

**Universidade de Ribeirão Preto**  
**UNAERP**  
**Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia**

**DENISE DIAS DE OLIVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DAS ATIVIDADES ANSIOLÍTICA  
E ANTICONVULSIVANTE DA VITEXINA**

**Ribeirão Preto**

**2019**

DENISE DIAS DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DAS ATIVIDADES ANSIOLÍTICA  
E ANTICONVULSIVANTE DA VITEXINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto UNAERP. Área de concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde.

**Orientador:** Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni.

**Ribeirão Preto**

**2019**

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento  
Técnico da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

O48c Oliveira, Denise Dias de, 1989-  
Caracterização farmacológica das atividades ansiolítica e  
anticonvulsivante da vitexina / Denise Dias de Oliveira. – Ribeirão  
Preto, 2019.  
84 f.: il. color.

Orientador: Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni.

Tese (doutorado) - Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,  
Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2019.

1. Ansiedade. 2. Epilepsia. 3. GABA. 4. Vitexina. I. Título.

CDD 660

DENISE DIAS DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO FARMACOLÓGICA DAS ATIVIDADES ANSIOLÍTICA  
E ANTICONVULSIVANTE DA VITEXINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão  
Preto UNAERP. Área de concentração:  
Biotecnologia Aplicada à Saúde.

**DENISE DIAS DE OLIVEIRA**

**ATIVIDADES ANSIOLÍTICAS E ANTICONVULSIVANTE DE VITEXINA:  
ESTUDO DE NEUROETOLOGIA E NEUROQUÍMICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

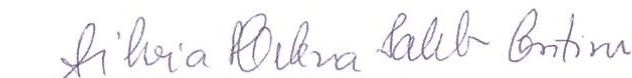
Data da defesa: 17 de junho de 2019

Resultado: Aprovada

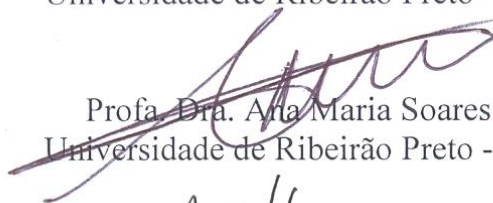
**BANCA EXAMINADORA**



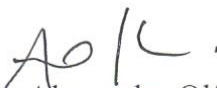
Prof. Dr. Renê de Oliveira Beleboni  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Profa. Dra. Silvia Helena Taleb Contini  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Profa. Dra. Ana Maria Soares Pereira  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP



Profa. Dra. Alexandra Olímpio Siqueira Cunha  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP



Prof. Dr. Norberto Cysne Coimbra  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

Dedico este trabalho a você que,  
em todos os atos, em todas as palavras  
tem um olhar compassivo ao outro.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Ele que me ensinou nesses anos a observar, em pequenas situações, as respostas das minhas indagações. Que me auxiliou e ainda auxilia durante a dolorosa, porém gratificante, evolução (profissional e humana). Obrigada Deus.

Aos meus pais, João e Delcida, que se despiram de preconceitos para apoiar minhas escolhas. Cada um com seu jeitinho contribuiu para eu conseguir, com tranquilidade, ficar longe e finalizar mais um objetivo.

À minha irmã Michele, com quem eu me aproximei ainda mais com a distância. Quem também me proporcionou sentir um amor transcendente, que é o de ser tia/madrinha.

À você meu sobrinho/afilhado João Lucas, que com pouca idade me traz tanta felicidade; que quebra meu coração quando, mal sabendo falar, me chama pela casa; que dá esse sorriso sapeca (e com poucos dentes) e me faz esquecer qualquer acontecimento ruim. Te amo!

Ao meu noivo Jean, que é brisa leve em meio a chuva e tempestade, que compreende minha ausência, que me incentiva, que acredita, que tem os mesmos princípios, que tem paciência, que me ajuda a crescer.

Aos meus tios, tias, primos e primas que me proporcionam tanto amor e momentos de descontração.

À Flavinha e Miriam, que acreditam e me incentivam em qualquer ocasião.

Aos meus sogros, tios, tias e primos que compõem essa família que ganhei e amo como se fosse a minha. Aos amigos, que agora são meus também!

