



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E
CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO**

ALUIZIO ROBERTO DA SILVA

**ESTUDO COMPORTAMENTAL E ELETROGRÁFICO DO EXTRATO AQUOSO DA
PLANTA *INDIGOFERA SUFFRUTICOSA* E DE UM COMPONENTE ESPECÍFICO
(ÍNDIGO) NO MODELO DE PILOCARPINA EM RATOS**

**RECIFE
2014**

ALUIZIO ROBERTO DA SILVA

**ESTUDO COMPORTAMENTAL E ELETROGRÁFICO DO EXTRATO AQUOSO DA
PLANTA *INDIGOFERA SUFFRUTICOSA* E DE UM COMPONENTE ESPECÍFICO
(ÍNDIGO) NO MODELO DE PILOCARPINA EM RATOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Neuropsiquiatria e ciências do Comportamento do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título em Mestre em Neuropsiquiatria.

Área de Concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Cairrão

Araújo Rodrigues

Coorientadora: Prof^a Dr^a Belmira Lara da
Silveira Andrade de Costa

**RECIFE
2014**

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586e Silva, Aluizio Roberto da.
Estudo comportamental e eletrográfico do extrato aquoso da planta *Indigofera Suffruticosa* e de um componente específico (índigo) no modelo de Pilocarpina em ratos / Aluizio Roberto da Silva. – 2014.
63 f. : il. ; 30 cm.

Orientador : Prof. Dr. Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, Recife, 2014.
Inclui Referências e apêndices.

1. Anticonvulsivante. 2. Ansiolítico. 3. Sistema nervoso central. 4. Ratos. 5. Albinos Wistar. I. Rodrigues, Marcelo Cairrão Araújo (Orientador). II. Título.

612.665 CDD (22. ed.)

UFPE (CCS2017-253)

ALUIZIO ROBERTO DA SILVA

**ESTUDO COMPORTAMENTAL E ELETROGRÁFICO DO EXTRATO AQUOSO DA
PLANTA *INDIGOFERA SUFFRUTICOSA* E DE UM COMPONENTE ESPECÍFICO
(ÍNDIGO) NO MODELO DE PILOCARPINA EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Neurociências.

Aprovada em: 14 / 03 / 2014.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Cairrão Araújo Rodrigues (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Ângela Amâncio dos Santos (Presidente-Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Jemisson Raphael Cardoso Vieira (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Filipe Silveira Duarte (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

À minha esposa Beth,

Responsável pela infraestrutura de minha casa...

Pela assistência constante me propiciando tempo suficiente para meus estudos e pesquisas...

Pelo carinho, dedicação e amor com que me tem tratado por todo o tempo de meus estudos

Em todos os meus dias, horas e segundos....

A minha essência... "o meu eu"...

A minha vida!

Um grande presente que Deus me deu no momento certo!

Aos meus ex-patrões Arthur Lobato e Maria Clara

Dois anjos que um dia estiveram na Terra...

Emprestaram-me suas luzes, mostraram-me o caminho do conhecimento e propiciaram-me um esplêndido futuro.

"IN MEMORIAM"

AGRADECIMENTOS

Ao meu ex-patrão, in-memoriam, Prof Dr José Filipe Ludolf de Melo, que na minha adolescência influenciou em minha educação auxiliando-me no encontro do prazer de aprender.

Aos meus ex-patrões, in-memoriam, Sr Arthur Lobato de Magalhães e Dona Maria Clara Rezende de Magalhães, a quem devo meus progressos no mundo dos conhecimentos. Foram eles que incentivaram àquele simples empregado doméstico de apenas 12 anos de idade, mostrando que o conhecimento adquirido torna-se uma moeda cujo valor é visto na pessoa de quem o adquiriu. O que penetra em nossa mente, a modifica-a, valoriza-a e torna-nos um pouquinho melhor. Acreditei neles, aqui cheguei e progredirei ainda muito mais.

Ao meu filho Kedny Márcel da Silva e Silva, pela sua presença em minha vida, ouvindo-me com paciência, trocando informações e muitas vezes auxiliando-me a encontrar soluções para problemas que muitas vezes eram divergentes de sua área de formação. Nas tristezas diante dos insucessos e nas alegrias diante dos sucessos, pude ter meu filho sempre ao meu lado. Obrigado!

Aos meus pais Geraldo Moisés e Maria das Dores(in-memoriam), esses que são a razão de meu viver, são as bases de minha existência.

Ao Prof Marcelo Cairrão pela sua valiosa orientação com que incutiu em mim a vontade de pesquisar mais e mais e adquirir um saber científico.

À Prof Belmira Lara de quem me mantive próximo assimilando dela as orientações de que muitas vezes me vali para sedimentar meus conhecimentos nos protocolos laboratoriais.

À amiga Mestra Thais Malheiros Chaves cuja seriedade, inteligência, firmeza de decisões, correção de atitudes durante o vasto período que, juntos, trabalhamos em experimentos com camundongos, levou-me ao espírito de busca incessante de uma verdade objetiva naqueles experimentos o que forneceu-me uma vontade grande de descobrir meios para auxiliar a humanidade.

Ao Exército a quem devo a infraestrutura de meus estudos. Na reserva remunerada, aposentadoria militar, pude utilizar tempo e recursos para o meu desenvolvimento científico.

Ao Professor Dr Jeymesson, que gentilmente cedeu-me não só orientações como também o extrato deste fitoterápico auxiliando-me sobremaneira na execução de meus trabalhos.

À amiga Alinny, por suas verdadeiras aulas e orientações bem como seu trabalho nas perfusões durante o tempo de minhas aulas teóricas em que eu não dispunha de tempo suficiente para execução paralela da parte prática de meus trabalhos laboratoriais.

Agradeço a todos os integrantes do Grupo de Neurodinâmica e Neuroquímica do Setor de Neurofisiologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial à IC Camila Fagundes, que ajudou grandemente na realização deste trabalho. Agradeço aos colegas Eraldo, Riciele, Igor, Renata e Dra Catarina Pimerntel-PhD, sempre presentes com suas sinceras observações que muito me auxiliaram nos meus trabalhos. Agradeço ao prof. Rubem Guedes (Depto. de Nutrição), pelo apoio constante nas discussões, pela ajuda com material de consumo (fio de aço para o quimetrodo) e por permitir o uso do criostato. Agradeço ao apoio técnico de SC Nielson (DFF) e de Dra Cássia do NIT2, da Fiocruz Ageu Magalhães, pelo uso do criostato. Agradeço ao Prof. Norberto Garcia-Cairasco (FMRP-USP), pelo fornecimento de fio de aço para a confecção de quimetrodos. Agradeço à FACEPE e à Pró-Reitoria de Pesquisa da UFPE, por fornecimento de parte do material permanente do projeto. Agradeço ao apoio do Professor Dr Claudio do Departamento de Biofísica e Radiobiologia pelo uso do Osmômetro e suas meticolosas orientações para o uso do mesmo. Agradeço em especial, aos Prof Dr Marcelo Cairrão-PhD, meu orientador, quem designo de “SOL” e à Profa Belmira Lara, a quem designo “LUA” pela sua presença constante ao meu lado fornecendo suas luses, transferindo a mim seus conhecimentos proporcionando acréscimos em meu conhecimento científico, através de verdadeiras aulas particulares”, uma vez que suas luzes sempre clarearam meus caminhos durante estes quase 4 anos de trabalho.

Quem pensa em fracassar, já fracassou mesmo antes de tentar.

Somos o que pensamos e acreditamos ser.
Nossa mente acredita e cumpre.

Autor desconhecido

Nós crescemos...

Quando não perdemos a esperança, nem
diminuímos a vontade, nem perdemos a fé.

Quando aceitamos a realidade e temos
orgulho de vivê-la.

Quando aceitamos nosso destino, mas temos
garra para mudá-lo.

Quando aceitamos o que deixamos para trás,
construindo o que temos pela frente e
planejando o que está por vir.

Cresce-se quando se supera, se valoriza e se
sabe dar frutos.
Cresce-se quando se abre caminho, assimila-
se experiências, e semeia-se raízes....

Cresce-se quando se impõe metas, sem se
importar com comentários, nem julgamentos,
quando se dá exemplos, sem se importar com o
desdém, quando se cumpre com o trabalho..

Suzana Cariza

RESUMO

O objetivo deste trabalho é avaliar a ação anticonvulsivante do extrato aquoso das folhas de *I. suffruticosa* e *índigo*. Tal avaliação ocorrerá por parâmetros comportamentais e análise eletrográfica, de acordo com o modelo experimental de crises convulsivas induzidas por microinjeção intra-hipocampal de pilocarpina em ratos. A *Indigofera suffruticosa* Mill, conhecida popularmente por anil do campo, é utilizada na medicina tradicional como agente antiespasmódico, sedativo, diurético e anti-inflamatório. Há relatos científicos sobre o efeito anticonvulsivante desta planta sobre animais de crises convulsivas, mas sem confirmação do efeito anticonvulsivante deste extrato sobre registros da atividade elétrica cerebral (potencial de campo local, “*local field potential*” LFP). Isso porque um roedor sob efeito de droga convulsivante pode estar com intensa atividade paroxística no LFP sem nenhum correspondente motor. A hipótese é a de que o extrato aquoso das folhas de *I. suffruticosa* e o sulfato de índigo, alcaloide bis-indólico possuem efeitos anticonvulsivantes comportamentais e eletrográficos. Utilizou-se ratos wistar albinos (n=25) que receberam implante cirúrgico para posicionamento de quimetrodo no hipocampo, possibilitando a administração intra-hipocampal de drogas e o registro simultâneo do LFP hipocampal. Após período de recuperação, os ratos do grupo controle (GC, n=9) receberam microinjeção de 1,5 µL de veículo (solução salina 0,9%, velocidade de injeção 0,5 µL/min) e, 30 minutos depois, uma microinjeção do convulsivante pilocarpina (PILO, 24 mg /10 µL de veículo, mesma velocidade). O grupo experimental (extrato, n=9) recebeu também duas microinjeções, a primeira com extrato aquoso e a segunda, 60 minutos depois, com PILO. O grupo experimental com sulfato de índigo (n=3) recebeu solução 55,5 mg/500 µL (300 mOsmol/L, isosmótica) deste composto em veículo seguido, 60 minutos depois, por PILO e foi comparado com um grupo controle (n=3) oriundos do grupo controle já constituído. A avaliação comportamental das crises foi realizada segundo Escala de reatividade convulsiva de Racine (1972), modificada por Pinel e Rovner (1978), assumindo que um rato havia entrado em *status epilepticus* (SE) caso este apresentasse crises convulsivas contínuas sem intervalo entre elas ou uma apenas, por mais de 30 minutos. Quantificou-se também o número de sacudidas de corpo (WDS), comportamento que surge associado às crises convulsivas e demonstra acometimento do sistema nervoso. Na avaliação da crise eletrográfica, quantificou-se as espículas nos registros de LFP utilizando o programa

MatLab e algoritmos confeccionados no laboratório, que diferenciam espículas de baixa ($<40\mu\text{V}$), média (entre $40\mu\text{V}$ e $60\mu\text{V}$) e grande amplitude ($>60\mu\text{V}$). Para análise estatística, onde não houver outra indicação, utilizou-se teste T de Student bicaudal, e foram consideradas como significantes as diferenças com probabilidade $p < 0,05$. Verificou-se que o extrato aquoso da planta *Indigofera suffruticosa* possui efeito anticonvulsivante quanto aos parâmetros comportamental e eletrográfico; Os efeitos provavelmente não são secundários à uma grande concentração de compostos, ou a hiperosmolaridade. Uma possível molécula candidata a este efeito é o sulfato de índigo em concentração isotônica (300 mOsmol/L), já que apresentou também efeito semelhante. Novos experimentos são necessários para se conhecer o mecanismo de ação do sulfato de índigo e se não há outros componentes no extrato que possuam também efeito anticonvulsivante.

Palavras-Chave: Anticonvulsivante. Ansiolítico. Sistema Nervoso Central. Ratos. Albinos Wistar.

ABSTRACT

The objective of this work is to evaluate the anticonvulsive action of the aqueous extract of the leaves of *I. suffruticosa* and indigo. Such evaluation will be by behavioral parameters and electrographic analysis, according to the experimental model of convulsive crises induced by intra-hippocampal microinjection of pilocarpine in rats. *Indigofera suffruticosa* Mill, popularly known as “anil de campo”, is used in traditional medicine as an antispasmodic, sedative, diuretic and anti-inflammatory agent. There are researches about anticonvulsive effect of this plant on animals of seizures, but without confirmation of the anticonvulsant effect of this extract on records of local field potential (LFP). This is because a rodent under a convulsive drug effect may have intense paroxysmal activity in the LFP without any corresponding motor. The hypothesis is that aqueous extract of the leaves of *I. suffruticosa* and the indigo, bis-indol alkaloid sulfate have anticonvulsive behavioral and electrographic effects. Albino wistar rats ($n = 25$) were given surgical implantation for positioning of quimetodo in the hippocampus, allowing intra-hippocampal administration of drugs and simultaneous recording of hippocampal LFP. After the recovery period, the rats in the control group (GC, $n = 9$) received microinjection of 1.5 μL vehicle (0.9% saline solution, 0.5 μL / min injection rate) and, 30 minutes later, A microinjection of the convulsive pilocarpine (PILO, 24 mg / 10 μL vehicle, same speed). The experimental group (extract, $n = 9$) also received two microinjections, the first with aqueous extract and the second, 60 minutes later, with PILO. The experimental group with indigo sulfate ($n = 3$) received 55.5 mg / 500 μL (300 mOsmol / L, isosmotic) solution of this compound in vehicle followed 60 minutes later by PILO and was compared with a control group ($n = 3$) from the control group already constituted. The behavioral evaluation of seizures was performed according to Racine's (1972) Scale of Convulsive Reactivity, modified by Pinel and Rovner (1978), assuming that a rat had entered status epilepticus (SE) if it had continuous seizures with no interval between them or just one, for more than 30 minutes. The number of body flutters (WDS) was also quantified a behavior that is associated with convulsive seizures and shows involvement of the nervous system. In the evaluation of the electrographic crisis, the spicules were quantified in the LFP records using the MatLab program and algorithms made in the laboratory, which differentiate spicules of low ($<40\mu\text{V}$), medium (between

40 μ V and 60 μ V) and large amplitude (> 60 μ V). For statistical analysis, where no other indication was used, two-tailed Student's t-test was used, and the differences with probability $p < 0.05$ were considered as significant. It was verified that the aqueous extract of the plant *Indigofera suffruticosa* has anticonvulsive effect on the behavioral and electrographic parameters; the effects are probably not secondary to a high concentration of compounds, or hyperosmolarity. A possible candidate molecule for this effect is the indigo sulfate in isotonic concentration (300 mOsmol / L), since it also showed a similar effect. New experiments are needed to know the mechanism of action of the indigo sulfate and if there are no other components in the extract that also have anticonvulsive effect.

