Convulsivo de Eletrochoque | 13 |
| 1.2.2. Modelo do Pentilenotetrazol | 15 |
| 1.2.3. Modelo Epiléptico Induzido pela Picrotoxina | 17 |
| 1.2.4. Modelo Epiléptico Induzido pela Pilocarpina | 18 |
| 1.2.5. Modelo Epiléptico Induzido pelo Ácido Caínico | 21 |
| 1.2.6. Modelos Genéticos de Epilepsias | 21 |
| 1.2.6.1. Crises Audiogênicas em Camundongos | 21 |
| 1.3. ESTRUTURAS ANATÔMICAS CEREBRAIS RELACIONADAS COM O DESENCADEAMENTO DA EPILEPSIA | 23 |
| 2. OBJETIVOS | 27 |
| 2.1. OBJETIVOS GERAIS | 27 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 27 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 28 |
| 3.1. MATERIAL BOTÂNICO..... | 28 |
| 3.2. EXTRAÇÃO DO MATERIAL PARA ESTUDO | 28 |
| 3.2.1. Preparação dos Extratos Brutos | 28 |
| 3.2.2. Isolamento dos Constituintes Químicos | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.2.1. Fracionamento do Extrato Hexânico das Folhas de <i>Clibadium sylvestre</i> | 29 |
| 3.2.2.2. Determinação estrutural de S ₁ e S ₃ | 34 |
| 3.3. ANIMAIS | 35 |
| 3.4. DROGAS | 36 |
| 3.5. CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DO ACETATO DE CUNANIOL E CUNANIOL APÓS APLICAÇÃO INTRAPERITONEAL DE EXTRATO HEXÂNICO ATRAVÉS DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO PLASMA DOS ANIMAIS..... | 36 |
| 3.6. CARACTERIZAÇÃO DOS REGISTROS ELETROENCEFALOGRAFICOS DE ANIMAIS EM CONVULSÃO | 37 |
| 3.6.1. Cirurgia para Implante de Eletrodos..... | 37 |
| 3.6.2. Equipamentos Utilizados para Obtenção de Registros | 39 |
| 3.6.3. Análise do Eletrocortigrama ECoG | 39 |
| 3.7. AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE DROGAS NO CONTROLE DAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR APLICAÇÃO DO CUNANIOL | 42 |
| 3.6.8. Análise estatística..... | 44 |
| 4. RESULTADOS | 45 |
| 4.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO PLASMA DE ANIMAIS QUE RECEBERAM INJEÇÕES INTRAPERITONEAIS DE EXTRATO HEXÂNICO (ACETATO DE CUNANIOL E CUNANIOL) E AVALIAÇÃO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DO ACETATO DE CUNANIOL EM CUNANIOL | 45 |
| 4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS REGISTROS ELETROCORTICOGRÁFICOS DE ANIMAIS EM CONVULSÃO | 55 |

| | |
|---|------------|
| 4.3. AVALIAÇÃO DAS AÇÕES DE DROGAS NO CONTROLE DAS CONVULSÕES APÓS APLICAÇÕES DE DOSES PROGRESSIVAS DE CUNANIOL POR VIA INTRAPERITONEAL | 62 |
| 5.DISSCUSSÃO | 83 |
| 5.1. AVALIAÇÃO DAS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DO PLASMA EM TESTES <i>In vivo</i> E <i>In vitro</i> RELACIONADOS COM A BIOTRANSFORMAÇÃO DO ACETATO DE CUNANIOL | 83 |
| 5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS REGISTROS ELETROCORTICOGRÁFICOS DE ANIMAIS EM CONVULSÃO | 86 |
| 5.3. AVALIAÇÃO DAS AÇÕES DE DROGAS NO CONTROLE DAS CONVULSÕES APÓS APLICAÇÕES DE DOSES PROGRESSIVAS DE CUNANIOL POR VIA INTRAPERITONEAL | 89 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 99 |
| 7. BIBLIOGRAFIAS..... | 101 |
| ANEXO -1. ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹H PARA A SUBSTÂNCIA S₁ (CUNANIOL)..... | 126 |
| ANEXO -2. ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹³C PARA S₁ (CUNANIOL)..... | 128 |
| ANEXO -3 ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹H PARA A SUBSTÂNCIA S₃ (ACETATO DE CUNANIOL)..... | 129 |
| ANEXO - 4 ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ¹³C PARA SUBSTÂNCIA S₃ (ACETATO DE CUNANIOL)..... | 131 |

1. INTRODUÇÃO

Atualmente existe um interesse crescente sobre o conhecimento dos compostos naturais e suas interações com os sistemas orgânicos. O acetato de cunaniol e o cunaniol são substâncias extraídas das folhas de *Clibadium sylvestre*, que possuem atividades no sistema nervoso central (SNC) promovendo excitabilidade em vários graus. A interação dessas moléculas com o sistema nervoso, ainda é pouco estudada como modelo quimioconvulsivante ou como um estimulante central, sendo que o estudo adequado de sua farmacodinâmica e farmacocinética, poderão dar subsídios para que futuramente essas substâncias possam ser utilizadas como modelo convulsivante e proporcionar um novo teste para drogas antiepilépticas.

A partir do século XIX teve início a pesquisa sistemática para isolamento de princípios ativos vegetais, sendo, a morfina (1807) a primeira a ser isolada em forma pura, seguida pela estricnina (1818). Muitos princípios, ainda hoje são obtidos desta forma, não possuindo substitutos sintéticos. A flora brasileira é dotada de uma exuberante e preciosa fonte para a pesquisa de produtos naturais, apresentando importância e o interesse cada vez maior da comunidade científica em estudar tais propriedades (Cavalcante, 1974).

Na medicina popular é muito extensa a variedade de plantas utilizadas com comprovada ação no SNC, que através da investigação científica, podem gerar idéias e oportunidades para pesquisas de novos agentes, como indicativos terapêuticos e/ou como modelos experimentais para o estudo de determinadas doenças (Moreira *et al.*, 1989; Hoehne, 1939).

Dentre as muitas espécies vegetais utilizadas popularmente, a que nos chamou atenção foi a espécie *Clibadium sylvestre* (Figura 1), que pertence à Sub-classe Asteridae, Ordem Asterales, Família Asteraceae. Arbusto alto, até 2 metros de altura, ramos hirsutos e folhas opostas pecioladas, ovado-oblongas ou ovado-lanceoladas, acuminadas, agudas, cuneadas na base, de até 13 centímetros de comprimento, geralmente menos, membranosas, denteadas, ásperas na parte superior e vilosa na inferior, enquanto jovens, depois escabrosas, oito a doze flores brancacentas de cheiro forte, reunidas em capítulos ovoideglobosos, corimboso-peniculados, as exteriores são femininas e as do disco hermafroditas, apresenta envólucro violáceo com escamas agudas e pelos espessos, fruto obovoide sem papo (Corrêa, 1984; Hoehne, 1939).

Plantas do Gênero *Clibadium*, popularmente conhecidas como cunambi, são comumente encontradas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Devido suas propriedades ictiotóxicas, são usadas para captura de peixes por populações ribeirinhas, principalmente na região Amazônica. Preparação de iscas com folhas maceradas com farinha de mandioca são lançadas na água e quando ingeridas pelos peixes induzem sinais de intoxicação, demonstradas por hiperatividade seguida por imobilidade na superfície da água, permitindo sua captura. Esses sinais podem levar os peixes à morte ou o retorno à normalidade, dependendo da quantidade de iscas ingeridas (Pires, 1978; Mors, 1978; Albuquerque, 1980; Costa *et al.*, 2006).

Além da ação ictiotóxica, segundo Garcia (1975) as folhas maceradas são também indicadas na medicina popular para o tratamento de erisipela, hemorragias, inchaços e podem ser utilizadas como inseticida natural.

A ingestão da *C. sylvestre* causa embriaguez, ou mesmo morte dos peixes demonstrando ter poder ictiotóxico. Neste caso, as folhas são socadas em um pilão, onde o produto é misturado com farinha de mandioca, reduzido a bolinhas que funcionam como iscas, e estas, jogadas na água. Apenas certas espécies de peixes são muito atraídas por este tipo de iscas (Albuquerque, 1980; Villaméa & Pinto, 2000).

No que diz respeito à composição química do vegetal, pouco foi estudado, sendo que Clark (1969) descreveu a presença de uma substância nas folhas, o Álcool C₁₄ tetraidropiranil poliacetileno. Quilliam & Stables (1969a) demonstraram a presença do cunaniol em toda a planta; e segundo Gorinsky *et al.* (1973) outras três substâncias foram encontradas nas folhas, o acetato de β -amirina, acetato de ictioterol e o ictioterol.

O acetato de cunaniol é a substância convulsivante majoritária nas folhas de *C. surinamense*. Apesar de uma mistura de cunaniol e acetato de cunaniol (Figura 2) terem sido descritos em extratos de folhas de *Clibadium sylvestre* e de *Ichthyothere terminales* (Spreng) Malme, ambos os compostos induzem convulsões clônicas (Cascon *et al.*, 1965; Quilliam & Stables, 1968).

Vários estudos relatam ausência destes compostos químicos em outras espécies do gênero *Clibadium* (Quilliam & Stables, 1969a; Clark, 1969; Bohlmann & Fritz, 1980; Bohm & Stuessy, 1981; Bohm *et al.*, 1983; Bohm & Stuessy, 1985; Castillo *et al.*, 1988). Estudos químicos anteriores demonstraram que somente o *Clibadium sylvestre* e o *Ichthyothere terminalis* compartilham o acetato de ictioterol. Estudos realizados por Czerson *et al.* (1979) reforçam a relação entre os dois

gêneros (*Clibadium* e *Ichthyothere*), no entanto, estes pesquisadores relatam a presença do acetato de ictioterol em outras duas espécies de *Clibadium*, o *C. surinamense* e *C. erosum*.

Os compostos existentes nas folhas da *Clibadium sylvestre* são poderosos estimulantes do SNC e neuromuscular, sendo capazes de reverter quadros de bloqueios cardíacos (Villaméa & Pinto, 2000).

Quilliam & Stables (1969b) comprovaram a ação ictiotóxica do cunaniol ao utilizá-lo em peixes de aquários, onde foram observados sintomas de hiperestimulação do SNC. Os testes foram feitos em aquários onde o cunaniol foi diluído a 0,15 µg/ml, nessa concentração os peixes tornaram-se hiperativos e nadando em círculos. Nos testes feitos em concentrações superiores (0,3 µg/ml) foram observados espasmos violentos, acompanhados por nados em círculo, perda do reflexo de postura, paralisia e morte.

Quilliam & Stables (1968) compararam os efeitos do cunaniol e acetato de cunaniol a outros agentes que estimulam o SNC, e determinaram a Concentração Efetiva (CE₅₀) que corresponde à concentração das substâncias na água capaz de produzir efeitos nos animais que estão inseridos neste meio, neste caso, foram utilizados peixes da espécie *Carassius auratus*. A CE₅₀ de cunaniol observada para *C. auratus* foi de $7,10 \times 10^{-7}$ M (0,15 µg/ml), para a picrotoxina $7,94 \times 10^{-6}$ M (7,3 - $8,7 \times 10^{-6}$ M), para o leptazol $1,5 \times 10^{-3}$ M e para a estricnina CE₅₀ $2,5 \times 10^{-6}$ M. Nesse experimento o cunaniol mostrou ser o mais potente desses compostos e foi também o mais rápido no início da ação. Em comparação ao efeito, somente o acetato de cunaniol com $4,5 \times 10^{-7}$ M ($4,2-4,8 \times 10^{-7}$ M) teve ação similar ao do cunaniol.

Costa *et al.* (2006) demonstraram que a administração por via oral de extrato etanólico das folhas de *Clibadium surinamense* em dose de 250 mg/kg induz convulsões tônico-clônicas e morte em camundongos, trinta minutos após a administração.

O acetato de cunaniol é um sólido branco isolado das folhas de plantas do Gênero *Clibadium* e pode ser identificado por análise de ressonância magnética nuclear em uma fração F₉₁₋₁₀₀, fração esta obtida do extrato hexânico que induz convulsões clônicas em camundongos por via oral na dose de 8 mg/kg (Costa *et al.*, 2006).

Continuamente tem-se obtido substâncias derivadas de plantas capazes de induzir convulsões semelhantes ao causado pelo cunaniol. A fração neurotóxica da carambola (*Averrhoa carambola*), embora não quimicamente identificado, causa inibição na neurotransmissão do GABA (ácido gama-aminobutírico) concentração dependente (Carolino *et al.*, 2005).

Segundo Hamoy (2002) e Costa *et al.* (2006) os mecanismos moleculares pelo qual o acetato de cunaniol causa excitação do sistema nervoso central (SNC) são bloqueadas por aumento na atividade GABAérgica, como a utilização de benzodiazepínicos que diminuem as convulsões e a mortalidade dos animais intoxicados.

Trabalhos preliminares realizados no Laboratório de Neuroquímica da UFPA mostraram que o extrato bruto aquoso das folhas desta planta foi capaz de desencadear “*status epilepticus*” em mamíferos, ratos albinos *wistar*, quando administrado por via intraperitoneal (Hamoy, 2002; Aguiar, 2008).



Figura 1- Aspecto das flores e folhas da *Clibadium sylvestre*.

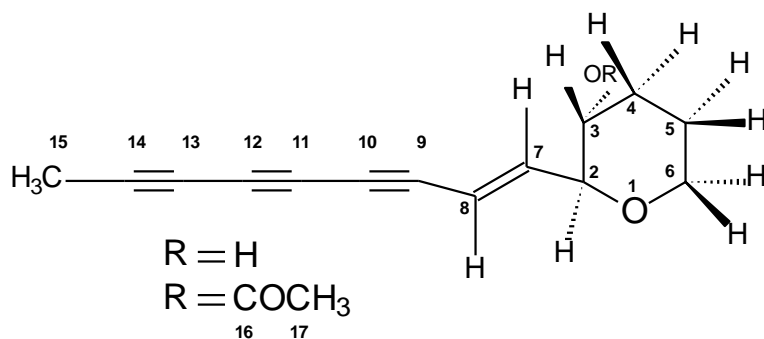


Figura 2- Estrutura molecular do cunaniol e acetato de cunaniol. Peso Molecular de 214,2 e 256,3, respectivamente (Cunaniol $R = H$ e Acetato de cunaniol $R = COOH$).

1.1. IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DA EPILEPSIA

As crenças predominam na história da epilepsia, pois existem relatos de que pessoas com epilepsia na Roma Antiga eram evitadas por medo de contágio, e na Idade Média elas foram perseguidas como bruxas. Em 1494, foi lançado o manual de caça às bruxas, "*Malleus maleficarum*", escrito por dois frades dominicanos vinculados à Inquisição Católica. Neste tratado a presença de crises epiléticas era uma característica de feitiçaria (Masia & Devinsky, 2000).

Há mais de um século John Huhlings Jackson, descreveu os conceitos modernos da epilepsia propondo que as crises epiléticas fossem causadas por "descargas eventuais, súbitas, excessivas, rápidas em locais da substância cinzenta" e que uma convulsão generalizada resultasse quando o tecido cerebral normal fosse invadido pela atividade convulsiva desencadeada em um foco anormal (Yacubian, 1999).

No Renascimento houve a tentativa de se ver a epilepsia como uma manifestação de doença física em lugar de uma mais obscura. No entanto, foi durante o Iluminismo que a epilepsia começou a ser considerada de forma mais moderna, com a ajuda de avanços na anatomia, patologia, química, farmácia e fisiologia (Pearce, 1998).

Dentre os grandes estudiosos da epilepsia na história destacaram-se, Galeno (130-200) o qual deduziu que a epilepsia era um transtorno do cérebro devido ao acúmulo de humores espessos; Paracelsus reconhecia uma ebulição para cima dos espíritos vitais (*Spiritus animalis*). Thomas Willis (1621-1675) indicou que a predisposição do cérebro para ter crises epiléticas era hereditária ou adquirida. Nathnagel defendeu a hipótese do "centro convulsivo" adjacente ao da respiração;

Hammond no seu tratado “*On the diseases of the nervous system*”, em 1871, deduziu que a localização da epilepsia era na medula e as lesões no córtex a excitariam para produzir a convulsão. No entanto, várias teorias patofisiológicas da epilepsia identificaram corretamente o cérebro como a origem do problema, mas enfatizando causas incorretas. Jacobus Schroedern Van Der Kolk (1797-1862) realizou autópsias e caracterizou a dilatação das veias que apareceram cheias de sangue no córtex, medula e espinha dorsal. Assim, no decorrer desses anos, se passou da hipótese do sobrenatural, com denominações de “Doenças sagradas” e “lunáticos”, até idéias mais modernas sobre o transtorno que começaram a ocorrer a partir dos Séculos XVIII e XIX (Matthes, 1976; Pearce, 1998; Gomes, 2006).

Na primeira metade do século passado nos Estados Unidos da América, essas pessoas eram rotuladas como desviantes e o seu matrimônio e a reprodução eram restringidos através de legislação (Offen, 2003).

A visão da epilepsia, devido a influências ocultas ou más, teve partidários até mesmo na Medicina durante os tempos antigos, conseqüentemente foram prescritos tratamentos mágicos ou religiosos, e algumas práticas persistem até hoje em parte da população leiga (Masia & Devinsky, 2000).

O advento do eletroencefalograma na década de 1930 permitiu o registro da atividade elétrica a partir do couro cabeludo de seres humanos com epilepsia e finalmente foi demonstrado que as epilepsias são distúrbios da excitabilidade neuronal (Andresen *et al.*, 2001).

A incidência de crises epilépticas é maior na infância e na adolescência quando comparada com aquela que ocorre na vida adulta, sendo que a maioria das

epilepsias começa durante as fases iniciais do desenvolvimento humano (Matthes, 1976; Hauser & Hesdorffer, 1990; Andresen *et al.*, 2001).

A epilepsia é uma doença comum na população, mas com incidência bastante variável nos diferentes países. Assim, existem incidências tão baixas como na Eslovênia que possui 24 casos para cada 100.000 habitantes e casos de alta incidência como no Equador que possui 190 casos para cada 100.000 habitantes. No Brasil é relatada a prevalência de 165 casos para cada 100.000 habitantes (Costa *et al.*, 1998). Na maioria dos estudos internacionais, as taxas de prevalência de epilepsia ativa na população geral ficam entre 0,4 % e 1 % (Cordas & Moreno, 2001).

A população do Brasil, de acordo com o último censo realizado pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), é de 191.397.996 pessoas. Baseado nos estudos internacionais pode-se, portanto, estimar 366.723 casos novos ao ano (estimativa de incidência anual de 16,5/10.000), 1,9 milhões de pessoas com epilepsia ativa (estimativa de 1 % de prevalência pontual) e nove milhões de pessoas que já apresentaram crises epiléticas alguma vez na sua vida (estimativa de 5 % de prevalência de vida) (Gallucci Neto & Marchetti, 2005).

Ferreira & Silva (2007) demonstraram que a epilepsia causa óbito mais frequentemente em grupos de pessoas com idades entre 20 a 39 anos (40,53 %), e a mortalidade mais elevada é no sexo masculino, tal achado deve-se ao fato da epilepsia ser mais prevalente neste gênero.

O impacto econômico da epilepsia se tornou um assunto importante nos anos recentes, pois, várias das novas drogas antiepiléticas possuem o custo mais

de 100 vezes superior ao do fenobarbital e dez a vinte vezes superior ao da fenitoína e carbamazepina (Gallucci Neto & Marchetti, 2005).

A Organização Mundial de Saúde calculou o impacto global das doenças no trabalho e, a síndrome epiléptica foi responsável por 1 % dos dias de trabalho perdidos em todo o mundo, 25 % do total de pacientes não respondem a nenhum tipo de terapia e apresentam mortalidade duas a três vezes maior que a população geral (Gallucci Neto & Marchetti, 2005).

As crises podem afetar a consciência, memória, cognição, estado emocional, comportamento e as funções sensoriais, motoras e neurovegetativas. Nem todas as crises afetam todos estes fatores, mas, todas afetam pelo menos um deles (Fischer *et al.*, 2005).

A epilepsia não é uma condição, mas sim uma diversidade de desordens, que apresentam um aumento anormal de predisposição para crises. Esta diversidade se deve às numerosas bases celulares e moleculares envolvidas, bem como as características temporais e espaciais da crise. Pode ter etiologia genética ou adquirida, decorrente de infecções, tumores, trauma, exposição a agentes tóxicos, processos degenerativos e processos vasculares que ocorrem em todas as idades (McCormick & Cotreras, 2001; Fischer *et al.*, 2005).

1.2. IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DE MODELOS EPILÉPTICOS

A epilepsia é uma desordem neuronal caracterizada por convulsões espontâneas recorrentes que afeta 1 a 2 % da população mundial (Browne & Holmes, 2001). As crises epilépticas podem ser generalizadas ou focais. Vários estudos relatam a fisiopatologia e farmacologia da epilepsia, descrevendo o

comportamento eletrofisiológico ou alterações bioquímicas em vários modelos animais, onde a indução experimental ou convulsões espontâneas tem sido desenvolvida para estudo. O modelo epiléptico provocado pela aplicação da pilocarpina, um agonista muscarínico, e ácido caínico, um agonista de um subtipo de receptor do glutamato, são os modelos de epilepsia mais utilizados experimentalmente (Bem-Ari, 1985; Turski *et al.*, 1989; Santo *et al.*, 2004).

As crises epilépticas são divididas fundamentalmente em generalizadas e parciais. Na crise generalizada não há evidência do local de início, envolve simultaneamente todo o cérebro ou grande parte de ambos os hemisférios cerebrais. Na crise parcial há evidências clínicas e eletroencefalográficas que apontam o local de início, que se restringe a uma porção de um hemisfério cerebral. A crise parcial pode se generalizar (Löscher, 1997). As crises epilépticas podem também receber uma classificação quanto ao estado de consciência do epiléptico, sendo a epilepsia simples quando há preservação da consciência ou complexa quando ocorre a perda da consciência (McNamara *et al.*, 1980).

Vários modelos experimentais de epilepsia têm sido propostos para a compreensão das epilepsias numa tentativa de representar com fidelidade o fenômeno natural. Dentro da diversidade de modelos existentes, alguns têm sido utilizados preferencialmente na elucidação dos mecanismos subjacentes ao fenômeno epiléptico, enquanto outros são principalmente utilizados na avaliação pré-clínica de drogas antiepilépticas (Löscher & Schmidt, 1988; Löscher, 2011).

A pesquisa experimental sobre epilepsias tem sido realizada, predominantemente, em roedores nos quais crises epilépticas podem ser induzidas por estimulação elétrica ou química. Outros modelos de epilepsia utilizando primatas

também têm sido extensivamente explorados. Esses modelos permitem estudos farmacêuticos cujos resultados são geralmente mais próximos daquele observados no homem do que aqueles encontrados em roedores (Löscher & Schmidt, 1988).

Os modelos experimentais de epilepsia são necessários para o estudo dos substratos neurais e mecanismos neuroquímicos envolvidos no fenômeno epiléptico e são também indispensáveis para a seleção de novos agentes anticonvulsivantes e para estudo de mecanismo de ação de drogas. Cada modelo apresenta características próprias quanto à expressão motora, à eletroencefalográfica e à resposta a diferentes agentes antiepilépticos (Turski *et al.*, 1987). Cada modelo experimental se aproxima mais de um determinado tipo de epilepsia humana: O modelo epiléptico provocado por injeção de pilocarpina está associado às epilepsias parcial complexa com foco no lobo temporal (Turski *et al.*, 1987). O modelo de epilepsia induzida pelo pentilenotetrazol (PTZ) pode resultar em crises de ausência, crises mioclônicas e crises tônico-clônicas, sendo sua expressão muito semelhante a estes tipos de epilepsias em humanos (Marescaux *et al.*, 1984). O modelo de atividade convulsiva induzida por penicilina com aplicação sistêmica está associada à epilepsia generalizada, e com aplicação cortical relacionada à epilepsia parcial com generalização secundária (Avoli & Goor, 1982). O modelo de abrasamento elétrico ou audiogênico, associado à epilepsia parcial com envolvimento de estruturas límbicas (Cairasco *et al.*, 1996; Moraes *et al.*, 2000). O modelo de crises epilépticas por eletrochoque transauricular está associado também à epilepsia com crises tônico-clônicas generalizadas (Löscher *et al.*, 1991). O modelo audiogênico agudo está relacionado à epilepsia generalizada, com crises mioclônicas e tônico-clônicas generalizadas (Cairasco *et al.*, 1993).

Uma das vantagens importantes dos modelos experimentais é, por exemplo, a facilidade com que podem ser controladas variáveis como uniformidade genética, idade, circuitos que podem gerar crises epiléticas, características dos insultos que podem gerar epilepsia, tempo entre crises epiléticas e alterações funcionais ou estruturais. Adicionalmente, o uso de várias técnicas em um mesmo modelo tem permitido compor um quadro mais completo dos processos associados à epilepsia (Guedes *et al.*, 2006). Apesar do importante progresso na compreensão das crises convulsivas nas últimas décadas, as bases celulares das epilepsias no homem permanecem ainda desconhecidas (Löscher & Schmidt, 2006).

A seguir, são descritos alguns modelos utilizados na investigação preliminar dos fenômenos envolvidos na epileptogênese:

1.2.1. **Modelo Convulsivo de Eletrochoque**

Desde 1870, Fritsch & Hitzig já demonstravam que crises epiléticas poderiam ser observadas em animais, através da estimulação elétrica. Este método forneceu um modelo adequado, prático e relativamente simples para a reprodução do fenômeno ictal da epilepsia. Representa uma condição aguda que pode ser repetidamente reproduzida em diversas estruturas neurais.

Um dos modelos experimentais proposto para o estudo da epilepsia é o eletrochoque máximo, que possibilitou identificar o potencial anti-epilético da fenitoína por Merritt & Putnam (1938). A partir desses achados esse modelo vem sendo empregado para triagem de novos agentes anti-epiléticos, bem como nas investigações patológicas e fisiológicas das crises com a finalidade de verificar o possível papel dos vários sistemas neurotransmissores nos distúrbios neuronais

epilépticos (Burley & Ferrendelli, 1984; Cowen *et al.*, 1980; Deakin *et al.*, 1981; Lebrecht & Nowak, 1980; London *et al.*, 1982; Mehta & Ticku, 1986).

No teste do eletrochoque máximo, um choque de corrente alternada de 60 Hz e 50 mA (em camundongos) ou 150 mA (em ratos) é administrado por eletrodos corneanos por 0,2 segundos para verificar a eficácia de determinada droga em abolir a extensão tônica do membro posterior. Clinicamente drogas que apresentam essa propriedade são eficazes em prevenir crises parciais e tônico-clônicas generalizadas (Putnam & Merritt, 1937; Yacubian, 1999; Mehta & Ticku, 1986).

O método envolve o posicionamento de dois eletrodos na córnea ou na orelha e consiste na estimulação, por meio de impulsos elétricos repetidos, sob parâmetros adequados, capaz de desencadear um padrão característico da atividade epiléptica, relativamente duradouro, que é automantido. Este é um teste sensível para determinar a capacidade de uma droga em alterar o limiar para a crise tônica extensora. Baseado na observação de que a estimulação por meio de pulsos elétricos repetitivos com uso de parâmetros adequados, o estímulo é capaz de induzir em diferentes estruturas neuronais, um padrão característico de atividade epiléptica que automantida, comumente denominada pós-descarga. O eletrochoque máximo é um modelo bem estabelecido que mimetiza crises convulsivas generalizadas do tipo tônico-clônicas (Löscher & Schmidt, 2006).

Drogas antiepilépticas com eficácia clínica contra crises generalizadas tônico-clônicas aumentam este limiar, porém drogas como a etossuximida e a trimetadiona, que são clinicamente inefetivas contra essas crises, não aumentam esse limiar, mesmo em doses tóxicas (Löscher & Schmidt, 1988).

1.2.2. Modelo do Pentilenotetrazol

O modelo de estudo das epilepsias causadas pelo pentilenotetrazol, é frequentemente utilizado nas pesquisas de substâncias anti-epilépticas. O pentilenotetrazol em doses subconvulsivantes age como uma substância ansiogênica, sendo empregado nos estudos para avaliação de medicamentos ansiolíticos como controle positivo. É também utilizado em estudos experimentais para triagem de fármacos anticonvulsivantes. Esta droga é capaz de induzir crises clônicas generalizadas e, em altas doses, crises tônicas, independentemente da via de administração. As crises convulsivas obtidas após injeção intraperitoneal de pentilenotetrazol são similares àquelas que ocorrem após a sua aplicação subcutânea, porém a latência para o aparecimento das crises, no último caso, é maior (Purpura & Monteagudo, 1960).

O pentilenotetrazol é uma das principais substâncias indutoras de convulsões que são utilizadas na triagem pré-clínica de novos fármacos anticonvulsivantes, podendo ser utilizado como modelo de crises generalizadas do tipo ausência ou mioclônicas como de crises tônico-clônicas (Löscher, 1998; Smith *et al.*, 2007). O pentilenotetrazol é um estimulante bulbar, que age também no centro vasomotor, causando exagerada excitabilidade reflexa, e em doses maiores, convulsão (Andrade, 2002).

Um dos procedimentos básicos deste teste requer a determinação de DE₉₇ em camundongos (dose de pentilenotetrazol capaz de induzir crises epilépticas em 97 % dos animais), após a administração do pentilenotetrazol por via subcutânea. Uma dose convulsivante de pentilenotetrazol (85 mg/kg em

camundongos, 70 mg/kg em ratos) é injetada por via subcutânea. Os animais são observados por 30 minutos, para verificação dos espasmos clônicos que apresenta em pelo menos cinco segundos. A ausência do componente clônico indica que a substância testada elevou o limiar crítico, clinicamente drogas que apresentam essas propriedades impedem crises de ausência (Yacubian, 1999).

A potência de uma substância antiepiléptica quando testada pelo modelo do pentilenotetrazol é avaliada pela determinação de sua DE₅₀, isto é, dose efetiva capaz de suprimir as crises clônicas generalizadas em 50 % dos animais. O mecanismo de ação convulsivante do pentilenotetrazol está associado à função inibitória do neurotransmissor ácido gama aminobutírico (GABA). O pentilenotetrazol age nos receptores GABAérgicos, inibindo seus efeitos. As convulsões são caracterizadas por movimentos clônicos assíncronicos generalizados. Esta fase é geralmente seguida por convulsões tônicas, observando uma fase de flexão, seguida por outra de extensão (Spinosa *et al.*, 2006). O pentilenotetrazol atua inibindo canais de cloreto associado aos receptores GABA_A (Löscher, 1998).

O modelo do pentilenotetrazol pode ser usado isoladamente ou associado com outros, servindo como uma ferramenta útil no estudo das crises de pequeno mal (Marescaux *et al.*, 1984).

Para ambos os testes acima mencionados (eletrochoque e pentilenotetrazol) são necessários grupos de oito a dez animais para cada dose do agente antiepiléptico e a dose efetiva é então calculada pela respectiva curva dose-efeito (Litchfield & Wilcoxon, 1949). Estudos têm mostrado que alguns agentes anti-epilépticos clássicos como a etossuximida, ácido valpróico e benzodiazepínicos são efetivos neste teste, porém outros mostram que a fenitoína bem como a

carbamazepina, que são altamente ativas no modelo do eletrochoque, são ineficazes no modelo do pentilenotetrazol (Löscher & Schmidt, 1988).

A utilização de benzodiazepínicos e barbitúricos para o tratamento das crises convulsivas foi constatado a partir de estudos com pentilenotetrazol (Löscher, 1998).

1.2.3. **Modelo Epiléptico Induzido pela Picrotoxina**

A picrotoxina é obtida da *Amanita cocculus*, uma trepadeira nativa de Malabar e das Índias Orientais, suas ações são muito similares àquelas vistas com o pentilenotetrazol, exceto pelo fato de apresentarem um desenvolvimento sintomatológico mais lento (Hahn, 1960). A picrotoxina também é capaz de produzir crises motoras límbicas e “*status epilepticus*”, servindo, portanto, como ferramenta para o estudo da epilepsia do lobo temporal (Turski *et al.*, 1985). Um exemplo de epilepsia focal recorrente, para crises do tipo “pequeno mal” ou crises de ausência. A picrotoxina é um poderoso estimulante do sistema nervoso central, sendo utilizado na indução química de convulsões através do antagonismo dos receptores GABAérgicos (Zia *et al.*, 1995).

A picrotoxina produz seus efeitos por interagir com sítios específicos no complexo ionóforo de cloro do receptor GABA_A, bloqueando de forma não-competitiva as ações deste neurotransmissor, ou seja, é um antagonista de receptores GABAérgicos (Sivine *et al.*, 1985).

A reversão da estimulação induzida pela picrotoxina é considerada um parâmetro eficaz no estudo de drogas da classe dos anticonvulsivantes que atuam em mecanismos que envolvem o sistema GABAérgico (Zia *et al.*, 1995).

As pesquisas revelam que drogas como a bicuculina, a benzilpenicilina, que também interferem na neurotransmissão GABAérgica induzem um padrão de crises epilépticas semelhantes àquelas desencadeados pelo pentilenotetrazol (Löscher & Schmidt, 1988).