Aos meus amigos de laboratório, Cássio, Érica, Suelen, Bruno, Luis, Raphaela e Anieli pelo compartilhamento de conhecimentos e diversos momentos de descontrações.

Aos meus amigos Camila, Bruna Cestari, Lucas, Tamires, Mayara, Letícia, Bianca, Sara, Jana, Natália, Franciele, Bruna Ferrari, Lilian, Laís, Carla, Marina, Bira, Isabela e Tatiana. Cada um de vocês me doou um pouquinho de força para terminar mais essa etapa.

Aos técnicos e profissionais de laboratórios que auxiliaram em meu trabalho: Carla, Carlinhos e Marilena.

Aos funcionários da Universidade e principalmente da pós-graduação.

Aos professores que participaram, mesmo que indiretamente, desses quatro anos.

Ao meu orientador Renê, que me recebeu, acreditou, insistiu e que me fez evoluir grandiosamente.

À UNAERP e Capes pelo auxílio financeiro.

*O que você ganha, ao atingir seu objetivo,  
não é tão importante quanto o que  
você se torna ao atingir seu objetivo*

*Zig Ziglar  
(Hilary Hinton)*

## RESUMO

A ansiedade é um estado emocional frequentemente negativo, caracterizado por sentimentos de preocupação e apreensão, acompanhado por manifestações somáticas, cognitivas e comportamentais específicas. Além disso, afeta quase 300 milhões de pessoas em todo o mundo e envolve a atividade de várias vias cerebrais e diferentes neurotransmissores como serotonina, noradrenalina, dopamina e GABA. Semelhante à ansiedade, a epilepsia ocorre quando o equilíbrio GABAérgico é perturbado, desencadeando nesse caso as convulsões. O GABA é o principal neurotransmissor inibitório no córtex cerebral e mantém o tônus inibitório que contrabalança a excitação neuronal (sistema glutamatérgico). Aproximadamente 50 milhões de pessoas em todo o mundo têm epilepsia e 30 % destas não respondem adequadamente ao tratamento disponível. A busca por novos compostos de diferentes naturezas capazes de aumentar ou diminuir as atividades sinápticas GABAérgica e/ou glutamatérgica respectivamente, tem sido de interesse no desenvolvimento racional de fármacos anticonvulsivantes e ansiolíticos. A vitexina é constantemente citada por ser majoritária ou se apresentar em altas concentrações em plantas com atividade ansiolítica e anticonvulsivante. De fato, a condição de entidade majoritária de um composto nem sempre pode se correlacionar com a atividade farmacológica observada, necessitando então do estudo do princípio ativo em condição isolada. O objetivo deste estudo foi investigar os efeitos ansiolítico (agudo), anticonvulsivante (agudo e crônico) e no desempenho locomotor da administração crônica intraperitoneal da vitexina, bem como investigar a ação dessa flavona em canais iônicos de sódio e potássio e potencial toxicidade hepatorenal após tratamento crônico. Vitexina (0,75; 1,25; 2,5 mg/Kg, i.p) apresentou atividade ansiolítica nos testes de campo aberto, labirinto em cruz elevado e caixa claro-escuro. O espectro de sua atividade anticonvulsivante foi caracterizado pela realização de diferentes modelos de crises e os resultados mostram que a vitexina não apresentou atividade anticonvulsivante em modelos clássicos para triagem glutamatérgica. Por outro lado, a vitexina (5 mg/Kg, i.p) demonstrou forte ação anticonvulsivante ao se utilizar PTZ e picrotoxina, convulsivantes envolvidos com a via GABAérgica. O *Kindling* induzido por PTZ (teste crônico) foi utilizado para estudar a epileptogênese e como resultado observou-se que a severidade máxima das convulsões diminuiu e a latência para o estágio 8 aumentou quando os animais foram tratados com vitexina (2,5 mg/kg, i.p). Após a avaliação crônica, o teste rotarod foi utilizado para investigar a possibilidade de comprometimento locomotor e os resultados evidenciaram que a vitexina não prejudica a coordenação motora dos roedores. A avaliação da toxicidade renal e hepática demonstrou que o tratamento crônico com vitexina não causou aumento nos níveis de ALT, AST, creatinina e ureia. Ao investigar a ação da vitexina por meio do *voltage clamp*, foi possível observar que este flavonoide não apresentou modulação nos canais iônicos utilizados na investigação. Os resultados sugerem que a vitexina apresenta atividade ansiolítica e marcado efeito anticonvulsivante, tanto após tratamento agudo quanto crônico, sem comprometimento locomotor e sem toxicidade hepática e renal. Finalmente, os efeitos da vitexina parecem não se relacionar com os canais de potássio e sódio, mas sim com a modulação de vias GABAérgicas.