Keywords: Anticonvulsant. Intrahippocampal. Pilocarpine. Central Nervous System. Rats.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Principais elementos da neurotransmissão glutamatérgica.....	20
FIGURA 2 - <i>Indigofera suffruticosa</i>	22
FIGURA 3 - Quimetrodo confeccionado no laboratório contendo dois fios.....	28
FIGURA 4 - Local de posicionamento do quimetrodo no implante.....	29
FIGURA 5 - Sistema de Vídeo EEG	32
FIGURA 6 - Posicionamento histológico dos quimetrodos no hipocampo.....	38
FIGURA 7 - Número de WDS observados nos ratos do grupo controle ($48,73 \pm 12,42$) e experimental (extrato + PILO) ($6,667 \pm 4,494$). **: $p < 0,01$, teste “t” de Student. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão.....	39
FIGURA 8 - Latência para primeira crise observada nos ratos do grupo controle ($10,27 \pm 1,96$) e experimental (extrato + PILO) ($6,33 \pm 2,0$): $p > 0,05$, teste “t” de Student. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão.....	39
FIGURA 9 - Quantidade de picos menores que $40\mu V$. Controle (Ctl (salina + PILO): e Experimentais (extrato + PILO) Expl). Não houve diferença significativa entre os dois grupos.....	40
FIGURA 10 - Quantidade de picos acima de $40\mu V$ e menores que $60\mu V$	40
FIGURA 11 - Quantidade de espículas acima de $60\mu V$	41
FIGURA 12 - Quantidade de crises apresentadas pelos grupos controle (salina + PILO) ($195,7 \pm 117,3$) e experimental (Síndigo + PILO) ($89,33 \pm 89,33$);: $p > 0,05$	42
FIGURA 13 - Quantidade de WDS, apresentados pelos grupos Controle (salina + PILO) $49,67 \pm 20,30$ e Experimentais (sindigo + PILO) $8,333 \pm 4,631$ $p = 0,059$, não significativa.....	42
FIGURA – 14 Quantidade de espículas menores que $40\mu V$. Controle (salina + PILO) (54415 ± 21118) e Experimental (Síndigo + PILO) (15529 ± 1190).....	43
FIGURA 15 - FIGURA 15 - Quantidade de picos acima de $40\mu V$ e menores que $60\mu V$. Controle (salina + PILO): 4631 ± 2440 e Experimentais (síndigo + PILO): $629,3 \pm 297,0$. *: $p < 0,05$, teste “t” de Student.....	43
FIGURA 16 - Quantidade de picos acima de $60\mu V$	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
i.p.	Intraperitoneal
DL	Dose Letal
DZP	Diazepan
EM	Extrato Metanólico
EA	Extrato aquoso
EPM	Erro Padrão de Média
GABA	Ácido gama-aminoburítico
SE	Status Epilepticus
LFP	Potencial de Campo Local
EEG	Eletro Encefalograma
PILO	Pilocarpina
PGE	Epilepsia Primária Generalizada
CRE	Crise Recorrente Expontânea
ELT	Eplepsia do Lobo Temporal
FLC	FluorJade C
GD	Giro denteado
CA	Corno de Amon
WDS	Wet Dog Shak (Chacoalhar di Cachorro Molhado)
SI	Sulfato de Indigo
PIC	Picrotoxina
PTZ	Pentilenotetrazol
PDC	Coerência Parcial Direcionada
OMS	Organização Mundial de Saúde
PFA	Paraformol aldeído

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	MARCO TEÓRICO.....	18
2.1	Registro elétrico do Encéfalo e Modelos experimentais de Epilepsia.....	18
2.2	Fitoterapicos e <i>Indigofera suffruticosa</i>	21
3	OBJETIVOS	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1	Animais	25
4.2	Drogas	25
4.3	Cirurgia estereotáxica para implante do quimetrodo	27
4.4	Microinjeções e registro do Potencial de Campo Local	30
4.5	Avaliação comportamental e vídeo EEG	31
4.6	Perfusão dos animais	32
4.7	Pós-fixação e congelamento dos cérebros.....	33
4.8	Corte dos cérebros.....	33
4.9	Programas de informática utilizados	33
4.9.1	Estatística.....	33
4.9.2	Registros de potencial de campo local.....	34
4.9.3	Análise de registros e contagem de picos.....	34
4.9.4	Captura de vídeo.....	34
4.10	Material vegetal	34
4.10.1	Obtenção.....	34
4.10.2	Preparação do extrato.....	34
4.10.3	Investigação quantitativa dos derivados indigóides em folhas de <i>I. suffruticosa</i>	34
4.10.4	Extração metanólica.....	35
4.10.5	Obtenção do extrato aquoso de folhas de <i>I. suffruticosa</i>.....	35
4.11	Experimento com sulfato de índigo	36
5	RESULTADOS	37
5.1	Análise comportamental.....	37
5.2	Análise eletrográfica – efeito do extrato.....	40
5.3	Experimentos com sulfato de índigo.....	41
6	DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS	45

6.1	Discussão.....	45
7	CONCLUSÕES.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50
	APÊNDICE A - OUTROS COMPORTAMENTOS EXIBIDOS PELOS RATOS DO GRUPO CONTROLE (VEÍCULO + PILO) E GRUPO (EXTRATO + PILO).....	57
	APÊNDICE B - ANÁLISES COMPLEMENTARES DEMONSTRANDO QUE O EFEITO ANTICONVULSIVANTE DO EXTRATO DE <i>I. SUFFRUTICOSA</i> NÃO SE DEVE A UM EFEITO DE PEROSMOLARIDADE.....	60

1 INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Indigofera* são conhecidas por produzir um pigmento denominado índigo, considerado a mais importante tintura azul para humanidade desde a pré-história (SIMON *et al.*, 1984; LESTARI, 1998; CLARK *et al.* 1993) e período medieval (CLARK *et al.*, 1993; FERREIRA *et al.*, 2004), chegando a ter um preço semelhante ao do valioso cravo da Índia (22 dolares/kg) (ALLEN *et al.*, 1981; RODRÍGUES-KÁBANA., *et al.*, 1988). Com a colonização, as Américas passaram a ser grandes fornecedoras do pigmento.

A indústria usou o índigo até o início do século XX quando a produção sintética de anilina substituiu o pigmento natural. Ainda hoje, há comunidades do interior do Brasil que fabricam e utilizam o pigmento azul da indigófera para colorir roupas de lã e algodão (AYLWARD *et al.*, 1987). O principal uso comercial atual da *Indigofera* sp. é na adubação verde e cobertura de solo (AYLWARD *et al.*, 1987). Como forragem, é bem aceita pelos animais após a fenação (ALLEN *et al.*, 1981). Experimentos cromatográficos realizados com a *I. suffruticosa* demonstraram que os dois principais componentes do extrato aquoso são o índigo (pigmento azul) e a indirrubina (pigmento vermelho) (VIEIRA, 2007). Desde a década de 1970, surgiram artigos científicos demonstrando que o extrato aquoso da folha de *I. suffruticosa* possui efeito anticonvulsivante em modelos animais de indução a convulsões tônico-clônicas quando aplicadas perifericamente (ROIG e MESA, 1974).

Os medicamentos tradicionais utilizados na clínica para o controle de crises convulsivas, não conseguem tratar efetivamente todo o contingente de pacientes acometidos, o que estimula a busca por novos compostos (LÖSCHER, 1998). Apesar da farmacopéia de produtos naturais do Brasil ser imensa e dever ser explorada de forma racional e sustentável, tal só ocorre quando há pesquisas científicas associadas.

Aluizio Roberto da Silva, observou que o extrato aquoso de *I. suffruticosa* possui efeito anticonvulsivante após pre-tratamto utilizando injeção periférica (i.p) nas doses de 100, 300 e 500 mg/kg, em camundongos induzidos à convulsão tônico-clônica com pilocarpina e pentilenotetrazol (SILVA, 2011). No entanto, até o presente momento, não há relatos na literatura de que a redução das crises convulsivas pelo extrato aquoso de *I. suffruticosa* controle também crises eletrográficas (eventos paroxísticos de crise na atividade elétrica cerebral), muito menos qual componente químico deste extrato

seria um possível candidato a este efeito. Desta forma, esta dissertação visa estudar se o extrato aquoso desta planta possui também efeito anticonvulsivante sobre crises eletrográficas, bem como buscar uma molécula candidata ao efeito.

A hipótese de nosso trabalho é que o extrato aquoso de *I. suffruticosa* terá efeitos anticonvulsivantes quanto a análises de parâmetros comportamental e eletrográfico sobre crises convulsivas induzidas por pilocarpina em ratos. Acreditamos também que um possível candidato a este efeito é o índigo, já que este é um composto majoritário no extrato (VIEIRA, 2007).

2 MARCO TEÓRICO

2.1 Registro Elétrico do Encéfalo e Modelos Experimentais de Epilepsia

O registro elétrico do encéfalo recebeu grande atenção após os trabalhos pioneiros de Hans Berger e descrição do eletroencefalograma (EEG) (HANS BERGER, 1929). No entanto, registros profundos da atividade elétrica extracelular, chamado potencial de campo local (LFP, do inglês *local field potential*) são muito importantes para a determinação do envolvimento de núcleos específicos em fenômenos fisiológicos ou patológicos do sistema nervoso, como por exemplo na epilepsia (Florins E, *et al.*, 2013).

Epilepsia é um conjunto de alterações no sistema nervoso central caracterizada por acometimentos comportamentais e/ou eletrográficos espontâneos e recorrentes (ENGEL, 1995; LOTHMAN *et al.*, 1990). Os eventos comportamentais durante um ataque epiléptico são denominados crises convulsivas, que podem ser tônicas (contração muscular tetânica), clônicas (apenas abalos musculares) ou tônico-clônicas (ENGEL, 1995; MCNAMARA, 1994; GARCIA-CAIRASCO, 2002). No entanto, há também crises epiléticas não-convulsivas, como exemplo as crises de ausência, em que o acometido não esboça nenhum componente motor mas apenas eletrográfico, caracterizado por descargas elétricas anormais detectadas por eletroencefalografia (EEG) (SNEAD, 1991; CONTRERAS, 1995). A epilepsia é um distúrbio relativamente comum com prevalência em torno de 1% na população em geral (PAGLIOLI, *et al.*, 2004).

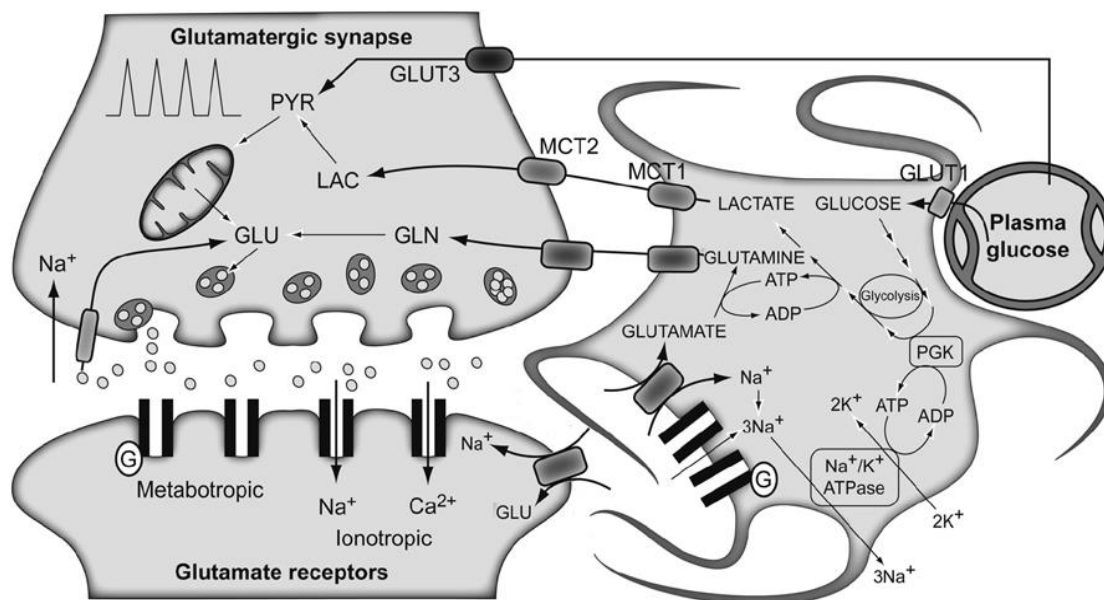
Dos pacientes epiléticos, 20 e 30% não conseguem obter controle adequado das crises convulsivas com os tratamentos convencionais ou apresentam efeitos colaterais significativos (LOSCHER, 1998; QUINTAS-JUNIOR *et al.*, 2002). Portanto, a elevada toxicidade bem como os efeitos colaterais das drogas antiepiléticas tem motivado a contínua busca de alternativas medicamentosas mais atraentes (PAGLIOLI *et al.*, 2004). Mas esta busca passa obrigatoriamente por testes de eficácia, que ocorrem inicialmente em animais de experimentação. Os modelos experimentais de epilepsia são os baseados principalmente no tipo de crise induzida (se convulsiva tônica, clônica, mioclônica ou não-convulsiva), na duração da indução (se aguda ou crônica, tipo abrasamento) e no substrato neural envolvido (se crise de tronco encefálico ou crise límbica), se induzidos por estimulação sensorial (como som ou luz)

ou química (ácido caínico, bicuculina, pilocarpina entre outros) (CROSS, CAVAZOS, 2009; PRICHARD *et al.* 1969; MASON, COOPER, 1972; GARCIA-CAIRASCO, 2002; RACINE, 1972; PINEL E ROVNER, 1978). Os modelos agudos geralmente envolvem a indução do estado de mal epiléptico (ou *status epilepticus*, SE), caracterizado pela presença de crise constante entre 5 a 30 min (CAVALHEIRO, TURSKI, 1983). Um modelo agudo de indução de SE utiliza injeções de pilocarpina (PILO), modelo este que é homólogo ao tipo mais comum de epilepsia humana, a epilepsia do lobo temporal (ELT), que é extremamente refratária ao tratamento farmacológico. A PILO é um agonista colinérgico que induz SE agudo se administrada periféricamente e, depois de um período silencioso, faz surgir crises espontâneas e recorrentes (CAVALHEIRO, TURSKI, 1983). No entanto, a microinjeção intrahipocampal de PILO reproduz os principais efeitos da injeção sistêmica, incluindo o SE e a morte neuronal associada, mas com a vantagem de reduzir grandemente a morte dos animais (CASTRO, FURTADO, GARCIA-CAIRASCO, 2012, 2002).

Diversos sistemas de neurotransmissão estão envolvidos nos modelos experimentais de indução de crises convulsivas. O glutamato é um aminoácido e principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso. Sua liberação na fenda sináptica e ligação com seus receptores em geral causa despolarização da célula pós-sináptica. Os principais tipos de receptores glutamatérgicos são os ionotrópicos (associados a canais iônicos, como o receptor N-metil-D-aspartato- NMDA- e o AMPA/KAINATO) e os metabotrópicos (associados a proteínas G e que desencadeiam alterações de segundos mensageiros celulares) (PROPER *et al.*, 2002; BRIDGES; ESSLINGER, 2005). A neurotransmissão glutamatérgica é finalizada por transportadores específicos, na maioria dos casos, de alta afinidade (*Excitatory Amino acid transporter* - EAATs), que estão localizados em células gliais e neurônios, em processos que dependem de gradientes iônicos sinápticos (PROPER *et al.*, 2002; BRIDGES; ESSLINGER, 2005). Esses transportadores desempenham um importante papel na regulação da concentração de glutamato na fenda sináptica, pois atuam removendo rapidamente este neurotransmissor do espaço extracelular, evitando a excitotoxicidade decorrente da ativação excessiva dos receptores glutamatérgicos (SHIGERI *et al.*, 2004) (Figura1). Esta hiperativação induz uma maciça despolarização de neurônios, levando a entrada prejudicial de íons de Ca^{++} e, por conseguinte, levando

a morte celular (DANBOLT, 2001; AMARA; FONTANA, 2002; BRIDGES; ESSLINGER, 2005).