1.2.4. **Modelo Epiléptico Induzido pela Pilocarpina**

É importante ressaltar que uma variedade de espécies vegetais tem contribuído muito, através de seus princípios ativos, para o desenvolvimento de fármacos que atualmente vêm se tornando fontes valiosas para o entendimento do estudo das epilepsias. Entre essas, temos a pilocarpina que foi introduzida na medicina pelo português Synphrônio Coutinho em 1894 (Cavalcante, 1974). A pilocarpina é o principal alcalóide isolado das folhas dos arbustos da *Pilocarpus microphyllus stapf*, Família Rutaceae, sendo usado na terapêutica atual do glaucoma. Apresenta potente atividade colinérgica funcionando como agente epileptogênico efetivo. Desta forma é capaz de produzir em ratos e em camundongos, uma sequência de alterações comportamentais como automatismos faciais e crises motoras límbicas que evoluem progressivamente para o “*status epilepticus*”, constituindo assim, um modelo de epilepsia do lobo temporal (Turski *et al.*, 1984; Costa *et al.*, 1998; Pinheiro, 2002).

Esse modelo quimioconvulsivante, induz alterações eletroencefalográficas e comportamentais nos animais após aplicação de injeção sistêmica. O hidrocloreto de pilocarpina é um agonista colinérgico muscarínico. Estruturas límbicas são preferencialmente ativadas e lesadas quando ratos adultos são tratados com essa droga (Cherubini, 1983).

Esta droga induz atividade epiléptica eletrográfica e comportamental análoga ao “*status epilepticus*” e, os animais sobreviventes podem desenvolver crises espontâneas. Há um aumento considerável na suscetibilidade dos ratos aos efeitos da pilocarpina durante a terceira semana de vida, no entanto, a extensão das lesões cerebrais observadas após as crises induzidas por pilocarpina é menor que nos animais adultos. Acredita-se que as redes neurais necessárias para ação efetiva convulsivante da pilocarpina não estejam funcionais até a terceira semana de vida pós-natal, período crítico no desenvolvimento desse modelo (Turski *et al.*, 1987a; Mosche *et al.*, 1993; Albala *et al.*, 1984; Cavalheiro *et al.*, 1987; Lemos & Cavalheiro, 1995; Fabene *et al.*, 2001; Raza *et al.*, 2001).

Estudos anatômicos “*ex vivo*” têm demonstrado que o tratamento com pilocarpina, associado ao “*status epilepticus*”, resulta da seletiva perda celular hipocampal com características semelhantes às observadas na esclerose hipocampal humana (Sperber *et al.*, 1991). Isso ocorre devido a uma perda neural nas sub-áreas CA₁ e CA₃ do hipocampo, bilateralmente. Os interneurônios da camada molecular interna do giro denteado degeneram de forma semelhante à esclerose hipocampal humana (Obenaus *et al.*, 1993; Tang *et al.*, 2001a; Tang *et al.*, 2001b).

A administração de altas doses de pilocarpina (300-350 mg/kg) induz uma série de alterações comportamentais e eletroencefalográficas, indicativas de estado de mal epiléptico. Imediatamente após a administração deste agonista colinérgico, os animais apresentam automatismos faciais associados à salivação moderada, acinesia e tremores generalizados. Cerca de 15 a 25 minutos após, este

comportamento progride para crises motoras límbicas, onde os animais apresentam intensa salivação, clonias de patas anteriores e finalmente queda. Essas crises motoras límbicas ocorrem a cada dois a oito minutos, culminando em estado de mal epiléptico em 50 a 60 minutos. Este estado chega a durar até dezoito horas e ao final desse período os animais não respondem mais aos estímulos ambientais, retornando gradativamente seu comportamento normal dentro de 24 horas. Esses episódios caracterizam a fase aguda do modelo experimental de epilepsia induzida por pilocarpina (Turski *et al.*, 1987b).

O período silencioso inicia-se de quatro a 44 dias após a administração de pilocarpina e é caracterizado pela normalização das alterações comportamentais e eletrográficas. Já o período crônico inicia-se com o aparecimento das primeiras crises espontâneas, que ocorre numa frequência de duas a três crises por semana e mantém-se por toda a vida do animal (Fernandes *et al.*, 1996).

A lesão cerebral induzida pelo “*status epilepticus*” nesse modelo pode ser considerada como equivalente a um evento epileptogênico, ou seja, capaz de gerar epilepsia no ser humano, como por exemplo, uma convulsão febril (Quintans *et al.*, 2007).

1.2.5. **Modelo Epiléptico Induzido pelo Ácido Caínico**

O ácido caínico é uma molécula excitatória com ação glutamatérgica, quando injetado na região hipocampal ou sistemicamente, leva a um quadro de “*status epilepticus*” límbico. Posteriormente a essa fase, são observadas crises recorrentes espontâneas (Cavalheiro *et al.*, 1982).

As convulsões induzidas pela injeção intraventricular de ácido caínico produzem uma crise comportamental que é acompanhada por lesão cerebral muito semelhante ao da epilepsia do lobo temporal (Quintans *et al.*, 2007).

Estudos realizados nesse modelo mostram que, se o estado de mal epiléptico não ocorreu ou é abortado com drogas anti-epilépticas, essas alterações neuropatológicas no hipocampo não ocorrem, nem há desenvolvimento de crises espontâneas, o que pode mostrar uma relação direta entre esse tipo de epilepsia e as anormalidades anatômicas e funcionais do hipocampo (Lemos & Cavalheiro, 1995).

Este modelo utiliza o “*status epilepticus*” como injúria precipitante inicial e reproduz algumas características histopatológicas observadas na epilepsia do lobo temporal humana (Ben-Ari, 1985).

1.2.6. **Modelos Genéticos de Epilepsias**

1.2.6.1. Crises Audiogênicas em Camundongos

Os modelos genéticos de epilepsias mais utilizados são aqueles obtidos por estimulação sensitivo-sensorial (epilepsia reflexa) tal como ocorre nos camundongos DBA/2 (*Mus musculus*) (Löscher & Schmidt, 1988). Esta espécie é conhecida desde 1947, por sua susceptibilidade ao som (Chapman *et al.*, 1984).

As crises audiogênicas são caracterizadas por uma sequência de eventos comportamentais de natureza epiléptica que pode ser induzida por intensa estimulação auditiva (Seyfried, 1983). Estas crises apresentam-se como um padrão comportamental que se inicia por uma corrida abrupta seguida de convulsões clônicas e presença de um componente tônico extensor, culminando no

aparecimento de falência respiratória, ou então, recuperação completa dessas manifestações.

Esse modelo é utilizado no estudo de possíveis alterações bioquímicas presentes na maioria das epilepsias sendo caracterizada por extensas convulsões do tipo generalizadas tônico-clônico que podem ser conduzidas por intensas estimulações auditivas (Zivanovic *et al.*, 2005).

Ao contrário de outros modelos de epilepsia, as crises induzidas pelo som em animais DBA/2 não são particularmente sensíveis à uma categoria clínica específica de drogas antiepilépticas, entretanto, todos os agentes antiepilépticos disponíveis são efetivos em proteger as crises clônicas nesse modelo (Löscher, 1984).

Embora camundongos susceptíveis às crises audiogênicas possam ser úteis no teste de novos agentes anti-epilépticos, as crises induzidas pelo som são extremamente raras em humanos, e assim, camundongos suscetíveis não representam um modelo particular de distúrbios humanos (Löscher, 1984).

Um fato interessante deste modelo é a variação da susceptibilidade ser dependente da idade (Seyfried, 1983). Esta característica possibilita a esse modelo ser exaustivamente utilizado na busca de uma possível alteração bioquímica que estaria presente como elemento comum, em todas as formas de epilepsia, assim como, na avaliação ontogenética das alterações (Chen & Aberdeen, 1981; Horton *et al.*, 1980; Jones *et al.*, 1984; Laird *et al.*, 1984).

A geração das convulsões audiogênicas em animais naturalmente epiléticos inicia-se quinze a dezoito dias após o nascimento (Hjeresen *et al.*, 1987).

Em animais com o cérebro ainda em desenvolvimento, a geração de crises convulsivas é mais suscetível (Kubová & Mares, 1995).

Essas convulsões são bloqueadas pela transecção bilateral das camadas profundas do colículo superior, indicando alguma participação das camadas profundas do colículo superior na transdução sensoriomotora das crises audiogênicas em camundongos DBA/2, no processamento das crises (Costa *et al.*, 1998).

1.3. ESTRUTURAS ANATÔMICAS CEREBRAIS RELACIONADAS COM O DESENCADEAMENTO DA EPILEPSIA

Um dos primeiros sistemas cerebrais a ser investigado foi aquele cujo comprometimento causa, invariavelmente, algum tipo de amnésia, o qual constitui o chamado sistema límbico, composto pelo hipocampo e o giro hipocampal, o complexo amigdalóide, o núcleo *basalis* de Meynert, o núcleo septal, os núcleos mediais talâmicos e as estruturas corticais envolvidas nas funções associativas superiores. Os primeiros estudos revelaram que são precisamente essas estruturas as primeiras a serem lesadas pelas mudanças neuropatológicas causadas por substâncias que levam a amnésia (Jack *et al.*, 1997; Schmand *et al.*, 1997).

A formação hipocampal normal, pode ser dividida em quatro regiões, a *fascia dentata* ou Giro denteado, corno de Ammon ou Hipocampo (dividido em CA₁, CA₂, CA₃ e CA₄), o *subiculum* e o córtex entorrinal. A *fascia dentata* tem, fundamentalmente, dois tipos de projeções aferentes, uma glutamatérgica, que se origina na camada II do córtex entorrinal (via perfurante) e termina nos dois terços externos da camada molecular, e outra colinérgica, provenientes do núcleo septal

medial e que termina de forma difusa. As principais eferências da *fascia dentata* são os axônios das células granulares, denominadas fibras musgosas, que liberam principalmente glutamato (Acsády *et al.*, 1998) e ácido gama-amino-butírico (GABA) e fazem sinapses com neurônios piramidais de CA₃ e CA₄, interneurônios e células musgosas do hilo (Amaral *et al.*, 1990; Sandler & Smith, 1991; Sloviter *et al.*, 1996; Gutierrez, 2003).

As células piramidais de CA₃ e CA₄ emitem axônios que fazem sinapses em CA₁ e esta área, por sua vez, projeta para o *subiculum*. As células localizadas no hilo da *fascia dentata* são principalmente de dois tipos: interneurônios que liberam GABA e neuropeptídeos, e células musgosas, que projetam axônios principalmente para o terço interno da camada molecular interna da *fascia dentata*, que liberam glutamato e ativam interneurônios GABAérgicos (Soriano & Frotscher, 1994).

O hipocampo é uma região do lobo temporal, responsável por alguns aspectos da neurobiologia da memória. Os aferentes vindos de fora do hipocampo são as fibras perfurantes, que fazem sinapses com as células granulares do giro denteado. Os axônios das células granulares se estendem até a região CA₃, onde estabelecem sinapses com os dendritos das células piramidais. Estas, por sua vez, projetam seus axônios para fora do hipocampo, mas enviam também colaterais para a região CA₁, os colaterais de Schaffer, que fazem sinapses com os dendritos de outras células piramidais aí situadas, cujos axônios projetam para fora do hipocampo (Rutecki & Yang, 1998; Lent, 2001).

A formação hipocampal compreende uma série de circuitos anatômicos envolvendo múltiplas regiões corticais e subcorticais. Estes circuitos incluem a clássica via trans-sináptica que se caracterizam por apresentar um fluxo

unidirecional, bem como, circuitos com grande reciprocidade como os que envolvem o córtex entorrinal. As sinapses desta circuitaria são predominantemente excitatórias, sendo que a inibição se faz principalmente através de interneurônios localizados no hilo e na região do corno de Ammon (Costa *et al.*, 1998; Künzle & Randtke-Schuller, 2001).

Pesquisas têm revelado que a formação hipocampal encontra-se extensivamente lesada em pacientes após quadros de epilepsias induzidas com a pilocarpina (Rutecki & Yang, 1998). As áreas mais vulneráveis à morte celular após epilepsia são CA₁, CA₃ e região do hilo, isto ocorre devido estas regiões serem ricas em receptores para o glutamato, como os receptores sensíveis ao N-Metil-D-Aspartato (NMDA) no caso do CA₁ e os receptores para cainato no caso do hilo e região CA₃. Estes receptores quando ativados, permitem um influxo de grande quantidade de cátions, particularmente o íon cálcio através do receptor NMDA para o meio intracelular do neurônio alvo, que poderia alcançar concentrações lesivas à célula. Algumas áreas são caracterizadas por apresentar maior resistência neural a lesões provocadas pela hiperexcitabilidade, essa resistência é proveniente da presença de proteínas com a propriedade de tamponar cálcio, tais como a calbidina e cromogranina (Sloviter, 1987; Duman & Vaidya, 1998).

Estudos com eletrodos na profundidade do cérebro apontam o hipocampo como estrutura mais frequentemente envolvida no início das crises. O hipocampo pode ser uma estrutura crítica na qual as descargas se “afunilam” durante o processo de disseminação, ou ainda, uma estrutura responsável pela gênese das crises (Lopes da Silva & Arnolds, 1978).

No modelo de epilepsia do lobo temporal há um padrão caracterizado por morte neuronal seletiva no hipocampo, na região CA₁ (setor de Sommer), CA₃ e no hilo, enquanto as células granulares do giro denteado e as células piramidais da região CA₂ são caracteristicamente menos afetadas (Margerison & Corsellis, 1966).

Dados obtidos de estudos com modelos animais sugerem que a esclerose hipocampal está associada à presença de uma injúria precipitante inicial, porém crises epilépticas de curta duração também podem contribuir com a perda neuronal (Pitkanen & Sutula, 2002; Mathern *et al.*, 2002; Fabene *et al.*, 2003; Nairismagi *et al.*, 2004).

O estudo eletrográfico observado durante a convulsão induzida pela injeção da pilocarpina mostra que a origem das descargas epilépticas ocorre na região hipocampal, difundindo-se para a amígdala e córtex. Investigações neuropatológicas feitas durante o período agudo do modelo mostram que o hipocampo é a estrutura cerebral mais afetada dentre as outras também envolvidas (Turski *et al.*, 1987b).

No modelo epiléptico da pilocarpina há uma agressão inicial que leva à perda de células GABAérgicas hipocampais, com diminuição da atividade inibitória, que combinada à aferência excitatória dos estímulos normais, irão gerar descargas excessivas das células granulares, responsável pela morte celular progressiva no hilo e ao aparecimento de uma condição epiléptica com o passar do tempo após a agressão inicial (Costa *et al.*, 1998).

As substâncias encontradas nas folhas da *C. sylvestre* como acetato de cunaniol e cunaniol por possuírem efeitos relacionados ao aumento da excitabilidade do SNC podem ser enquadrados como um novo modelo quimioconvulsivante,

possibilitando estudo de eficácia de drogas anticunvulsivantes, possuindo características próprias em relação aos outros modelos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

A proposta deste trabalho foi estudar os efeitos do cunaniol e acetato de cunaniol sobre o SNC para caracterização de um padrão convulsivo que possa ser usado como modelo experimental de epilepsia generalizada.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a cinética do acetato de cunaniol e cunaniol, medido após aplicação intraperitoneal, através da análise cromatográfica e sua concentração no plasma dos animais.
- Caracterizar os registros eletroencefalográficos de animais em convulsão, ocasionadas pela aplicação intraperitoneal de cunaniol.
- Correlacionar o processo das crises convulsivas com a concentração plasmática de cunaniol.
- Avaliar a eficiência de substâncias antiepilépticas e miorelaxantes no controle das convulsões provocadas pelo cunaniol.
- Correlacionar a eficácia das substâncias antiepilépticas com o sistema de neurotransmissão participante do processo convulsivo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BOTÂNICO

A *Clibadium sylvestre* foi coletada na cidade de Castanhal-PA, em área de terra-firme, da Universidade Federal do Pará (UFPA). Imediatamente após a colheita das folhas maduras o material foi pesado, seco em estufa de ventilação interna e processada para extração do acetato cunaniol, no Laboratório de Cromatografia do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da UFPA em Belém PA.

3.2. EXTRAÇÃO DO MATERIAL PARA ESTUDO

3.2.1. Preparação dos Extratos Brutos

As folhas de *Clibadium sylvestre* foram limpas e em seguida secas em estufa, sendo posteriormente trituradas. As extrações da droga para estudo foram realizadas por percolação com solventes em ordem crescente de polaridade (Figura 3): Hexano, Diclorometano e Metanol, respectivamente, que após filtração forneceram os extratos brutos hexânico (EBH), extratos brutos diclorometânico (EBDM) e metanólico (EBM). Esses extratos, com suas respectivas massas obtidas, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Rendimento de extrato bruto obtido das folhas de *Clibadium sylvestre*.

| PARTE VEGETAL | SOLVENTE | EXTRATO BRUTO (g) | RENDIMENTO (%) |
|---------------|---------------|-------------------|----------------|
| Folhas | Hexano | EBH (6,10) | 0,99 |
| | Diclorometano | EBDM (18,20) | 3,74 |
| | Metanol | EBM (20,65) | 1,43 |

Rendimento de uma amostra de 772,7 g de material seco.

3.2.2. Isolamento dos Constituintes Químicos

3.2.2.1. Fracionamento do Extrato Hexânico das Folhas de *Clibadium sylvestre*

O extrato hexânico das folhas (6,10 g) foi fracionado em coluna cromatográfica em sílica gel por via úmida (CCVU) filtrante (Figura 4), com utilização das misturas de solventes com polaridade crescente, resultando num total de 4 frações: hexano-acetato de etila 10% (Hex-AcOEt 10%) (1,45 g), Hex-AcOEt 30% (1,85 g), Hex-AcOEt 50% (0,85 g) e AcOEt 100% (0,60 g). As frações obtidas foram analisadas através de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) e reveladas com solução de sulfato cérico 1%. As frações Hex-AcOEt 30% e Hex-AcOEt 50% foram reunidas (**A₁**, 2,7 g) e refracionadas em coluna cromatográfica e eluída com hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade, resultando um total de 10 frações que foram reunidas em **A₂** (Fr. 4-7, 1,20 g) e **A₃** (Fr. 8-9, 0,2 g). As frações **A₂** e **A₃** foram dissolvidas separadamente em acetonitrila, filtradas em membrana filtrante com diâmetro de poros de 0,25 µm, sendo posteriormente injetadas, em alíquotas de 500 µL no sistema de cromatografia líquida (HPLC).

O HPLC semipreparativo usado foi o aparelho composto por uma bomba LC-8 AD (Shimadzu), com sistema de injeção manual (loop de 500 µL), detector SPD 10 AV UV-Visível (em um comprimento de onda de 245 nm) e uma interface CBM, software Class 3.1. Como fase estacionária foi utilizado uma coluna semipreparativa Gemini C18 (250 x 10 mm), 5 µm e pré-coluna C18. Como fase móvel foi utilizado mistura de solventes, água ultra-pura obtida do sistema millipore (Direct-Q3), com acetonitrila, em fluxo de 4,7 ml/minuto. Os solventes foram filtrados em membrana de nylon de 0,45 µm e mantidos em banho de ultrassom durante 20

minutos. Foi utilizado um sistema isocrático de H₂O/CH₃CN 60%. A separação dos picos no HPLC semipreparativo resultou em três frações para A₂ e quatro frações para A₃.

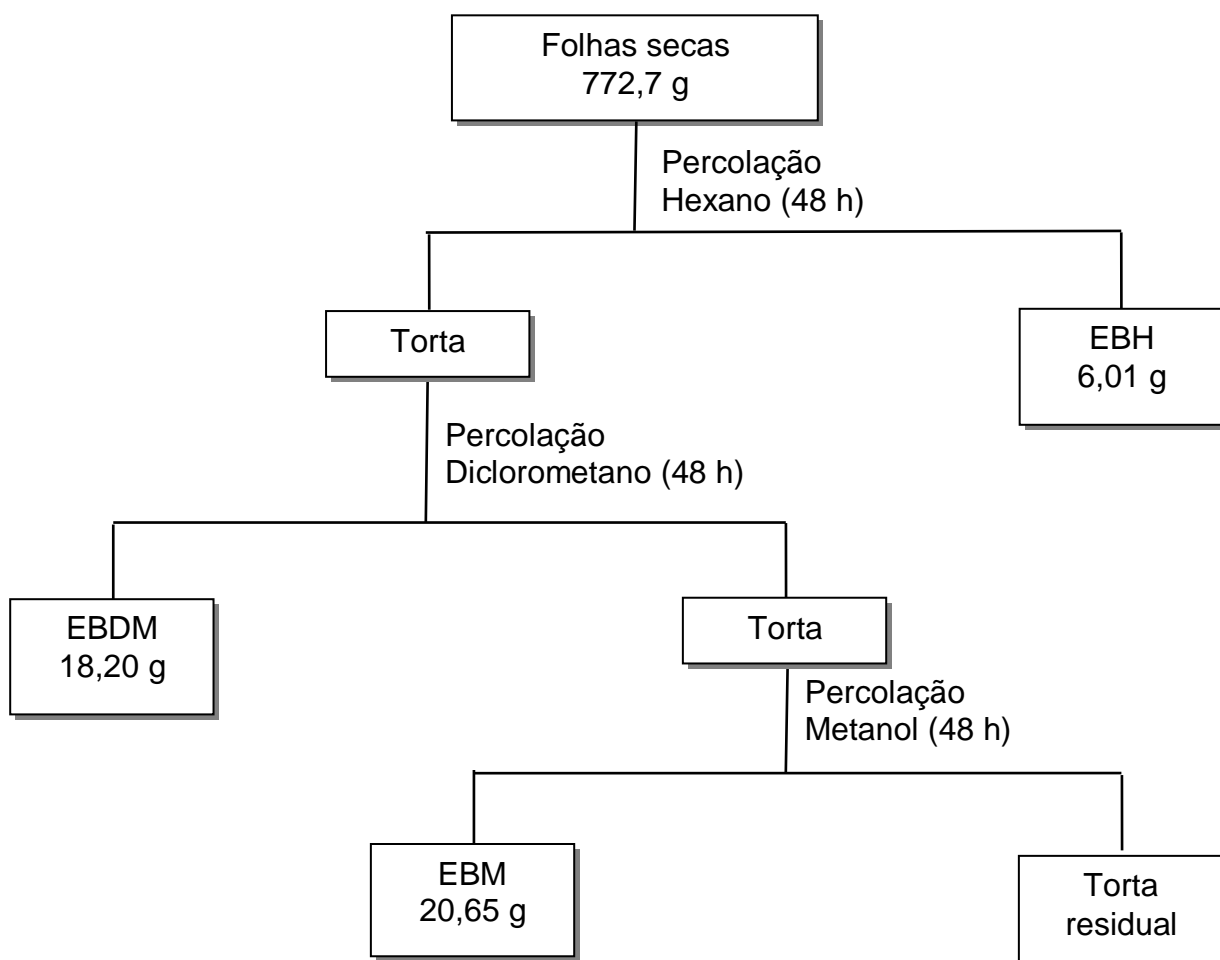


Figura 3- Obtenção dos extratos brutos das folhas de *Clibadium sylvestre*, extratos em ordem crescentes de polaridade.

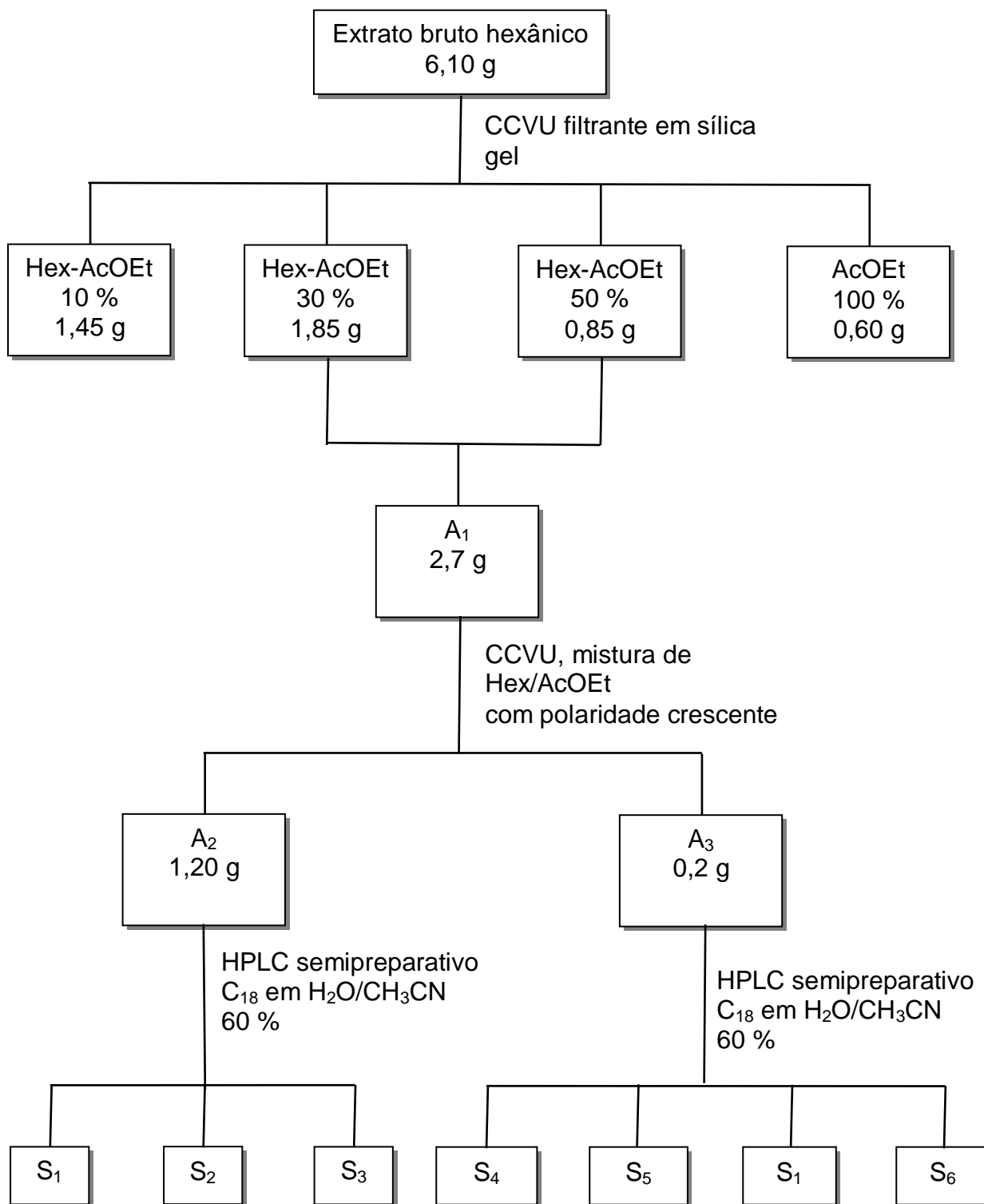
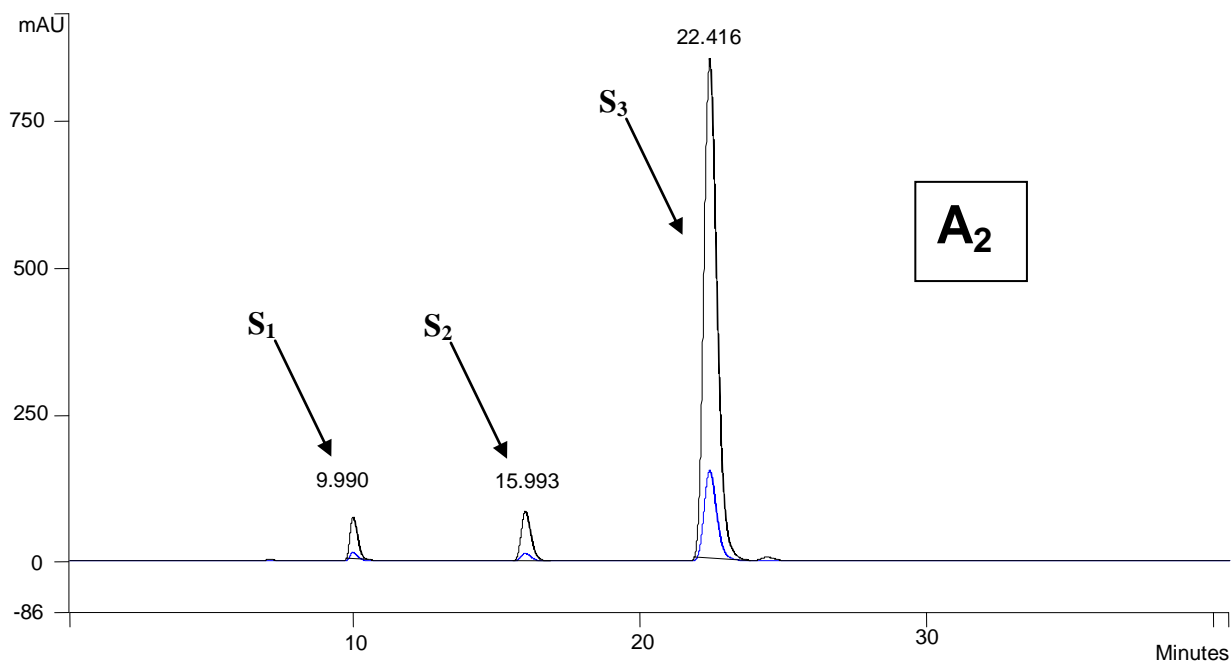


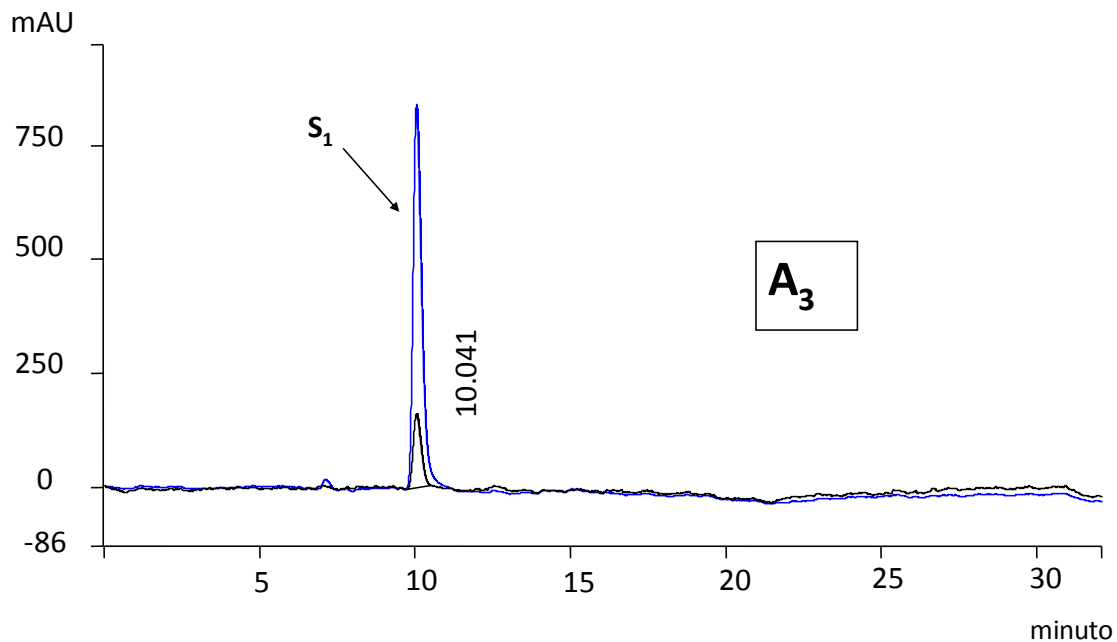
Figura 4- Fracionamento do extrato hexânico das folhas de *Clibadium sylvestre*.

As substâncias identificadas em A₂ são representadas por S₁ (cunaniol), S₂ (substância não elucidada) e S₃ (acetato de cunaniol) analisadas no Cromatograma 1, que confirma a presença das substâncias de acordo com o tempo de retenção.



Cromatograma 1- Tempo de retenção cromatográfica das substâncias majoritárias em A₂, com identificação do padrão para cunaniol (S₁), substância não elucidada (S₂) e Acetato de cunaniol (S₃).

As substâncias identificadas na fração A₃ (Figura 4) foram representadas por S₁ (cunaniol), S₄ (substância não elucidada), S₅ (substância não elucidada) e S₆ (substância não elucidada) e apresentado conforme o tempo de retenção cromatográfica da substância majoritária S₁ (Cromatograma 2).



Cromatograma 2- Tempo de retenção cromatográfica da substância majoritária em A_3 , com identificação do padrão para cunaniol (S_1).

As frações purificadas de A_2 e A_3 foram analisadas por ressonância magnética nuclear (RMN) usando ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) com técnica uni e bidimensional. As substâncias foram identificadas quimicamente baseando-se em padrões descritos na literatura. Os dados referentes aos espectros de ressonância magnética nuclear das substâncias S_1 e S_3 , em anexo, comprovam a purificação do cunaniol e acetato de cunaniol.