**Palavras-Chaves:** Ansiedade. Epilepsia. GABA. *Kindling* induzido por pentilenotetrazol. Vitexina.

## ABSTRACT

Anxiety is a frequent negative emotional state characterized by feelings of worry and apprehension, and accompanied by specific somatic, cognitive, and behavioral manifestations. In addition, it affects nearly 300 million people worldwide and involves the activity of several brain pathways and different neurotransmitters like serotonin, noradrenaline, dopamine and GABA. Similar to anxiety, epilepsy occurs when GABAergic balance is disturbed, triggering seizures in this case. GABA is the main inhibitory neurotransmitter in the cerebral cortex and maintains the inhibitory tone that counterbalances the neuronal excitation (glutamatergic system). Approximately 50 million people worldwide have epilepsy and 30% do not respond adequately to treatment. The search for new compounds of different chemical and biological natures capable of increasing or decreasing GABAergic and/or glutamatergic synaptic activities, respectively, has aroused interest in the rational development of anticonvulsants and anxiolytics. Vitexin is often reported to be the majority or to be present at high concentrations in plants with anxiolytic and anticonvulsant activity. In fact, the condition of the majority of a compound cannot always correlate with the pharmacological activity observed, necessitating the study of the active in an isolated condition. The aim of this study was to investigate the anxiolytic (acute), anticonvulsant (acute and chronic) and locomotor effects of intraperitoneal administration of vitexin, as well as to investigate the action of this flavone on ionic sodium and potassium channels and hepatorenal toxicity after chronic treatment. Vitexin (0.75, 1.25, 2.5 and 5 mg/kg, i.p) showed anxiolytic activity in open field tests, elevated plus maze and light-dark box. The spectrum of its anticonvulsant activity was characterized by the performance of different seizure models and the results demonstrate that vitexin did not present anticonvulsant activity in classic models for glutamatergic screening. The spectrum of its anticonvulsant activity was characterized by the performance of different seizure models and the results demonstrate that vitexin did not demonstrate anticonvulsant activity in classical models for glutamatergic screening. On the other hand, vitexin (1.25, 2.5 and 5 mg/kg, i.p) demonstrated anticonvulsant action when using PTZ and picrotoxin, convulsants involved with the GABAergic pathway. The PTZ-Induced Kindling (chronic test) was used to study epileptogenesis and as a result it was observed that the maximum severity of the seizures decreased and the latency to stage 8 increased when the animals were treated with vitexin (2.5 mg/kg, i.p). After the chronic evaluation, the rotarod test was used to investigate the possibility of locomotor impairment and the results showed that vitexin does not impair the motor coordination of rodents. The assessment of renal and hepatic toxicity showed that chronic treatment with vitexin did not cause increased levels of ALT, AST, creatinine, and urea. When investigating the action of vitexin by means of voltage clamp, it was possible to observe that this flavonoid did not present modulation in the ionic channels used in the investigation. The results suggest that vitexin has anxiolytic activity and anticonvulsive effect, both after acute and chronic treatment, without locomotor impairment and without hepatic and renal toxicity. Finally, the effects of vitexin appear to be unrelated to the potassium and sodium channels, but it appears to be related to the positive modulation of GABAergic pathways.