FIGURA 1 - Principais elementos da neurotransmissão glutamatérgica



Fonte: RODRIGUES, TB *et al.* *Frontiers in Neuroenergetics*, 2013
<http://journal.frontiersin.org/Journal/10.3389/fnene.2013.00009/full#sthash.wGocf8YP.dpuf>

Informações sobre a Figura 1 : Principais elementos da neurotransmissão glutamatérgica. GLU: glutamato; GLN: glutamina; LAC: lactato; Metabotropico: receptores glutamatérgicos metabotrópicos; Ionotropic: receptores glutamatérgicos ionotrópicos; ATP: adenosita trifosfato; ADP: adenosina difosfato; G: proteína G; PGK: fosfoglicerato cinase; GLUT1 e GLUT3: transportadores de glutamato 1 e 3; MCT1 e MCT2: transportadores de monocarboxilato; PYR: piruvato.

É possível induzir crises convulsivas em animais através da administração de agonistas glutamatérgicos intrahipocampusais, como o N-metil-D-aspartato (NMDA) e o ácido caínico (BEM, 1979). Por outro lado, a inibição da neurotransmissão glutamatérgica, como por exemplo através de antagonistas de receptores NMDA (como o MK801) costuma ter efeito anticonvulsivante (VEATCH, BECKER, 2005). Também alterações nos transportadores do glutamato possuem efeitos sobre crises convulsivas: o aumento na captação do glutamato, retirando-o da fenda sináptica, como o causado

por toxinas da aranha *Parawixia bistriata* (ex. *Parawixina* 10) (LIBERATO, 2013) possui efeito anticonvulsivante; a inibição da captação neuronal da glutamina extracelular, reduzindo o aporte do precursor do glutamato, possui efeito anticonvulsivante. (KANAMORI, ROSS, 2013)

Também a acetilcolina é um neurotransmissor excitatório do hipocampo de mamíferos. Ela atua nos receptores colinérgicos nicotínicos (ionotrópicos) e muscarínicos (metabotrópicos). A ativação de receptores colinérgicos muscarínicos pelo agonista pilocarpina (PILO) microinjetado via intrahipocampal causa eventos de crise comportamental e eletrográfica em roedores (FURTADO, *et al.*, 2002; CASTRO, *et al.*, 2012).

2.2 Fitoterápicos e *Indigofera suffruticosa*

Vários estudos farmacológicos têm demonstrado a ação de extratos vegetais em diversas patologias induzidas experimentalmente em animais de laboratório. Isso tem aberto perspectivas favoráveis no sentido de se ter, nas plantas, uma grande fonte de substâncias, que em um futuro próximo, poderão ter emprego na terapêutica convencional (alopatia), através do isolamento e identificação de princípios ativos, para os mais variados males que afligem o homem (CASTRO e FERREIRA, 2001; COELHO *et al.*, 2004; SALATINO *et al.*, 2005). Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a OMS reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas (POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS, Brasília – DF Ministério da Saúde, 2006). É senso comum por grande parte da população que o consumo de plantas medicinais traz benefício irrestrito com pouco ou nenhum risco. Essa afirmativa deve ser questionada, uma vez que muitos fitoterápicos possuem princípios ativos capazes de modificar funções orgânicas, bem como de interferir na ação dos fármacos administrados simultaneamente, ambos os fenômenos negativos para a resposta terapêutica (ZARONI *et al.*, 2004). E por agirem farmacologicamente, novos fitoterápicos necessitam ser estudados em contextos desafiadores para a saúde e bem estar humano e veterinário.

A *Indigofera suffruticosa* Mill (Fabaceae), (Figura 2) comum em regiões tropicais e subtropicais, é uma leguminosa utilizada na adubação verde e cobertura dos solos. Essa forrageira anual ou perene é adaptada à região do semi-árido e agreste do estado de Pernambuco. Conhecida popularmente como “anil do campo” ou “anileira”, é encontrada do sudoeste dos Estados Unidos à Argentina (BRAGA, 1985). Na medicina tradicional é utilizada como agente antiespasmódico, sedativo, diurético e anti-inflamatório (LEITE *et al.*, 2003). Recentemente, efeitos embriotóxicos (LEITE *et al.*, 2004), atividade antitumoral (VIEIRA, 2007) e atividade antimicrobiana (LEITE *et al.*, 2006) têm sido relatados.

FIGURA 2 - *Indigofera suffruticosa*.



Fonte: Fotografia retirada de <http://www.hear.org/starr/images/image/?q=060416-7687&o=plants>

Uma investigação química do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa* com técnica de camada delgada de sílica, apresentou o pigmento índigo, derivados cinâmicos, triterpenos, iridóides, leucocianidina e carboidratos, não sendo detectada a presença de flavonoides, alcalóides e cumarina (VIEIRA, 2007). Os autores Roig e Mesa (1974) reportaram que uma das propriedades da injeção sistêmica (intraperitoneal, i.p.) de *Indigofera suffruticosa* é sua ação anticonvulsivante, utilizando camundongos nos modelos de convulsão induzida por SEM (choque elétrico máximo) e picrotoxina. Mais tarde este efeito anticonvulsivante por injeção i.p. foi confirmado por

Alejo *et al.* (1996) e Alejo *et al.* (1998) nos modelos de indução de convulsão tônico-clônica por eletrochoque e picrotoxina. Wong e colaboradores, trabalhando com o modelo crônico de abrasamento (*kindling*) através de injeção de lidocaína em ratos, evidenciaram um efeito protetor do extrato desta planta porque causou a elevação dos aminoácidos inibitórios taurina e glicina e diminuição do aminoácido excitatório glutamato no plasma (WONG *et al.*, 1999). Recentemente foi constatado um efeito anticonvulsivante do extrato metanólico de *I. suffruticosa* injetado i.p. em camundongos tratados também i.p. com os convulsivantes picrotoxina, estriquinina, pentilenotetrazol e pilocarpina (ALMEIDA, *et al.*, 2013). Este artigo também propõe como possível mecanismo de ação da *I. suffruticosa* o sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A, já que o efeito neuroprotetor do extrato foi revertido pelo pré-tratamento com um antagonista seletivo contra este sítio (Carbamazepina, Ro 15-1788) (ALMEIDA, *et al.*, 2013).

No entanto, modelos sistêmicos de indução de crises convulsivas possuem a desvantagem de não se saber exatamente onde o composto está agindo, o que dificulta a determinação do seu mecanismo de ação. Há também outro ponto a ser considerado: modelos experimentais de epilepsia sem o simultâneo registro da atividade eletrográfica podem resultar em dados falso-positivos, já que é possível um animal ter atividade eletrográfica no LFP (ex. espículas) sem nenhum tipo de manifestação motora.

Apesar da necessidade do desenvolvimento de novos fármacos anticonvulsivantes, e do extrato aquoso de *I. suffruticosa* ter apresentado efeito anticonvulsivante por injeção sistêmica em alguns modelos experimentais de epilepsia, não se sabe ainda seu exato mecanismo de ação, nem se este extrato também bloquearia eventos eletrográficos e comportamentais límbicos de crise. Não se sabe também qual componente específico do extrato seria um candidato a responsável pelo efeito, já que todos os artigos publicados até o momento foram realizados apenas com o extrato aquoso.

3 OBJETIVOS

a) Objetivo geral

Avaliar o efeito anticonvulsivante da administração intrahipocampal do extrato aquoso das folhas de *Indigofera suffruticosa* MILL através de análise de parâmetros comportamentais e eletroencefalográfica em ratos.

b) Objetivo específico

- Verificar o efeito da microinjeção intrahipocampal (i.h.) do extrato aquoso de *I. suffruticosa* sobre crises convulsivas induzidas pela microinjeção intrahipocampal de pilocarpina (PILO) com ratos, com simultâneo registro comportamental e eletrográfico (LFP), no hipocampo.
- Verificar o efeito da microinjeção intrahipocampal(i.h.) do sulfato de indigo sobre crises convulsivas induzidas pela microinjeção intrahipocampal de pilocarpina (PILO) em ratos, com simultâneos registros comportamental e eletrográfico(LFP), no hipocampo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Em todos os experimentos foram usados ratos Wistar machos com idade variando entre 50 e 80 dias, com peso na faixa de 250 a 290 gramas (n=25), provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE. No período dos experimentos, os animais foram mantidos no biotério do departamento em ambiente com temperatura controlada (21 °C), em caixas plásticas contendo de 4 a 6 animais no período pré-cirúrgico e 1 animal durante o pós-cirúrgico e experimental, com livre acesso à água e ração e com o ciclo claro/escuro de 12 horas (período claro: das 7 às 19 h).

Foram divididos nos seguintes grupos: grupo naïve (não recebeu cirurgia nem implantes, n=02); grupo Sham (recebeu implante cirúrgico e a cânula de microinjeção, mas nenhum líquido foi injetado, n= 02); Grupo Controle Salina-Pilo (n=09); Grupo Experimental Extrato-Pilo (n=09); Grupo Experimental Índigo-Pilo (n=3). Para a comparação com o grupo SÍndigo-Pilo, foram utilizados animais do grupo controle já prontos.

Todos os esforços foram feitos para evitar sofrimento desnecessário aos animais. O protocolo experimental está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal e foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFPE, (Projeto 23076.017787/2011-21; Projeto Conectividade funcional hipocampal *in vivo*)

4.2 Drogas

- Pilocarpina (PILO) (Sigma): Um agonista muscarínico, 24 mg de hidrocloreto de PILO solubilizada em 10 µL de solução de NaCl 0,9% (doses adaptadas de Croiset e De Wied (1997) e já utilizadas em Furtado *et al.* (2002) e Castro, O.W, 2012.
- Diazepam (DZP – Roche): preparado na dose de 5 mg/kg. Aplicado 90 minutos após início do *status epilepticus* (SE, crises contínuas por mais de 5 min, (ILAE-

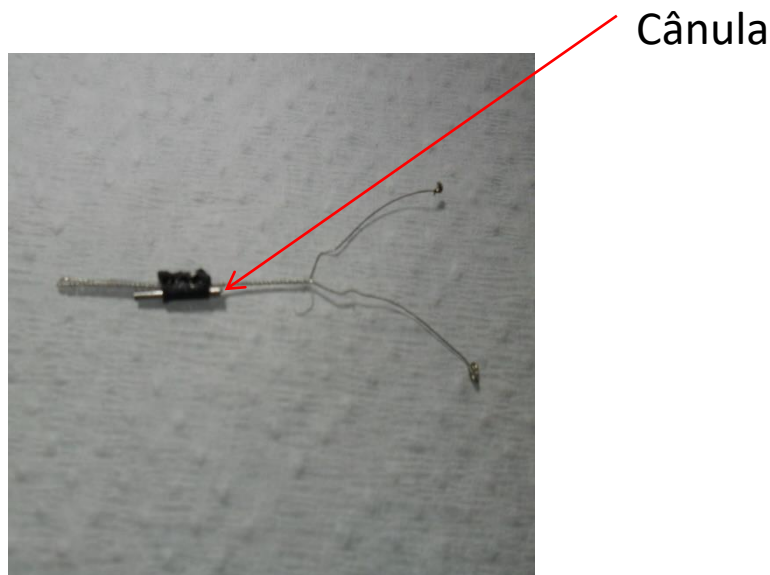
International League Against Epilepsy; Olagide. O.W.,. 2012), foi utilizado para resgate do animal impedindo sua morte por exaustão. Era reaplicado a cada hora, caso necessário (dose suplementar), até que o animal terminasse a atividade convulsiva.

- Enoflurano(Enuran®, Biochimico), é um anestésico volátil utilizado como pré-anestésia. Foi aplicado em volume de 1 mL em cilindro plástico de 2000 ml de volume, até que o rato perdesse o tônus muscular e ficasse arreflexo, estando então ele pronto para receber o anestésico QUET:XIL. Tal procedimento reduz o estresse do animal, e é preconizado por leis internacionais e nacionais de experimentação animal.
- Hidroxocloridrato de quetamina:xilazina (QUET:XIL)(Agener União Indústria(Brazil),: 14:1 mg/Kg Hidroxocloridrato de quetamina: xilazina; Esta combinação oferece excelente efeito anestésico e analgésico.
- *Cimento à base de Oxifostato de Zinco utilizado na fixação dos parafuso terra e quimetrodo; Líquido para cimento à base de Oxifosfato de Zinco, ambos da Marca Vigodente Coltren*
- *Cantrimol – Fabricado por Biogêntinese Bago S.A, Garin – Buenos Aires, Argentina; Antibiótico injetável com antiinflamatório*
- *Degermil – Iodopolvidona 10%; Antisséptico para curativo em geral, produzido por Lupon Química e Natural Ltda – Limoeiro PE*
- *Sulfato de índigo, adquirido da Sigma.*

4.3 Cirurgia estereotáxica para implante de quimetrodo

Os ratos foram pré-anestesiados com enoflurano e depois receberam QUET:XIL intramuscular antes do início da cirurgia e foram tricotomizados na cabeça. Após a fixação em aparelho estereotáxico (INSIGHT, Ribeirão Preto, Brasil), os animais receberam injeção subcutânea de anestésico local (Lidocaína com vasoconstrictor; Astra). O quimetrodo é um dispositivo contendo uma cânula-guia e um par de fios de aço inox retorcidos sobre si mesmos (FIGURA 3), que permite a microinjeção de líquidos e registro simultâneo do potencial de campo local.

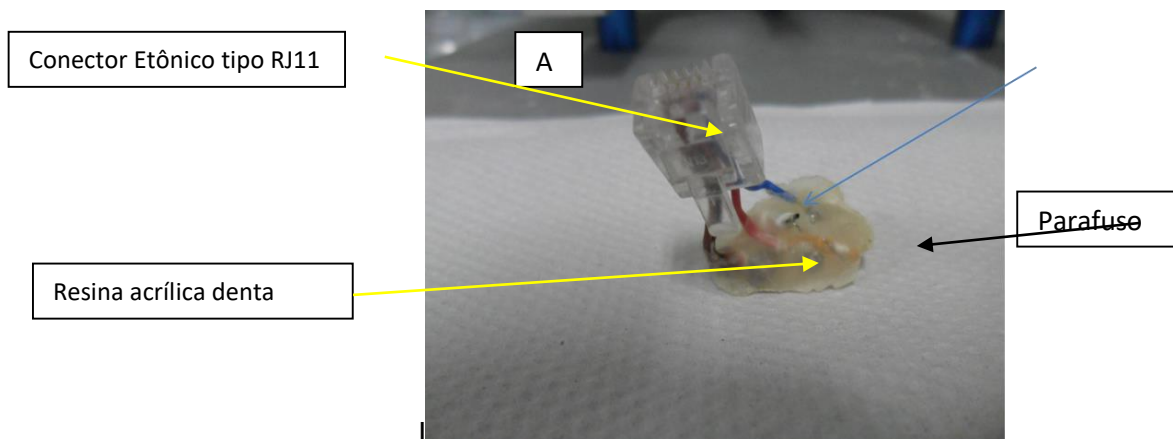
FIGURA 3 - Quimetrodo confeccionado no laboratório, contendo dois fios encapados com teflon e enrolados sobre si mesmos, unidos a uma cânula guia.