3.2.2.2. Determinação estrutural de S₁ e S₃

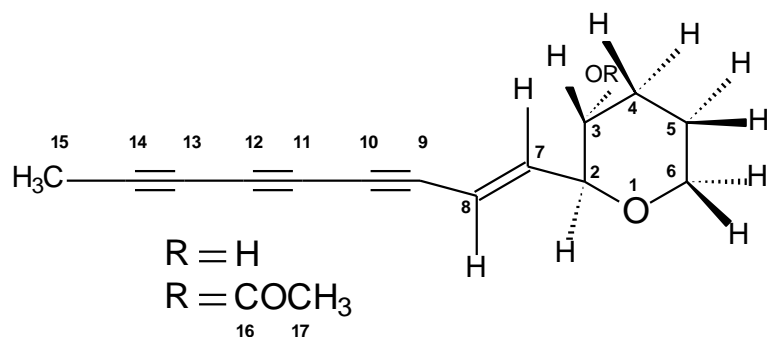
Os dados de RMN ¹H e ¹³C de S₃ encontram-se na Tabela 2, juntamente com os dados encontrados na literatura (COSTA, 2006) para o Acetato de Cunaniol.

Tabela 2-Dados de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) e RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) para S₃ (acetato de cunaniol).

| C | RMN ¹ H(δ) | RMN ¹ H(δ) * | RMN ¹³ C(δ) | RMN ¹³ C(δ) * |
|------|--------------------------|--------------------------|------------------------|--------------------------|
| C-2 | H axα 3,77 | H axα 3,77 | 78,5 | 78,70 |
| C-3 | H axβ 4,45 | H axβ 4,50 | 71,3 | 71,40 |
| C-4 | H axα 1,45 H eqβ 2,05 | H axα 1,45 H eqβ 2,04 | 29,1 | 29,2 |
| C-5 | H axβ 1,51 H eqβ 1,71 | H axβ 1,50 H eqβ 1,70 | 24,6 | 24,7 |
| C-6 | H axα 3,41 H eqβ 3,90 | H axα 3,40 H eqβ 3,90 | 67,3 | 67,50 |
| C-7 | HC= 5,78 | HC= 5,80 | 110,0 | 110,4 |
| C-8 | HC= 6,30 | HC=6,29 | 144,3 | 144,4 |
| C-9 | | | 67,2 | 67,39 |
| C-10 | | | 73,3 | 73,47 |
| C-11 | | | 58,7 | 54,4 |
| C-12 | | | 64,7 | 65,9 |
| C-13 | | | 75,4 | 75,6 |
| C-14 | | | 78,2 | 78,2 |
| C-15 | 1,95 | 1,94 | 4,53 | 4,66 |
| C-16 | | | 169,7 | 169,9 |
| C-17 | 2,0 | 2,04 | 20,9 | 21,10 |

*Costa *et al.*, 2006.

O grupo R na fórmula abaixo é a única diferença estrutural entre o Cunaniol (R=H) e o Acetato de Cunaniol (R=COCH₃), essa diferença estrutural é o suficiente para distinguir as substâncias quando se observa os espectros de RMN.



No espectro de RMN ¹³C do Acetato de Cunaniol, os sinais em δ_c 169,7 atribuído ao carbono carbonílico e 20,9 atribuído ao carbono metilênico, confirmam a presença do grupo acetato, que está ausente no espectro do cunaniol. A presença do grupo acetato também é perceptível no espectro de RMN ¹H, uma vez que ele influencia no deslocamento do H-3, o sinal em δ_H 4,45 justifica este fato.

3.3. ANIMAIS

Para realizar o presente trabalho, foram utilizados ratos albinos wistar adultos do sexo masculino, pesando entre 200 a 290 g, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Pará, e mantidos no Biotério do Laboratório de Neuroquímica, sob condições de livre acesso à água e alimentação, como também à temperatura ambiente constante e ciclo claro-escuro de 12 horas, de 7:00 às 19:00 e mantidos à temperatura ambiente de 22 ± 2 °C. Os protocolos para os experimentos usados neste estudo foi aprovado pelo comitê de ética institucional (CEPAE-UFPA) sob registro: BIO024-10.

3. 4. DROGAS

Para o estudo de caracterização das convulsões foram utilizados acetato de cunaniol e cunaniol na concentração de 5 mg/ml dissolvido em 0,1 % de Tween 20 (Sigma) e solução fisiológica NaCl (0,9 %).

Baseado em estudos farmacológicos realizados no Laboratório de Neuroquímica, foram observadas que referidas substâncias possuem propriedades convulsivantes após aplicação via intraperitoneal, sendo que a curva dose-resposta em ratos para o cunaniol indicou dose efetiva média de $2,92 \pm 0,69$ mg/kg e dose letal média de $3,64 \pm 0,39$ mg/kg. Considerando que as substâncias são fotossensíveis, foram acondicionadas em frascos adequados e mantidas em refrigeração.

3.5. CARACTERIZAÇÃO DA CINÉTICA DO ACETATO DE CUNANIOL E CUNANIOL APÓS APLICAÇÃO INTRAPERITONEAL DE EXTRATO HEXÂNICO, ATRAVÉS DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO PLASMA DOS ANIMAIS

Foram realizadas análises cromatográficas do plasma dos animais apresentando convulsões induzidas pelo extrato hexânico na dose de $26,25 \pm 2,59$ mg/kg via intraperitoneal, para verificação através da cromatografia líquida dos tempos de retenção das substâncias majoritárias encontradas no extrato hexânico (acetato de cunaniol e cunaniol), a partir da análise plasmática, verificando o tempo de absorção e latência para o aparecimento do comportamento convulsivo.

A colheita de sangue foi procedida em tempo fixo após a aplicação, respectivamente em três, cinco, 15, 30 e 60 minutos. O sangue foi mantido em gelo em frascos heparinizados (Liquemine® 5000 UI/ml Laboratório Blausiegel) e

posteriormente centrifugado em resfriamento a 7500 RPM durante 10 minutos. As amostras foram armazenadas em tubos e resfriadas a -80° C, e encaminhadas ao Laboratório de Cromatografia (LABCRO-UFPA), onde sofreram desproteção com acetonitrila e em seguida filtradas e preparadas para análise cromatográficas.

O mesmo procedimento de colheita de sangue foi feito com animais hígidos, para testes *in vitro* com o plasma. Após a centrifugação e acondicionamento do plasma foi incubado o volume de 900 µl a 37° C durante 30 minutos, com 100 µl de acetato de cunaniol a 2 %, com concentração final de 0,2 mg/ml, a reação foi parada com acetonitrila para resfriamento das amostras, em seguida foi feita a análise cromatográfica.

Para a verificação da via metabólica do acetato de cunaniol, o plasma foi dopado antecipadamente com fisostigmina 0,01 mg/ml (Sigma), provocando a carbamilação das colinesterases presentes e posteriormente adicionado acetato de cunaniol 0,2 mg/ml, e incubado durante 30 minutos a 37° C.

3.6. CARACTERIZAÇÃO DOS REGISTROS ELETROCORTICOGRÁFICOS DE ANIMAIS EM CONVULSÃO

3.6.1. Cirurgia para Implante de Eletrodos

Para a obtenção de registros eletrocorticográficos (ECoG) após a aplicação da droga, todos os ratos usados nos experimentos foram submetidos a procedimento cirúrgico para implante e fixação de eletrodos (Figura 5).

Inicialmente foi adotado para o procedimento de anestesia dos animais associação de cloridrato de quetamina 10 % (Dopalen® Laboratório Vetbrands) via intraperitoneal, na dose de 50 mg/kg (5 mg/100 g de peso vivo), cloridrato de xilazina

a 2 % na dose de 5 mg/kg (Kensol® do Laboratório Köning) e diazepam 1 mg/kg (Laboratório Cristália), via intraperitoneal. Antes de iniciar a cirurgia para implantar os eletrodos, foi avaliado o grau de anestesia (plano anestésico), verificando o reflexo à dor após compressão da cauda ou do reflexo interdigital para verificar a necessidade de suplementação anestésica. Se o animal não apresentar reação, é iniciada a tricotomia para expor a pele sobre o crânio, devendo ser injetado lidocaína a 2 % (Laboratório Hipolabor) com vasoconstritor, para reforçar o efeito anestésico no local da incisão. Sendo a lidocaína colocada também nos meatos auriculares para diminuir o efeito da pressão exercida nesse local pelas barras auriculares quando o animal for fixado ao estereotático. Após tricotomia e as devidas medidas de assepsia e anestesia, o animal é posicionado em aparelho estereotático.

Após a incisão longitudinal da pele da cabeça, foi realizado a exposição da superfície óssea do crânio e cuidadosamente limpa (Figura 6), para perfuração do crânio foram utilizadas brocas odontológicas nas coordenadas estereotáticas de Bregma 0,96 mm, latero-lateral \pm 2 mm, dorso-ventral -2 mm em área do córtex motor do rato (Figuras 7 e 8) e Bregma -10,92 mm, latero-lateral \pm 1 mm e dorso-ventral de -4 mm, para registro do cerebelo (Paxinos & Watson, 2005). Os eletrodos foram fixados ao crânio dos ratos utilizando acrílico autopolimerizante. Após a cirurgia foi aplicado antibiótico enrofloxacina (Flotril® 2,5 % Laboratório Schering-Plough) na dose de 10 mg/kg e antiinflamatório flunixin meglumine (Banamine® Laboratório Schering-Plough 10mg/ml) na dose de 2 mg/kg, com obtenção dos registros após sete dias da cirurgia.

Para obtenção dos registros os animais foram inicialmente anestesiados com o éter dietílico P.A. (Sigma), o que possibilitou a colocação e fixação de tubo

endotraqueal, lubrificado previamente com Cloridrato de lidocaína Gel a 2% (Laboratório Hipolabor), em seguida foi utilizado 6 mg/kg de Trietilodeto de Galamina (Flaxedil® 40 mg do Laboratório Rhodia Farma LTDA) por via intraperitoneal, de tal forma que a medida em que os planos anestésicos superficializam o miorelaxante é absorvido mantendo o animal imóvel, a respiração do animal foi mantida mecanicamente durante todo o experimento.

3.6.2. Equipamentos Utilizados para Obtenção de Registros

Para investigação proposta no presente trabalho, a principal técnica utilizada foi de registro eletrofisiológico de potencial de campo. Decorridos sete dias após a cirurgia, os animais foram submetidos ao quadro convulsivo com $2,92 \pm 0,69$ mg/kg de cunaniol via intraperitoneal. A aquisição do registro foi realizada através de um amplificador diferencial com alta impedância de entrada AC (Grass Technologies, Modelo P511) ajustados com filtragem de 0,3 Hz (passa baixa) e 300 Hz (passa alta), monitorados com um osciloscópio (Protek, Modelo 6510), e continuamente digitalizados em uma taxa de 1 KHz por um computador equipado com uma placa de aquisição de dados (National Instruments, Austin, TX).

3.6.3. Análise do Eletrocorticograma (ECoG)

Para a caracterização dos aspectos de hiperexcitabilidade neuronal nas convulsões ocasionadas pelo cunaniol, foi utilizado o programa Signal® 3.0 e Matlab® 7.1, que possibilitou a análise no domínio da frequência das ondas cerebrais, além da inspeção visual dos padrões ondulatórios. A análise espectral de potência dos componentes de frequência do ECoG, proporcionou correlacionar os

estágios de excitabilidade neuronal, após a aplicação de drogas para controlar as convulsões.



Figura 5- Procedimento anestésico e fixação do animal no estereotáxico.



Figura 6- Incisão cirúrgica longitudinal demonstrando a linha do Bregma.



Figura 7- Posicionamento dos eletrodos em 0,96 Bregma, para acesso ao córtex.



Figura 8- Posicionamento após a perfuração do crânio, posição lateral de 2 mm e dorso-ventral de 2 mm.

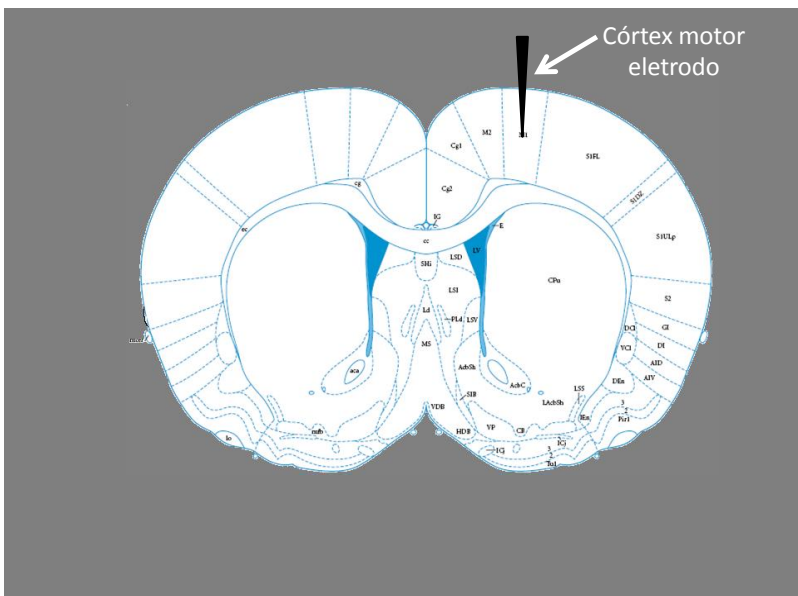


Figura 9- Coordenada estereotáxica e posicionamento do eletrodo no córtex motor.

3.7. AVALIAÇÃO DA AÇÃO DE DROGAS NO CONTROLE DAS CONVULSÕES INDUZIDAS POR APLICAÇÃO DE CUNANIOL

O tratamento via intraperitoneal de ratos com cunaniol na dose de $2,92 \pm 0,69$ mg/kg foi capaz de induzir convulsões tônico-clônicas sem causar a morte, e a dose de $3,64 \pm 0,39$ mg/kg induz convulsões tônico-clônicas seguida por perda do reflexo de postura e morte, em média 26 ± 10 minutos após a administração.

Os ratos foram distribuídos em seis grupos com seis animais que receberam por via intraperitoneal injeções prévias (30 minutos antes) de solução salina (NaCl 0,9 %) (10 ml/kg), Diazepam (Compaz®, Laboratório Cristália) (5 mg/kg), Fenobarbital (Fenocris®, Laboratório Cristália) (30 mg/kg), Escopolamina (Uni Hioscin® Laboratório UNI) (10 mg/kg), Cloridrato de Xilazina (Kensol®) (20 mg/kg) e Cloridrato Quetamina (Dopalen®) (100 mg/kg), posteriormente cada grupo recebeu doses crescentes de cunaniol, que variaram entre 1,1 a 13,3 mg/kg via

intraperitoneal. Os animais tratados foram observados durante 60 minutos e o efeito comportamental foi avaliado, obedecendo a uma escala de classificação em estágios proposta por Moreira *et al.* (1989), e adequada para este trabalho, conforme os estágios seguintes:

Estágio - 1: Os animais apresentam imobilidade, salivação discreta, tremores de pinas e vibríssias.

Estágio - 2: Os animais apresentam movimentos orofaciais (abre e fecha a boca), movimentos rápidos com as vibríssias e cauda embandeirada.

Estágio - 3: Os animais apresentam crises clônicas isoladas em um ou mais membros, e espasmos tônicos nos membros anteriores.

Estágio - 4: Os animais apresentam crises clônicas generalizadas, salivação abundante, e perda transitória do reflexo de postura.

Estágio - 5: Os animais apresentam crises tônico-clônicas (Grande-Mal), cianose, perda do reflexo de postura e morte por incapacidade de respirar no momento da convulsão.

Cada estágio subsequente inclui os comportamentos dos estágios precedentes. Os estágios foram utilizados em uma escala progressiva de relação dose/efeito estabelecendo correlação entre os estágios apresentados após a aplicação de doses crescentes de cunaniol.

Para facilitar a análise do comportamento observado após a aplicação do cunaniol, os referidos estágios foram desmembrados e para cada comportamento apresentado atribui-se um valor em escala progressiva de 1,0 a 10,0. Os comportamentos característicos foram observados em cada animal, a intensidade do comportamento foi registrado usando a escala de Rundfeldt *et al.* (1995) e

Homayoun *et al.* (2002), modificada de acordo com os estágios característicos da convulsão, sendo o comportamento registrado durante 60 minutos usando a seguinte escala: imobilidade (1,0), tremores de pino e vibrissas eriçadas (1,5), tremores orofaciais (2,0), cauda embandeirada (3,0), crises clônicas isoladas principalmente em membros anteriores (4,0), espasmos tônicos em membros anteriores (5,0), crises clônicas generalizadas com perda transitória do reflexo de postura (6,0), crises tônico-clônicas (8,0) e morte (10,0). Para a confirmação dos dados obtidos pela análise comportamental, foram implantados eletrodos nos animais para registros eletrocorticográficos, obtendo o traçado 30 minutos após a aplicação das drogas anticonvulsivantes e 30 minutos após a aplicação de $3,64 \pm 0,39$ mg/kg de cunaniol, para proporcionar avaliação do pré-tratamento com as drogas anticonvulsivantes e miorrelaxantes no desencadeamento e propagação do processo convulsivo.

Para analisar a influência da ordem de aplicação na atuação das drogas anticonvulsivantes, o protocolo de análise foi invertido, sendo o cunaniol a primeira droga a ser aplicada por via intraperitoneal na dose de $2,92 \pm 0,69$ mg/kg, a partir do qual se registrou o eletrocorticograma durante 30 minutos. Posteriormente foi aplicado por via intraperitoneal, os anticonvulsivantes pré-estabelecidas para o controle das convulsões, e foi registrado o eletrocorticograma por mais 30 minutos.

3.6.8. **Análise Estatística**

Os resultados foram apresentados em estatística descritiva como média, desvio padrão. Na análise de variância (ANOVA) um critério seguida do teste “t” de Student (amostras independentes), os dados obtidos por progressão não linear foi

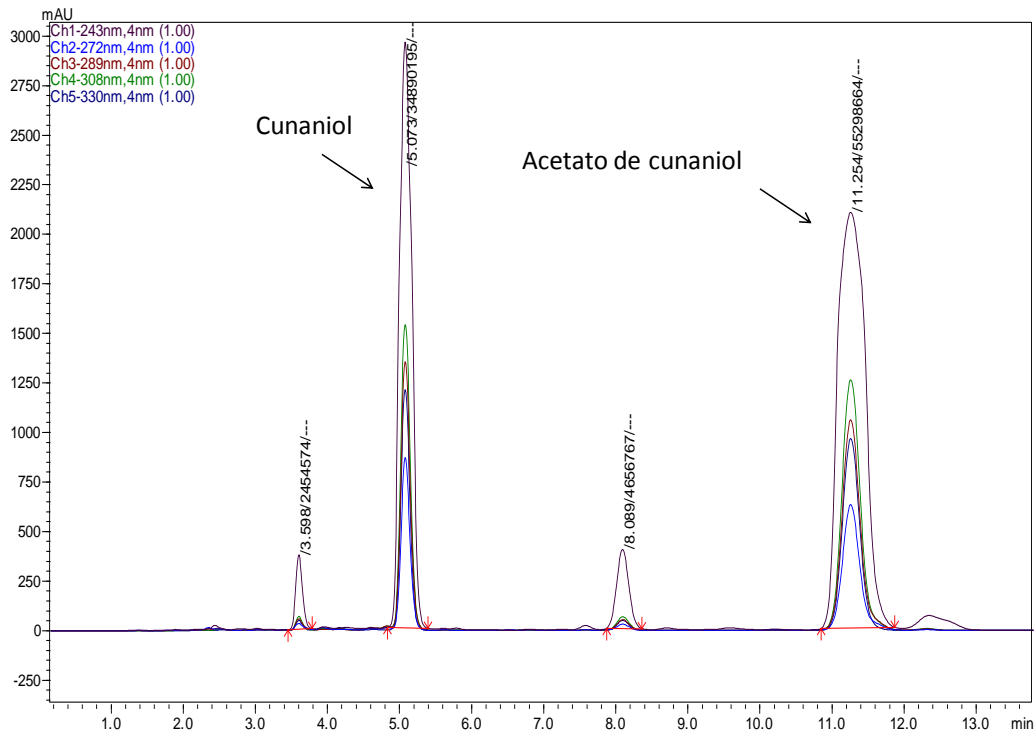
expressado com limites de confiança e analisado em uma escala logarítmica. As proporções foram analisadas e as diferenças foram detectadas pelo teste de Fisher. Os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

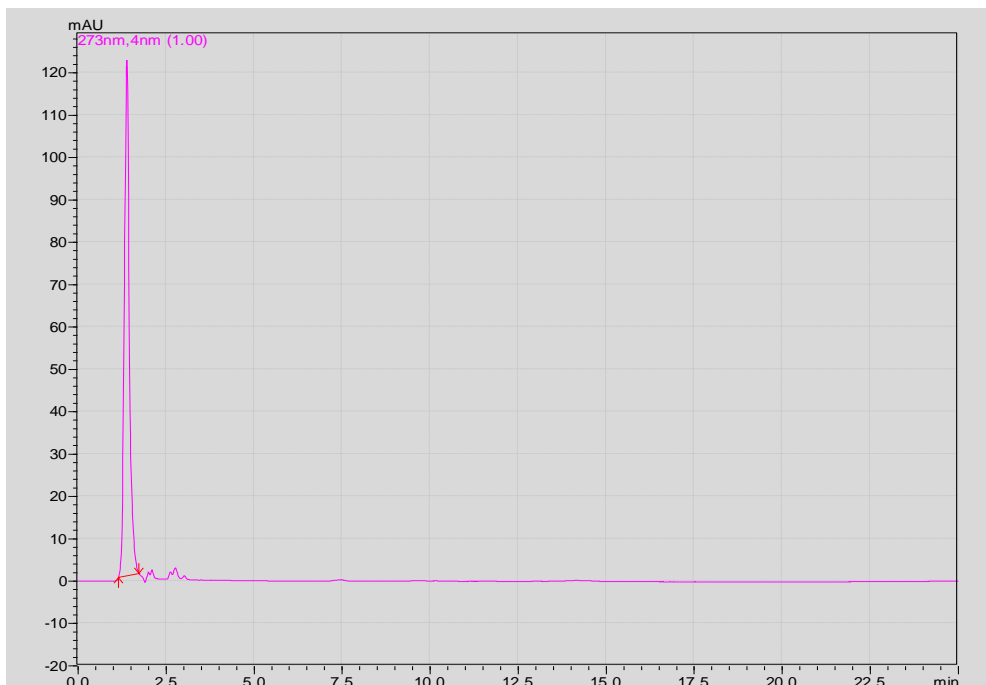
4.1. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DO PLASMA DE ANIMAIS QUE RECEBERAM INJEÇÕES INTRAPERITONEAIS DE EXTRATO HEXÂNICO (ACETATO DE CUNANIOL E CUNANIOL) E AVALIAÇÃO DA BIOTRANSFORMAÇÃO DO ACETATO DE CUNANIOL EM CUNANIOL

De acordo com o Cromatograma 3 o extrato hexânico é composto basicamente por uma mistura de acetato de cunaniol e cunaniol, com tempo de retenção de 5,07 minutos para o cunaniol e de 11,25 minutos para o acetato de cunaniol, correspondendo às substâncias majoritárias do extrato, comprovando a presença destas substâncias utilizadas no experimento. Foi possível também verificar a presença de dois outros compostos minoritários com tempo de retenção de 3,59 e 8,08 minutos.

Através do Cromatograma 4 foi possível demonstrar o perfil cromatográfico do plasma dos ratos hígidos sem a aplicação prévia de extrato hexânico, observando a presença de substância endógena com o tempo de pico em 1 minuto.



Cromatograma 3- Perfil cromatográfico da amostra de extrato hexânico utilizado no tratamento dos animais, observar tempo de retenção das substâncias majoritárias cunaniol e acetato de cunaniol.

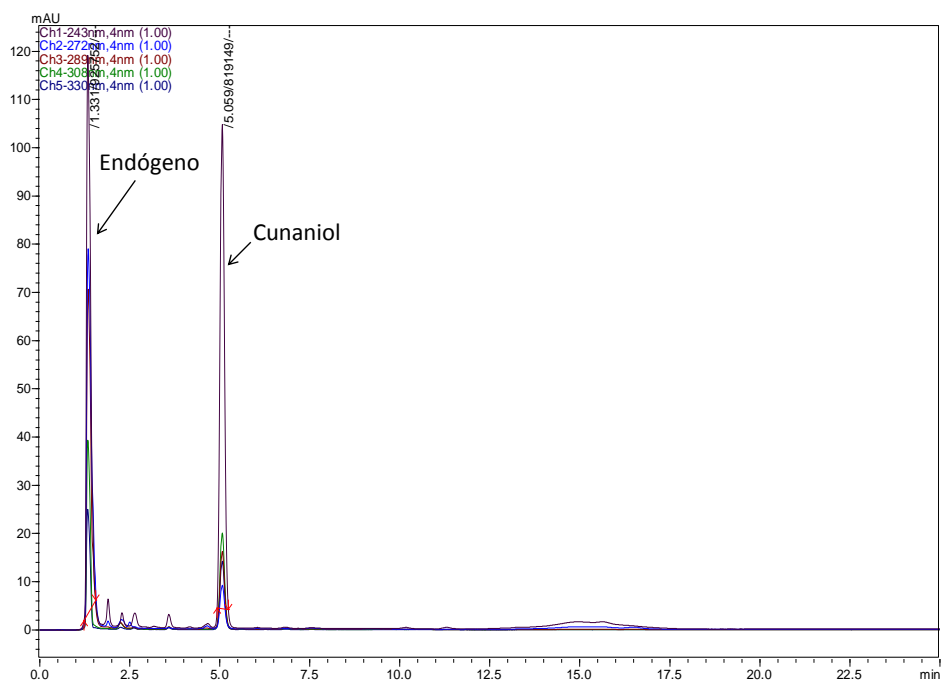


Cromatograma 4- Perfil cromatográfico de amostra de plasma de animal não tratado.

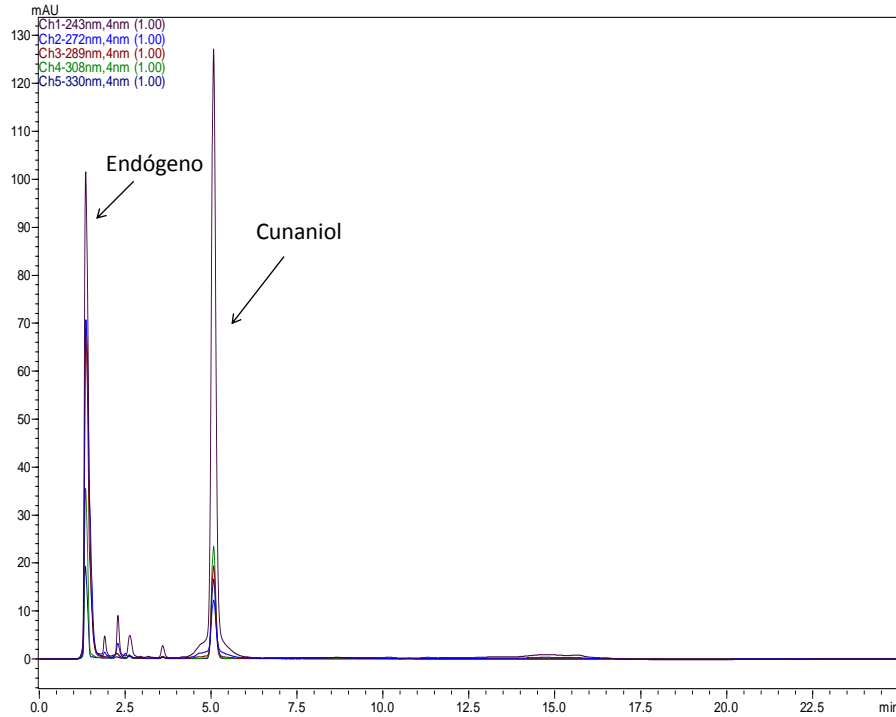
Na análise do Cromatograma 5 o perfil cromatográfico do plasma dos animais, decorridos três minutos após a aplicação intraperitoneal de $26,25 \pm 2,59$ mg/kg de dose efetiva de extrato hexânico, os animais apresentaram, movimentos rápidos com as vibríscia e cauda embandeirada. O cromatograma revelou a presença de cunaniol no plasma dos animais com tempo de retenção de 5,059 minutos. Não sendo observado a presença do acetado de cunaniol no plasma do animal tratado, de acordo com o Cromatograma 3.

Através da análise cromatográfica do sangue dos animais colhidos 5 minutos após a aplicação intraperitoneal do extrato hexânico, nos quais os animais apresentaram crises clônicas generalizadas, salivação abundante e perda transitória do reflexo de postura, foi observado pico de cunaniol, indicando a presença da

substância no plasma, e a ausência da detecção do acetato de cunaniol (Cromatograma 6).



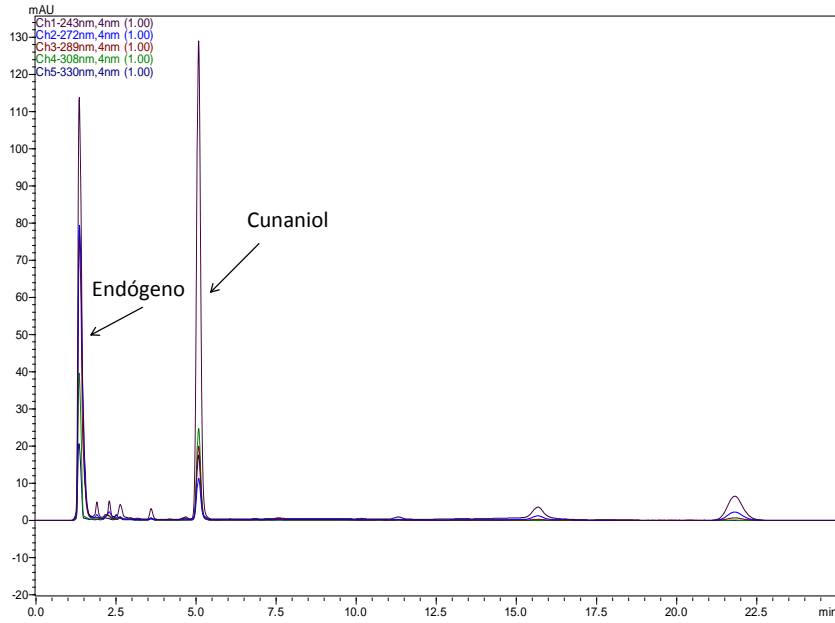
Cromatograma 5– Perfil cromatográfico da amostra de plasma retirada três minutos após aplicação intraperitoneal de extrato hexânico.



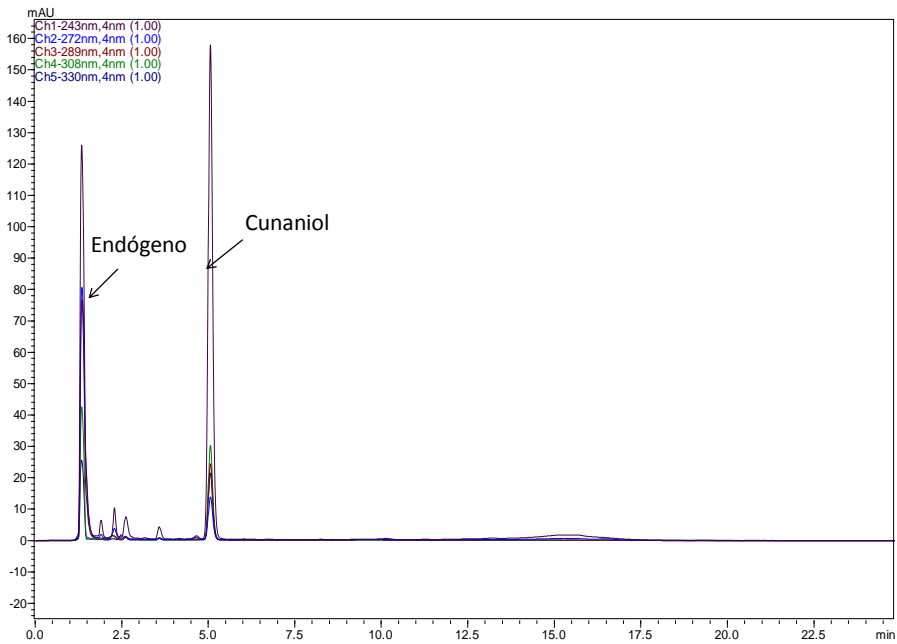
Cromatograma 6– Perfil cromatográfico da amostra de plasma retirada cinco minutos após a aplicação intraperitoneal de extrato hexânico.

Amostras de plasma coletados 15 e 30 minutos após o contato com a droga e analisadas pela cromatografia líquida, indicou somente a presença de cunaniol, com animais apresentando comportamentos definidos por convulsões tônico-clônica, perda do reflexo de postura e cianose.

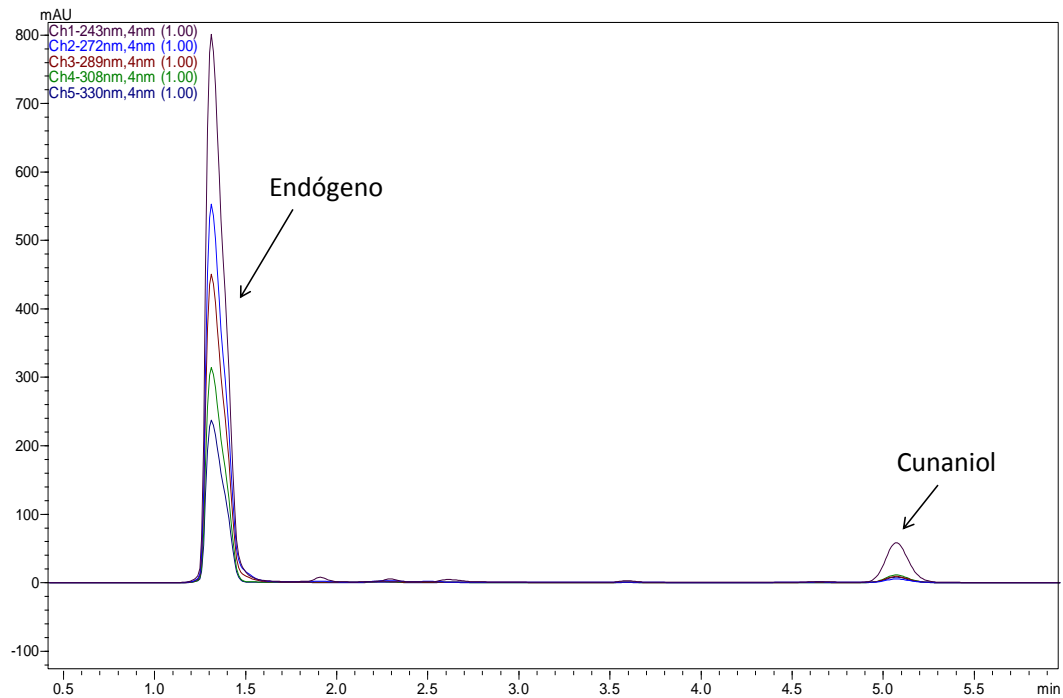
Na análise do perfil cromatográfico das amostras do plasma após uma hora de aplicação do extrato hexânico (Cromatograma 9), foi constatada somente a presença de cunaniol, neste caso, os animais apresentavam comportamento convulsivo com perda do reflexo de postura, salivação e tremores de vibríssia.



Cromatograma 7- Perfil cromatográfico do plasma retirado 15 minutos após a aplicação intraperitoneal de extrato hexânico.



Cromatograma 8- Cromatografia do plasma retirado 30 minutos após aplicação intraperitoneal de extrato hexânico.



Cromatograma 9- Perfil cromatográfico da amostra de plasma, retirada uma hora após aplicação intraperitoneal de extrato hexânico.

As análises dos perfis cromatográficos do plasma dos animais, não demonstraram a presença do acetato de cunaniol, sugerindo que o mesmo sofre biotransformação plasmática por desacetilação, dando origem ao cunaniol, que corresponde a droga responsável pelos efeitos convulsivantes observados após a aplicação.

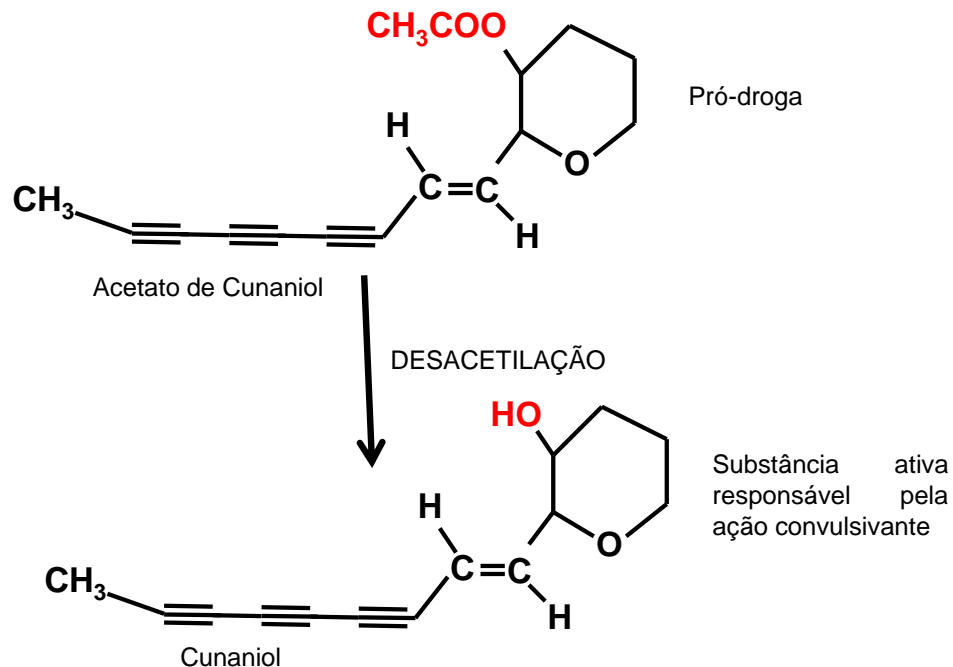
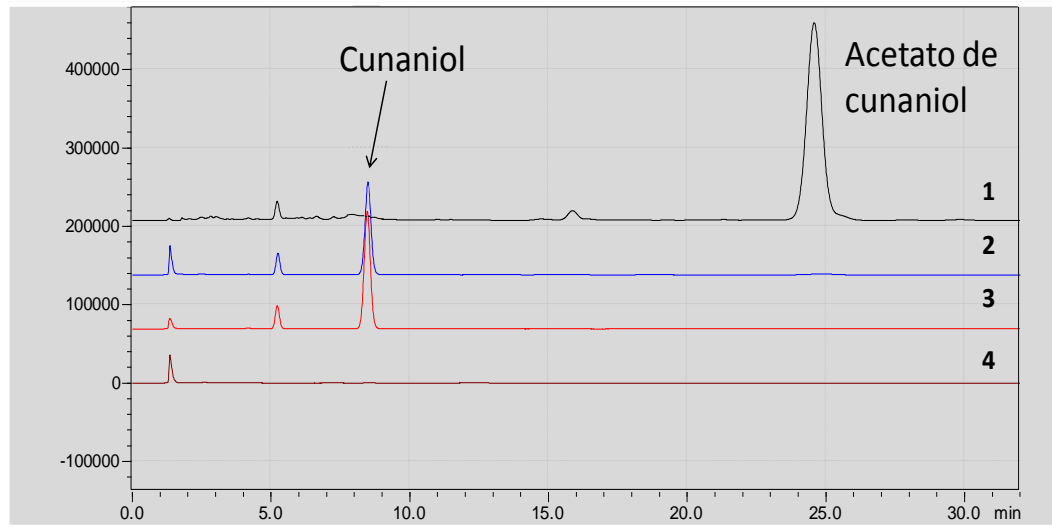
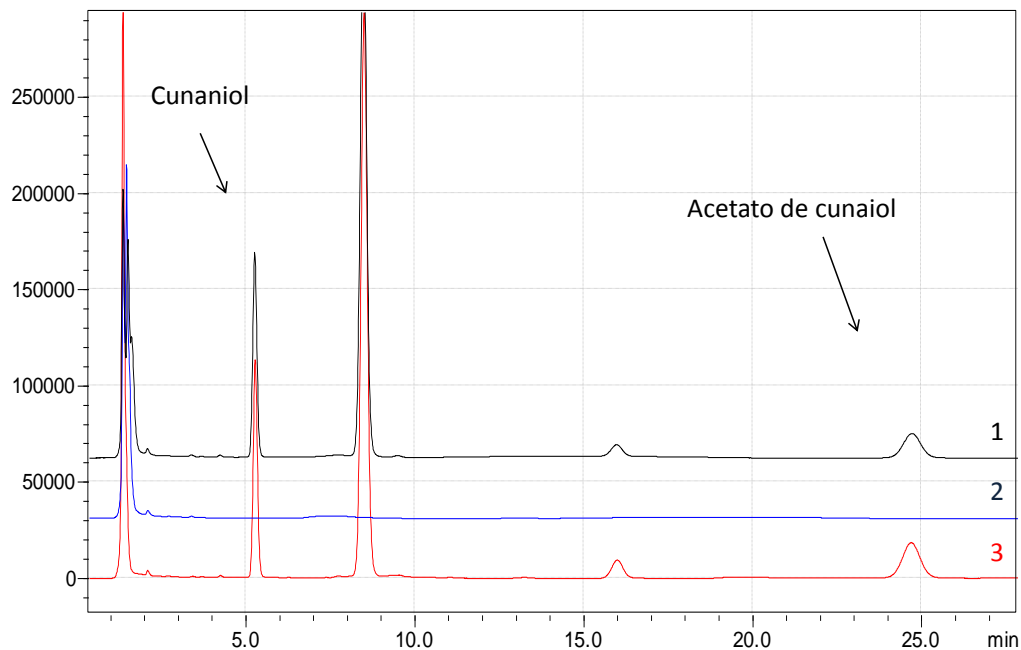


Figura 10- Metabolismo plasmático do acetato de cunaniol em cunaniol.

Para elucidar a via de biotransformação do acetato de cunaniol em cunaniol, inicialmente o plasma de um animal sadio foi colhido, em seguida incubado a 37° C, com o acetato de cunaniol durante um período de 30 e 60 minutos, posteriormente analisado por cromatografia líquida (Cromatograma 10), que demonstra o tempo de retenção para o padrão da droga, o padrão do plasma controle e a forma de acetato de cunaniol dando origem ao cunaniol por desacetilação a nível plasmático em 30 e 60 minutos de contato, indicando ser um processo rápido e de alta seletividade e eficiência.



Cromatograma 10- Comparação dos cromatogramas, (1) padrão do acetato de cunaniol 0,2 mg/ml; (2) plasma tratado com acetato de cunaniol na concentração de 0,2 mg/ml, após 30 minutos de incubação a 37° C; (3) análise do plasma após a incubação de 60 minutos com acetato de cunaniol na concentração de 0,2 mg/ml, e; (4) plasma do animal controle.



Cromatograma 11- Perfil cromatográfico do plasma após a utilização de acetato de cunaniol a 0,2 mg/ml (1); aspecto cromatográfico do plasma na presença de fisostigmina (2); plasma contendo 0,01 mg/ml de fisostigmina e acetato de cunaniol 0,2 mg/ml (3). Todos avaliados após a incubação de 30 minutos a 37° C.

A comprovação da desacetilação foi confirmada em teste *in vitro*, utilizando o plasma de animais sadios, que foram incubados (Cromatograma 11) no experimento 1, com o acetato de cunaniol a 0,2 % e após o período de incubação de 30 minutos a 37° C, foi detectado por cromatografia líquida somente o cunaniol e resíduos de acetato de cunaniol, comprovando que enzimas contidas no plasma possuem a capacidade de desacetilar o acetato de cunaniol. Para elucidar o problema e identificar a rota de metabolização do acetato de cunaniol, foi utilizada a

fisostigmina para carbamilar a região esterásica das esterases plasmáticas causando um bloqueio reversível dessas enzimas. O acetato de cunaniol foi adicionado na concentração de 0,2 mg/ml e incubado durante 30 minutos a 37° C. Posteriormente o plasma sofreu análise cromatofrágica, detectando a presença de acetato de cunaniol e de cunaniol, demonstrando que embora ainda se tenha resíduos detectáveis de acetato de cunaniol no experimento *in vitro* (1) é no experimento (3) que a substância aparece de forma incontestável após o bloqueio das esterases plasmáticas com a fisostigmina. Porém o que se pode afirmar é que a(s) enzima(s) responsáveis pela biotransformação do acetato de cunaniol em cunaniol está presente no plasma, porém o bloqueio das esterases pela fisostigmina na concentração utilizada não foi suficiente para bloquear totalmente sua biotransformação.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS REGISTROS ELETROCORTICOGRÁFICOS DE ANIMAIS EM CONVULSÃO



Figura 11- Registro da atividade de campo elétrico no córtex motor de ratos após a aplicação de cunaniol por via intraperitoneal, com duração de 4 horas.

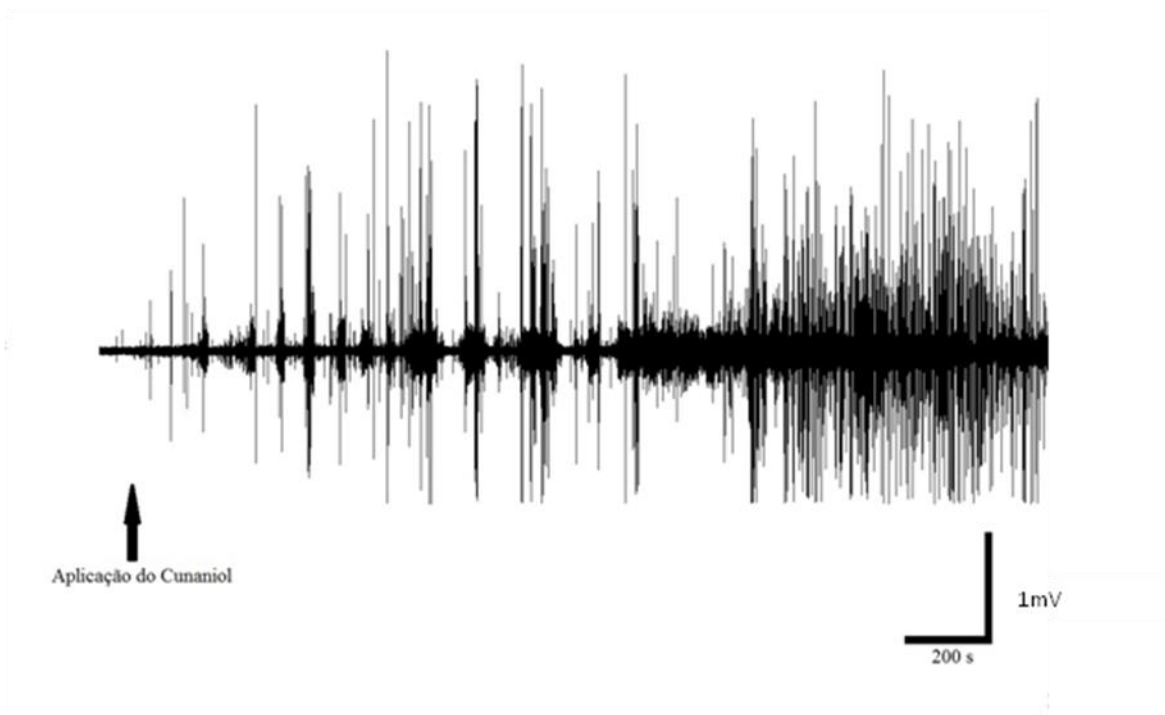


Figura 12- Registro eletrofisiológico da atividade no cerebelo de ratos após a aplicação de cunaniol por via intraperitoneal, com duração de 1,5 horas.

A aplicação de cunaniol na dose de $2,92 \pm 0,69$ mg/kg via intraperitoneal, foi capaz de causar alterações nos traçados registrados no córtex motor de ratos, com aumento da amplitude e frequência no registro, com curto período de latência para o aparecimento das alterações. O registro foi feito durante quatro horas, o que comprova efeitos prolongados após aplicação da droga, outra característica do registro é que apresenta inicialmente um padrão cíclico com variação de amplitude e frequência que é mantido durante 2,78 horas, após esse período, a sincronia dos ciclos de disparos foram interrompidas pela elevação e manutenção da amplitude e da frequência durante o período registrado, com duração de 1,22 horas (Figura 11). A figura 12 demonstra as salva de potenciais que ocorrem no cerebelo, inicialmente demonstrando os ciclos característicos após a aplicação de cunaniol.

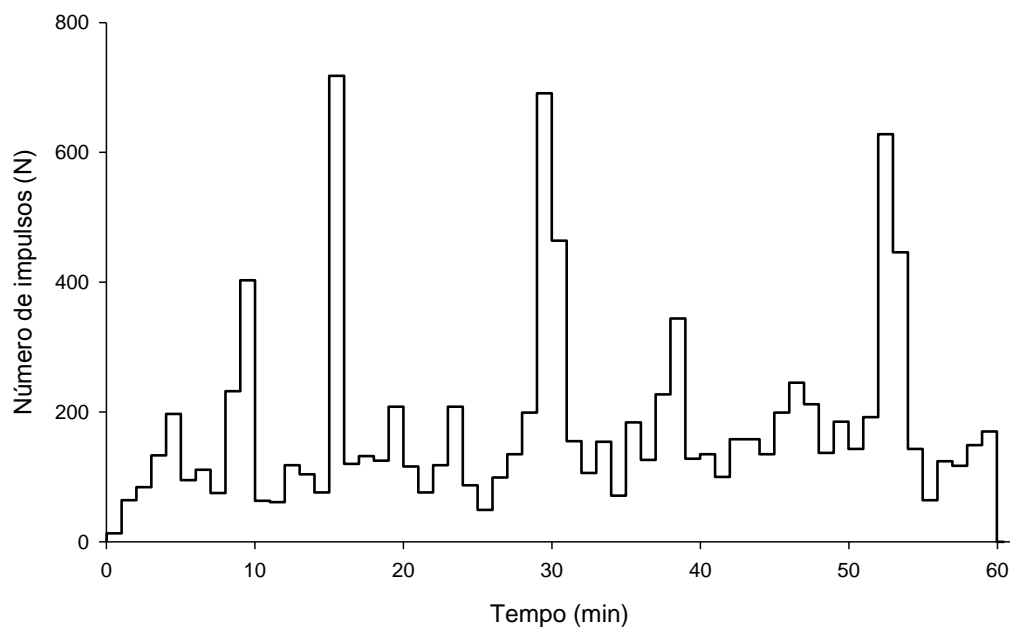


Gráfico 1- Número de impulsos registrados em eletrocorticograma de ratos durante uma hora de convulsão, após a aplicação de $2,92 \pm 0,69$ mg/kg de cunaniol.

Após a aplicação de $2,92 \pm 0,69$ mg/kg de cunaniol, o número de impulsos registrados por eletrocorticograma em ratos durante uma hora, demonstrou que a atividade neuronal ficou alterada (Gráfico 1). Quanto ao número de impulsos, os picos máximos de registros ocorreram em 15^o, 29^o e 53^o minutos, detectados entre o intervalo de 600 a 800 impulsos, corresponderam aos pontos de maior número de impulsos registrados. Os registros observados no 30^o e 54^o minutos estão localizados na escala entre o intervalo de 400 e 600 impulsos, constata-se que esses registros ocorreram nos minutos seguintes aos picos máximos, desta forma, há uma diminuição de registros nos minutos seguintes aos picos máximos

registrados. Uma faixa menor de impulsos registrados na escala entre 200 e 400, que corresponderam aos 9^o, 10^o, 38^o, 39^o e 46^o minutos. A maioria dos registros posicionou na escala entre 50 e 200 impulsos. Durante o registro foram observados impulsos próximos à atividade basal, como o observado no 25^o minuto. Nos minutos seguintes, os números de impulsos registrados são cada vez maiores, caracterizando uma atividade cíclica, oscilando entre picos máximos de registros e próximos a atividade basal.

Levando em consideração o procedimento de aplicação da droga que deve obter concentrações plasmáticas cada vez mais elevadas no decorrer do tempo, devido ao processo de absorção gradativo que ocorre a nível peritoneal, a concentração plasmática aumenta tornando a biodisponibilidade maior até atingir o pico de concentração máxima, o que corresponde ao máximo de atividade, porém, não existe a correlação entre a biodisponibilidade da droga e a fase assumida dos impulsos registrados durante o experimento. O registro máximo foi atingido pela primeira vez em 15 minutos, demonstrando que a droga é muito lipossolúvel e facilmente passa pela barreira hematoencefálica, este fato pode ser constatado no primeiro minuto após aplicação, onde, foram observadas mudanças nos traçados ECoG.

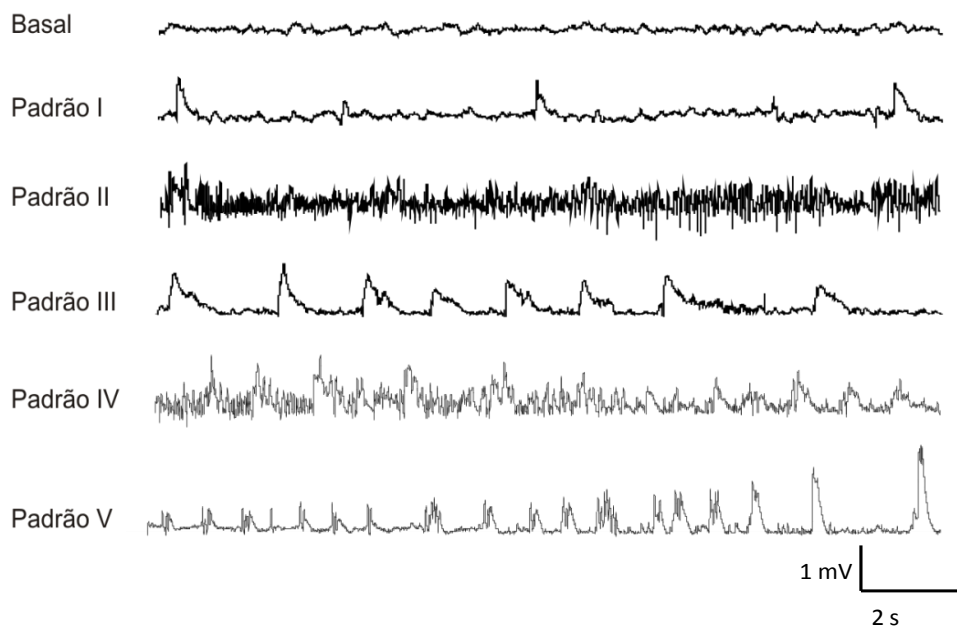


Figura 13- Padrões de ondas observados em registros de ECoG em ratos sob o efeito do cunaniol (Representativo de quatro animais).

Foram observados cinco padrões de ondas no traçado do ECoG após a aplicação de 2,92 mg/kg de cunaniol (Figura 13). Os padrões de traçados foram numerados de I a V de acordo com a ordem de surgimento no registro. Após a aplicação da droga o tempo de latência para o padrão I foi de 75 ± 19 segundos. O padrão I foi diferente do basal, porque possui o traçado mais irregular, e sua intensificação ocorre pelo aumento da amplitude. O padrão II corresponde ao registro de alta frequência, com o tempo de latência de $4,81 \pm 1,87$ minutos, o traçado indica nível de excitabilidade elevado neste padrão, provocando o comportamento convulsivo. O padrão III foi observado logo em seguida ao registro de alta frequência, o padrão de traçado indica baixa frequência e amplitude elevada, com latência de $6,7 \pm 2,38$ minutos. O padrão IV ocorre pelo aumento do registro da

frequência no traçado logo após intensificação do padrão III, com latência de $16,3 \pm 5,28$ minutos, mostrando uma frequência menor e uma amplitude maior que a do padrão II.

No padrão V de registro ocorre da diminuição da frequência e aumento gradativo da amplitude, com latência de $18,62 \pm 7,35$ minutos. Os padrões confirmam que os registros de alta frequência estão intercalados com de baixa frequência. Os padrões I e II são os que mais se repetem durante no registro.

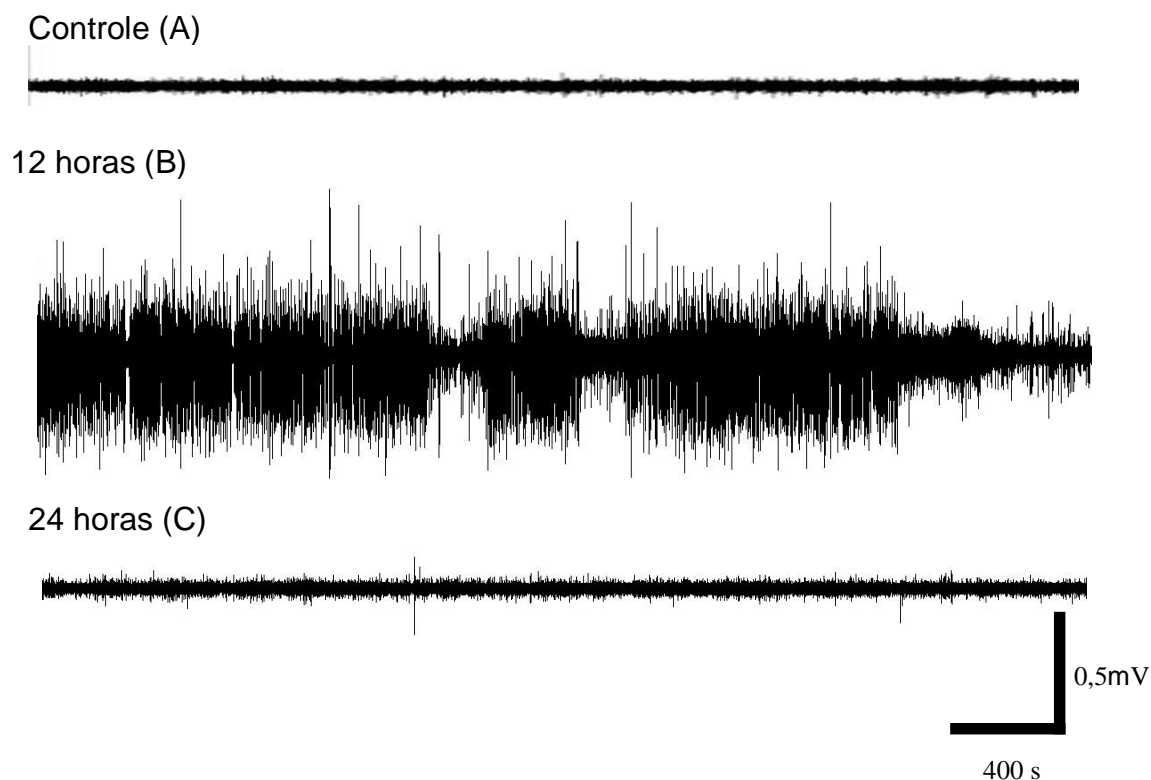


Figura 14- Registro eletroencefalográfico do córtex motor de ratos, com traçado indicando atividade basal (A), registro obtido 12 horas após aplicação de cunaniol (B), e registro obtido 24 horas após aplicação de cunaniol (C).

O registro eletroencefalográfico na Figura 14, demonstra a atividade do cunaniol 12 horas após a aplicação intraperitoneal de 2,92 mg/kg, o comportamento

observado nos animais são caracterizados por tremores de vibríssias, movimentos mastigatórios, tremores na musculatura do pescoço e movimentos rápidos com os olhos. O reflexo de postura está normal, porém o animal não explora o ambiente, permanecendo imóvel na gaiola. No registro de 24 horas após a aplicação demonstrou traçado compatível com atividade neuronal normal, nesse período os animais voltam a se alimentar normalmente e a explorar o ambiente.

4.3. AVALIAÇÃO DAS AÇÕES DE DROGAS NO CONTROLE DAS CONVULSÕES APÓS APLICAÇÕES DE DOSES PROGRESSIVAS DE CUNANIOL POR VIA INTRAPERITONEAL

Tabela 3- Relação entre as características clínicas dos estágios convulsivos e a concentração plasmática de cunaniol (n=4).

| Estágios da convulsão | Característica comportamentais de cada estágio | Latência em Minutos | Concentração plasmática de cunaniol em µg/ml de plasma |
|-----------------------|--|---------------------|--|
| Estágio -1 | Os animais apresentam imobilidade, salivação discreta, tremores de pinas e vibríssias. | 1,03 ± 0,394 | 0,75 ± 0,12 µg/ml |
| Estágio -2 | Os animais apresentam movimentos orofaciais (abre e fecha a boca), movimentos rápidos com as vibríssias e cauda embandeirada. | 2,95 ± 0,208 | 1,10 ± 0,15 µg/ml |
| Estágio -3 | Os animais apresentam crises clônicas isoladas em um ou mais membros e espasmos tônicos nos membros anteriores. | 3,55 ± 0,394 | 1,38 ± 0,21 µg/ml |
| Estágio -4 | O animal apresenta crises clônicas generalizadas, salivação abundante e perda transitória do reflexo de postura. | 4,41 ± 0,404 | 2,16 ± 0,44 µg/ml |
| Estágio -5 | O animal apresenta crises tônico-clônicas (Grande-Mal), cianose, perda do reflexo de postura e morte por incapacidade de respirar no momento da convulsão. | 5,22 ± 0,310 | 2,10 ± 0,25 µg/ml |

A partir da análise cromatográfica do plasma dos animais submetidos à aplicação intraperitoneal de 3,64 mg/kg de cunaniol. Foram observados os estágios das convulsões de acordo com suas características clínicas, tempo de latência para aparecimentos dos sinais característicos dos estágios e concentração plasmática de cunaniol em cada estágio.

O tempo médio de latência para atingir o Estágio 1 foi de $1,03 \pm 0,394$ minutos, os animais apresentaram imobilidade, salivação discreta e tremores de pinas e vibríssias, a concentração correspondente de cunaniol obtida no plasma dos animais por análise cromatográfica foi de $0,75 \pm 0,12 \mu\text{g/ml}$. Para o Estágio 2 a concentração plasmática correspondeu $1,10 \pm 0,15 \mu\text{g/ml}$, com latência de $2,95 \pm 0,208$ minutos com comportamento característico de movimentos orofaciais, movimentos rápidos com as vibríssias e cauda embandeirada. No Estágio 3, onde os animais apresentaram sinais de excitabilidade com clonias isoladas e espasmos tônicos, principalmente nos membros anteriores, o tempo de latência foi de $3,55 \pm 0,394$ minutos e a concentração plasmática de $1,38 \pm 0,21 \mu\text{g/ml}$. Nos Estágios 4 e 5, a análise cromatográfica do plasma não evidenciou diferenças nas concentrações plasmática de cunaniol, nesses estágios os animais apresentaram respectivamente, crises clônicas isoladas e perda transitória do reflexo de postura com latência de $4,41 \pm 0,404$ minutos, concentração plasmática de $2,16 \pm 0,44 \mu\text{g/ml}$ e crises tônico-clônicas com perda do reflexo de postura com $5,22 \pm 0,310$ minutos para a latência e $2,10 \pm 0,25 \mu\text{g/ml}$ de concentração plasmática. Desta forma a biodisponibilidade é um fator importante no desencadeamento dos estágios iniciais do quadro convulsivo, e a relação entre as diferenças do Estágio 4 e do Estágio 5 são simplesmente

clínica, demonstrando que o tempo de contato da droga com o organismo foi fundamental para o desencadeamento das convulsões (Tabela 3).

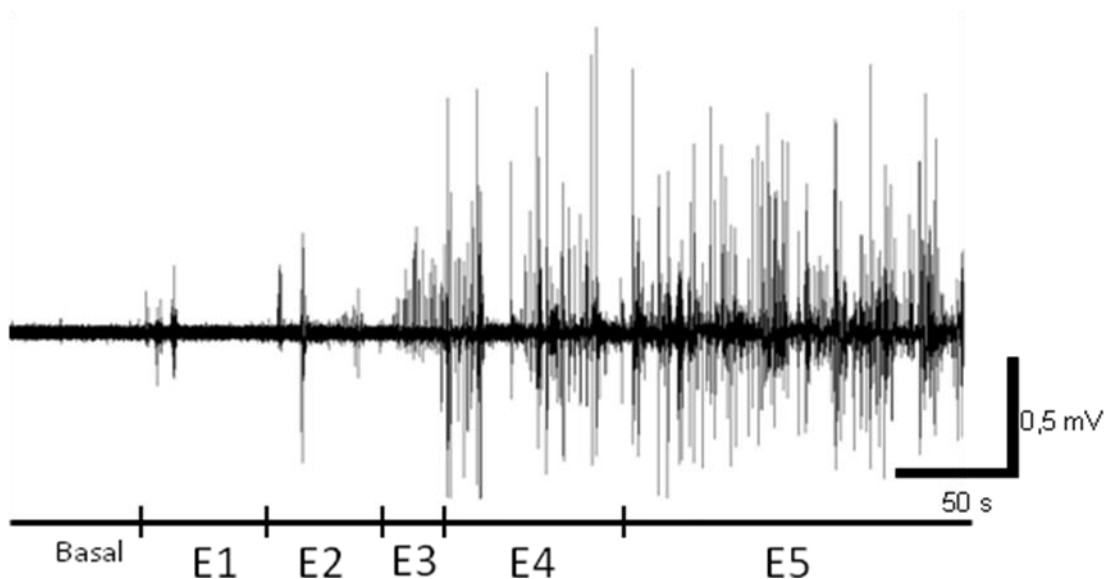


Figura 15- Relação entre o comportamento convulsivo presente em cada estágio e as alterações no traçado eletrocorticográfico.