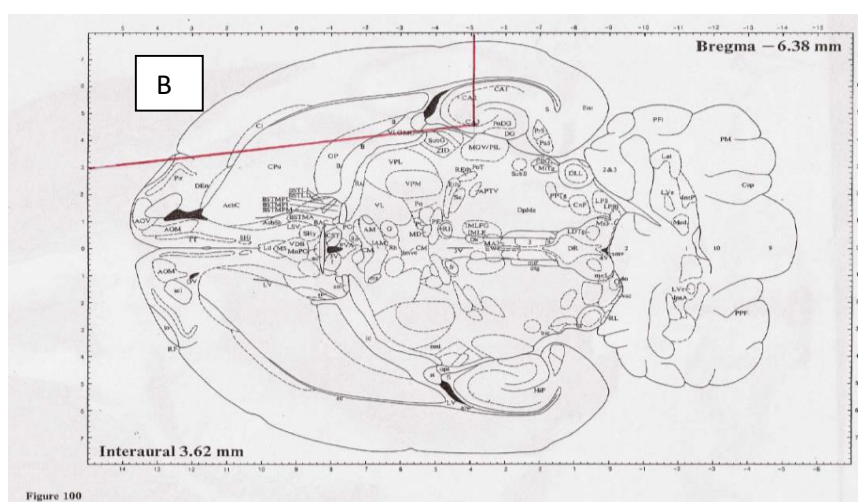
Fonte: O Autor

Após o posicionamento na área de interesse com o auxílio de aparelho estereotáxico, os eletrodos são soldados a um conector telefônico (Figura 4 A e B). A cânula-guia fica implantada no córtex do rato e permite que no dia do experimento seja inserido, através dela, uma outra cânula denominada cânula de injeção. A cânula-guia é confeccionada partir de uma agulha 25x6 descartável de 0,6 mm de diâmetro interno por onde passa a cânula de injeção. Aquela possui comprimento de 10 mm e esta um diâmetro externo de 0,35 mm, por isso, passa por dentro da cânula-guia. A cânula-guia foi estereotaxicamente implantada nas seguintes coordenadas, retiradas de atlas neuroanatômico do cérebro de ratos (PAXINOS, 1996): – 5,00 mm AP (em relação ao bregma); 3,00 mm ML (em relação ao seio sagital) e 6,20 mm DV (em relação à duramáter) de acordo com Furtado e colaboradores (2002). Após o implante, a cânula-guia foi reversivelmente ocluída através de um mandril de fio de aço, evitando assim que o encéfalo do animal ficasse exposto ao meio exterior. Os eletrodos foram confeccionados a partir de 2 fios de aço de 70 μm de diâmetro, encapados com teflon (diâmetro total encapado por fio: 100 μm) por toda a sua extensão com exceção da ponta. Os eletrodos foram fixados à cânula-guia por cola tipo epóxi líquida, e soldados em conector macho de cabo telefônico de 4 vias tipo RJ 11, sendo o conjunto envolto em acrílico dental, formando o que é chamado de “Implante”.

FIGURA 4 – Local de posicionamento do quimetrodo no implante



Fonte: O Autor



Fonte: O Autor

Informações sobre a Figura 4: Local de posicionamento do quimetrodo e implante completo. A. Implante completo contendo quimetrodo já soldado ao conector telefônico, parafuso de aterramento no osso nasal e acrílico dental envolvendo todo o sistema. B. Imagem retirada do Atlas de Paxinos e Watson (2007) mostrando posição almejada para inserção do quimetrodo intrahipocampal.

Após a cirurgia estereotáxica, os animais permaneceram no Biotério do Departamento de Fisiologia da UFPE durante 3 a 7 dias para recuperação. Neste

período foram habituados ao ambiente de experimentação de maneira a sentirem menos o estresse da contenção necessária durante o protocolo de microinjeção. Durante três dias, os animais dos grupos controle e experimental, eram levados ao laboratório, manuseados, colocados na arena de filmagem, imobilizados e deixados por um período de trinta minutos no ambiente em que seria executados os registros.

4.4 Microinjeções e Registro de Potencial de Campo Local

Os animais (n=18) foram imobilizados enquanto receberam injeção de PILO (volume=1,5µL). Foi utilizada uma seringa de 10 µL (Hamilton –Sigma) e microinjetado manualmente com velocidade de 0,5 µL/min. O grupo controle (n=09) recebeu o mesmo volume de salina (0,9%) intrahipocampal.

Após a microinjeção de PILO, os animais foram observados quanto à latência para a primeira crise convulsiva, número de sacudidas de “cachorro molhado” (*Wet Dog Shakes*, WDS) e latência para o surgimento do *Status Epilepticus* (SE), considerado como presença contínua de crises convulsivas por no mínimo 5 min (CASTRO, 2012). Passados 90 minutos após o início de SE, os animais foram resgatados pela injeção i.p. de diazepam (5 mg/kg) e permaneceram no Biotério do Departamento de Fisiologia para recuperação. O LFP hipocampal foi registrado a partir da amplificação da atividade elétrica medida num eletrodo monopolar através de 10.000x de amplificação (BIOPAC EEG 100C, EUA) e filtro passabandas entre 0,1 e 35 Hz, utilizando como referência um parafuso implantado no osso nasal. Após a amplificação, a atividade elétrica recebia conversão analógico-digital (National Instruments, USB6008, EUA) e os registros eram gravados em computador pessoal para análise posterior.

A avaliação da crise eletrográfica (atividade paroxística), quantificou-se as espículas nos registros de LFP utilizando o programa MatLab e algoritmos confeccionados no laboratório, que diferenciam espículas cujo módulo da amplitude foi considerado de pequena (<40µV), média (entre 40µV e 60µV) ou grande amplitude (>60µV) no LFP (Figura 6). Estes valores foram obtidos em experimentos piloto realizados em nosso laboratório onde percebeu-se que, sob nossas condições experimentais, a injeção de pilocarpina geralmente ocasiona espículas maiores que 60µV e os controles apresentam apenas espículas até 40 µV.

4.5 Avaliação Comportamental Vídeo-EEG

Após a microinjeção, o plugue macho tipo RJ 11 afixado no quimetrodo implantado no crânio do rato, foi conectado a um plugue fêmea conectado a um cabo ligado a um comutador tipo “*swível*” (MOOG, EUA), que permite que o animal se locomova livremente na arena de filmagem enquanto é registrado seu potencial de campo hipocampal. Foi gravada a tela do computador contendo o comportamento do rato e a atividade elétrica simultânea, o que caracteriza um sistema de vídeo-EEG(Figura 6).

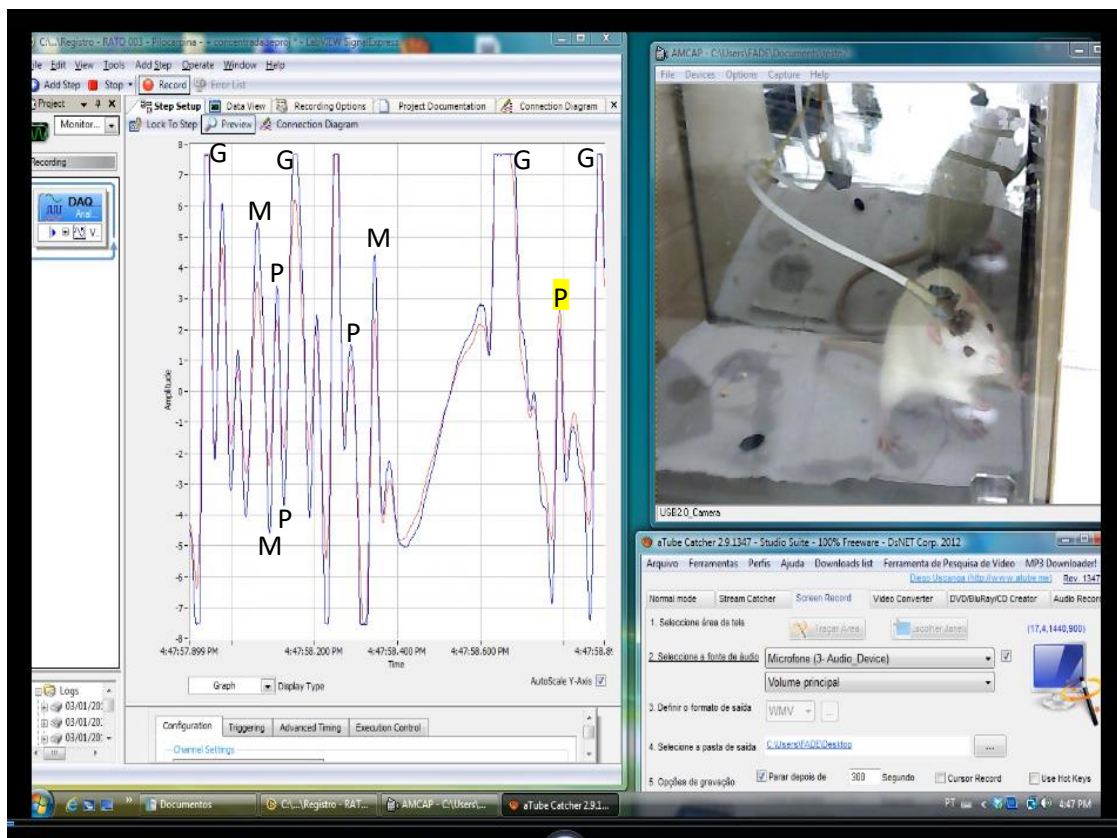
Para quantificação das crises límbicas, foi utilizado o índice de Racine (1972) modificado por Pinel e Rovner (1978) (Quadro 1). Este índice retrata de forma crescente, a gravidade de crises (RACINE, 1972) modificado por (PINEL & ROVNER, 1978). Estes índices são comumente empregados para avaliação de SE, Leite, Garcia-Cairasco e Cavalheiro (2002); Tilelli (2003); Tilelli *et al.*, (2005).

Quadro 1- Índice de Racine (1972), modificado por Pinel e Rovner (1978).

Índice	Comportamento(s)
0	Imobilidade
1	Automatismos faciais
2	Mioclonias de cabeça e pescoço
3	Clonias de patas anteriores
4	Elevação sobre as patas posteriores
5	Elevação e queda
6	Várias classes 5 (>3)
7	Comportamentos anteriores + corrida
8	Comportamentos anteriores + corrida + convulsão tônico-clônica

O trabalho de Pinel & Rovner (1978) adiciona ao índice de gravidade de crises sugerido por Racine (1972), como mostrado na Tabela 1, alguns eventos que passam a descrever comportamentos tipicamente evocados pela ativação de estruturas mesencefálicas, além daquelas do sistema límbico.

FIGURA 5 - Sistema de vídeo-EEG



Fonte: O Autor

Observações sobre a Figura 5: Sistema de vídeo-EEG. Rato é filmado e seu comportamento é sincronizado na tela de um computador pessoal com os registros de potencial de campo local (LFP). Notar presença de espículas no LFP. Na figura estão representadas algumas das espículas com amplitude pequena ($<40\mu\text{V}$, P), média (entre $40\mu\text{V}$ e $60\mu\text{V}$, M) e grande ($>60\mu\text{V}$, G).

Para avaliarmos o comportamento do animal, quantificamos: 1. as crises comportamentais em seus níveis de intensidade; 2. O número de sacudidelas de corpo (WDS, do termo inglês “*wet dog shakes*”); 3. O índice somativo (soma dos índices de severidade das crises apresentadas durante cada minuto em que o comportamento foi observado por item); e 4. O número de animais que entraram em SE em cada grupo.

4.6 Perfusão dos animais

Vinte e quatro horas após o experimento, cada animal foi profundamente anestesiado com QUET:XIL intraperitoneal. Com o auxílio de uma bomba de perfusão Masterflex (Cole Parmer), com velocidade controlada, foram infundidos na artéria aorta

dos ratos 50 mL de tampão fosfato salina (PBS, 100 mM, pH 7,4) e posteriormente 300 mL de paraformaldeído (PFA) 4% em PBS com pH 7,4.

4.7 Pós-fixação e congelamento dos cérebros

Após a remoção dos encéfalos, os tecidos foram pós-fixados em paraformolaldeído (PFA) durante 2 a 4 horas. Na sequência foram submetidos a banho em solução de sacarose 10, 20 e 30% por tempo variável aguardando sua precipitação para a troca da solução. Foi utilizado como critério para decisão do momento do congelamento, a precipitação dos cérebros na solução de 30% (Andrade da costa, B. L. S., et al., 2012). O congelamento se deu por colocação em freezer a -20 C° até o momento do corte.

4.8 Corte dos cérebros

Os cérebros foram cortados em secções de 40 µm em criostato (Microm HM-505-E da Leika) com temperatura variando de -18 a -22°C. Os cortes foram colocados em lâminas gelatinizadas (solução para gelatinização: gelatina 0,5%. Todas as lâminas foram armazenadas em freezer a -20°C.

Seguindo rotina descrita na literatura (FURTADO, 2003; TILELLI, 2003; CASTRO, 2007) e também utilizada em nosso laboratório, as secções horizontais foram feitas observando-se três cortes por lâmina sendo um intervalo de 120 µm entre os cortes referenciados ao bregma segundo o atlas estereotático de Paxinos e Watson (1996). Os três cortes por nível representam a extensão dorsoventral do hipocampo.

4.9 Programas utilizados

4.9.1 Estatística

One-way ANOVA com Dunnett's post test e test "t" de student, executado utilizando GraphPad Prism version 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com".

4.9.2 Registros de Potencial de campo Local

LabVIEW™ SignalExpress 2010, de Junho de 2010, 371268L-01.

4.9.3 Análise de registros e contagem de picos

MatLab, Mathworks, v 7.8.0.347(2009a), 32 bit(Win 32); Licença 161051.

4.9.4 Captura de vídeo

aTube Catcher 3.8.5187 – Studio Suite; <http://www.aTube.me>.

4.10 Material Vegetal

4.10.1 Obtenção

O vegetal foi coletado na fase adulta, no período de floração. O material para estudo botânico foi condicionado entre folhas de jornal, prensado e transportado até o laboratório onde foi efetuada a herborização.

A espécie *I. suffruticosa* foi coletada na cidade de Nova Cruz no Estado de Pernambuco – Brasil. As folhas foram separadas e imediatamente utilizadas na produção de extrato aquoso. A amostra da planta encontra-se catalogada sob o número 43694 no Herbário da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.10.2 Preparação do extrato

O extrato foi obtido por infusão a partir de 75 g de folhas frescas em 2x200 ml dos solventes (hexano, acetato de etila, metanol e água) a 40 °C por 10 minutos e os resíduos sólidos removidos por filtração. Os solventes foram removidos em rotaevaporador e a água por liofilização. Após a liofilização, o extrato aquoso rendeu 1,75% e foi estocado a -20°C (VIEIRA, 2007).

4.10.3 Investigação quantitativa dos derivados indigóides em folhas de *I. suffruticosa*

A determinação quantitativa de derivados indigóides foi procedida utilizando 300g de folhas divididas em duas partes iguais (150g), armazenadas à temperatura ambiente e à 5°C durante 4 dias. O material vegetal foi submetido à extração Vieira, J.R.C. Investigação Farmacognóstica e Biológicas de folhas de *Indigofera suffruticosa* Mill sobre *Aedes aegypti* (VIEIRA, 2007).