As características de cada estágio comportamental podem ser bem evidenciadas após a aplicação de cunaniol, os três primeiros estágios (E1, E2 e E3) são de evolução rápida e dependente da concentração da droga no sangue, a latência curta para mudança no traçado, comprova acesso rápido ao SNC. No quarto estágio ocorre o aumento da amplitude e da frequência de disparos e possui características comportamentais que se traduzem por convulsões clônicas com perda transitória do reflexo de postura, não existe um período de transição que demonstre claramente a passagem do quarto para o quinto estágio, porém o quinto estágio se caracteriza pelo aumento da intensidade das convulsões, que passam a

manifestar um componente tônico, que leva o animal a apresentar crises tônico-clônico com perda de reflexo de postura (Figura 15).

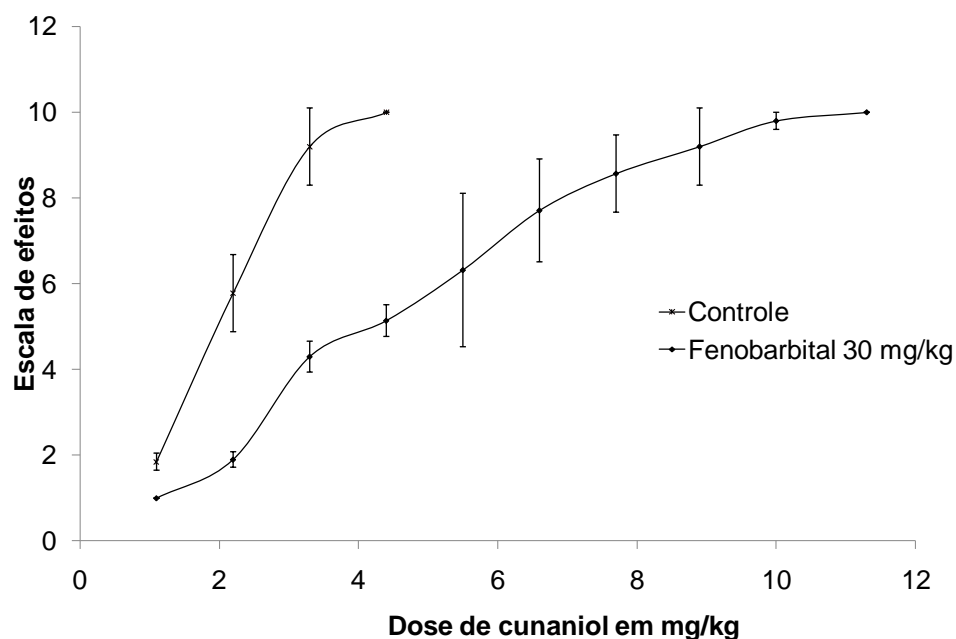


Gráfico 2- Curva dose-efeito para atividade excitatória central do cunaniol após aplicação intraperitoneal do anticonvulsivante Fenobarbital.

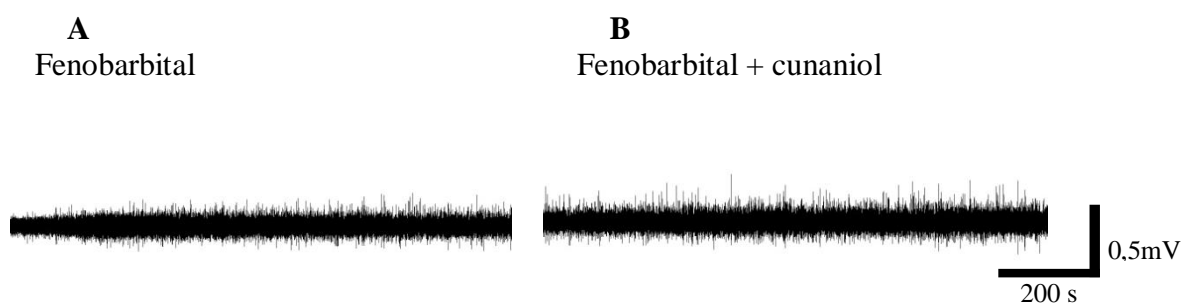


Figura 16- Registro eletrocorticográfico após aplicação de 30 mg/kg de fenobarbital com duração de 30 minutos (A), continuação do registro eletroencefalográfico após aplicação de cunaniol em dose letal, demonstra a eficácia do fenobarbital no controle das convulsões (B).

Para elucidar o mecanismo pelo qual são desencadeadas as convulsões, foram utilizados drogas anticonvulsivantes clássicas que agem no receptor GABA_A (fenobarbital e diazepam), droga com atividade antimuscarínica (escopolamina), alfa-2 agonista (cloridrato de xilazina) e bloqueador não competitivo do receptor N-metil-D-aspartato do glutamato (cloridrato de quetamina). As drogas foram administradas 30 minutos antes das aplicações de doses crescentes de cunaniol.

O Fenobarbital foi administrado na dose de 30 mg/kg por via intraperitoneal, 30 minutos antes da aplicação de cunaniol, posteriormente os animais foram observados por uma hora. O Fenobarbital possui ação direta nos receptores do neurotransmissor inibitório Ácido Gama Aminobutírico (GABA), no qual a interação entre o Fenobarbital e o receptor GABA_A provoca a abertura dos ionóforos de cloro, permitindo a hiperpolarização da membrana neuronal, possibilitando o controle das convulsões. Os resultados demonstraram que o Fenobarbital foi eficiente em controlar o comportamento convulsivo (Gráfico 2), de acordo com as características principais dos estágios houve aumento nas doses de cunaniol em relação ao controle de $3,68 \pm 0,54$ vezes para a manifestação de espasmos tônicos (Gráfico 7), $3,13 \pm 0,63$ para crises clônicas com perda transitória do reflexo de postura (Gráfico 8) e $2,68 \pm 0,31$ vezes para crises tônico-clônicas (Gráfico 9). O eletrocorticograma demonstrou que após a administração de fenobarbital o cunaniol não foi capaz de desencadear aumento na frequência e amplitude de disparos, diminuindo a intensidade da resposta neuronal, comprovando sua ação anticonvulsivante (Figura 16 A e B).

A atuação do bloqueador não competitivo do receptor NMDA do glutamato, a Quetamina, demonstrou ser eficaz no controle do comportamento convulsivo e reduzindo a letalidade das doses de cunaniol durante a observação (Gráfico 3). Os animais submetidos a dose de 100 mg/kg de Quetamina apresentaram inicialmente como comportamento a cauda embandeirada evoluindo para crises clônicas isoladas. A diminuição dos efeitos excitatórios do cunaniol após aplicação da quetamina podem ser observadas no (Gráfico 3). Após a aplicação de quetamina a dose de cunaniol aumentou $2,95 \pm 0,45$ vezes a dose controle para se obter espasmos tônicos (Gráfico 7), $2,88 \pm 0,42$ para o comportamento de crises clônicas generalizadas com perda transitória do reflexo de postura (Gráfico 8) e $2,84 \pm 0,31$ para crises tônico-clônicas (Gráfico 9).

O eletrocorticograma demonstrou que após a aplicação da quetamina, o cunaniol na dose letal, foi capaz de provocar mudanças no traçado eletrocorticográfico com aumento na frequência e amplitude, não ocorrendo sincronia de disparos, que é característico das convulsões induzidas por cunaniol (Figura 17 A e B).

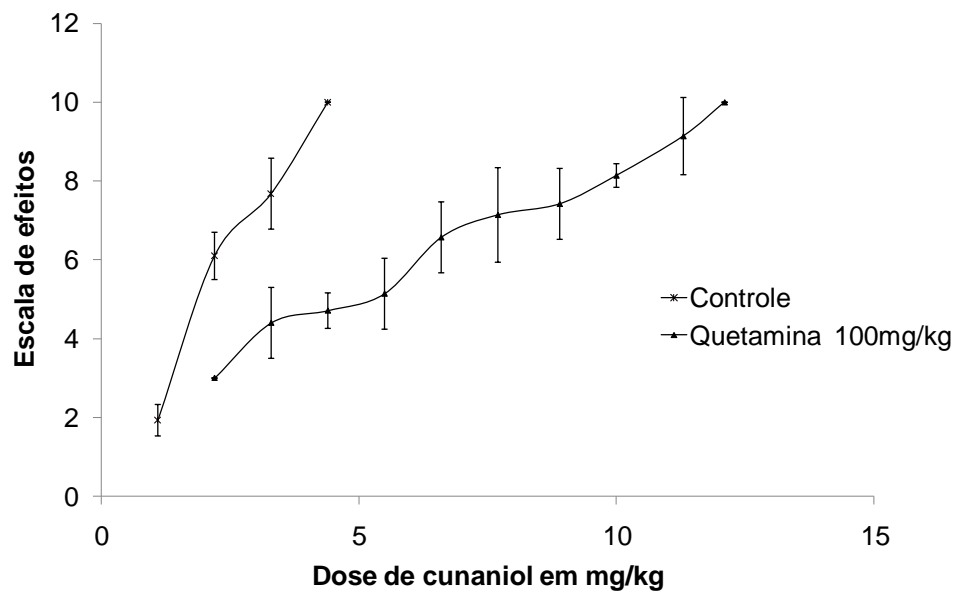


Gráfico 3- Curva dose-efeito para atividade excitatória central do cunaniol após aplicação do anestésico dissociativo cloridrato de quetamina.

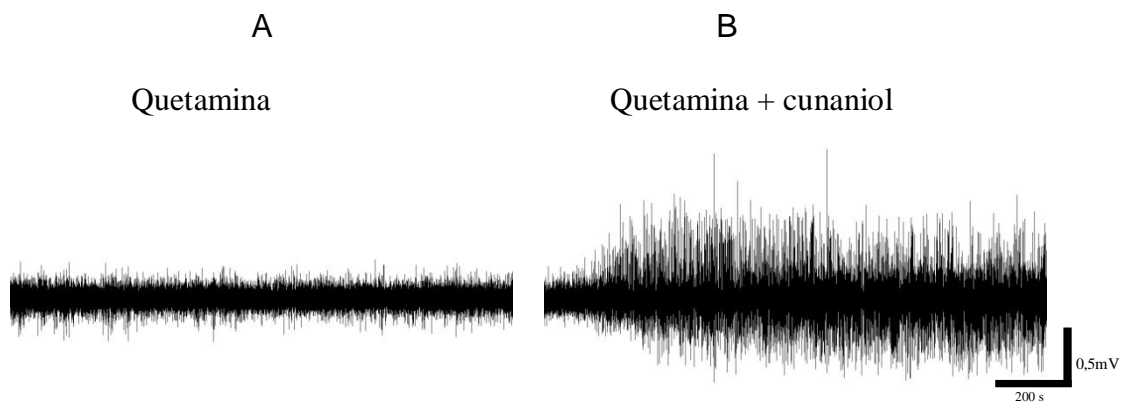


Figura 17- Registro eletrocorticográfico após a aplicação de 100 mg/kg de quetamina via intraperitoneal, com duração de 30 minutos (A), continuação do registro após a aplicação do cunaniol em dose de 3,64 mg/kg, com duração de 30 minutos (B).

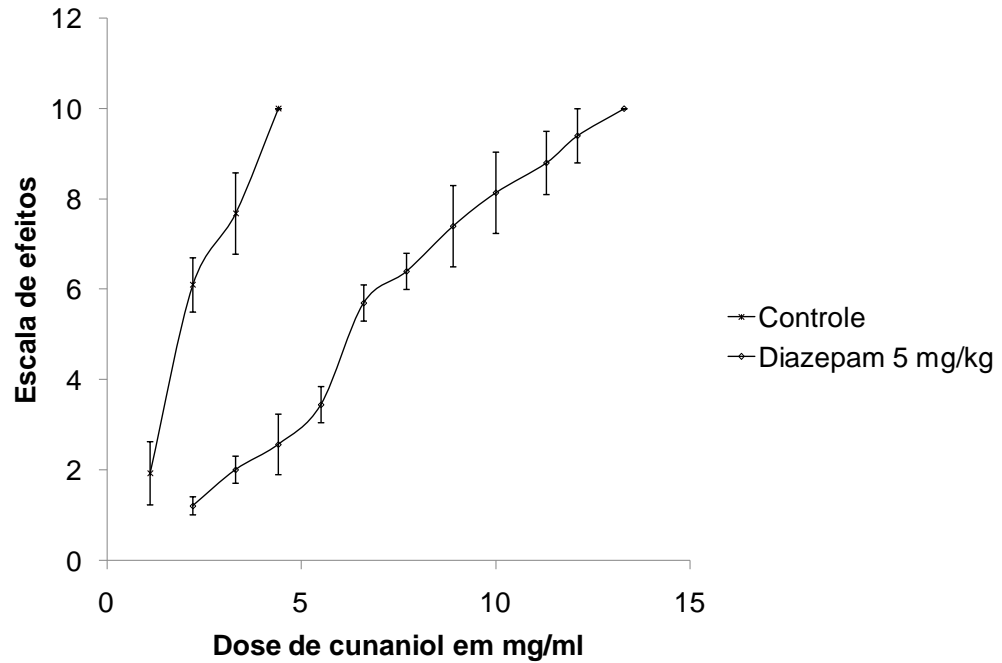


Gráfico 4- Curva dose-efeito para atividade excitatória central do cunaniol, em relação ao anticonvulsivante e miorreaxante diazepam.

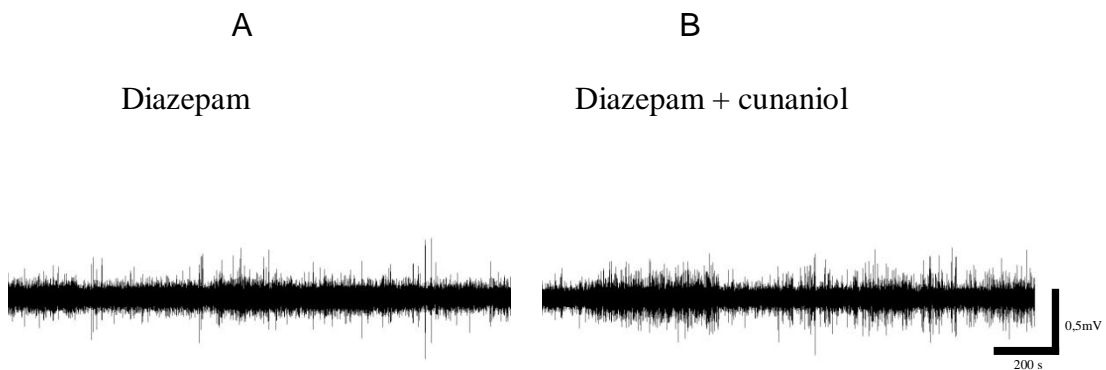


Figura 18- Eletrocorticograma registrado após a aplicação de 5 mg/kg de diazepam via intraperitoneal, com duração de 30 minutos (A), continuação do registro após a aplicação de cunaniol (B).

aplicação intraperitoneal de 3,64 mg/kg de cunaniol, demonstra a eficácia do diazepam no controle das convulsões (B).

A utilização prévia do Diazepam na dose de 5 mg/kg por via intraperitoneal para o controle das convulsões induzidas por cunaniol, apresentou ser efetivo, conforme verificado no Gráfico 4. Os comportamentos iniciais da escala foram obtidos na dose de 2,2 mg/kg de cunaniol. Para o aparecimento de espasmos tônicos foram necessárias $4,44 \pm 0,54$ vezes a dose controle (Gráfico 7), para crises generalizadas com perda transitória do reflexo de postura a dose correspondeu a $3,7 \pm 0,21$ vezes a dose controle (Gráfico 8) e para crises tônico-clônicas $3,12 \pm 0,21$ vezes a dose controle (Gráfico 9). O eletrocorticograma demonstrou que após a administração de diazepam o cunaniol administrado em dose letal, não foi capaz de desencadear atividade neuronal intensa no córtex motor do rato, controlando a frequência e amplitude de disparos (Figura 18 A e B).

A utilização da escopolamina na dose de 10 mg/kg por via intraperitoneal, demonstrou baixa seletividade no controle das convulsões na avaliação comportamental representado no Gráfico 5, não houve diferença estatística em relação ao controle. A resposta eletroencefalográfica demonstrou atividade neuronal intensa no córtex motor (Figura 19).

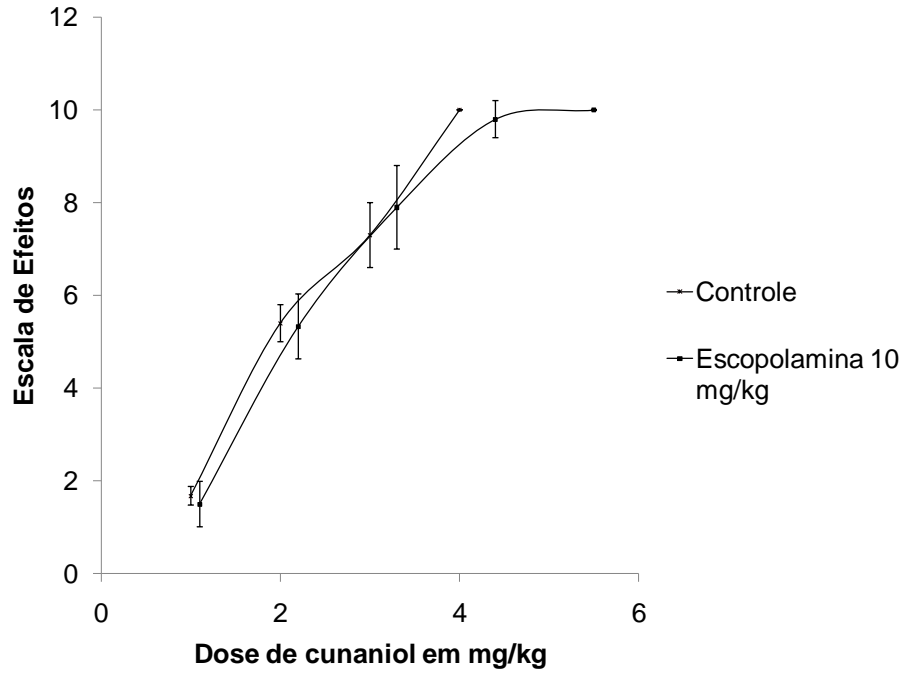


Gráfico 5 – Curva dose-efeito para dose excitatória central do cunaniol em relação a atividade antimuscarínica da escopolamina (antagonista colinérgico muscarínico).

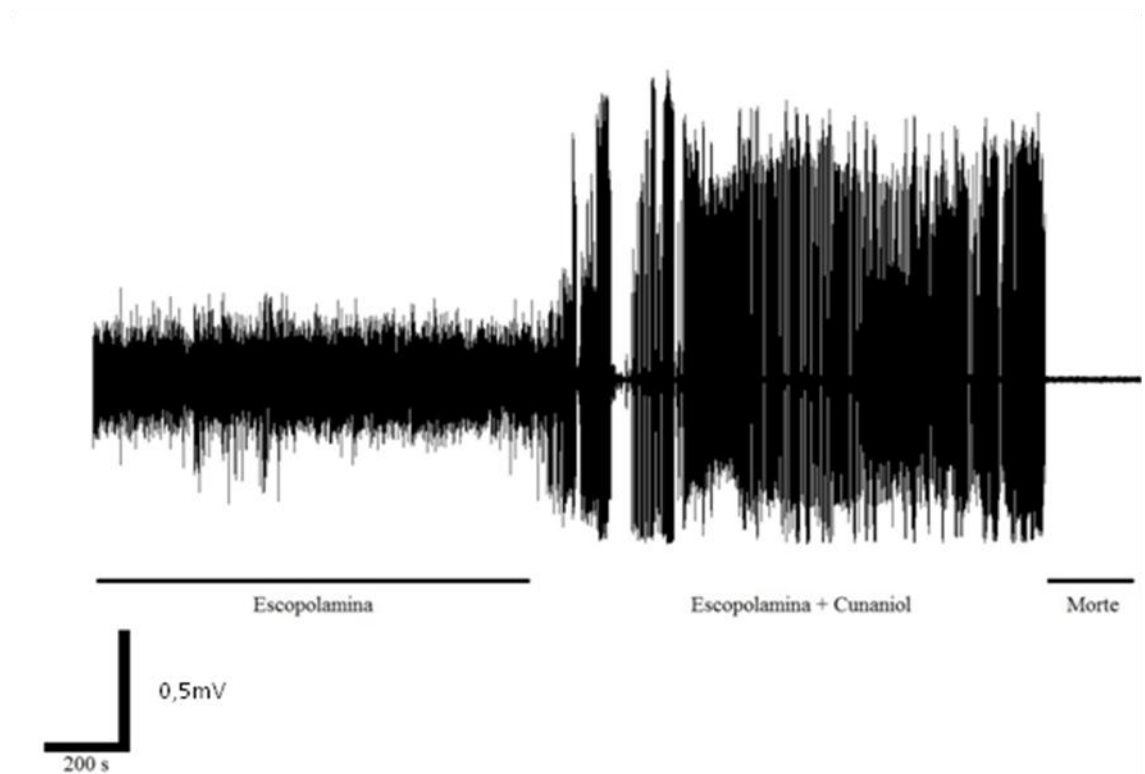


Figura 19- Registro eletroencefalográfico obtido após aplicação de escopolamina na dose de 10 mg/kg via intraperitoneal, com duração de 60 minutos, observar o aumento da amplitude e frequência após aplicação de cunaniol na dose de 3,64 mg/kg.

A utilização de alfa-2 agonista (Cloridrato de Xilazina) na dose de 20 mg/kg, para o controle das convulsões é observado no Gráfico 6. Esta droga possui propriedades miorelaxante, sedativa e analgésica. Testes para avaliação após doses crescentes de cunaniol, demonstrou diferença estatística em relação ao controle, para a manifestação do comportamento convulsivo de espasmos tônicos foram necessárias $2,2 \pm 0,51$ vezes a dose controle (Gráfico 7), para crises clônicas generalizadas com perda parcial do reflexo de postura a dose de cunaniol foi $1,9 \pm 0,6$ vezes a do controle (Gráfico 8) e para crises tônico-clônicas $1,74 \pm 0,28$ vezes a dose controle (Gráfico 9).

O registro eletrocorticográfico obtido após a administração de dose letal de cunaniol demonstrou atividade neuronal intensa no córtex motor, com aumento da amplitude e frequência, porém o comportamento observado não reflete as alterações eletrocorticográficas em relação a intensidade de disparos observados (Figura 20 A e B).

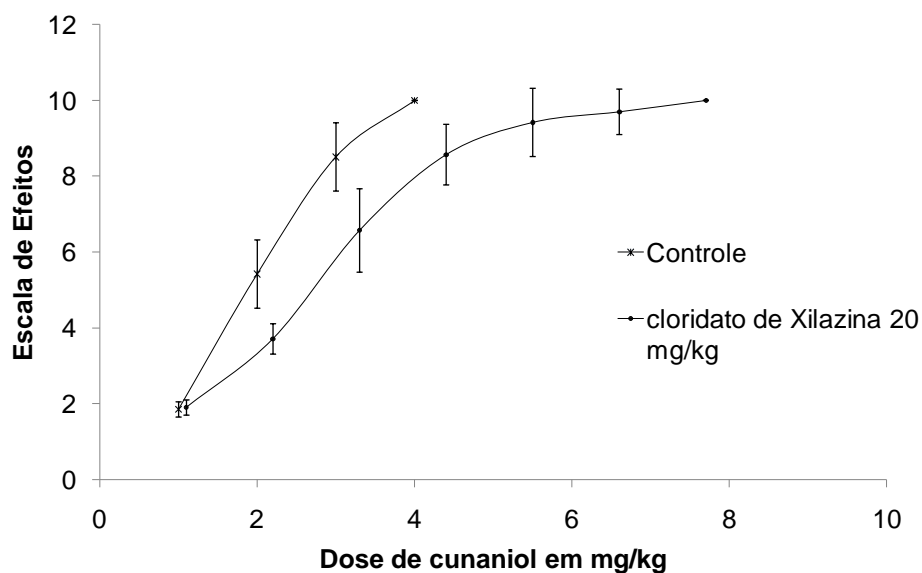


Gráfico 6- Curva dose-efeito para atividade excitatória central do cunaniol após aplicação intraperitoneal do miorelaxante de ação central cloridrato de xilazina (α_2 -agonista).

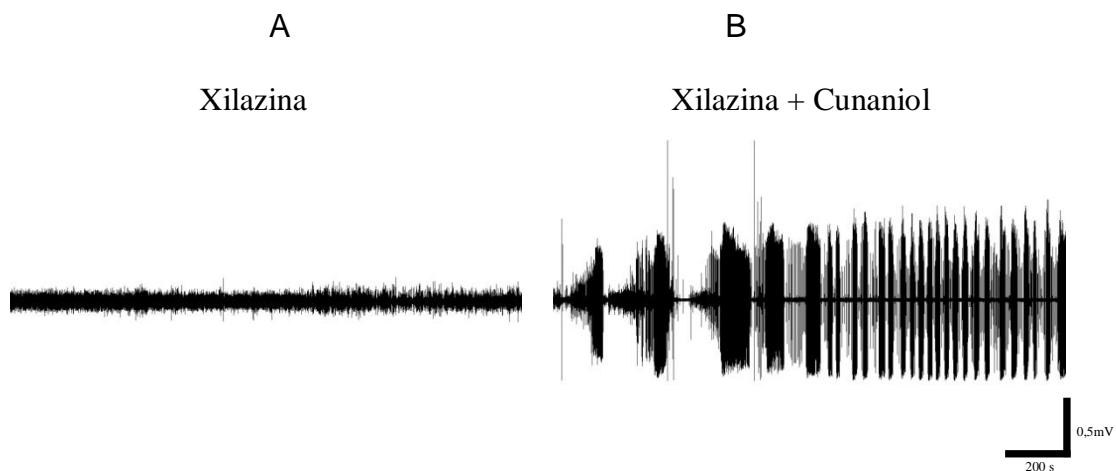


Figura 20- Registro eletrocorticográfico obtido após aplicação de 20 mg/kg de xilazina via intraperitoneal com duração de 30 minutos (A), continuação do registro após aplicação de 3,64 mg/kg via intraperitoneal de cunaniol, o registro demonstra a eficácia da xilazina no controle das convulsões (B).

De acordo com a classificação dos estágios convulsivos proposto no trabalho, com exceção da Escopolamina, todas as drogas tiveram diferenças significativas no que se refere a diminuição das manifestações comportamentais em relação a dose crescentes de cunaniol. Para controle da manifestação dos comportamentos convulsivos dos Estágios 3 e 4, o fenobarbital e o diazepam foram as drogas mais efetivas em relação a doses crescentes de cunaniol para o comportamento de espasmos tônicos e crises clônicas generalizadas com perda transitória do reflexo de postura (Gráficos 7 e 8). Para o comportamento de crises tônico-clônicas, característica observada no Estágio 5, o fenobarbital, a quetamina e o diazepam foram as drogas que controlaram de maneira mais eficiente o comportamento, com resultados muito semelhantes, não havendo diferenças

estatísticas entre elas. Porém mantiveram diferenças estatísticas para o grupo controle e grupo da xilazina (Gráfico 9).

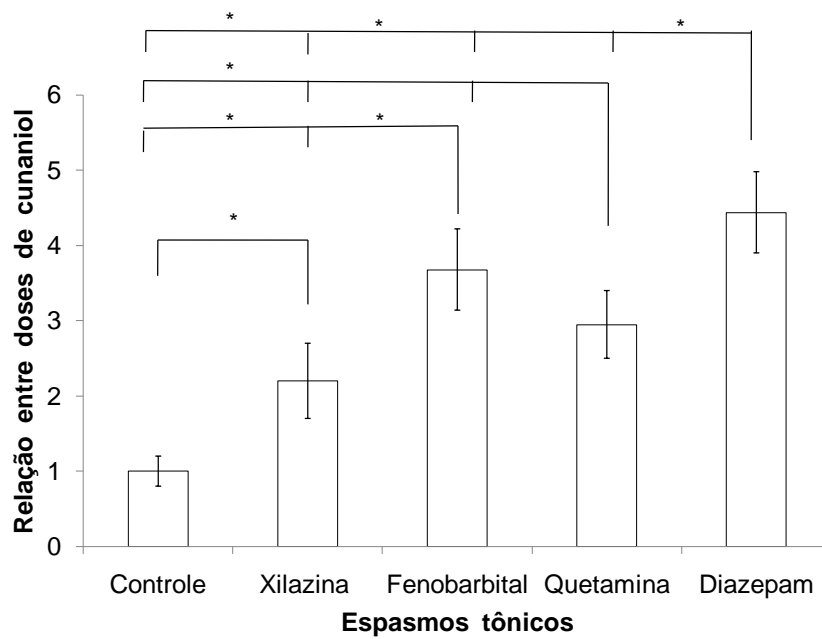


Gráfico 7- Relação entre doses crescentes de cunaniol e o aparecimento do comportamento de espasmos tônicos (P < 0,05).

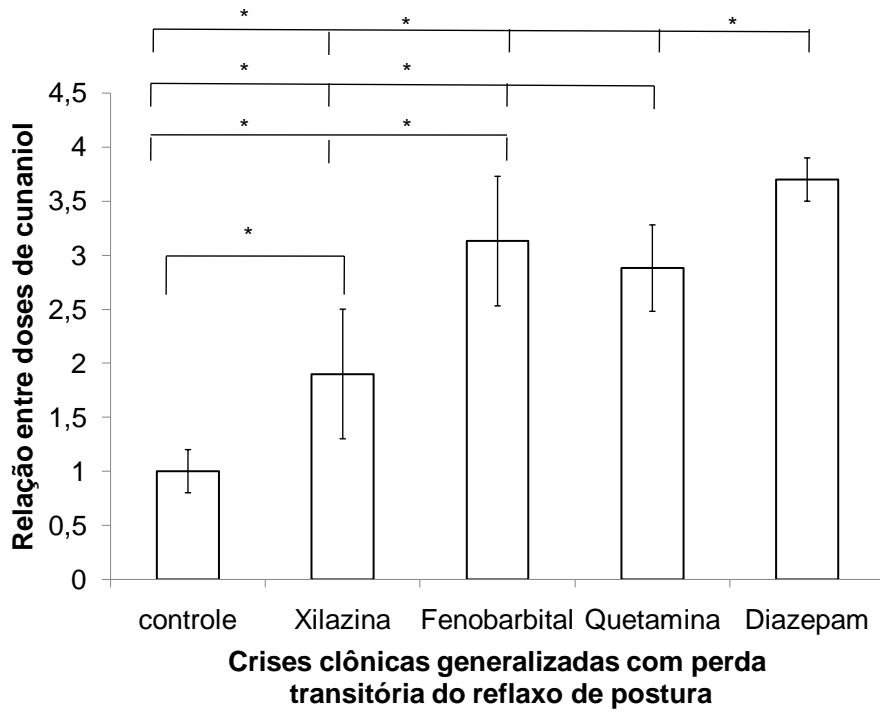


Gráfico 8- Relação entre doses crescentes de cunaniol e o aparecimento do comportamento de crises clônicas generalizadas com perda transitória do reflexo de postura (P < 0,05).

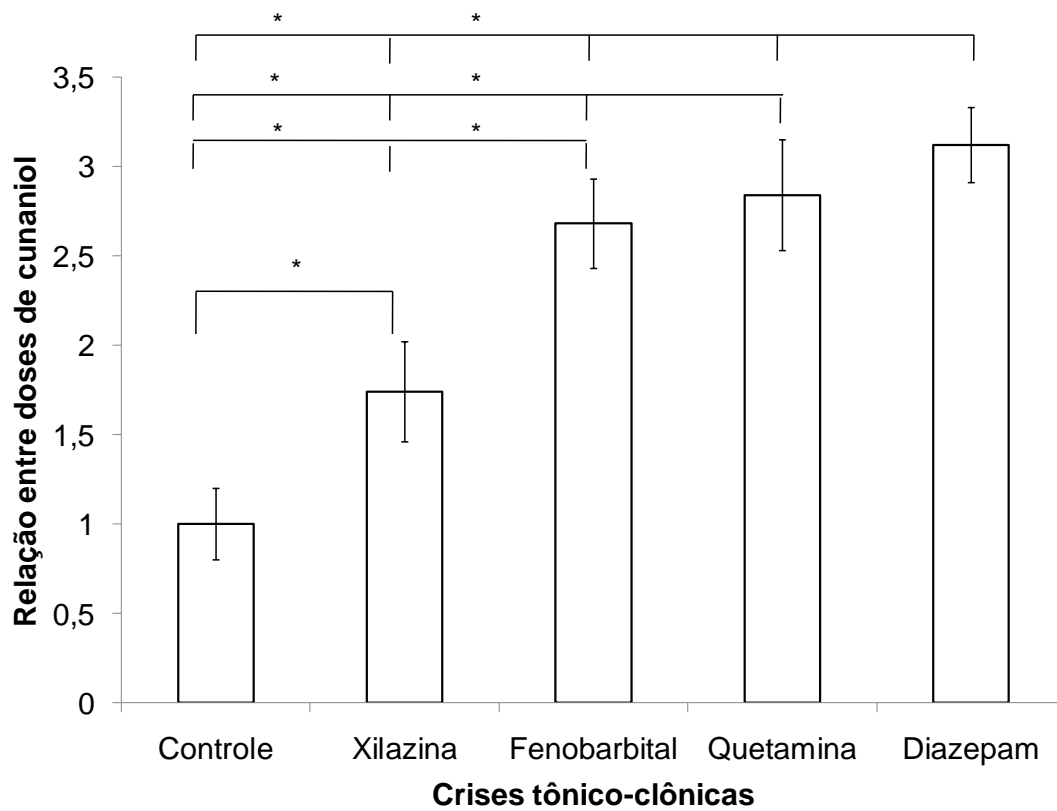


Gráfico 9- Relação entre doses crescentes de cunaniol e o aparecimento do comportamento de crises tônico-clônicas (P < 0,05).

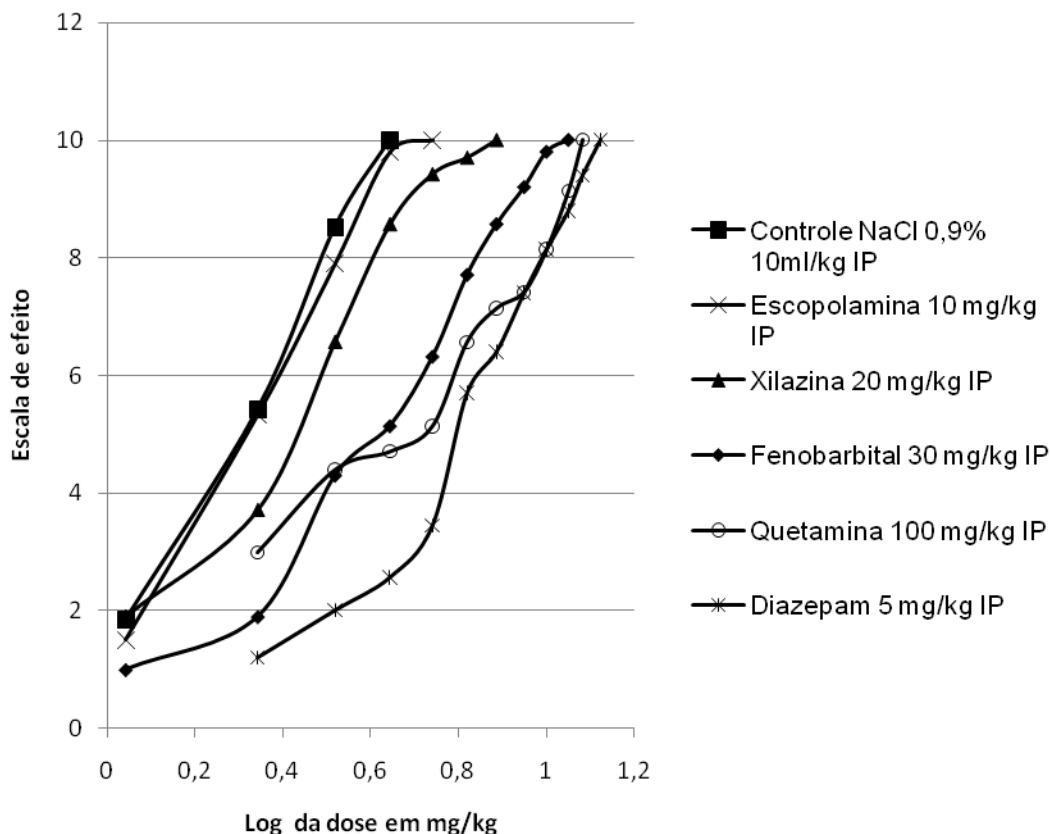


Gráfico 10- Relação entre a escala de efeito e o log da dose de cunaniol após administração das drogas utilizadas no controle das manifestações comportamentais.

As curvas dose-resposta após a utilização das drogas no controle das manifestações comportamentais demonstram inclinações semelhantes ao grupo controle e grupo de animais tratados com escopolamina, indicando não haver interferência da droga no controle das manifestações comportamentais exercida pela aplicação de cunaniol (Gráfico 10). A quetamina, o fenobarbital e o diazepam tiveram suas curvas deslocadas em função das doses maiores de cunaniol necessárias para ocasionar as manifestações dos escores comportamentais, diminuindo a inclinação

das curvas, que apresentaram evolução progressiva caracterizando manifestações comportamentais dependentes da dose. Os grupos que receberam diazepam e quetamina previamente, necessitaram de doses mais elevadas de cunaniol para apresentarem os primeiros comportamentos na escala (Gráfico 10).

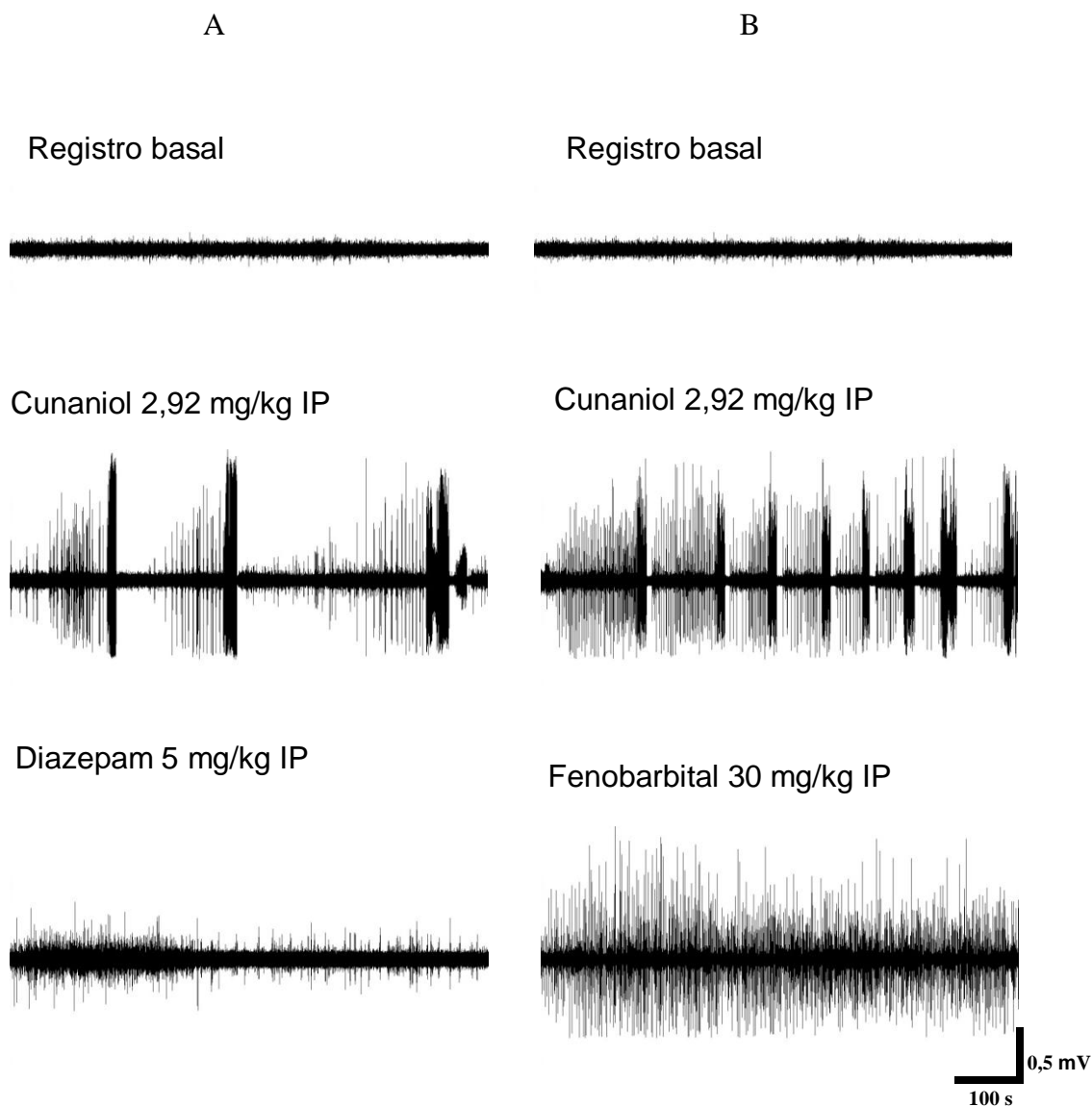


Figura 21- Registro eletrográfico no córtex motor de ratos durante crise convulsiva desencadeada pela aplicação intraperitoneal de cunaniol, e atividade

eletrocorticográfica registradas após administração de diazepam (A) e do fenobarbital (B) no controle das convulsões.

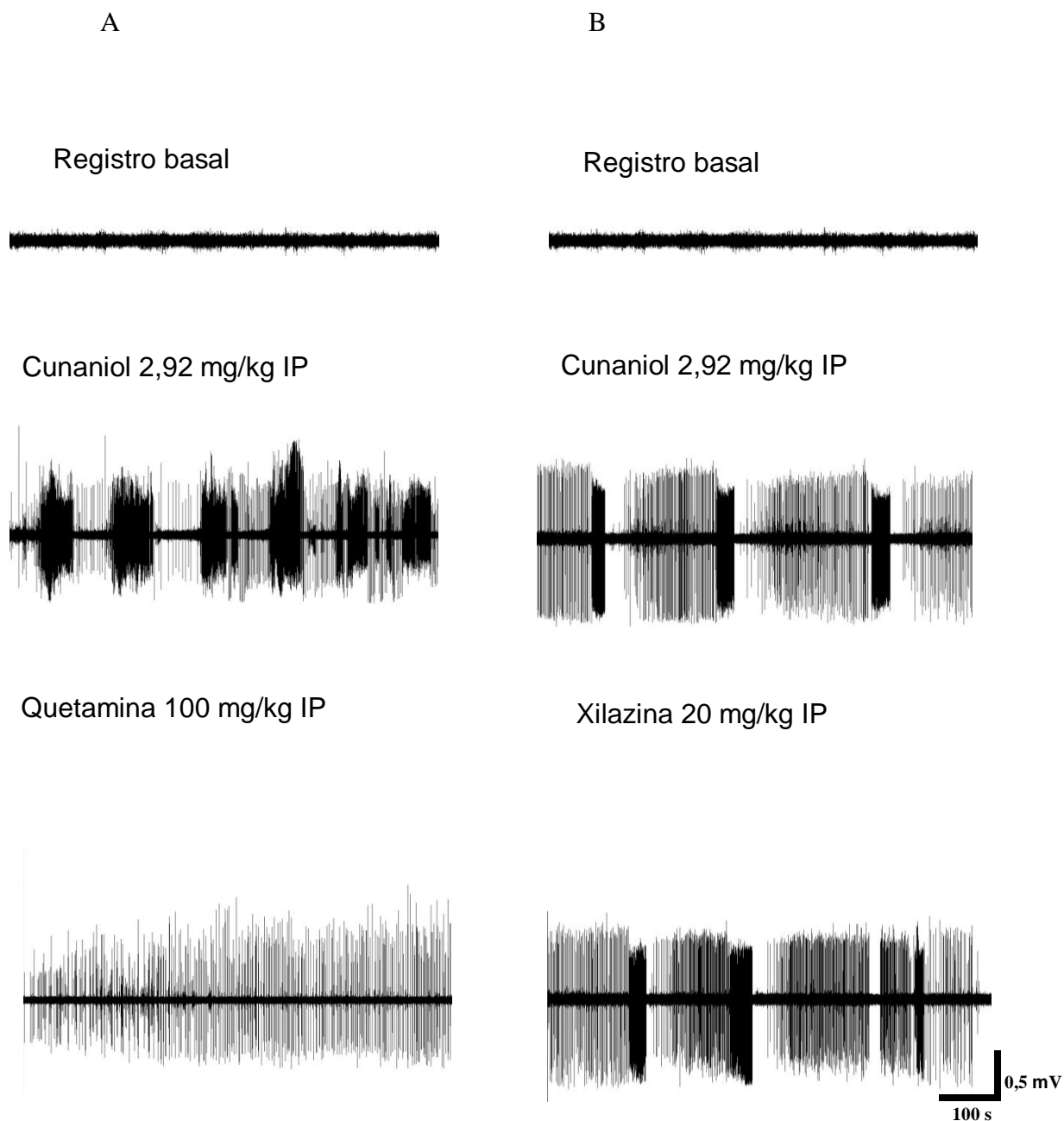


Figura 22- Registro eletrográfico no córtex motor de ratos durante crise convulsiva desencadeada pela aplicação intraperitoneal de cunaniol, e após administração de quetamina (A) e xilazina (B) no controle das convulsões.

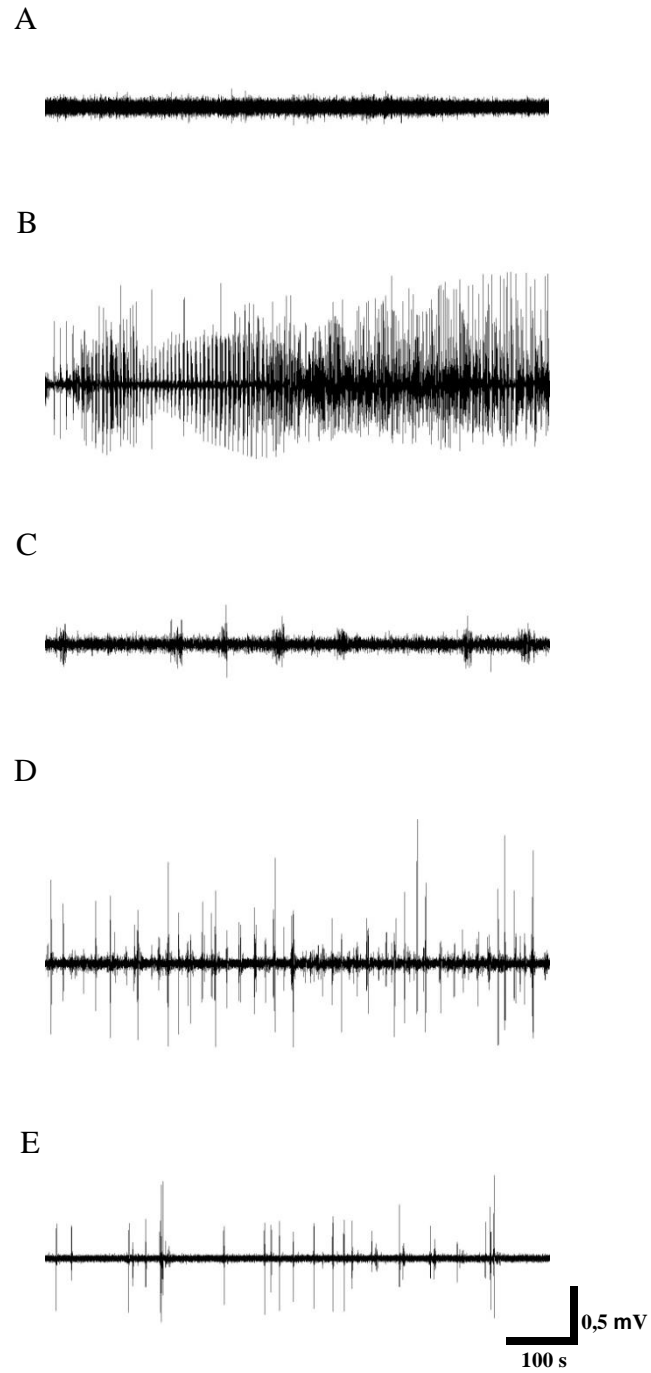


Figura 23- Trechos das respostas eletrofisiológicas (100 segundos de registro) obtidas do padrão basal e dos tratamentos: (A) Basal; (B) Cunaniol; (C) Cunaniol +Diazepam; (D) Cunaniol + Fenobarbital; (E) Cunaniol + Quetamina.

A droga que apresentou melhor controle das manifestações comportamentais relacionado ao processo convulsivo foi o diazepam, para constatar a atuação do anticonvulsivante, foram implantados eletrodos para registro no córtex motor dos ratos. No registro podem ser analisados a relação entre frequência e amplitude de disparos, após a aplicação de cunaniol na dose de 2,92 mg/kg IP, o registro apresenta mudanças nos traçados compatíveis com quadros convulsivos, com característica cíclica, após o registro de 30 minutos foi aplicado 5 mg/kg de diazepam via IP. A avaliação do registro após aplicação do diazepam demonstrou diminuição da frequência e amplitude de disparos, comprovando a ação do diazepam no controle das convulsões (Figura 21 A). Após administração de fenobarbital ocorreu diminuição da frequência de disparos principalmente durante os períodos mais críticos observados no registro, a amplitude se tornou menor, proporcionando interrupção no desencadeamento do processo que leva a sincronia de disparos (Figura 21 B). Foi comprovado que dos dois anticonvulsivantes utilizados no experimento, o diazepam controlou melhor a amplitude e a frequência de disparos em relação ao fenobarbital, quando utilizado 30 minutos após a aplicação de cunaniol (Figura 23 C e D).

O comportamento convulsivo a partir da administração de doses crescentes de cunaniol diminuiu pela aplicação de 100 mg/kg de quetamina. O padrão de registro de atividade elétrica no córtex motor, observado após a aplicação de cunaniol, foi modificado com aplicação de quetamina, que se caracterizou por diminuição na frequência e amplitude de disparos, interrompendo o desencadeamento do processo que culmina com apresentação de disparos de alta frequência, conforme o registro controle (Figura 22 A). A amplitude e a frequência de

disparos no registro após a aplicação da quetamina foi menor quando comparado ao registro observado para fenobarbital (Figura 23 E).

A utilização da xilazina após 30 minutos de convulsão provocada pelo cunaniol revelou no registro eletroencefalográfico disparos cíclicos e sincronizados semelhantes ao observado no controle, a frequência e amplitude são mantidas no período inicial, e no final do registro pode ser notado a diminuição da frequência (Figura 22 B).

5. DISCUSSÃO

5.1. AVALIAÇÃO DAS ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DO PLASMA EM TESTES *In vivo* E *In vitro* RELACIONADOS COM A BIOTRANSFORMAÇÃO DO ACETATODE CUNANIOL

Muitas substâncias retiradas de plantas possuem atividades convulsivantes, sendo potencialmente tóxicas, entre elas a mais bem descrita é o alcalóide da *Stricnus nux vomica* que é altamente convulsivante, por bloquear os receptores do neurotransmissor inibitório a nível central. As convulsões produzidas são reflexas, do tipo tônico-clônicas e simétricas (Melo *et al.*, 2002). O extrato da raiz de *Spilanthes acmella* var. *Oleracea*, conhecida popularmente como jambu também provoca convulsões quando injetado em doses de 50 a 150 mg/kg de extrato hexânico da raiz da planta por via intraperitoneal (Moreira *et al.*, 1989). Existem poucas informações na literatura sobre a farmacocinética e a farmacodinâmica de substâncias convulsivantes sintetizadas por plantas, neste contexto inclui-se o cunaniol e acetato de cunaniol, que são sintetizadas por plantas do gênero *Clibadium* e que possuem a capacidade de interagir com o organismo aumentando a

excitabilidade neuronal (Costa, *et al.*, 2006; Quilliran & Stables 1969a), porém as vias metabólicas e excretoras das substâncias nunca foram anteriormente relatadas.

O extrato hexânico de *Clibadium sylvestre* se caracteriza por conter substâncias com poder convulsivante, representadas pelos componentes acetato de cunaniol e cunaniol que são as substâncias majoritárias no extrato e sua presença comprovada através de cromatografia líquida e ressonância magnética nuclear como demonstrado no Cromatograma 1.

Segundo Gorinsky *et al.* (1973), o acetato de cunaniol parece ser o componente majoritário no extrato das folhas de *Clibadium surinamenses*, uma planta da mesma família da *Clibadium sylvestre*.

De acordo com a análise cromatográfica do plasma dos animais que receberam extrato hexânico (acetato de cunaniol e cunaniol) via intraperitoneal em tempos fixos após a análise, não foi constatada a presença do acetato de cunaniol, sugerindo que a molécula sofra uma desacetilação plasmática de maneira rápida e eficiente, indicando conversão metabólica do acetato de cunaniol em cunaniol. Desta forma, os cromatogramas demonstraram somente a presença do cunaniol nas amostras de plasma, indicando que a droga responsável pelo aparecimento de alterações comportamentais e o aumento da excitabilidade no SNC é o cunaniol. O cunaniol correspondeu à única substância encontrada no plasma, capaz de justificar os sinais clínicos que os animais apresentavam durante a coleta de sangue. A conversão do acetato de cunaniol para cunaniol foi observado após incubação, por 30 e 60 minutos no plasma de animais sadios. O processo de desacetilação do acetato de cunaniol no plasma não foi totalmente dependente da atividade das esterases plasmáticas, pois mesmo com o bloqueio através de uma carbamilação

por fisostigmina, a conversão foi efetuada no tempo de incubação observado, porém após a inibição da esterase plasmática foi possível detectar no cromatograma um sinal mais forte da presença de acetato de cunaniol. Levando em consideração a eficiência enzimática das esterases, e que a carbamilação provocada pela fisostigmina é reversível, esta via metabólica não pode ser descartada.

É importante ressaltar que o princípio ativo cunaniol foi detectado no plasma uma hora após a administração intraperitoneal, o que pode ter relação com a duração das convulsões provocadas pela substância, o que de fato, foi comprovado com os registros eletroencefalográficos, com mudança no traçado detectado 12 horas após a aplicação.

Segundo Mukai *et al.* (2001), o cunaniol e acetato de cunaniol foram pela primeira vez sintetizados quimicamente em laboratório 30 anos após o primeiro isolamento que ocorreu em 1965, sendo a primeira síntese total feita na Universidade de Kanazawa no Japão, constando-se um processo oneroso e trabalhoso. A possível rota metabólica do acetato de cunaniol ser convertido em cunaniol no plasma, nunca foi decifrada na literatura anteriormente, portanto o modelo quimioconvulsivante provocado pela aplicação do extrato hexânico composto por acetato de cunaniol e cunaniol, possui diferença que envolvem a potencialização do quadro convulsivo em relação a fatores farmacocinéticos, sendo a primeira relacionada à absorção das drogas contidas no extrato e a segunda a partir da conversão plasmática através da desacetilação do acetato de cunaniol em cunaniol, favorecendo a hipótese de que o acetato de cunaniol corresponde a uma pró-droga e o cunaniol é responsável pelos efeitos observados. É importante ressaltar que embora sejam observadas insaturações na estrutura químicas do

cunaniol, o que facilitaria a quebra da molécula e sua metabolização com diminuição dos seus efeitos, os quadros convulsivos são de duração longa indicando estabilidade da molécula e/ou manutenção da sua atividade no sítio de ação, pode ser justificado pela conversão da droga para a forma ativa.

A análise cromatográfica da urina dos animais não apresentou cromatogramas compatíveis com a presença das substâncias contidas no extrato hexânico.

5.2. CARACTERIZAÇÃO DOS REGISTROS ELETROCORTICOGRÁFICOS DE ANIMAIS EM CONVULSÃO

Os modelos experimentais de epilepsia são importantes porque permitem uma compreensão dos fenômenos subjacentes aos processos epiléticos, alguns requisitos principais são importantes para o modelo de epilepsia ser considerado um modelo experimental como demonstrar a presença de atividade epileptiforme nos registros eletroencefalográficos e clinicamente apresentar uma atividade semelhante a uma crise epilética (Quintans *et al.*, 2007).

Segundo Costa *et al.* (2006), diferentes doses de extrato hexânico de *Clibadium surinamense* provocam alterações comportamentais, com aparente sintomatologia de aumento da excitabilidade central como convulsões clônicas que evoluem até a morte dos animais. A *Clibadium sylvestre* corresponde a uma planta do mesmo gênero e sintetiza substâncias como acetato de cunaniol e cunaniol. O cunaniol possui ação indutora de excitabilidade central, constatada pelos registros eletroencefalográficos, a atuação dessa substância no sistema nervoso central, confirmaram o potencial convulsivante podendo ser classificado como modelo

quimioconvulsivante dose dependente, podendo servir como teste para triagem de drogas antiepilépticas.

A partir dos eletrocorticogramas obtidos após a aplicação de 2,92 mg/kg, via intraperitoneal do cunaniol, foi possível comparar com outros modelos de epilepsia bem estabelecidos, como o pentilenotetrazol, eletrochoque, pilocarpina e ácido caínico.

Os registros eletrocorticográficos observados após administração de pentilenotetrazol demonstraram atividades epileptiformes por mais de uma hora após a injeção, sendo uma atividade duradoura e sem retornos periódicos à condição celular basal (Jutkiewicz *et al.*, 2006).

O registro eletroencefalográfico característico, após a aplicação de cunaniol, demonstrou diferença, em comparação ao “*status ictal*” produzido pelo pentilenotetrazol, pois os registros de impulsos aumentam e em seguida retomam a uma condição de registro próximo ao basal, não mantendo a amplitude de disparos, este comportamento eletroencefalográfico foi observado durante 2,78 horas em 4 horas de registro. A diminuição de registros de impulsos celulares e aproximação do traçado basal tornam o processo cíclico, possibilitando registros com amplitude e frequência elevados e, logo em seguida, registros de baixa frequência e amplitude. Este padrão é substituído por outro de alta frequência e amplitude no decorrer do registro que é mantido, fenômeno constatado no córtex motor e no cerebelo. Porém, os modelos concordam no que se refere à duração do “*status ictal*”, constatou-se que após a aplicação da DE₅₀ os animais permanecem sobre o efeito por mais de 4 horas, indicando que o “*status ictal*” provocado pela aplicação de cunaniol possui

efeito de longa duração, podendo ser observada diferença de traçado registrado 12 horas após a aplicação.

Os padrões de atividade elétrica cerebral, detectados no córtex motor do rato, após a aplicação de cunaniol foi caracterizado por mudanças contínuas de intensidade durante a fase aguda do processo convulsivo, o que pode ser constatado pelos diversos padrões de surgimento no registro.

No modelo epiléptico da pilocarpina foram observados picos interictais, que são resultados de descargas neuronais focais anormais, que podem ser comprovadas por registros eletroencefalográficos durante os períodos entre as convulsões que possuem duração entre 50 a 200 ms, e são resultados da sincronização, produzindo despolarização paroxísticas em neurônios com uma rápida sucessão de potenciais de ação. Neste ponto os picos interictais nessa síndrome epiléptica se assemelha à epilepsia do lobo temporal (Kleen *et al.*, 2010), estas características das convulsões provocadas pela aplicação da pilocarpina, não foi constatado para as crises desencadeadas após a aplicação de cunaniol.

Após a aplicação da pilocarpina, o “*status ictal*” inicial tem duração entre 3 a 7 horas (Kleen *et al.*, 2010). No “*status ictal*”, provocado pela aplicação de cunaniol, a manifestação do comportamento pode ser observado durante um período longo, tendo sido registrado até 4 horas de atividade cerebral aumentada. O padrão de disparo difundido no córtex cerebral durante as convulsões induzidas por cunaniol gera registro da atividade neuronal diferenciada comprovada nesse trabalho. É importante notar que as convulsões se caracterizam com manifestações comportamentais de crises tônico-clônicas, sendo inclusive observados períodos silentes que frequentemente são demonstrados nos registros eletroencefalográficos.

Um fato importante é que o modelo experimental de convulsão imprimida pelo cunaniol pode ser classificado como agudo, com as manifestações das crises ocorrendo somente durante a vigência do agente indutor, portanto, apresenta-se diferente dos modelos ditos crônicos, ou seja, quando as crises recorrem a intervalos variados de tempo, como os modelos obtidos pela injeção da pilocarpina e do ácido caínico.

5.3. AVALIAÇÃO DAS AÇÕES DE DROGAS NO CONTROLE DAS CONVULSÕES APÓS APLICAÇÕES DE DOSES PROGRESSIVAS DE CUNANIOL POR VIA INTRAPERITONEAL

A investigação de drogas antiepilépticas teve maior direcionamento quanto a seu potencial antiepiléptico, após estudos e detalhamento dos mecanismos convulsivantes produzido por drogas ou instrumentos que são utilizados como modelos quimioconvulsivantes ou epiléticos. Na procura de novos conhecimentos sobre os mecanismos fisiopatológicos das epilepsias, diversos modelos experimentais têm sido desenvolvidos e apresentados na literatura (Löscher & Schmidt, 2006). Cada modelo experimental apresenta suas vantagens e desvantagens. As características de cada um parecem estar relacionadas com os diferentes graus de envolvimento de determinadas estruturas no SNC, bem como dos mediadores químicos envolvidos. Os modelos experimentais têm sido classificados levando-se em conta as alterações comportamentais, morfológicas e os aspectos neuroquímicos envolvidos com a gênese e/ou difusão das descargas epiléticas (Löscher, 2011).

Os modelos experimentais sempre foram utilizados na realização de triagem (*screening*) farmacológicas de drogas antiepilépticas, onde o principal objetivo é a contenção das crises convulsivas por drogas em estudo, ou seja, um tratamento sintomático, mas não necessariamente curativo, portanto, modelos experimentais mais elaborados farmacologicamente como o modelo do “abrasamento” ou genéticos têm contribuído significativamente como ferramenta para a compreensão dos mecanismos básicos da epilepsia e no desenvolvimento de novas drogas antiepilépticas (Löscher & Schmidt, 2006).

Segundo Moreira *et al.* (1989), o extrato hexânico de *Spilanthes acmella* var. Oleracea, produz convulsão em ratos na dose de 75 mg/kg por via intraperitoneal que se caracteriza por apresentar seis estágios epiléticos, sendo os efeitos observados dependentes da dose. As alterações comportamentais induzidas por diferentes doses de cunaniol variaram de acordo com a classificação em cinco estágios epiléticos, que iniciam com imobilidade, salivação discreta, movimentos orofaciais até o aparecimento de crises tônico-clônicas e morte. Essa ação convulsivante e o aparecimento dos estágios possuem características que são dependentes da dose, principalmente para o desencadeamento dos estágios iniciais.

De acordo com a classificação dos estágios epiléticos, a convulsão provocada pela aplicação intraperitoneal de cunaniol, se diferencia dos outros modelos de epilepsia classicamente estudados. Nesse modelo a evolução de cada estágio possui particularidades. Um dos comportamentos iniciais referido em outros modelos, como o do pentilenotetrazol, pilocarpina, bicuculina, ácido caínico e extrato de *Averrhoa carambola* é o comportamento conhecido como “*wet dog shakes*”. Segundo Rondouin *et al.* (1987), este comportamento é marcado por progressão das

convulsões límbicas para a sua posterior generalização. Dagci *et al.* (2002) reafirmou que esse comportamento foi expresso somente quando há focos de atividade límbica, principalmente na região da amígdala, podendo se estender até o hipocampo. Este comportamento não foi observado em animais após a aplicação de doses de cunaniol.

O Pentilenotetrazol, convulsivante sintético que induz crises epiléticas por antagonizar a função GABAérgica, é um dos agentes convulsivantes mais comumente empregados nos testes pré-clínicos para avaliação de novos agentes com atividade anti-epiléptica. Independente da via de administração, essa substância é capaz de produzir crises clônicas generalizadas, e em altas doses crises tônicas (Löscher & Schmidt, 1988; Löscher, 2011). Após aplicação de cunaniol as manifestações comportamentais são de aparecimento rápido, culminando com crises convulsivas generalizadas, do tipo tônico-clônica, que muito se assemelham àquelas observadas após a aplicação do Pentilenotetrazol. Da mesma forma que o cunaniol, o Pentilenotetrazol produz uma sequência de alterações comportamentais, tempo e dose dependentes, iniciando com os abalos mioclônicos, crises clônicas generalizadas e crises tônicas seguidas de morte (Burley & Ferrendelli, 1984).

A curta latência para a obtenção de efeitos do cunaniol, também estabelece uma estreita similaridade com o rápido aparecimento de crises observadas no modelo do Pentilenotetrazol. Em ratos, a injeção de 100 mg/kg de Pentilenotetrazol leva ao aparecimento de crises num período que varia entre 30 segundos a cinco minutos após a injeção (Burley & Ferrendelli, 1984).

Outra importante alteração constatada pela injeção do cunaniol foi a ocorrência de crises clônicas generalizadas precedidas por corridas abruptas e

saltos. Esse comportamento foi observado com relativa frequência, tais alterações apresentam correlações com outros modelos experimentais de epilepsia. Assim, foi encontrada alguma semelhança com as crises audiogênicas observadas em camundongos DBA/2. Essa fase de corrida é provavelmente a característica mais importante que permite distinguir as crises audiogênicas da maioria das outras crises epiléticas (Seyfried, 1983; Ascoti *et al.*, 1986).

O agonista colinérgico pilocarpina foi extensivamente utilizado experimentalmente para se obter “*status epilepticus*”. Animais tratados com pilocarpina, não são somente utilizados para estudo da epileptogênese, mas também, servem como modelos para testes de diversas drogas antiepiléticas (Hoffmann *et al.*, 2006).