4.10.4 Extração metanólica para investigar a presença de bandas dos derivados indigóides.

As bandas foram analisadas por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) utilizando como fase móvel o sistema: 100 v. v. acetato de etila, 2 v.v. acetato fórmico, 2v.v. ácido acético, 2v.v. água. (VIEIRA, 2007).

4.10.5 Obtenção do extrato aquoso de folhas de *I. suffruticosa*

Com base nos resultados do screening fitoquímico, extrato aquoso foi obtido a partir de 3 Kg de folhas recém coletadas reduzidas a pequenos fragmentos divididos em partes iguais (1,5kg). Folhas armazenadas à 5°C foram trituradas e os procedimentos extrativos foram realizados com metanol e água. Cada infusão foi preparada com 1,5 Kg de folhas em 4 L de solvente (água e metanol) à 40°C por 10min sendo o resíduo sólido removido por filtração. (LEITE, 2003). O solvente do extrato metanólico foi removido em rotaevaporador. O extrato aquoso foi liofilizado, para uma concentração final de 10% e posteriormente utilizado para ensaios biológicos.

Cinética de hidrólise O extrato metanólico (12mL) foi submetido à hidrólise ácida e condição térmica de degradação para isolar os compostos químicos índigo e indirubina das folhas de *I. suffruticosa*. O extrato foi hidrolisado com ácido clorídrico (HCl-86mL) a 50% e posteriormente foi realizada a degradação térmica (100°C) durante 30 minutos com três retiradas a cada 10 minutos (10, 20 e 30 minutos). Alíquotas de 4mL foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando como fase móvel o sistema: 100 v. v. acetato de etila, 2 v.v. acetato fórmico, 2v.v. ácido acético, 2v.v. água. (VIEIRA, 2011)

4.11 Experimentos com sulfato de índigo

Na busca pela determinação de componentes majoritários do extrato aquoso de *I. suffruticosa* responsáveis pelo efeito anticonvulsivante, efetuamos experimentos com o sulfato de índigo. Inicialmente determinou-se, com o auxílio de osmômetro (Fiske Mark 3 Massachusetts, USA), existente no Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Laboratório de Biofísica de Membrana, UFPE), a maior concentração de sulfato de índigo que resultasse numa solução de isosmótica fisiológica. Foi feita, assim, uma solução com 55,5 mg/500 µL de água destilada (300 mOsmolar), com que fizemos os testes utilizando 03 animais para controle (salina-PILO) e 03 animais para experimentais (Indigo-PILO).

5 RESULTADOS

5.1 Análise comportamental

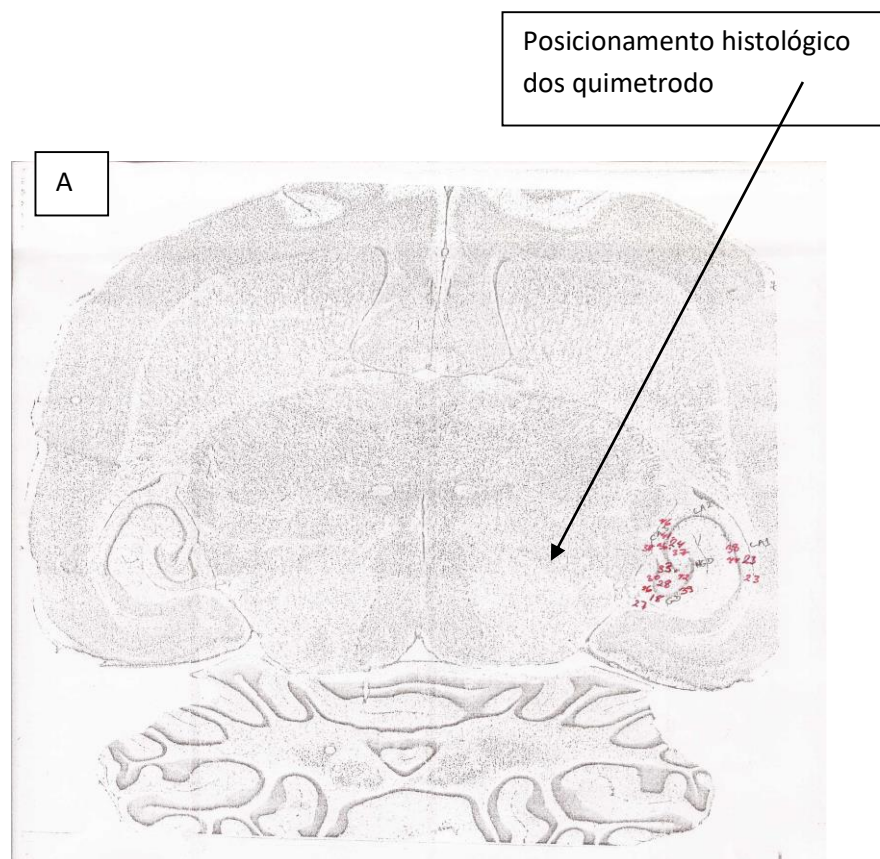
Foram inclusos no estudo apenas os ratos cujo implante do quimetrodo estava corretamente posicionado no hipocampo (Figura 7A). Pelo fato de não termos visto diferenças significativas entre as crises evocadas pela pilocarpina quando microinjetada no giro denteado, CA3 ou CA1, quaisquer destas áreas foi considerada como acerto histológico, e o rato incluído no estudo. Nossos resultados confirmam um efeito anticonvulsivante do extrato de *I. suffruticosa* no modelo de pilocarpina intrahipocampal. No grupo controle (veículo + PILO) todos os ratos entraram em SE após a injeção de pilocarpina (9/9; 100%). Já no grupo experimental (extrato + pilo), apenas um rato entrou em SE após de injeção do convulsivante (1/9; 11,1%) (Tabela 2) ($p < 0,05$, Teste Exato de Fisher).

Tabela 1 – Quantificação do número de ratos que entraram em SE após injeção
Injeção intrahipocampal de pilocarpina

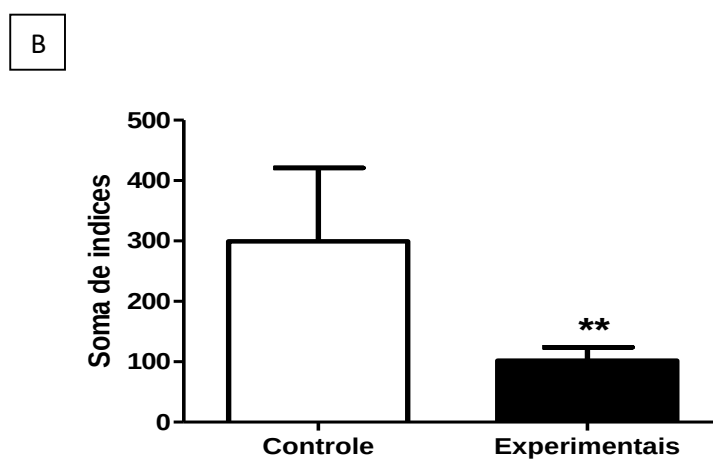
Grupo	N	SE	Porcentagem
Controle	9	9	100,00%
Experimentais	9	1	11,11%

O número de crises comportamentais obtidas através da soma dos índices límbicos apresentados pelos ratos do grupo experimental (extrato + pilo) ($102,0 \pm 21,79$) foi menor que o do grupo controle ($299,3 \pm 121,8$) (figura 6B). O grupo controle apresentava normalmente comportamentos de índices elevados (nº 4, 5 ect), porém os animais do grupo experimental apresentavam comportamentos de índices mais baixos (0,1 e 2).

FIGURA 6 – A. Posicionamento histológico dos quimetrodos no hipocampo.

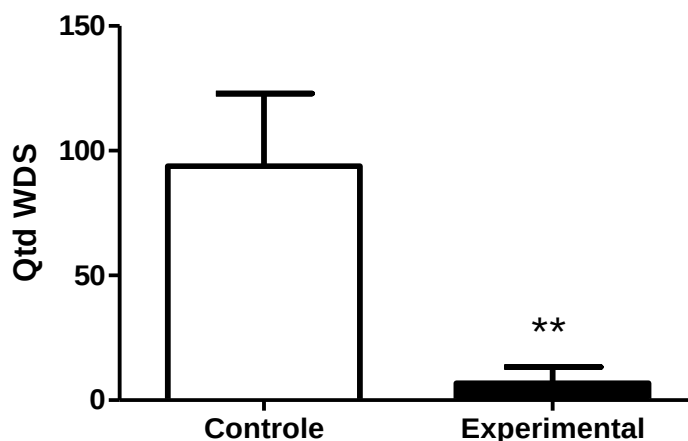


B. Quantidade de crises apresentadas pelos grupos controle ($299,3 \pm 121,8$) e experimental ($102,0 \pm 21,79$). **: $p < 0,01$, teste "t" de Student. Para cada grupo, somou-se os índices límbicos de Pinel e Rovner (1978) conforme iam sendo identificados pelo comportamento em 90 min de observação. Valores expressos em média em média $\pm$ desvio padrão.



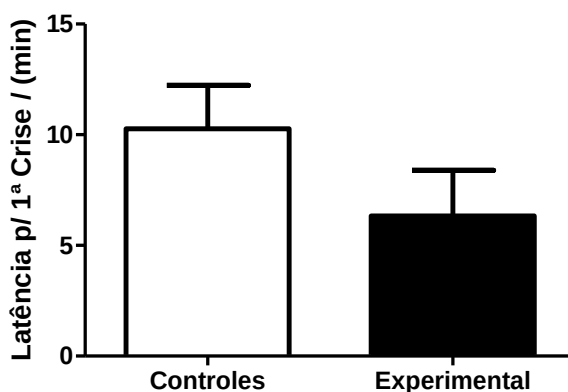
O número de WDS também foi significativamente maior no grupo controle ($48,73 \pm 12,42$) quando comparado ao grupo experimental (extrato + PILO) ($6,667 \pm 4,494$) (figura 7).

FIGURA 7 - Número de WDS observados nos ratos do grupo controle($48,73 \pm 12,42$) e experimental (extrato + PILO) ($6,667 \pm 4,494$). **: $p < 0,01$, teste "t" de Student. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão.



Os ratos do grupo experimental (extrato + pilo), embora em geral não tenham entrado em SE, que é caracterizado por crises convulsivas com mais de 30 min de duração, apresentavam ocasionalmente alguns comportamentos de crise. A latência para a primeira crise (figura 10) e os tempos de movimentação e imobilidade (figura 8), não diferiram significativamente entre os grupos.

FIGURA 8. Latência para primeira crise observada nos ratos do grupo controle($10,27 \pm 1,96$) e experimental (extrato + PILO) ($6,33 \pm 2,0$): $p > 0,05$, teste "t" de Student. Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão.



5.2 Análise eletrográfica – efeito do extrato

A contagem de espículas com valores abaixo de 40 μV e entre 40 e 60 μV não demonstrou diferença significativa entre o grupo controle (veículo + PILO) e experimental (extrato + PILO) (figura 9).

FIGURA 9 - Quantidade de picos menores que 40 μV . Controle(Ctl (salina + PILO): e Experimentais (extrato + PILO)Expl). Não houve diferença significante entre os dois grupos

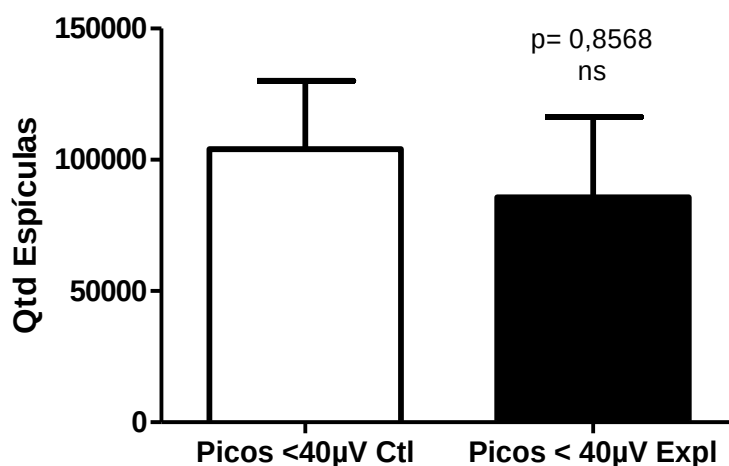
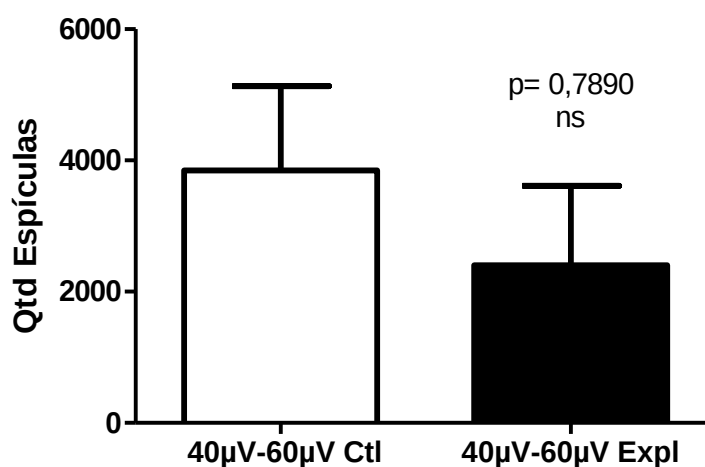


FIGURA 10 - Quantidade de picos acima de 40 μV e menores que 60 μV .

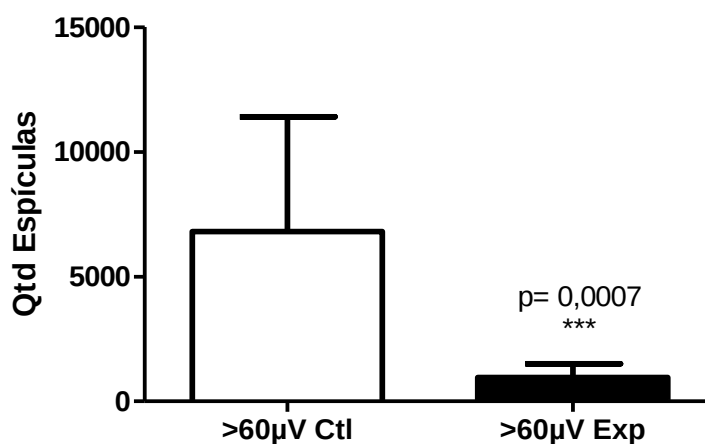


Controle(Ctl): N=9 e Experimentais(Expl): N= 9. Não houve diferença significativa entre os dois grupos. A contagem de espículas com valores acima de 60 μV demonstrou

diferença significativa entre o grupo controle (veículo + PILO) e experimental (extrato + PILO) (figura 11).

FIGURA 11 - Quantidade de espículas acima de 60 μ V.

Foi observada diferença extremamente significativa entre os dois grupos; Ctrl= 6811 $\pm$ 4591; Exp média= 957,8 $\pm$ 543,1. Dados mostram média $\pm$ desvio padrão.