O mecanismo de ação da pilocarpina no SNC envolve os receptores muscarínicos M1 e M2, porém os efeitos obtidos para a epileptogênese são mediados pela ativação dos receptores M1. Essa droga induz atividades comportamentais análogas ao “*status epilepticus*”, sendo este um dos modelos mais estudados, principalmente porque animais tratados com pilocarpina sofrem lesões em neurônios resultando no desenvolvimento de crises espontâneas (Bymaster *et al.*, 2003). As crises convulsivas provocadas pela aplicação de hidrocloreto de pilocarpina são muito semelhantes às causadas por cunaniol, porém nesse modelo, os animais não desenvolvem crises espontâneas dias após tratamento.

No modelo epilético da pilocarpina as crises motoras límbicas recorrem a cada dois a oito minutos, culminando em estado de mal epilético em 50 a 60 minutos, sendo que o “*status epilepticus*” chega a durar dezoito horas e ao final desse período os animais tornam-se irresponsivos a estímulos ambientais,

retornando gradativamente seu comportamento normal dentro de 24 horas (Turski *et al.*, 1987).

Após a aplicação de cunaniol na dose de 2,92 mg/kg, os animais apresentaram o estado de “mal epiléptico” (tônico-clônico) de forma mais imediata, demonstrando desta forma menor período de latência ao ser comparada com o modelo da pilocarpina para a indução de convulsões tônico-clônicas.

Segundo Mudo *et al.* (1996), os efeitos induzidos pela pilocarpina na dose de 300 a 350 mg/kg via intraperitoneal, foram bloqueados após pré-tratamento com antagonista muscarínico, a escopolamina (0,5 a 1 mg/kg) por via intraperitoneal. Na tentativa de antagonizar os efeitos convulsivantes do cunaniol e relacionar os modelos epilépticos, foi aplicado o antagonista muscarínico antes da indução às convulsões pelo cunaniol, obtendo os resultados que demonstraram que a escopolamina não foi eficaz em controlar o quadro convulsivo provocado pelo cunaniol em dose 10 vezes maior do que a utilizada para controlar as convulsões induzidas pela pilocarpina, desta forma, pode-se constatar que os fenômenos que desencadeiam o comportamento convulsivo entre os modelos são diferentes, não havendo relação entre os mecanismos epileptogênicos nos dois modelos.

Os benzodiazepínicos são eficazes como antiepilépticos em modelos experimentais, diminuindo a duração das descargas epileptiformes e restringindo sua propagação, e potencialmente eficazes em prevenir crises induzidas por pentilenotetrazol, picrotoxina e bicuculina. Os benzodiazepínicos têm demonstrado eficácia contra crises no modelo de epilepsia induzida por alumínio assim como em alguns modelos animais com epilepsia genética, incluindo a epilepsia audiogênica em ratos (Delaney & Sah, 1999).

Segundo Corral-Ansa *et al.* (2008), no “*status epilepticus*” as drogas de primeira escolha são os benzodiazepínicos, principalmente o diazepam, o lorazepam e o clonazepam. O diazepam possui a vantagem de agir rapidamente no controle levando, em média de 2 minutos para finalizar as crises, sendo os efeitos secundários dos benzodiazepínicos, a sedação e a depressão respiratória.

O diazepam e o flunitrazepam foram estudados por Delaney & Sah (1999) para controlar convulsões induzidas por antagonistas do GABA, como a bicuculina e a picrotoxina, os resultados foram satisfatórios para o controle dessas convulsões. Segundo Morrisett *et al.* (1987), o diazepam possui ação protetor aos efeitos convulsivantes da pilocarpina, esse efeito foi demonstrado também para o controle das convulsões induzidas pelo cunaniol, sendo, entre as drogas testadas a que comprovou eficácia, no controle do comportamento convulsivo. O eletrocorticograma permitiu evidenciar a diminuição da amplitude e frequência, registrados após a aplicação de cunaniol, não permitindo a propagação das descargas convulsivas, como também seu desencadeamento quando aplicado previamente.

O fenobarbital é um oxibarbitúrico que reduz a excitabilidade neuronal basicamente por aumentar a inibição mediada pelo GABA através dos receptores GABA_A. A transmissão GABAérgica intensificada pelos barbitúricos no tronco encefálico suprime o sistema de ativação reticular causando sedação, amnésia e perda da consciência, por outro lado, o aumento da transmissão GABAérgica nos neurônios motores da medula espinhal causa relaxamento dos músculos e suprime os reflexos. O fenobarbital controla as convulsões ocasionadas após a aplicação da tetrodotoxina, do pentilenotetrazol e do modelo de eletrochoque máximo (Luszczki *et al.*, 2009; Kozinska *et al.*, 2009)

Com a utilização prévia do fenobarbital, houve redução do aparecimento do comportamento convulsivo após a aplicação de doses crescentes de cunaniol, corroborando com o trabalho de Costa *et al.* (2006). No traçado eletroencefalográfico foi constatado que a sincronização de disparos de alta amplitude e frequência diminuem, prevenindo o desencadeamento do processo convulsivo, porém, a utilização do fenobarbital para controlar o processo convulsivo já estabelecido pelo cunaniol se mostrou diferente, a amplitude de disparo foi mantida e a frequência foi diminuída.

Segundo Wasterlain & Chen (2008), a fisiopatologia do “*status epilepticus*”, em convulsões induzidas experimentalmente, como os modelos da pilocarpina e do ácido caínico, ocorrem injúria neuronal, que resultam em convulsões farmacorresistentes, devido atividade prolongada das convulsões. Essas lesões são reduzidas ou prevenidas quando se utiliza agonistas GABAérgicos no receptor GABA_A, porém outras classes de drogas podem diminuir a lesão, não ficando em condição restrita a tratamentos limitados somente às drogas com ação no receptor GABA_A.

No modelo epiléptico do abrasamento elétrico que consiste na estimulação elétrica subconvulsivante de áreas cerebrais específicas gerando convulsões clônicas bilaterais em decorrência da estimulação, o fator mais importante para a indução do abrasamento é a obtenção gradativa de pós-descargas (Goddard *et al.*, 1969). Segundo Dudek *et al.* (1994), os antagonistas competitivos e não competitivos do receptor NMDA produzem inibição do desenvolvimento e da expressão do abrasamento, sugerindo o envolvimento desses receptores excitatórios pós-sinápticos na evolução das convulsões. Os resultados observados

após a aplicação de quetamina demonstraram que os animais diminuíram a intensidade do comportamento convulsivo, comprovando que o bloqueio do receptor NMDA, foi capaz de interferir na resposta comportamental após aplicação de cunaniol. Este fato pode ser constatado após a análise do trecho eletrocorticográfico que demonstrou alterar o desencadeamento e a propagação do processo diminuindo a amplitude e a frequência.

O modelo genético da fotoepilepsia do babuíno, que se apresenta como uma síndrome de crises eletroencefalográficas bilaterais síncronas, com sinais de fácil localização do sítio epiléptogênico, é bloqueada pelos antagonistas NMDA, tendo potente ação anticonvulsivante (Ascioti, 1986). Mazarati *et al.* (1998) observaram o aumento da atividade dos receptores NMDA durante “*status epilepticus*” e que seu bloqueio seria benéfico melhorando o quadro clínico dos pacientes. Segundo Fujikawa (1996), ao contrário dos outros anestésicos gerais a quetamina aumenta a pressão sanguínea e a contratilidade cardíaca, mesmo assim, tem comprovada ação protetora no “*status epilepticus*”. O anestésico dissociativo quetamina foi capaz de controlar as convulsões induzidas por cunaniol, diminuindo a intensidade das convulsões nos animais submetidos a doses crescentes.

A quetamina foi testada para controlar as convulsões induzidas após intoxicação pelo organofosforado Soman em suínos, e foi comprovada a eficiência da quetamina em prevenir a morte dos animais, quando utilizada na dose de 10 mg/kg por via intramuscular (Dorandeu *et al.*, 2007).

Existe a hipótese de que o prolongamento das convulsões alteram a estrutura e/ou o funcionamento do receptor GABA_A que contribui bastante para a reduzida eficácia de drogas agonistas GABAérgicos durante “*status epilepticus*”

(Macdonald & Olsen, 1994). Como as convulsões causadas pelo cunaniol são prolongadas podendo durar horas, este fato pode justificar a utilização do antagonista NMDA no controle das convulsões.

O cloridrato de xilazina é um agonista α_2 -adrenérgico e sua ação em receptores pré-sinápticos diminui o tônus simpático, em receptores medulares auferindo analgesia, e no tronco cerebral no *locus coeruleus* proporcionando sedação e miorelaxamento (Spinosa *et al.*, 1994).

Segundo Spinosa *et al.* (1994), o pré-tratamento de ratos com 30 mg/kg de cloridrato de xilazina por via intraperitoneal protegeu os animais contra convulsões induzidas por anfetamina, mas intensificou as convulsões induzidas por pentilenotatrazol e estriçnina. O pré-tratamento com xilazina foi eficiente para controlar convulsões induzidas pelo eletrochoque em ratos. Hikasa *et al.* (1993) verificaram a ação da xilazina em felinos anestesiados com enflorano, que apresentavam traçados eletroencefalográficos compatíveis com convulsões quando induzidos à anestesia volátil, foi constatado que a xilazina não reduz a frequência de disparos, porém reduz a sua amplitude durante a anestesia. A utilização de agonista α_2 -adrenérgico reduziu a intensidade do comportamento convulsivo após aplicação de doses crescentes de cunaniol. O registro eletroencefalográfico demonstrou que o desencadeamento de disparos cíclicos e de alta frequência são mantidos.

Segundo Tanaka *et al.* (2005), a dexmedetomidina um agonista seletivo dos receptores alfa-2 adrenérgicos, possui a propriedade de diminuir as convulsões provocadas pelo quadro de intoxicação por anestésicos locais bupivacaína e levobupivacaína em ratos. Foi constatado por Begec *et al.* (2008), que o agonista α_2

dexmedetomidina atua reduzindo a resposta hiperdinâmica em pacientes humanos submetidos a eletroconvulsoterapia, diminuindo a duração das convulsões. Após a administração de cunaniol e o estabelecimento de “*status epilepticus*” com duração de 30 minutos, o resultado do registro eletrocorticográfico demonstrou que a aplicação da xilazina não modificou o traçado, havendo manutenção da amplitude e frequência de disparos em relação ao controle.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que o cunaniol mostrou ser capaz de induzir alterações comportamentais características de atividade convulsiva de maneira dependente da dose, correspondendo a um modelo quimioconvulsivante, que se caracteriza por possuir padrões eletroencefalográficos capazes de diferenciá-lo de outros modelos bem estudados, possuindo características cíclicas, com cinco padrões de ondas observadas no registro, com duração de efeito convulsivo prolongado e latência para o aparecimento dos efeitos curtos.

As crises epiléticas generalizadas do tipo tônico-clônico, observadas após aplicação do extrato hexânico estão relacionadas inicialmente à absorção do cunaniol presente no extrato e do processo de desacetilação plasmática do acetato de cunaniol, portanto o pico de concentração sérica máxima está relacionado tanto ao processo de absorção quanto a converção do acetato de cunaniol em cunaniol.

O quadro convulsivo apresentado após a aplicação da droga se caracterizou por demonstrar cinco estágios epiléticos, com evolução de cada estágio dependente da dose, sendo que no desencadeamento de cada estágio existem características particulares, observadas somente neste modelo convulsivo. O registro eletroencefalográfico permitiu identificar os cinco estágios de classificação comportamental, os Estágios 1, 2, 3 e 4 são bem definidos quanto a mudanças no traçado eletroencefalográfico. A passagem do Estágio 4 para o Estágio 5 não existe um período de transição característico, somente a intensificação da frequência de disparos. Para a ocorrência dos estágios 4 e 5 não houve diferenças estatísticas quanto à concentração plasmática de cunaniol.

No que diz respeito à utilização de drogas anticonvulsivantes, o diazepam, a quetamina e o fenobarbital foram as drogas que controlaram de maneira eficiente o desencadeamento das convulsões. O antagonista muscarínico escopolamina não controlou os acessos convulsivos, demonstrando não ter relação com mecanismos epileptogênicos ocasionados pela aplicação da pilocarpina.

7. BIBLIOGRAFIAS

ACSÁDY, L., KOMONDI, A., SIK, A., FREUND, T., BUZSÁKI, G. GABAergic cells are the major postsynaptic targets of mossy fibers in the hippocampus. **J. Neurosci.**, **18 (9)**: 3383-3403, 1998.

AGUIAR, S. J. L. **Utilização do extrato aquoso da planta *Clibadium Sylvestre* (cunambi) como modelo experimental de epilepsia.** Tese de mestrado, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008, 40 p.

ALBALA, B. J., MOSHE, S. L., OKADA, R. Kainic-acid-induced seizures: A developmental study. **Brain Research**, **315 (1)**: 139-148, 1984.

ALBUQUERQUE, J. M. **Plantas tóxicas no jardim e no campo.** Belém, FCAP, Serviço de Documentação e Informação, 1980, 120 p.

AMARAL, D. G., ISHIZUKA, N., CLAIBORNE, B. Neurons, numbers and the hippocampal network. **Prog. Brain Res.**, **83**: 1-11, 1990.

ANDRADE, F. S. **Manual de Terapêutica Veterinária.** São Paulo, Roca, segunda edição, 2002, 696 p.

ANDRESEN, M. L., VELLE, A. C., TIMO-IARIA, C., TUFIK, S. **Implantação de eletrodos para estudo eletrofisiológico do ciclo vigília-sono do rato.** São Paulo, UNIFESP-Universidade Federal de São Paulo, 2001.

ASCIOTI, C., DE SARRO, G. B., MELDRUM, B. S., NISTICO, G. Calcium entry blockers as anticonvulsant drugs in DBA/2j mice. **BR. J. Pharmacol.**, **88**: 379, 1986.

AVOLI, M., GOOR, P. Interaction of cortex and thalamus in spike and wave discharges of feline generalized penicillin epilepsy. **Exp. Neurol.**, **76 (1)**: 196-217, 1982.

BEGEC, Z., TOPRAK, H. I., DEMIRBILEK, S., ERDIL, F., ONAL, D., ERSOY, M. O. Dexmedetomidine blunts acute hyperdynamic responses to eletroconvulsive therapy without altering seizure duration. **Acta Anaesthesiol. Scand.**, **52 (2)**: 302-306, 2008.

BEN-ARI, Y. Limbic seizures and brain damage produced by kainic acid: mechanisms and relevance to human temporal lobe epilepsy. **Neuroscience**, **14 (2)**: 375-403, 1985.

BOHLMANN, F., FRITZ, V. Benzofurans from *Clibadium armanii*. **Phytochemistry**, **19**: 2500-2501, 1980.

BOHM, B. A., BERLOW, S., STUESSY, T. F. Flavonol variation in *Clibadium trianae* and *Clibadium surinamense*. **Phytochemistry**, **22**: 2743-2744, 1983.

BOHM, B. A., STUESSY, T. F. Flavonol derivatives of the genus *Clibadium* (COMPOSITAE). **Phytochemistry**, **20**: 1053-1055, 1981.

BOHM, B. A., STUESSY, T. F. Further studies of flavonols of *Clibadium* (COMPOSITAE). **Phytochemistry**, **24**: 2134-2136, 1985.

BROWNE, T. R., HOLMES, G. L. Epilepsy. **N. Engl. J. Med.**, **344 (15)**: 1145-1151, 2001.

BURLEY, E. S., FERRENDELLI, J. A. Regulatory effects of neurotransmitters on electroshock and pentylenetetrazol seizures. **Fed. Proc.**, **43 (10)**: 2521-2524, 1984.

BYMASTER, F. P., CATER, P. A., YAMADA, M., GOMEZA, J., WESS, J., HAMILTON, S. E., NATHANSON, N. M., MCKINZIL, D. L., FELDER, C. C. Role of specific muscarinic receptor subtypes in cholinergic parasympathomimetic responses, in vivo phosphoinositide hydrolysis and pilocarpine-induced seizure activity. **Eur. J. Neurosci.**, **17 (7)**: 1403-1410, 2003.

CAIRASCO, N. G., REIS, L. C., TERRA, V. C., OLIVEIRA, J. A., ANTUNES-RODRIGUES, J. Diuresis and natriuresis in non-seizing and in kindled rats from a genetically audiogenic susceptible strain. **Neuroreport**, **5 (15)**: 1873-1876, 1994.

- CAIRASCO, N. G., TERRA, V. C., DORETTO, M. C. Midbrain substrates of audiogenic seizures in rats. **Behavioural Brain Research**, **58 (1-2)**: 57-67, 1993.
- CAIRASCO, N. G., WAKAMATSU, H., OLIVEIRA, J. A, GOMES, E. L., DEL BEL, E. A., MELLO, L. E. Neuroethological and morphological correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizure susceptible wistar rats. **Epilepsy research**, **26 (1)**: 177-192, 1996.
- CAROLINO, R. O, BELEBONI, R. O., PIZZO, A. B., VECCHIO, F. D., GARCIA-CAIRASCO, N., MOYSES-NETO, M., SANTOS, W. F., COUTINHO-NETTO, J. Convulsant activity and neurochemical alterations induced by a fraction obtained from fruit *Averrhoa carambola* (Oxalidacea: Geraniales). **Neurochem. Int.**, **46 (7)**: 523-531, 2005.
- CASCON, S. C., MORS, W. B., TURSCH, B. M., APLIN, R. T., DURHAN, L. J. Ichthyothereol and its acetate, the active polyacetylene constituents of *Ichthyothere terminalis* (Spreng) Malme, a fish poison from the Lower Amazon. **J. Am. Chem. Soc.**, **87 (22)**: 5237-5241, 1965.
- CASTILLO, T. G., JAKUPOVIC, J., BOHMANN, F., CASTRO, V. Clibadiolide, a sesquiterpene lactone esterified with a homoditerpene from *Clibadium pittierii*. **Phytochemistry**, **27**: 1868-1870, 1988.

CAVALCANTE, R. Q. **Efeitos farmacológicos do suco e extrato aquoso de *Sedum praealtum***. Tese de Mestrado. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1974, 110 p.

CAVALHEIRO, E. A., RICHE, D. A., LE GAL LA SALLE, G. Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats: a method for inducing spontaneous recurrent seizures. **Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.**, **53 (6)**: 581-589, 1982.

CAVALHEIRO, E. A., SILVA, D. F., TURSKI, W. A., CALDERAZZO-FILHO, L. S., BORTOLOTTI, Z. A., TURSKI, L. The susceptibility of rats to pilocarpine-induced seizures is age-dependent. **Brain Research**, **465 (1-2)**: 43-58, 1987.

CHAPMAN, A. G., CROUCHER, M. J., MELDRUM, B. S. Evolution of anticonvulsant drugs in DBA/2 mice with sound-induced seizures. **Arzneimittelforschung**, **34 (10)**: 1261-1264, 1984.

CHEN, C. S., ABERDEEN, G. C. Elicitation of audiogenic seizures as a function of time after acoustic trauma and rate of stimulation in mice. **Exp. Neurol.**, **74 (3)**: 920-923, 1981.

CHERUBINI, E., De FEO, M. R., MACARELLI, O., RICCI, G. F. Behavioral and electrographic patterns induced by systemic administration of kainic acid in developing rats. **Brain Research**, **285 (1)**: 69-77, 1983.

- CLARK, J. B. Effect of a polyacetylenic fish poison on the oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria. **Biochem. Pharmacol.**, **18 (1)**: 73-83, 1969.
- CORDÁS, T. A., MORENO, R. A. **Condutas em psiquiatria**. São Paulo. Editora **Lemos**, 4^a edição, 2001, 349 p.
- CORRAL-ANSA, L., HERRERO-MESEGUER, J. I., FALIP-CENTELLAS, M., AIGUABELLA-MACAU, M. Estatus epilepticus. **Med. Intensiva**, **32 (4)**: 174-182, 2008.
- CORRÊA, P. M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. V. 2, 1984.
- COSTA, C. J., PALMINI, A., YACUBIAM, E. M. T., CAVALHERO, E. A. **Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos**. São Paulo, **Lemos**, V. 1, 1998, 703 p.
- COSTA, E. A., ROCHA, F. F., TORRES, M. L., SOUCCAR, C., De LIMA, T. C., LAPA, A. J., LIMA-LANDMAN, M. T. Behavioral effects of a neurotoxic compound isolated from *Clibadium surinamense* L (Asteracea). **Neurotoxicology and Teratology**, **28 (3)**: 349-353, 2006.

COWEN, P. J., NUTT, D. J., GREEN, A. R. Enhanced 5-hydroxytryptamine and dopamine-mediated behavioural responses following convulsions. The effects of anaesthesia and current conditions on the appearance of enhanced responses following electroconvulsive shock. **Neuropharmacology**, **19 (9)**: 901-906, 1980.

CZERSON, H., BOHLMANN, F., STUESSY, T. F., FISCHER, N. H. Sesquiterpenoid and acetylenic constituents of seven *Clibadium* species. **Phytochemistry**, **18**: 257-260, 1979.

DAGCI, T., TAN, M., KOYLU, E. O., TAN, U., POGUN, S. The effect of octreotide on Kainate-induced wet dog shakes and seizure activity in male and female rats. **Int. J. Neurosci.**, **112 (7)**: 829-839, 2002.

DEAKIN, J. F., OWEN, F. CROSS, A. J., DASHWOOD, M. J. Studies on possible mechanisms of action of electroconvulsive therapy: effects of repeated electrically induced seizures on rat brain receptors for monoamines and other neurotransmitters. **Psychopharmacology**, **73 (4)**: 345-349, 1981.

DELANEY, A. J., SAH, P. GABA receptors inhibited by benzodiazepines mediate fast inhibitory transmission in the central amygdala. **Journal of Neuroscience**, **19 (22)**: 9698-9704, 1999.

DORANDEU, F., BAILLE, V., MIKLER, J., TESTYLIER, G., LALLEMENT, G., SAWYER, T., CARPENTIER, P. Protective effects of S(+) ketamine and atropine

against lethality and brain damage during soman-induced status epilepticus in guinea-pigs. **Toxicology**, **234 (3)**: 185-193, 2007.

DUDEK, F. E., OBENAUS, A., SCHWEITZER, J. S., WU ARIN, J. P., Functional significance of hippocampal plasticity in epileptic brain: electrophysiological changes of the dentate granule cells associated with mossy fiber sprouting. **Hippocampus**, **4 (3)**: 259-265, 1994.

DUMAN, R. S., VAIDYA, V. A. Molecular and cellular actions of chronic electroconvulsive seizures. **Journal of ECT**, **14 (3)**: 181-193, 1998.

FABENE, P. F., CORREIA, L., CARVALHO, R. A., CAVALHEIRO, E. A., BETIVOGLIO, M. The spiny rat *Proechimys guyannensis* as model of resistance to epilepsy: chemical characterization of hippocampal cell populations and pilocarpine-induced changes. **Neuroscience**, **104 (4)**: 979-1002, 2001.

FABENE, P. F., MARZOLA, P., SBARBATI, A., BENTIVOGLIO, M. Magnetic resonance imaging of changes elicited by status epilepticus in the rat brain: diffusion-weighted and T2-weighted images, regional blood volume maps and direct correlation with tissue and cell damage. **Neuroimage**, **18 (2)**: 375-389, 2003.

- FERNANDES, M. J., NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G., CAVALHEIRO, E. A. Na⁺ K⁺ ATPase activity in the rat hippocampus: a study in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochem. int**, **28 (5-6)**: 497-500, 1996.
- FERREIRA, I. L. M., SILVA, T. P. T. Mortalidade por epilepsia no Brasil de 1980 a 2003. **Ciências & Saúde Coletiva**, **14 (1)**: 89-94, 2007.
- FISCHER, R S., VAN EMDE BOAS, W., BLUME, W., ELGER, C., GENTON, P., LEE, P., ENGEL, J. Jr. Epileptic seizures and epilepsy: definitions proposed by the international league against epilepsy (ILAE) and the international bureal for epilepsy. **Epilepsia**, **46 (4)**: 470-472, 2005.
- FRITSCH, G., HITZIG, E. Electric excitability of the cerebrum (Ueber die elektrischer Erregbarkeit des grosshirns). **Epilepsy behav.**, **15 (2)**: 123-130, 2009.
- FUJIKAWA, D. G. The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. **Brain Res.**, **725(1)**: 11-22, 1996.
- GARCIA, B. H. **Flora medicinal de Colómbia**. Bogotá, Colómbia. Botânica Médica. Instituto de Ciências Naturales. **Imprensa Nacional**, 1975, 330 p.
- GODDARD, G. V., McINTYRE, D. C., LEECH, C. K. A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. **Experiment Neurol.**, **25 (3)**: 295-330, 1969.

GOMES, M. M. História da epilepsia: um ponto de vista epistemológico. **J. Epilepsy Clin. Neurophysiol.**, **12 (3)**: 161-167, 2006.

GORINSKY, C., TEMPLETON, W., ZAIDI, S. A. Isolation of ichthyothereol and its acetate from *Clibadium sylvestre*. **Lloydia**, **36 (3)**: 352-353, 1973.

GUEDES, F. A., ALONSO, O. Y. G., LEITE, J. P. Plasticidade neuronal associada à epilepsia do lobo temporal medial: “ensights” a partir de estudo em humanos e em modelos Animais. **Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology**, **12**: 10-17, 2006.

GUTIERREZ, R. The GABAergic phenotype of the “glutamatergic” granule cells of the dentate gyrus. **Prog. Neurobiol.**, **71 (5)**: 337-358, 2003.

HAHN, F. Analeptics. **Pharmacol. Rev.**, **12**: 447-530, 1960.

HAMOY, M. **Convulsões indizadas pelo extrato aquoso de *Clibadium sylvestre*, um modelo experimental de epilepsia generalizada**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Pará, Belém. 2002, 70 p.

HAUSER, W. A., HESDORFFER, D. C. **Epilepsy, frequency, causes and consequence**. New York, **Demos Publications**, 1990, 378 p.

- HIKASA, Y., KOJIMA, N., TAKASE, K., OGASAWARA, S. Effects of thiopental, ketamine, diazepam, xylazine, and nitrous oxide on EEG spike activity and convulsive behavior during enflurane anesthesia in spontaneously breathing atropinized cats. Effect at surgical depth. **Vet. Surg.**, **22 (4)**: 318-325, 1993.
- HJERESSEN, D. L., FRANCK, J. E., AMEND, D. L. Ontogeny of seizure incidence, latency, and severity in genetically epilepsy prone rats. **Dev. Psychobiol.**, **20 (3)**: 355-363, 1987.
- HOEHNE, F. C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo, Graphicars, 1939, 139 p.
- HOFFMANN, K., GASTENS, A. M., VOLK, H. A., LÖSHER, W. Expression of multidrug transporter MRP2 in the blood-brain barriers after pilocarpine-induced seizures in rats. **Epilepsy Res.**, **69 (1)**: 1-14, 2006.
- HOMAYOUN, H., KHAVANDGAR, S., DEHPOUR, A. R. Anticonvulsant effects of cyclosporin A on pentylenetetrazole-induced seizure and kindling: Modulation by nitricoxidergic system. **Brain Research**, **939 (1-2)**: 1-10, 2002.
- HORTON, R., ANLEZARK, G., MELDRUM, B. Noradrenergic influences on sound-induced seizures. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **214 (2)**: 437-442, 1980.

JACK, C. R. Jr., PETERSEN, R. C., XU, Y. C., WARING, S. C., O'BRIEN, P. C., TANGALOS, E. G., SMITH, G. E., IUNIK, R. J., KOKMEN, E., Medial temporal atrophy on MRI in normal aging and very mild Alzheimer's disease. **Neurology**, **49 (3)**: 786-794, 1997.

JONES, A. W., CROUCHER, M. J., MELDRUM, B. S., WATKINS, J. C. Suppression of audiogenic seizures in DBA/2 mice by two new peptide NMDA receptor antagonists. **Neuroscience Lett**, **45 (2)**: 157-161, 1984.

JUTKIEWICZ, E. M., BALADI, M. G., FOLK, J. E., RICE, K. C., WOODS, J. H. The convulsive and electroencephalographic changes produced by nonpeptidic σ -opioid agonists in rats: comparison with pentylenetetrazol. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, **317 (3)**: 1337-1348, 2006.

KLEEN, J. K., SCOTT, R. C., HOLMES, G. L., LENCK-SANTINI, P. P. Hippocampal interictal spikes disrupt cognition in rats. **Ann. Neurol.**, **67 (2)**: 250-257, 2010.

KOZINSKA, J., SAWICKA, K. M., ZADROZNIAK, A., WOJDA, E., ANDRES-MACH. M., DUDRA-JASTRZEBSKA, M., LUSZCZKI, J. J. Indapamide enhances the protective action of carbamazepine, phenobarbital, and valproate against maximal electroshock-induced-seizures in mice. **Advance in Medical Sciences**, **54 (1)**: 66-74, 2009.

KUBOVÁ, H., MARES, P. Different postnatal development of convulsions and lethality induced by strychnine in rats. **Pharmacol. Toxicol.**, **77 (3)**: 219-224, 1995.

KÜNZLE, H., RADTKE-SCHULLER, S. Hippocampal fields in the hedgehog tenrec. Their architecture and major intrinsic connections. **Neuroscience Research**, **41 (3)**: 267-291, 2001.

LAIRD, H. E. 2nd, DAILEY, J. W., JOBE, P. C. Neurotransmitter abnormalities in genetically epileptic rodents. **Fed. Proc.**, **43 (10)**: 2505-2509, 1984.

LEBRECHT, U., NOWAK, J. Z. Effect of single and repeated electroconvulsive shock on serotonergic system in rat brain. Metabolic studies. **Neuropharmacology**, **19 (11)**: 1049-1053, 1980.

LEMOS, T., CAVALHEIRO, E. A. Suppression of pilocarpine-induced *status epilepticus* and the late development of epilepsy in rats. **Experiment. Brain Research**, **102 (3)**: 423-428, 1995.

LENT, R. **Cem bilhões de neurônios, conceitos fundamentais de neurociências**. São Paulo, **Atheneu**, 2001, 698 p.

LITCHFIELD, J. T. Jr., WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **96 (2)**: 99-113, 1949.

LONDON, E. D., WALLER, S. B., VOCCI, F. J., BUTERBAUGH, G. G. Age-dependent reduction in maximum electroshock convulsive threshold associated with decreased concentrations of brain monoamines. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, **16 (3)**: 441-447, 1982.

LOPES DA SILVA, F. H., ARNOLDS, D. E. A. T. Physiology of the hippocampus and related structures. **Annu. Rev. Physiol.**, **40**: 185-216, 1978.

LÖSCHER, W. Genetic animal models of epilepsy as a unique resource for the evaluation of anticonvulsant drugs. **Methods Find Exp. Clin. Pharmacol**, **6 (9)**: 531-547, 1984.

LÖSCHER, W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. **European Journal of Pharmacology**, **342 (1)**: 1-13, 1998.

LÖSCHER, W. Critical review of current animal models of seizures and epilepsy used in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Seizure**, **20 (5)**: 1-10, 2011.

LÖSCHER, W., SCHMIDT, D. Which animal models should be used in the search for new antiepileptic drugs? A proposal based on experimental and clinical considerations. **Epilepsy Research**, **2 (3)**: 145-181, 1988.

LÖSCHER, W., SCHMIDT, D. New horizons in the development of antiepileptic drugs: innovative strategies. **Epilepsy Research**, **69 (3)**: 183-272, 2006.

LÖSCHER, W., FASSBENDER, C. P., NOLTING, B. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. II Maximal electroshock seizures models. **Epilepsy Res.**, **8 (2)**: 79-94, 1991.

LÖSCHER, W. Animal models of intractable epilepsy. **Progress in Neurobiology**, **53 (2)**: 239-258, 1997.

LUSZCZKI, J. J., CZERNECKI, R., JASTRZEBSKA, M., BOROWICZ, K. K., CZUCZWAR, S. J. Influence of agmatine on the protective action of numerous antiepileptic drug against pentetrazole-induced seizures in mice. **Pharmacol. Reports**, **61 (2)**: 252-260, 2009.

MACDONALD, R. L., OLSEN, R. W. GABA_A receptor channels. **Annu. Rev. Neurosci.**, **17**: 569-602, 1994.

MARESCAUX, C., MICHELETTI, G., VERGNES, M., DEPAULIS, A., RUMBACH, L., WARTER, J. M. A model of chronic spontaneous petit mal-like seizures in the rat: comparison with pentylenetetrazol-induced seizures. **Epilepsia**, **25 (3)**: 326-331, 1984.

MASIA, S. L., DEVINSKY, O. Epilepsy and behavior: a brief history. **Epilepsy Behav., 1 (1):** 27-36, 2000.

MARGERISON, J. H., CORSELLIS, J. A. Epilepsy and the temporal lobes: a clinical, encephalographic and neuropathological study of the brain in epilepsy, with particular reference to the temporal lobes. **Brain, 89 (3):** 499-530, 1966.

MATHERN, G. W., ADELSON, P. D., CAHAN, L. D., LEITE, J. P. Hippocampal neuron damage in human epilepsy: Meyer's hypothesis revisited. **Prog. Brain Res., 135:** 237-251, 2002.

MATTHES, A. **Epilepsia, diagnóstico e tratamento no hospital e na clínica.** São Paulo, **Atheneu**, 1976, 161 p.