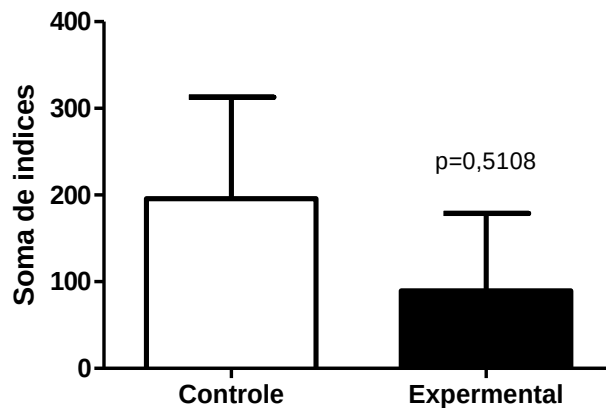


5.3 Experimentos com sulfato de índigo

Dos três ratos do grupo experimental Síndigo+PILO, um entrou em SE e dois não apresentaram nenhum sinal de crise convulsiva comportamental, apenas imobilidade, não havendo nem mesmo automatismos faciais (crise classe 1). No grupo controle os três animais entraram em SE.

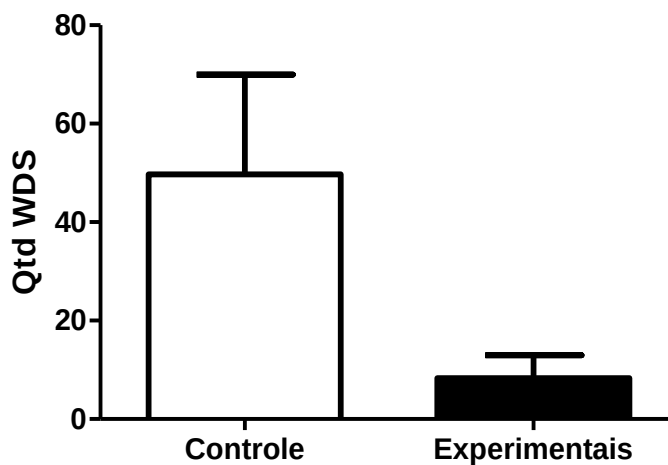
A respeito da quantidade de crises comportamentais, o grupo experimental (Síndigo+ PILO) apresentou uma menor soma de índices em relação ao grupo controle (figura 12).

FIGURA 12 - Quantidade de crises apresentadas pelos grupos controle (salina + PILO) ($195,7 \pm 117,3$) e experimental (Síndigo + PILO) ($89,33 \pm 89,33$);: $p > 0,05$.



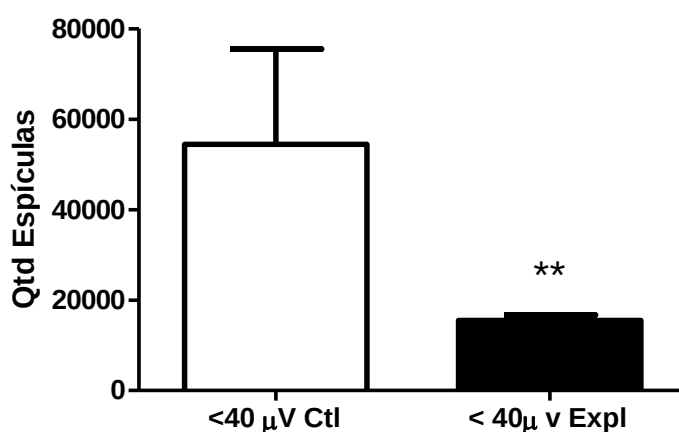
Dados mostram média $\pm$ desvio padrão. Quanto ao número de WDS, houve uma tendência à redução nos animais do grupo experimental Síndigo+PILO ($p=0,059$), embora o resultado não tenha sido significativo (figura 13).

FIGURA 13 - Quantidade de WDS, apresentados pelos grupos Controle (salina + PILO) $49,67 \pm 20,30$ e Experimentais (sindigo + PILO) $8,333 \pm 4,631$ $p = 0,059$, não significativo.



Os dados apresentam média $\pm$ desvio padrão. A contagem de espículas no LFP hipocampal resultou em uma redução estatisticamente significativa em todas as faixas estudadas: $<40\mu\text{V}$ (figura 14), $40\text{-}60\mu\text{V}$ (figura 15) e $>60\mu\text{V}$ (figura 16),

FIGURA – 14 Quantidade de espículas menores que $40\mu\text{V}$. Controle (salina + PILO) (54415 ± 21118) e Experimental (Síndigo + PILO) (15529 ± 1190).



Aqui é observável que houve diferença significativa entre os dois grupos; **: $p < 0,01$ (teste “t” de Student).

FIGURA 15 - Quantidade de picos acima de $40\mu\text{V}$ e menores que $60\mu\text{V}$. Controle (salina + PILO): 4631 ± 2440 e Experimentais (síndigo + PILO): $629,3 \pm 297,0$. *: $p < 0,05$, teste “t” de Student.

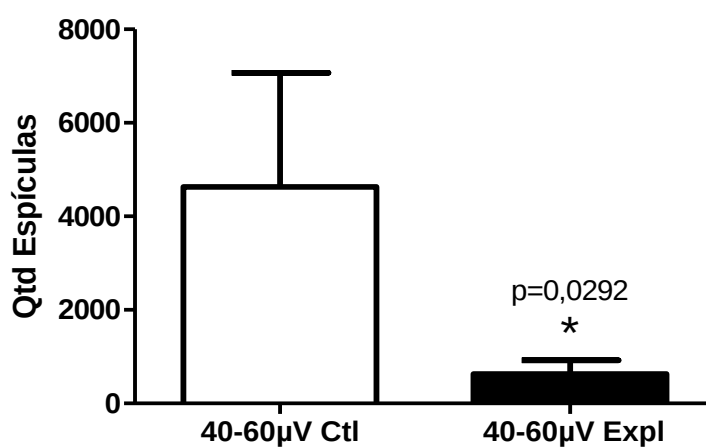
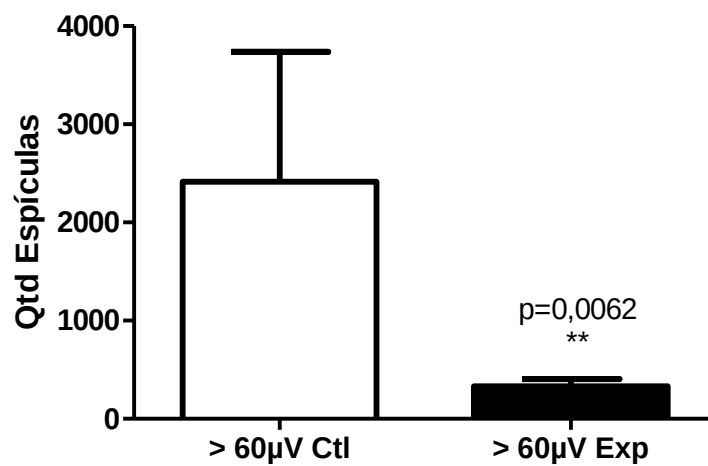


FIGURA 16 - Quantidade de picos acima de 60 μ V.

Foi observada diferença extremamente significativa entre os dois grupos; Ctl: grupo controle (salina + PILO), 2414 $\pm$ 1324; Exp: grupo experimental (síndigo + PILO), 331,0 $\pm$ 73,71; **: $p < 0,01$, teste "t" de Student.

6 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

6.1 Discussão

Nossos resultados apontam para a confirmação do efeito anticonvulsivante do extrato aquoso da planta *I. suffruticosa* e de um componente químico majoritário, o pigmento índigo. Graças ao emprego da técnica de vídeo-EEG, pudemos confirmar que estes compostos antagonizam não apenas as crises convulsivas comportamentais, mas também os eventos eletrográficos ictais.

No teste em que foi utilizado o Índigo, observou-se que os grupos foram considerados semelhantes apenas quanto ao comportamento W.D.S. No restante, houve significativa diferença entre os dois grupos, o que sugere uma forte influência do Índigo em que protegeu contra as crises tanto no parâmetro comportamental quanto eletrográfico.

Diferentemente dos trabalhos anteriores nesta área, que sempre envolviam administração sistêmica tanto do extrato de *I. suffruticosa* quanto dos convulsivantes, o presente trabalho utiliza injeções intrahipocampus. Desta forma, é possível excluir do mecanismo de ação possíveis metabólitos ativos produzidos sistemicamente, por exemplo por alteração química intra-hepática, e reforçando a ideia de que o extrato desta planta possui ação direta sobre o sistema nervoso. No entanto, é possível que os componentes ativos anticonvulsivantes do extrato estejam agindo diretamente sobre substratos neuroglicais ou sendo metabolizados localmente e originando assim os verdadeiros compostos anticonvulsivantes.

No entanto, a respeito dos mecanismos de ação do extrato, ainda resta muito a ser descoberto. Chaves (2010), ao testar a ação do extrato de *I. suffruticosa* (injetado i.p.), sobre crises convulsivas induzidas por pentilenotetrazol, pilocarpina, estriknina, picrotoxina e lidocaína, observou uma melhor atuação do extrato contra a lidocaína, que é um antagonista de receptores ligados a canais de sódio. Almeida e colaboradores sugerem uma atuação do extrato em receptores GABAérgicos ao constatar que efeitos do extrato são revertidos pelo pré-tratamento com flumazenil, um antagonista de receptores benzodiazepínicos centrais (ALMEIDA *et al.*, 2013). Porém, até o presente momento não se pode descartar também uma ação antagonista glutamatérgica do extrato uma vez que, em nossos experimentos, embora os ratos tratados com extrato ou com sulfato de índigo tenham apresentado uma menor probabilidade de entrar em

SE, eles ainda tiveram alguns comportamentos de crises límbicas, sobretudo as mioclonias faciais (crise classe I, a menos grave). Sabe-se que o pré-tratamento com antagonistas colinérgicos (escopolamina) ou GABAérgicos (diazepam), evita as crises convulsivas causadas por injeção subsequente de pilocarpina (TURSKI, 1983, 1984). O Diazepam consegue, inclusive, bloquear crises convulsivas iniciadas por pilocarpina e em andamento (TURSKI 1983, 1984), utilizado em nosso protocolo para reverter a crise do rato em pleno SE. No entanto, uma vez iniciada a crise convulsiva, ela não mais fica restrita aos neurônios colinérgicos, e sua continuação é glutamatérgica (RICEA; DELORENZO, 1998). O antagonismo de receptores glutamatérgicos tipo NMDA bloqueia o surgimento de crises recorrentes e espontâneas (mas não o SE) no modelo de pilocarpina (RICEA; DELORENZO, 1998). Turski e colaboradores (1983) demonstram que a injeção de altas doses de pilocarpina i.p. em camundongos, não resulta nem mesmo em espículas no LFP hipocampal se os animais forem pré-tratados com diazepam (10mg/kg, i.p.), apenas um breve retorno das ondas teta. Em conjunto, estas evidências sugerem que o extrato de *I. suffruticosa* e possivelmente o sulfato de índigo não possuem efeito GABAérgico. Nossa atual hipótese é de que o mecanismo de ação do extrato desta planta seria possivelmente através da redução da neurotransmissão glutamatérgica, já que os animais pré-tratados apresentam efeitos anticonvulsivos comportamentais e eletrográficos e em geral não entram em SE, mas apresentam sim crises de baixa intensidade e uma pequena quantidade de espículas de grande amplitude. Se o extrato fosse anticolinérgico ou GABAérgico, possivelmente não seria detectado nenhum sinal de crise. No entanto, novos experimentos são necessários para testar esta nova hipótese. É possível que o extrato aquoso e o sulfato de índigo tenham efeito sobre receptores ou transportadores glutamatérgicos, à semelhança de certas neurotoxinas isoladas da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* (LIBERATO, 2013)

Meurs e colaboradores (2006) estudaram o efeito do anticonvulsivante topiramato sobre crises convulsivas e ações eletrográficas causadas por administração intrahipocampal de pilocarpina em ratos (MEURS et al., 2006). Já se sabe que o topiramato potencializa a neurotransmissão GABAérgica (aumento de corrente Cl^- induzida por ativação de receptores $GABA_A$) (WHITE; WOODHEAD, et al. 1997) e reduz a glutamatérgica (antagoniza os receptores glutamatérgicos AMPA e cainato) (POULSEN, SIMEONE, MAAR, et al. 2004). Acreditávamos inicialmente que o extrato de *I. suffruticosa* e o sulfato de índigo talvez possuíssem alguns mecanismos de ação

em comum com o topiramato. No entanto, o já citado trabalho de Meurs (2006) demonstra que o topiramato apresentou efeito anticonvulsivante quando administrado sistemicamente (gavagem), mas não quando administrado por via intrahipocampal. Na verdade, a injeção de topiramato intrahipocampal agrava as crises por PILO intrahipocampal. Microdiálises realizadas simultaneamente, mostraram que durante as crises convulsivas, há um aumento de GABA no hipocampo e redução de glutamato, fato que justificaria que a presença local do topiramato amenizasse o quadro. No entanto, quando o topiramato era injetado na substância negra reticulada (SNPr), ele apresentava efeito anticonvulsivante. Isto sugere um envolvimento de um sistema GABAérgico no controle e produção das crises convulsivas envolvendo a SNPr e o hipocampo. As diferenças observadas entre o extrato da planta e o topiramato, tendo o primeiro sido anticonvulsivante quando microinjetado via intrahipocampal e o segundo não, sugerem que ambos não possuem os mesmos mecanismos de ação. Este fato reforça nossa hipótese de ausência de mecanismo GABAérgico do extrato.

Ainda não está (ão) determinada (s) qual (is) molécula (s) seria (am) responsável (eis) pela propriedade anticonvulsivante do extrato da planta. Dos componentes conhecidos do extrato aquoso, os derivados cinâmicos comprovadamente não possuem atividade anticonvulsivante (JAROGNIEW *et al.*, 2012). Quanto aos triterpenos, há descrição de efeito anticonvulsivante contra crises induzidas por antagonismo da neurotransmissão GABAérgica, no entanto estes compostos não foram eficazes contra antagonismo de glicina (estriquinina) nem contra pilocarpina (ARAGÃO, 2008). Não foi localizada na literatura nenhuma descrição de efeito anticonvulsivante atribuídos a iridóides nem leucocianidinas. Estes dados, juntamente com os resultados obtidos com o sulfato de índigo no presente trabalho, apontam o índigo como possível responsável pelo efeito anticonvulsivante no modelo da pilocarpina. Até o presente momento todas as descrições de efeito anticonvulsivante relacionados a esta planta, se originam de experimentos executados com o extrato aquoso, não tendo sido apontada uma molécula específica como candidata.

Como consta do Apêndice B deste volume, a análise da osmolaridade do extrato mostrou que não houve alteração significativa nas crises comportamental e eletrográfica, parâmetros estudados neste trabalho, quando comparados os animais controle no período em que estavam apenas sob ação da solução salina 0,9% microinjetada e os experimentais apenas com o extrato deste fitoterápico. Diante deste resultado, podemos inferir que, embora alta a osmolaridade do extrato, ela não interferiu

nos nossos estudos quanto aos parâmetros. Porém, maiores estudos utilizando os componentes mais abundantes neste extrato, que são o Índigo e o Indirrubina (VIEIRA, 2011), nos conduzirão a melhores conclusões. Utilizando o sulfato de índigo em uma concentração isotônica fisiológica, verificou-se que sua ação foi superior à do extrato uma vez que houve redução até mesmo nas espículas de baixa e média amplitudes.

Seguir-se-ão ao presente trabalho, estudos complementares em que serão apreciados os mesmos parâmetros, porém utilizando os compostos mais abundantes no extrato, observando-se a osmolaridade fisiológica e acrescentando eletrodos em três outras áreas do Sistema Nervoso: Substância Nigra, Amígdala, Núcleo Estriado além do Hipocampo. Analisaremos, assim, além das crises comportamental e eletrográfica, a coerência parcial direcionada (PDC) entre estas áreas durante a estimulação, pois temos por hipótese que uma dessas áreas exerce o controle endógeno preventivo da epilepsia.

7 CONCLUSÕES

- A microinjeção intrahipocampal do extrato aquoso de *I. suffruticosa* causa efeito anticonvulsivante quanto aos parâmetros comportamental e eletrográfico, evitando o *status epilepticus* causado por pilocarpina intrahipocampal;
- O extrato da *I. suffruticosa* bem como seu pigmento o SI, exerce seu efeito anticonvulsivante no foco da crise convulsiva;
- Dentre os componentes majoritários presentes no extrato aquoso de *I. suffruticosa*, o sulfato de índigo é uma molécula candidata a ser um dos princípios ativos anticonvulsivantes;

REFERÊNCIAS

ALEJO, J. L. P. de; RODRÍGUEZ, G. R.; FLORES, R. M. Actividad anticonvulsivante de las fracciones butanólica y acetato de etilo de la indigofera suffruticosa mill (añil cimarrón). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 3, n. 3, p. 7-11, 1998.

ALLEN, O. N; ALLEN, E. K. **Leguminosae**: a source book of Characteristics, uses and nodulation. Washington: The University of Winsconsin Press, 1981. 813 p.

ALMEIDA, E. R. et al. Anticonvulsant effect of Indigofera suffruticosa Mill: Indication of involvement of the GABAergic system. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 11, p. 622-628, 2013. Disponível em: < http://www.academicjournals.org/journal/AJPP/edition/22_March,_2013 >. Acesso em: 22 mar. 2013.

AMARA, S. G.; FONTANA, A. C. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. **Neurochemistry International**, v. 41, n. 5, p. 313-318, 2002.

ARAGÃO, G. F. **Efeitos dos triterpenos α - e β -amirina e de seus derivados acetilados no sistema nervoso central**. 2008. 190 f. Tese (Doutorado em Farmacologia)- Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

AYLWARD, J. H. et al. Indigofera species with agronomic potencial in tropics. Rat toxicity studies. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 38, n.1, p.177-188, 1987.

BEN-ARY, Y. et al. A new model of focal status epilepticus: intra-amygdaloid application of kainic acid elicits repetitive secondarily generalized convulsive seizures. **Brain Research**, v.163, n. 1, p. 176–179, Mar. 1979.

BERGER, H. Über das Elektroenkephalogramm des Menschen. **Archiv für Psychiatrie und Nervenkrankheiten**, v.87, n. 1, p. 527–570, Dec. 1929.

BRAGA, G. K.; GARCIA-CAIRASCO, N. Análise comportamental e morfológica das alterações presentes em modelos de crises límbicas induzidas por injeção intrahipocampal de pilocarpina. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP, 7., 1999, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Universidade de São Paulo, 1999.

BRIDGES, R. J.; ESSLINGER, C. S. The excitatory amino acid transporters: pharmacological insights on substrate and inhibitor specificity of the EAAT subtypes. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 107, n. 3, p. 271-85, 2005.

BULFINCH, T. **O Livro de ouro da mitologia**: história dos deuses e heróis. Rio de Janeiro: Ediouro, 1999.

BULLER, R.; LEGRAND, V. Novel treatments for anxiety and depression: hurdles in bringing them to the market. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 6, n. 23, p. 1220-1230, Dec. 2001.

BU WONG, M. et al. Actividad de la *Indigofera suffruticosa* Mill en la epilepsia crónica experimental y su relación con aminoácidos neurotransmisores. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 4, n.1, p. 18-21, Jan./Apr. 1999.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A. A Dialética do conhecimento no uso das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 3, n. 2, p. 19-21, 2001.

CASTRO, O. W. **Análise comparativa da neurodegeneração e neurogênese após Status Epilepticus induzido por administração sistêmica de pilocarpina e microinjeções na formação hipocampal de pilocarpina e extrato aquoso de carambola, modelos de epilepsia do lobo temporal**. 2012. 276 f. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

CAVAZOS, J. E. et al. Ultrastructural features of sprouted mossy fiber synapses in kindled and kainic acid-treated rats. **The Journal Comparative Neurology**, v. 458, n. 3, p. 272-292, Apr. 2003.

CHARRIAUT-MARLANGUE, C. et al. Apoptotic features of selective neuronal death in ischemia, epilepsy and gp 120 toxicity. **Trends in Neurosciences**, v. 19, n. 3, p. 109-114, Mar. 1996.

CHAVES, T. M. **Análise da ação ansiolítica e anticonvulsivante de *Indigofera suffruticosa* mill em roedores**. 2010. 57f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica Integrada)- Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

CHMUED, L. C.; ALBERTSON, C.; SLIKKER JR., W. Fluoro-Jade: A novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. **Brain Research**, v.75, n. 1, p. 37-46, 1996.

COCK, H. R. et al. Mitochondrial dysfunction associated with neuronal death following status epilepticus in rat. **Epilepsy Research**, v. 48, n. 3, p. 157-168, Feb. 2002.

CROISSET, G.; DE WIED, D. ACTH: a structure-activity study on pilocarpine-induced epilepsy. **European Journal of Pharmacology**, v. 229, n. 2-3, p. 211-216, Dec. 1992.

CROSSAND, D. J.; CAVAZOS, J. E. **Plasticity circuitry reorganization, regeneration, and sprouting**. [S.l]: Elsevier, 2009.

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

DULAC, O. Epileptic syndromes in infancy and childhood: recente advances. **Epilepsia**, v. 36, n. 1, suppl. 1, p. 51-57, Jan.1995.

ELLIOTT, E. M. et al. Corticosterone exacerbates kainate-induced alterations in hippocampal tau immunoreactivity and spectrin proteolysis in vivo. **Journal of Neurochemistry**, v. 61, n. 1, p. 57-67, July 1993.

FLORIN, E. et al. Modulation of local field potential power of the subthalamic nucleus during isometric force generation in patients with Parkinson's disease. **Neuroscience**, v. 14, n. 240, p.106-116, 2013.

FURTADO, M. A. **Crises induzidas por pilocarpina intra-hipocampal em ratos wistar**: aspectos comportamentais, morfológicos e eletrencefalográficos. 2003. 148 f. Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Fisiologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

FURTADO, M. A. et al. Behavioral, morphologic, and electroencephalographic evaluation of seizures induced by intrahippocampal microinjection of pilocarpine. **Epilepsia**, v. 43, Suppl. 5, p. 37-39, 2002.

GARCIA-CAIRRASCO, N. A critical review on the participation of inferior colliculus in acoustic-motor and acoustic-limbic networks involved in the expression of acute and kindled audiogenic seizures. **Hearing Research**, v. 168, n. 1-2, p. 208-222, June 2002.

JARROTT, B. Epileptogenesis: bioquematical aspects. In: EADIE, M. J.; VAJDA, F. J. (Ed.). **Antiepileptic drugs**: pharmacology and drugs: pharmacology and therapeutics. Berlin: Springer, 1999. p. 87-121. (Handbook of experimental pharmacology, v. 138).

KANAMORI, K.; ROSS, B. D. Electrographic seizures are significantly reduced by in vivo inhibition of neuronal uptake of extracellular glutamine in rat hippocampus. **Epilepsy Research**, v.107, n. 1-2, p.20-36, Nov. 2013.

KOKUBUN, T. et al. **HDyeing process with natural indigo**: the tradition and technology. [S.l]: Department of Industrial Promotion,1998.

KOKUBUN, T.; EDMONDS, J.; JOHN, P. Indoxyl derivatives in woad in relation to medieval indigo production. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p.79-87, Sept. 1998.

LEITE, J. P.; GARCIA-CAIRASCO, N.; CAVALHEIRO, E. A. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. **Epilepsy Research**, v. 50, n. 1-2, p.93-103, June 2002.

LEITE, S. P. et al. Antimicrobial activity of *Indigofera suffruticosa*. **Evidence-Based Complementary Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p.261-265, June 2006.

LEITE, S. P. et al. Atividade anti-inflamatória do extrato de *indigofera suffruticosa*. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v. 7, n. 1, p. 47-52, jan./abr. 2003.

LEITE, S. P. et al. Embryotoxicity *in vitro* with extract of *Indigofera suffruticosa* leaves. **Reproductive Toxicology**, v. 18, n.5, p. 701-705, July 2004.

LIBERATO, J. L. **Estudo da neuroatividade da Parawixina10, um composto isolado da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* (Araneae: Araneidae), em ratos Wistar submetidos ao Status Epilepticus induzido por pilocarpina.** 2013. 126 f. Tese (Doutorado em Psicobiologia)- Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

LITCHFIELD JUNIOR, J.T.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 96, n. 2, p. 99-113, June 1949.

LÖSCHER, W. New visions in the pharmacology of anticonvulsion. **European Journal of Pharmacology**, v. 342, n. 1, p.1-13, Jan. 1998.

LOTHMAN, E. W. et. al. Recurrent spontaneous hippocampal seizures in the rat as a chronic sequela to limbic status epilepticus. **Epilepsy Research**, v.6, n. 2, p. 110-118, July 1990.

LUSZCZKI, J. J. et al. No effect of 3-(N-p-isopropoxyphenyl-succinimidomethylamino)-cinnamic acid on anticonvulsant action of different classical antiepileptic drugs in mouse maximal electroshock- induced seizure model. **Journal of Pre-Clinical and Clinical Research**, v. 6, n.1, p. 20-24, 2012.

MELDRUM, B. S.; BRIERLEY, J. B. Prolonged epileptic seizures in primates. Ischemic cell change and its relation to ictal physiological events. **Archives of Neurology**, v. 28, n. 1, p.10-17, Jan. 1973.

MELDRUM, B. S.; ROGAWSKI, M. A. Molecular targets for antiepileptic drug development. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental**, v. 4, n. 1, p.18-61, Jan. 2007.

MEURS, A. et al. Substantia nigra is an anticonvulsant site of action of topiramate in the focal pilocarpine model of limbic seizures. **Epilepsia**, v. 47, n. 9, p.1519-1535, Sept. 2006.

NADLER, J. V; THOMPSON, M. A; MCNAMARA, J. O. Kindling reduces sensitivity of CA3 hippocampal pyramidal cells to competitive NMDA receptor antagonists. **Neuropharmacology**, v. 33, n.2, p. 147-153, Feb. 1994.

NIEDERMEYER, E. Primary (idiopathic) generalized epilepsy and underlying mechanisms. **Clinical Electroencephalography**, v. 27, n. 1, p.1-21, Jan. 1996.

PAGLIOLI, E. et al. Survival analysis of the surgical outcome of temporal lobe epilepsy due to hippocampal sclerosis. **Epilepsia**, v.45, n. 11 p.1383-1391, Nov. 2004.

PASSOS, P. P. et al. Dopaminergic cell populations of the rat substantia nigra are differentially affected by essential fatty acid dietary restriction over two generations. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 44, n. 2, p.66–75, 2012.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 4. ed. San Diego: Academic Press ,1998. 474 p.

POULSEN, C. F. et al. Modulation by topiramate of AMPA and kainate mediated calcium influx in cultured cerebral cortical, hippocampal and cerebellar neurons. **Neurochemical Research**, v. 29, n. 1, p.275–282, Jan. 2004.

PRICHARD, J. W.; GALLAGHER, B. B.; GLASER, G. H. Experimental seizure-threshold testing with fluorthyl. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.166, n. 1, p.170-178, Mar. 1969.

PROPER, E. A. et al. Distribution of glutamate transporters in the hippocampus of patients with pharmaco-resistant temporal lobe epilepsy. **Brain: a journal of neurology**, v. 125, parte 1, p.32-43, Jan. 2002.

QUINTAS-JUNIOR, L. J. et. Avaliação da atividade anticonvulsivante de plantas do nordeste brasileiro. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.21, n.3, p.179-184, 2002.

RACINE, R. J. Modification of seizures activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. **Electroencephalography and Clinical Neurophysiology**, v. 32, n. 3 p.281-293, Mar. 1972.

REUTENS, D. C. et al. Magnetic stimulation of the brain in generalized epilepsy: reversal of cortical hyperexcitability by anticonvulsants. **Annals Neurology**, v. 34, n. 3, p. 351-355, Sept. 1993.

RICE, A. C; DELORENZO, R. J. NMDA receptor activation during status epilepticus is required for the development of epilepsy. **Brain Research**, v. 782, n. 1-2, p. 240-247, Jan.1998.

RICHENS, A.; CHADWICK, D. (Ed). **A Textbook of epilepsy**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1993. p. 1-22, 1993.

ROBIN, J. H. et al. Indigo, woad, and Tyrian Purple: important vat dyes from antiquity to the present. **Endeavour**, v.17, n.14, p.191-199, 1993.

RODRIGUES, M. C. A. **Análise neuroetológica e estudo da atividade pró-convulsivante e anticonvulsivante in vivo da peçonha bruta da aranha parawixia bistriata em ratos**: injeção central e periférica. 1999. 80 f. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia)-Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1999.

RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. et al. Bahiagrass for the management of meloidogyne arenaria in peanut. **Journal of Nematology**, v. 20, n. 4S, p. 110-114, Oct. 1988.

ROIG, J. T.; MESA, R. B. F. **Plantas medicinales aromáticas y venenosas de Cuba**. Habana: Editorial Ciencia y Técnica Instituto del Libro, 1974.

ROMCY-PEREIRA, R. N. et al. A semi-automated algorithm for studying neuronal oscillatory patterns: a wavelet-based time frequency and coherence analysis. **Journal of Neuroscience**, v.167, n. 2, p. 384-392, Jan. 2008.

SCHEFFER, I. E.; BERKOVIC, S. F. Generalized epilepsy with febrile seizures plus. A genetic disorder with heterogeneous clinical phenotypes. **Brain: a journal of neurology**, v.120, parte 3, p.479-490, Mar.1997.

SILVA, A. R. **Análise da ação anticonvulsivante e ansiolítica da Indigofera suffruticosa MILL em roedores**. 2011. 40 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina)- Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2011.

SIMON, J. E.; CHADWICK, A. F.; CRAKER, L. E. **Herbs**: an indexed bibliography, 1971-1980: the scientific literature on selected herbs, and aromatic and medicinal plants of the temperate zone. Hamden: Archon Books, 1984.

SNEAD, O. C. The gamma-hydroxybutyrate model of absence seizures: correlation of regional brain levels of gamma-hydroxybutyric acid and gamma-butyrolactone with spike wave discharges. **Neuropharmacology**, v. 30, n. 2, p. 161-167, Feb. 1991.

SOUZA, G. C. de et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.90, n. 1, p.135-143, Jan. 2004.

STERIADE, M.; CONTRERAS, D. Relations between cortical and thalamic cellular events during transition from sleep patterns to paroxysmal activity. **Journal of Neuroscience**, v.54, n. 15, p. 581-618, 1995.

TILELLI, C. Q. **Estudo das alterações comportamentais, eletrofisiológicas e morfológicas num modelo animal para estudo das epilepsias**. 2003. Tese (Doutorado em Fisiologia)-Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Fisiologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2003.

TURSKI, W. A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, v. 9, n. 3, p. 315-335, Sept.1983.

VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN, B. W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anatomia, Histoistologia, Embryologia**, v.31, n. 4, p. 214-223, Aug. 2002.