MAZARATI, A. M., BALDWIN, R. A., SANKAR, R., WASTERLAIN, C. G. Time-dependent decrease in the effectiveness of antiepileptic drugs during the course of self-sustaining status epilepticus. **Brain. Res., 814 (1-2):** 179-185, 1998.

McCORMICK, D. A., COTRERAS, D. On the cellular and network bases of epileptic seizures. **Annu. Rev. Physiol., 63:** 815-846. 2001.

McNAMARA, J. O. BYRNE, M. C., DASHEIFF, R. M., FITZ, J. G. The kindling model of epilepsy: a review. **Progress in Neurobiology, 15 (2):** 139-159, 1980.

MEHTA, A. K., TICKU, M. K. Comparison of anticonvulsant effect of Pentobarbital and Phenobarbital against seizures induced by maximal electroshock and picrotoxin in rats. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, **25 (5)**: 1059-1065, 1986.

MELO, M. M., OLIVEIRA, N. J. F., LAGO, L. A. Intoxications caused by pesticides in dogs and cats part II: Amitraz, Strichnine, Sodium Fluoroacetate and Fluoroacetamide, anticoagulant rodenticides and Avermectins. **Continuous Education Journal CRMV-SP**, **5**: 259-267, 2002.

MERRITT, H. H., PUTNAM, T. J. A new series of anticonvulsant drugs tested by experiment on animals. **Arch. Neurol. Psychiat.**, **39**: 1003-1015, 1938.

DUTRA-MORAES, M. F., GALVIS-ALONSO, O. Y. A., CAIRASCO, N. G. Audiogenic kindling in the wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. **Epilepsy Research**, **39**: 251-259, 2000.

MOREIRA, V. M., MAIA, J. G, DE SOUZA, J. M., BORTOLOTTI, Z. A., CAVALHEIRO, E. A. Characterization of convulsions induced by a hexanic extract of *Spilanthes acamella* var. oleracea in rats. **Brazilian J. Med. Biol. Research**, **22 (1)**: 65-67, 1989.

MORRISETT, R. A., JOPE, R. S., SNEAD, O. C 3rd. Effects of drugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administrations of pilocarpine to lithium-pretreated rats. **Exp. Neurol.**, **97 (1)**: 193-200, 1987.

MORS, W. Plantas icotóxicas: aspectos químicos. **Ciência e Cultura**, **32**: 42, 1978.

MOSCHE, S. L., STANTON, P., SPERBER, E. F. **Electrophysiology of epilepsy models, mechanisms and concepts**. Cambridge. **University Press**, 1993, 182 p.

MUDO, G., JIANG, X. H., TIMMUSK, T., BINDONI, M. BELLUARDO, N. Change in neurotrophins and their receptor mRNAs in the rat forebrain after status epilepticus induced by pilocarpine. **Epilepsia**, **37 (2)**: 198-207, 1996.

MUKAI, C., MIYAKOSHI, N., HANAOKA, M. First total synthesis of (-)-ichthyothereol and its acetate. **J. Org. Chem.**, **66 (17)**: 5875-5880, 2001.

NAIRISMAGI, J., GROHN, O. H., KETTUNEN, M. I., NISSINEN, J., KAUPPINEN, R, PITKANEN, A. Progression of brain damage after status epilepticus and it's association with epileptogenesis a quantitative MRI study on a rat model of temporal lobe epilepsy. **Epilepsy**, **45 (9)**: 1024-1034, 2004.

- GALLUCCI-NETO, J., MARCHETTI, R. L. Epidemiologic aspects and relevance of mental disorders associated with epilepsy. **Rev. Bras. Psiquiatr.**, **27 (4)**: 323-328, 2005.
- OBENAU, A., ESCLAPEZ, M., HOUSER, C. R. Loss of glutamate decarboxylase mRNA-containing neurons in the rat dentate gyrus following pilocarpine-induced seizures. **J. Neuroscience**, **13 (10)**: 4470-4485, 1993.
- OFFEN, M. L. Dealing with “defectives” Foster kannedy and William Lennox on eugenics. **Neurology**, **61 (5)**: 668-673, 2003.
- PAXINOS, G., WATSON, C. The rat brain in steriotaxic coordinates. San Diego. Califórnia. **Ed Elsevier**, 2005.
- PEARCE, J. M. Early accounts of epilepsy: a synopsis. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry**, **64 (5)**: 679-682, 1998.
- PINHEIRO, C. U. B. Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus stapf* ex. holm. RUTACEAE) no Maranhão Brasil. **Acta Botânica Basílica**, **16 (2)**: 141-150, 2002.
- PIRES, J. M. Plantas ictiotóxicas: Aspectos da botânica sistemática. **Ciência e Cultura**, **32**: 37-41, 1978.

PITKANEN, A., SUTULA, T. P. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. **Lancet. Neurol.**, **1 (3)**: 173-181, 2002.

PUTNAM, T. J., MERRITT, H. H. Experimental determination of the anticonvulsant properties of some phenyl derivatives. **Science**, **85 (2213)**: 525-526, 1937.

PURPURA, D. P., GONZALEZ-MONTEAGUDO, O. Acute effects of methoxypyridine on hippocampal and-blade neurons: An experimental study of "special pathoclisis" in the cerebral cortex. **J. Neuropathol. Exp. Neurol**, **19**: 421-432, 1960.

QUILLIAM, J. P., STABLES, R. The effect of cunaniol, a polyacetylenic alcohol isolated from the plant *Clibadium sylvestre*, on piscine behaviour. **Br. J. Pharmacol.**, **34 (3)**: 679, 1968.

QUILLIAM, J. P., STABLES, R. Convulsant effects of cunaniol, a polyacetylenic alcohol isolated from plant *Clibadium sylvestre*, on frogs and mice. **Research Pharmacol.**, **1**: 7-14, 1969a.

QUILLIAM, J. P., STABLES. R. Action of cunaniol in goldfish. **Br. J. Pharmacol.**, **35 (2)**: 382, 1969b.

QUINTANS, L. J. Jr, LIMA, J. T., ALMEIDA, J. R. G. S., BERDOR, C. N. G., JUNIOR, R. G. S. Modelos animais para avaliação de drogas anticonvulsivantes: uma revisão. **Revista Bras. Farm.**, **88 (4)**: 163-166, 2007.

RAZA, M., PAL, S., RAFIQ, A., DE LORENZO, R. J. Long-term alteration of calcium homeostatic mechanisms in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Brain Research**, **903 (1-2)**: 1-12, 2001.

RONDOUIN, G., LERNER, N. M., HASHIZUME, A. Wet dog shakes in limbic versus generalized seizures. **Exp. Neurol.**, **95 (2)**: 500-505, 1987.

RUNDFELDT, C., KOCK, R., RICHTER, A., MEVISSSEN, M., GERECKE, U., LÖSCHER, W. Dose-dependent anticonvulsant and proconvulsant effects of nitric oxide synthase inhibitors on seizure threshold in a cortical stimulation model in rats. **European Journal of Pharmacology**, **274 (1-3)**: 73-81, 1995.

RUTECKI, P. A., YANG, Y. Ictal epileptiform activity in the CA₃ region of hippocampal slices produced by pilocarpine. **J. Neurophysiol.**, **79 (6)**: 3019-3029, 1998.

SANDLER, R., SMITH, A. D. Coexistente of GABA and glutamate in mossy fiber terminals of the primate hippocampus: an ultrastructural study. **J. Comp. Neurol.**, **303 (2)**: 177-192, 1991.

- SANTO, J. L. E., MAINERI, N., PORTUGUESZ, M. W. Epilepsia e crises não-epilépticas. **J. Epilepsy Clin. Neurophysiol.**, **10**: 29-33, 2004.
- SCHMAND, B., JONKER, C., GEERLINGS, M. I., LINDEBOOM, J. Subjective memory complaints in the elderly: depressive symptoms and future dementia. **British Journal of Psychiatry**, **171**: 373-376, 1997.
- SEYFRIED, T. N. Genetic heterogeneity for the development of audiogenic seizures in mice. **Brain Research**, **271 (2)**: 325-329, 1983.
- SIVINE, F., PLUME, C., ANSAY, M. Picrotoxin, the antidote to ivermectin in dogs. **Vet. Record**, **116 (7)**: 195-196, 1985.
- SLOVITER, R. S., Decreased hippocampal inhibition and a selective loss of interneurons in experimental epilepsy. **Science**, **235 (4784)**: 73-76, 1987.
- SLOVITER, R. S., DICHTER, M. A., RACHINSKY, T. L., DEAN, E., GOODMAN, J. H. SOLLAS, A. L., MARTIN, D. L. Basal expression and induction of glutamate decarboxylase and GABA in excitatory granule cells of the rat and monkey hippocampal dentate gyrus. **J. Comp. Neurol.**, **373 (4)**: 593-618, 1996.
- SMITH, M., WILCOX, K. S., WHITE, H. S. Discovery of antiepileptic drugs. **Neurotherapeutics**, **4 (1)**: 12-17, 2007.

SORIANO, E., FROTSCHER, M. Mossy cells of the rat fascia dentata are glutamate-immunoreactive. **Hippocampus**, **4 (1)**: 65-69, 1994.

SPERBER, E. F., HASS, K. Z., STANTON, P. K., MOSHE, S. L. Resistance of the immature hippocampus to seizure-induced synaptic reorganization. **Development Brain Research**, **60 (1)**: 88-93, 1991.

SPINOSA, H. S., GORNIK, S. L., BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. São Paulo, **Guanabara**, Quarta edição. 2006, 646 p.

SPINOSA, H. S., GORNIK, S. L., PALERMO-NETO, J., BERNARDI, M. M., SPINOSA, F. R. Pro and anticonvulsant effects of xylazine on convulsion models in rodents. **Vet. Hum. Toxicol**, **36 (1)**: 12-14, 1994.

TANAKA, K., ODA, Y., FUNAO, T., TAKAHASHI, R., HAMAOKA, N. A., ASADA, A. Dexmedetomidine decreases the convulsive potency of bupivacaine and levobupivacaine in rat: involvement of alpha 2-adrenoceptor for controlling convulsions. **Anesth. Analg.**, **100 (3)**: 687-697, 2005.

TANG, F. R., LEE, W. L., YANG, J., SIM, M. K., LING, E. A. Expression of metabotropic glutamate receptor 1 α in the hippocampus of rat pilocarpine model of *status epilepticus*. **Epilepsy Research**, **46 (2)**: 179-189, 2001a.

TANG, F. R., LEE, W. L., YANG, J., SIM, M. K., LING, E. A. Metabotropic glutamate receptor 8 in the rat hippocampus after pilocarpine induced status epilepticus. **Neuroscience Letters**, **300 (3)**: 137-140, 2001b.

TURSKI, W. A., CAVALHEIRO, E. A., BORTOLOTTA, Z. A., MELLO, L. M., SCHWARZ, M., TURSKI, L. Seizures produced by pilocarpine in mice: A behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Research**, **321**: 237-253, 1984.

TURSKI, W. A., CAVALHEIRO, E. A., CALDERAZZO, F. L. S., KLEINROK, Z., CZUCZWAR, S. J., TURSKI, L. Injections of picrotoxin and bicuculline into the amygdaloid complex of the rat: a electroencephalographic behavioural and morphological analysis. **Neuroscience**, **14 (1)**: 37-50, 1985.

TURSKI, L., CAVALHEIRO, E. A., CZUCZWAR, S. J., TURSKI, W. A., KLEINROK, Z. The seizures induced by pilocarpine: Behavioral, eletroencephalographic and neuropathological studies in rodents. **Pol. J. Pharm.**, **42 (5)**: 545-555, 1987a

TURSKI, W. A., CAVALHEIRO, E. A., COIMBRA, C., DA PENHA, B. M., IKONOMIDOU-TURSKI, C. TURSKI, L. Only certain antiepileptic drugs prevent seizures induced by pilocarpine. **Brain Res.**, **434 (3)**: 281-305, 1987b.

TURSKI, L., IKONOMIDOU, C., TURSKI, A. W., BORTOLOTTA, Z. A., CAVALHEIRO, E. A. Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures

induced by pilocarpine: a novel experimental modelo of intractable epilepsy. **Synapse, 3 (2):** 154-171, 1989.

WASTERLAIN, C. G., CHEN, J. W. Mecanistic and pharmacologic aspects of status epilepticus and its treatment with new antiepileptic drug. **Epilepsia, 49 (9):** 63-73, 2008.

VILLAMÉA, L., PINTO, M. G. Índio quer patente. **Isto É, 1581:** 53-56, 2000.

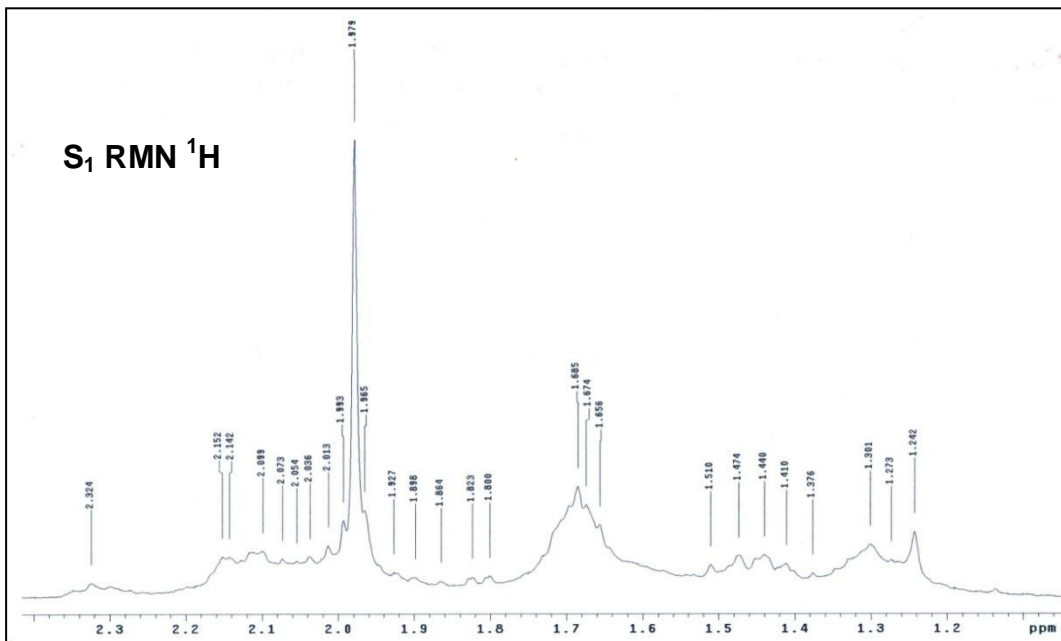
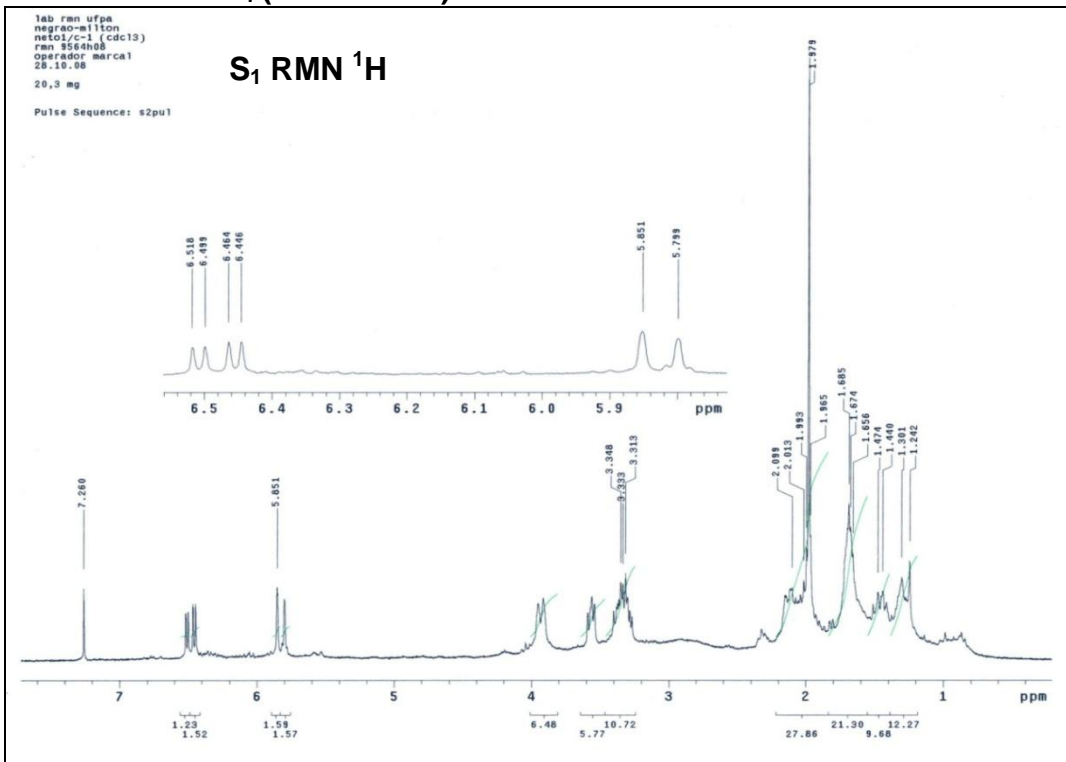
ZIVANOVIC, D., STANOJLOVIC, O., MIKROVIC, S., SUSIC, V. Ontogenetic study of metaphit-induced audiogenic seizures in rats. **Development Brain Reseach, 155 (1):** 42-48, 2005.

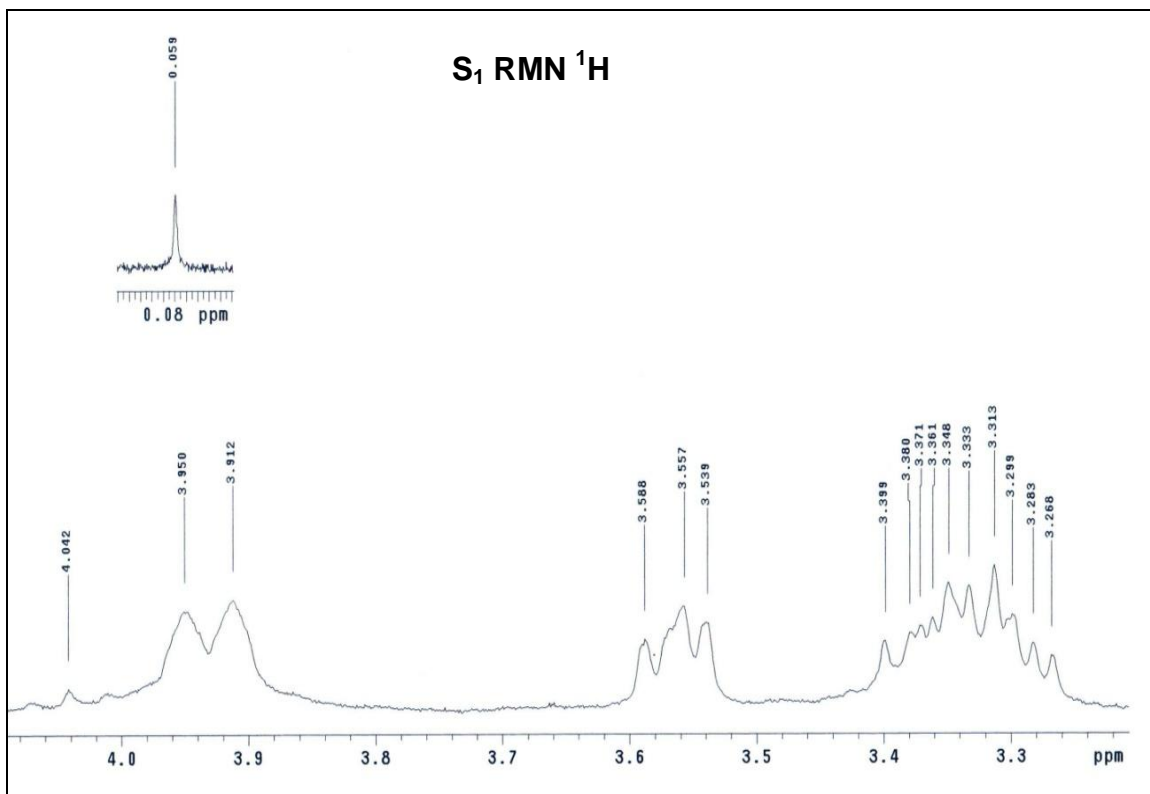
ZIA, A., SIDDIQUI, B. S., BEGUM, S., SURIA, A. Studies on the constituents of the leaves of Neurium oleander on behavior pattern in mice. **Journal of Ethnopharmacology, 49 (1):** 33-39, 1995.

YACUBIAN, E. M. T. **Tratamento medicamentoso das epilepsias.** São Paulo, **Lemos,** 1999, 254 p.

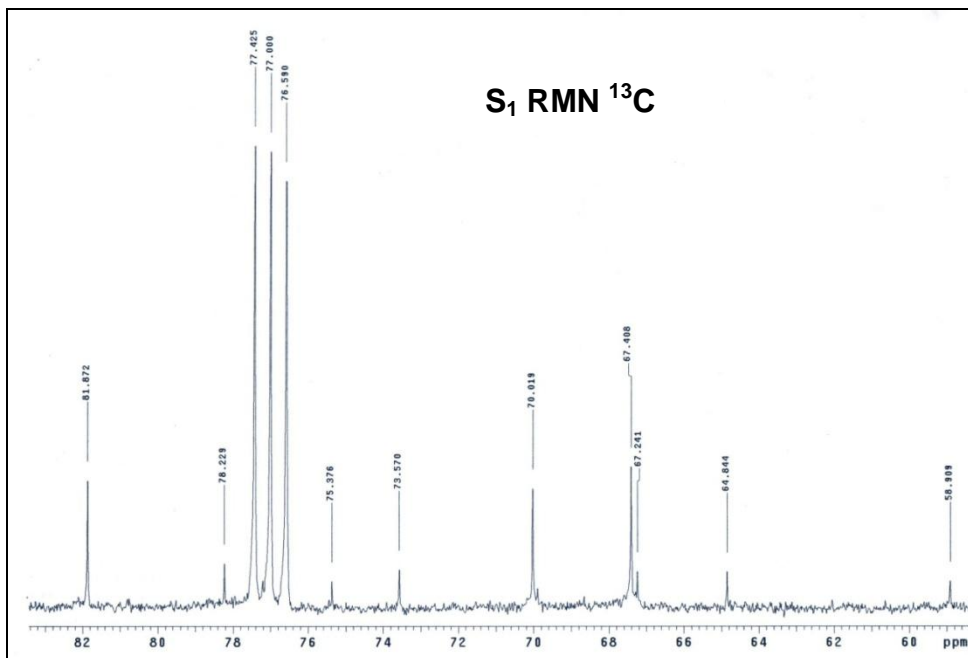
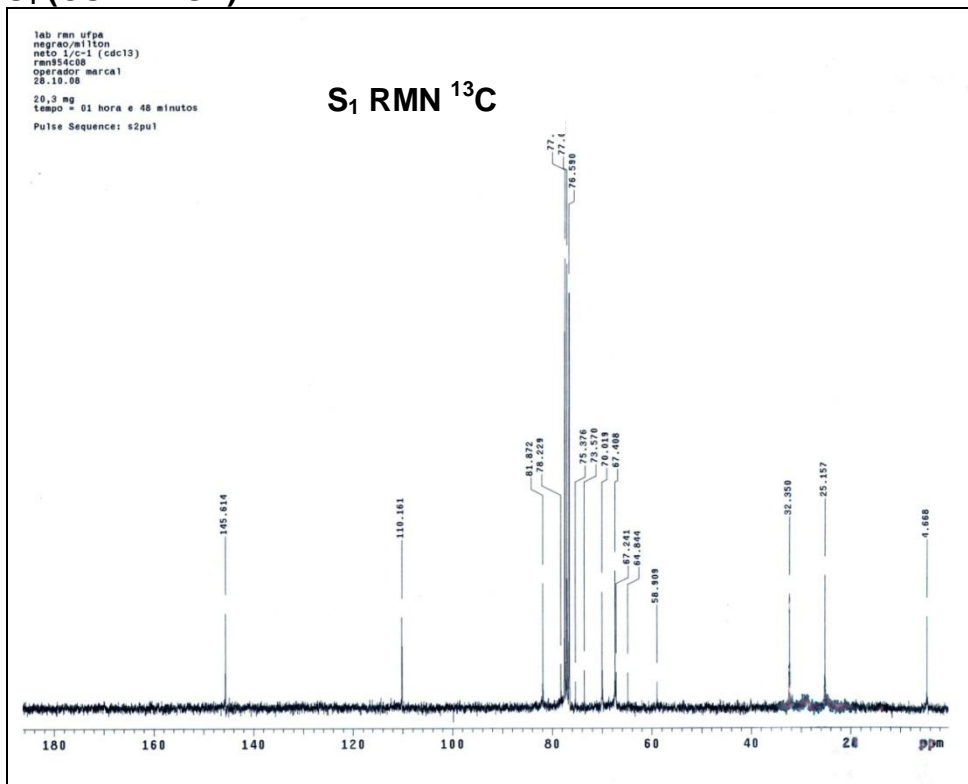
ANEXOS

ANEXO 1. ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H PARA A SUBSTÂNCIA S_1 (CUNANIOL).

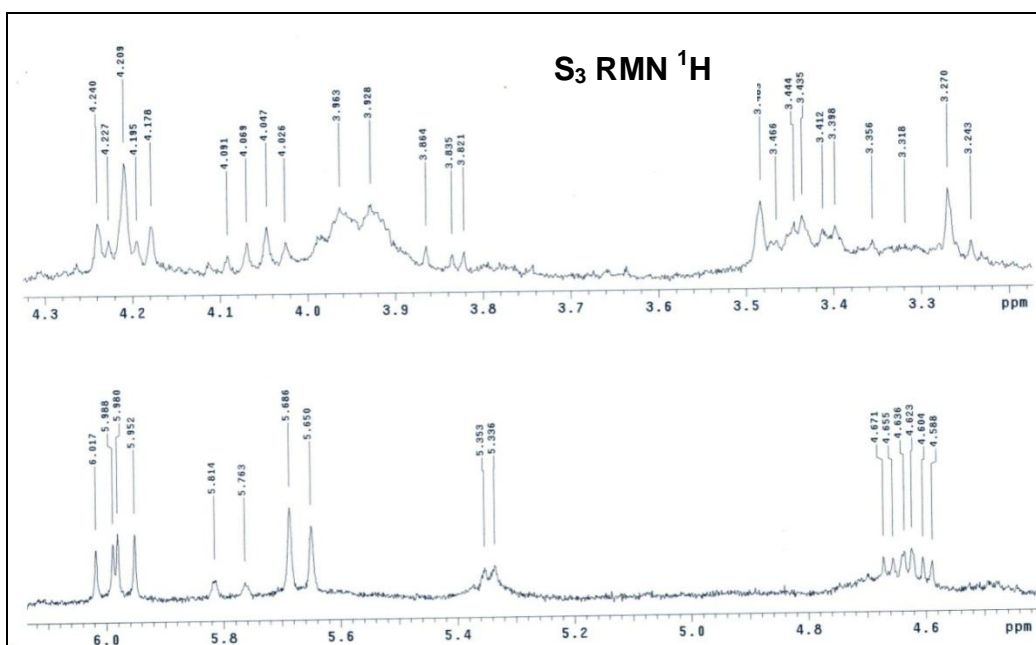
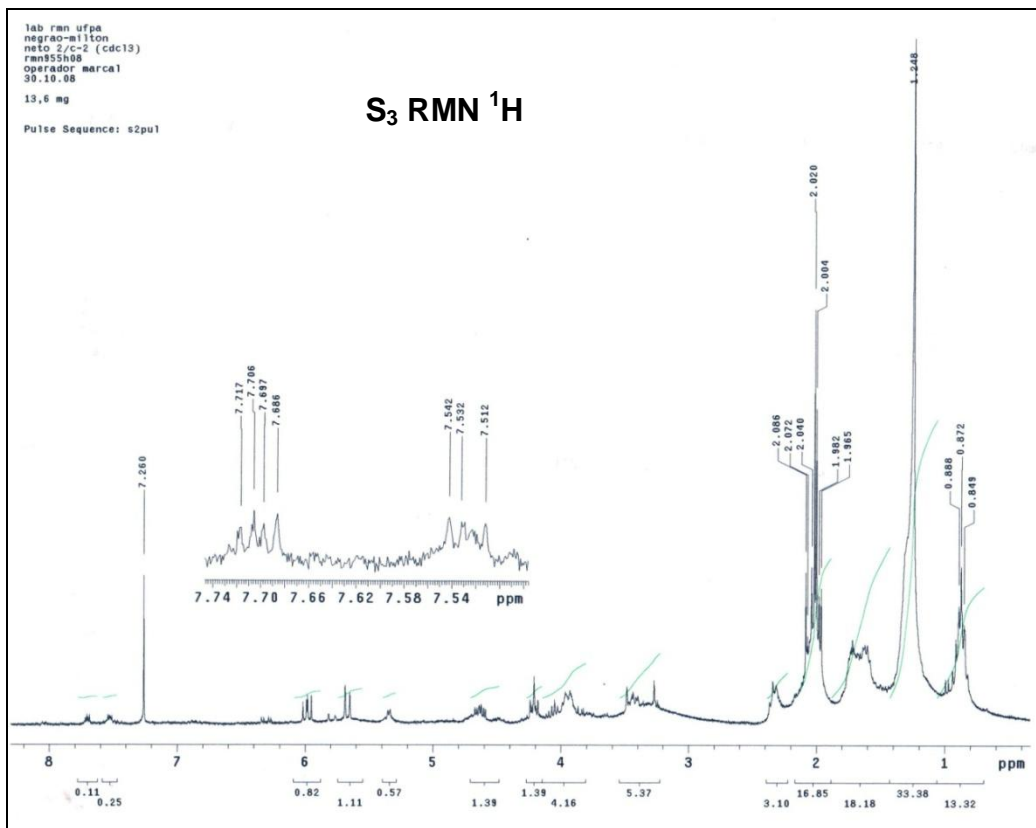


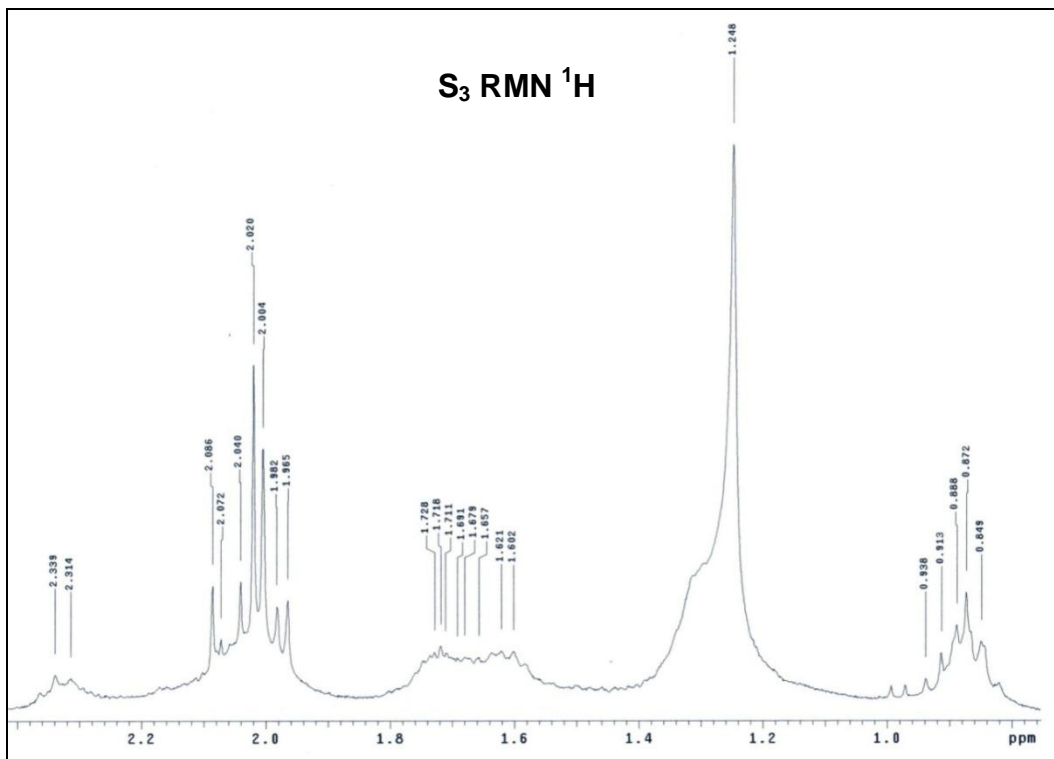


ANEXO 2. ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C PARA S_1 (CUNANIOL)



ANEXO 3. ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^1H PARA A SUBSTÂNCIA S_3 (ACETATO DE CUNANIOL)





ANEXO 4. ESPECTROS DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR ^{13}C PARA SUBSTÂNCIA S_3 (ACETATO DE CUNANIOL)