VEATCH, L. M.; BECKER, H. C. Lorazepam and MK-801 effects on behavioral and electrographic indices of alcohol withdrawal sensitization. **Brain Research**, v. 1065, n. 1-2, p.92-106, Dec. 2005.

VIEIRA, J. R. C. **Indigofera suffruticosa Mill**: um meio terapêutico alternativo anticâncer. 2007. 68 f. Dissertação (Mestrado em Patologia)- Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2007.

WALLACE, R. H. et al. Febrile seizures and generalized epilepsy associated with a mutation in the Na⁺-channel beta1 subunit gene SCN1B. **Nature Genetics**, v. 19, n. 4, p. 366-370, Aug. 1998.

WHITE, H. S. et al. Topiramate enhances GABA-mediated chloride flux and GABA-evoked chloride currents in murine brain neurons and increases seizure threshold. **Epilepsy Research**, v. 28, n. 3, p.167-179, Oct. 1997.

YUSTE, R.; MAJEWSKA, A.; HOLTHOFF, K. From form to function: calcium compartmentalization in dendritic spines. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 7, p. 653-659, July 2000.

ZARONI, M. et al. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.14, n. 1, 29-39, 2004.

ZIVANOVIC, D. et al. Ontogenetic study of metaphit-induced audiogenic seizures in rats. **Developmental Brain Research**, v. 155, n. 1, p. 42-48, Mar. 2005.

ZHANG, X. et al. Relations between brain pathology and temporal lobe epilepsy. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 14, p. 6052-6061, July 2002.

APÊNDICE A - OUTROS COMPORTAMENTOS EXIBIDOS PELOS RATOS DO GRUPO CONTROLE (VEÍCULO + PILO) E GRUPO (EXTRATO + PILO)

OUTROS COMPORTAMENTOS EXIBIDOS PELOS RATOS DO GRUPO CONTROLE (VEÍCULO + PILO) E GRUPO (EXTRATO + PILO)

Além das crises convulsivas, houve outras alterações comportamentais nos ratos do grupo controle (veículo + PILO) e experimental (extrato + PILO).

A quantidade de comportamentos de autolimpeza foi menor nos ratos do grupo experimental. Sabe-se que a imobilidade está diretamente correlacionada com as espículas de crise eletrográfica (dados não publicadoslaboratório), logo os ratos sob a proteção do extrato de *I. suffruticosa* tendem a apresentar menor quantidade de comportamentos ativos, como autolimpeza e exploração (figuras 1 e 2 do Apêndice A)

Figura 1 Quantidade de Auto-limpeza apresentadas pelo grupo Controle Média= $77,86 \pm 44,29$ N=9; Grupo Experimental Média= $39,80 \pm 8,243$ N=9; " $38,06 \pm 53,58$ "; $p=0,0031$

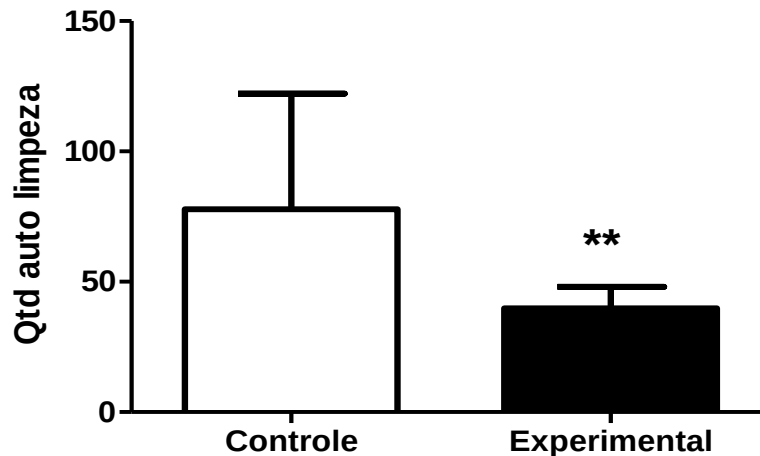
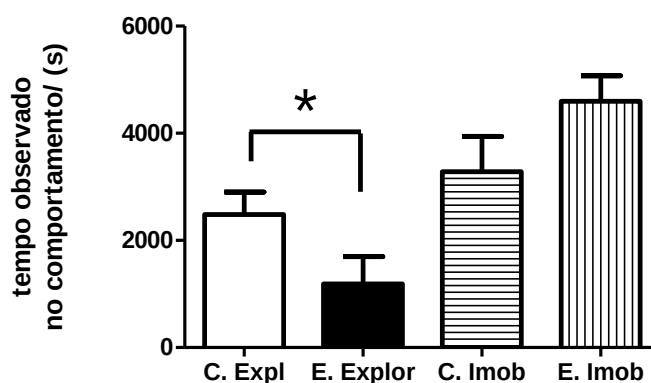


Figura 2 - Tempo de movimentação e imobildade apresentados pelos grupos. O grupo controle (veículo + PILO) apresentou maior tempo de exploração que o grupo experimental (extrato + PILO). Não houve diferença significativa entre o tempo de imobildade ($p>0,05$)



Os experimentos com sulfato de indigo resultaram em dados muito semelhantes ao do extrato aquoso (figuras 3 e 4 do Apêndice A)

Figura 3 - Quantidade de Auto-limpeza apresentadas pelo grupo Controle Média="127,3 ± 106,1 N=3; Grupo Experimental Média="19,67 ± 11,26 N=3, $p=0,0223$.

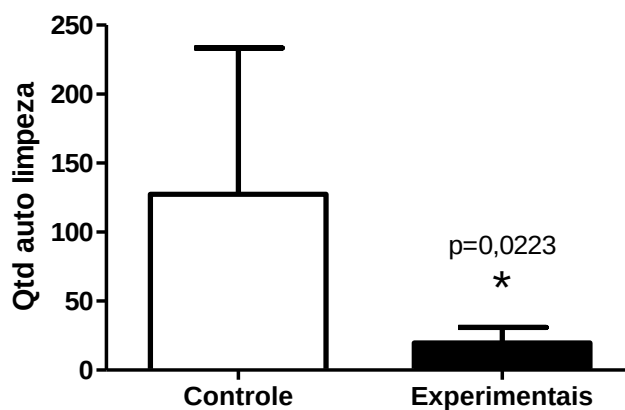
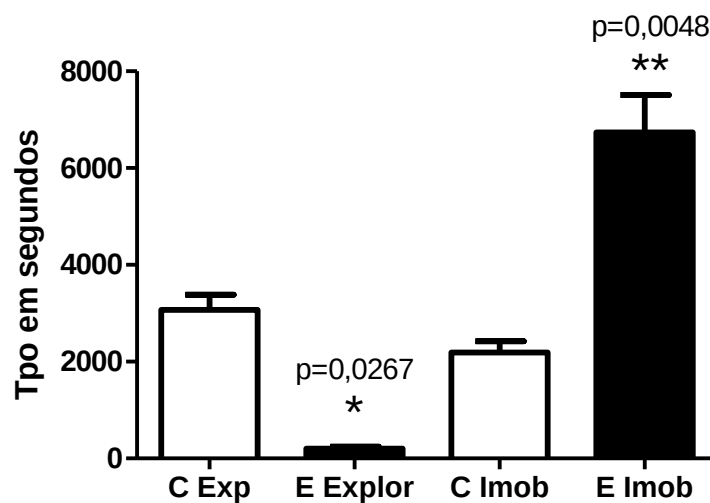


Figura 4 - Tempo de movimentação e imobilidade apresentados pelos grupos. Houve diferença significativa entre os grupos, Exploração: Controle Média="3068 $\pm$ 315,0 N=3"; Experimentais Média= "204,7 $\pm$ 36,63 N=3" , $p=0,0267$. Imobilidade Controle Média="2193 $\pm$ 228,1 N=3"; Experimentais Média="6739 $\pm$ 769,5 N=3, $p=0,0048$.



APÊNDICE B - ANÁLISES COMPLEMENTARES DEMONSTRANDO QUE O EFEITO ANTICONVULSIVANTE DO EXTRATO DE *I. SUFFRUTICOSA* NÃO SE DEVE A UM EFEITO DE HIPEROSMOLARIDADE

ANÁLISES COMPLEMENTARES DEMONSTRANDO QUE O EFEITO ANTICONVULSIVANTE DO EXTRATO DE *I. SUFFRUTICOSA* NÃO SE DEVE A UM EFEITO DE HIPEROSMOLARIDADE

a) Smolaridade

Foram utilizados 6 animais sendo 3 do Grupo experimental e 3 do Grupo controle para, nesses, avaliar os efeitos do extrato injetado diretamente no hipocampo. Nesse estudo foram utilizados dados dos animais apenas microinjetados aqueles com o extrato e estes com a solução salina. Portanto, antes da microinjeção de pilocarpina. Foram observados os seguintes resultados:

b) Comportamento

Crises: não foi observada nenhuma crise neste período.

WDS: apenas um animal do grupo experimental apresentou este comportamento o efetuando apenas uma só vez. Os animais do grupo controle não o apresentaram nenhuma vez.

Auto-limpeza: os animais apresentaram este comportamento, porém os resultados podem ser considerados semelhantes uma vez que na análise estatística não foi verificada diferença significativa entre os grupos (Figura 1).

Figura 1 - Quantidade de Auto limpeza apresentado pelos animais quando apenas microinjetados, os do Grupo controle(N=3) com solução salina 0,9% e os do Grupo Experimentais(N=3) com o extrato da *Indigofera suffruticosa*. Média controle= $26,33 \pm 9,821$ N=3, Experimentais $15,33 \pm 7,055$ N=3, $p=0,6809$, não significante.:

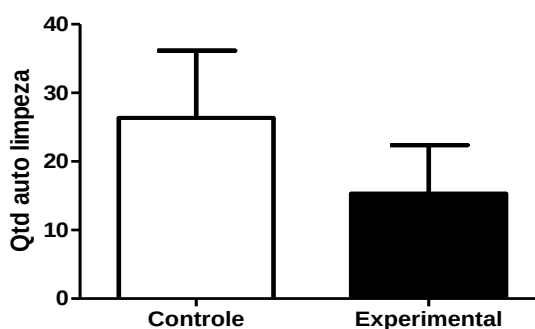
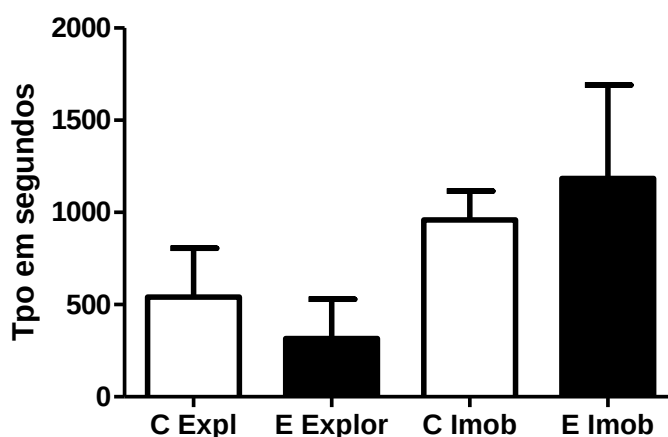


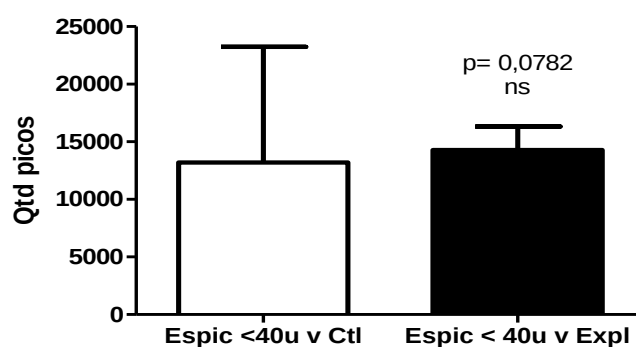
Figura 2 - Gráfico comparativo dos tempos de movimentação X imobilidade apresentado pelos animais quando apenas microinjetados, os do Grupo controle(N=3) com solução salina 0,9% e os do Grupo Experimentais(N=3) com o extrato da *Indigofera suffruticosa*. Média Exploração= 225,3 ± 0,7151 N=3, Média Imobilidade = 225,3 ± 0,7151 N=3, $p > 0,05$ não significante



c) Crise Eletrográfica

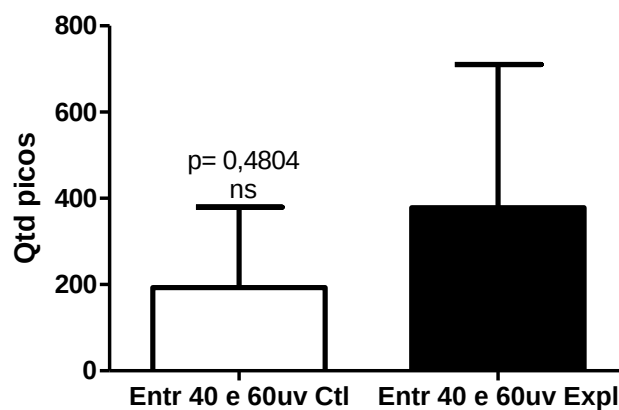
Espículas menores que 40μV:

Figura 3 - Gráfico comparativo das crises eletrográficas após registro do potencial de campo local apresentado pelos animais quando apenas microinjetados, os do Grupo controle(N=3) com solução salina 0,9% e os do Grupo Experimentais(N=3) com o extrato da *Indigofera suffruticosa*. Média do Grupo Controle 13190 ± 10053 N=3, Média do Grupo Experimentais 14290 ± 2028 N=3, $p = 0,0782$, não significante.



Espículas menores que 40 μV e menores que 60 μV

Figura 4 - Gráfico comparativo das crises eletrográficas após registro do potencial de campo local apresentado pelos animais quando apenas microinjetados, os do Grupo controle(N=3) com solução salina 0,9% e os do Grupo Experimentais(N=3) com o extrato da Indigofera suffruticosa. Média do Grupo Controle 193,0 $\pm$ 186,5 N=3, Média do Grupo Experimentais 378,7 $\pm$ 331,7 N=3, p=0,4804, não significativo



Espículas maiores que 60 μV

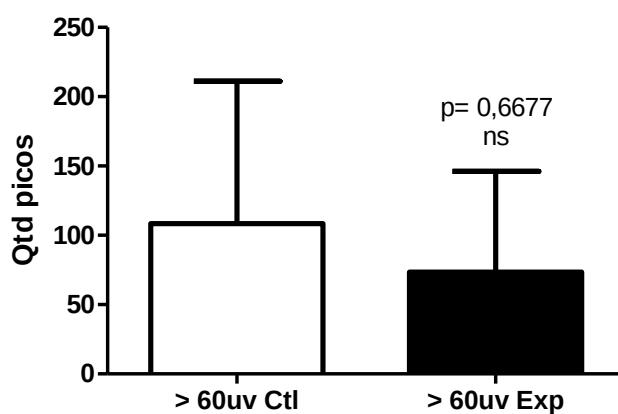


Figura 5 - Gráfico comparativo das crises eletrográficas após registro do potencial de campo local apresentado pelos animais quando apenas microinjetados, os do Grupo controle(N=3) com solução salina 0,9% e os do Grupo Experimentais(N=3) com o extrato da *Indigofera suffruticosa*. Média do Grupo Controle $108,3 \pm 102,9$ N=3, Média do Grupo Experimentais $73,33 \pm 72,83$ N=3, p=0,6677, não significativa