**Keywords:** Anxiety. Epilepsy. GABA. Pentilenotetrazole Induced Kindling. Vitexin

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação operacional básica para os tipos de crises epiléticas .....	16
Figura 2 - Classificação das epilepsias .....	18
Figura 3 - Estrutura química básica e comum dos flavonoides.....	28
Figura 4 - Estrutura química das principais classes dos flavonoides.....	28
Figura 5 - Estrutura química da vitexina.....	30
Figura 6 - Ilustração do Labirinto em Cruz Elevado .....	34
Figura 7 - Esquema representativo da arena utilizada no teste de campo aberto .....	35
Figura 8 - Ilustração da caixa claro-escuro .....	36
Figura 9 - Protocolo experimental de <i>kindling</i> químico por PTZ.....	38
Figura 10 - Ilustração do aparelho rotarod utilizado em ratos.....	38
Figura 11- Foto da espécie <i>Xenopus laevis</i> e coleção de oócitos .....	39
Figura 12 - Movimentos padrões presentes no <i>grooming</i> .....	54
Figura 13 - Flavona ajustada ao modelo farmacofórico .....	59
Figura 14 - Estrutura geral dos benzodiazepínicos e flavonoides. ....	61
Figura 15 - Relação estrutura atividade de vitexina .....	63

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito do tratamento de diferentes doses de vitexina na análise de TBA e TBF (A) e %TBA (B) em LCE.....	42
Gráfico 2 - Teste de campo aberto.....	43
Gráfico 3 - Teste claro escuro.....	44
Gráfico 4 - Porcentagem de animais protegidos contra crises convulsivas tônico-clônicas desencadeadas pelo convulsivante ácido caínico, NMDA, picrotoxina e PTZ.....	46
Gráfico 5 - Efeito do pré-tratamento com vitexina no desenvolvimento de crise induzida por PTZ em modelo crônico ( <i>Kindling</i> ).....	48
Gráfico 6 - Teste de <i>rotarod</i> em modelo crônico .....	49
Gráfico 7 - Parâmetros bioquímicos de ratos tratados em modelo crônico com vitexina .....	49
Gráfico 8 - Ensaio de citotoxicidade em oócitos nus para o flavonoide vitexina .....	50
Gráfico 9 - Estudo da interação vitexina com as diferentes isoformas de canais de K <sup>+</sup> .	51
Gráfico 10 - Estudo da interação de vitexina com as diferentes isoformas de canais de Na <sup>+</sup> .....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Drogas antiepilépticas comumente utilizadas e seus mecanismos de ação ...	22
Tabela 2 - Efeitos farmacológicos de vitexina .....	30
Tabela 3 - Índice de desempenho convulsivante .....	37
Tabela 4 - Canais estudados por meio de <i>voltage-clamp</i> .....	40
Tabela 5 - Tempo de Latência para início das crises de classe 8 em modelo agudo.....	47

## LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	- Alanina aminotransferase
AMPA	- Ácido $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-soxazol-4-propiónico
AST	- Aspartato aminotransferase
CID	- Classificação Internacional de Doenças
CN	- Controle negativo
CV	- Controle do veículo
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DSM-5	- Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais
DZP	- Diazepam
EEG	- Eletroencefalograma
GABA	- Ácido $\gamma$ -aminobutírico
i.c.v	- Intracerebroventricular
i.p	- Intraperitoneal
ILAE	- <i>International League Against Epilepsy</i>
KA	- Cainato
LCE	- Labirinto em cruz elevado
NMDA	- N-metil D-Aspartato
OMS	- Organização Mundial da Saúde
PTZ	- Pentilenotetrazol
SBNEC	- Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento
SNC	- Sistema nervoso central
TBA	- Tempo de permanência nos braços abertos
TBF	- Tempo de permanência nos braços fechados
%TBA	- Porcentagem de tempo nos braços abertos

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 EPILEPSIA.....	16
1.2 ANSIEDADE.....	23
1.3. FLAVONOIDES.....	27
1.3.1 VITEXINA .....	29
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	32
2.1 OBJETIVO GERAL .....	32
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
3.1 FÁRMACOS E REAGENTES.....	33
3.2 ANIMAIS .....	33
3.3 BIOENSAIOS USADOS NO ESTUDO DOS EFEITOS ANSIOLÍTICOS .....	33
3.3.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	33
3.3.2 Teste do Campo Aberto.....	34
3.3.3 Teste de Transição Claro-Escuro .....	35
3.4 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE EM MODELO AGUDO	36
3.5 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE EM MODELO CRÔNICO	37
.....	37
3.5.1 <i>Kindling</i> por Indução Química (PTZ) .....	37
3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA E ESTADO DE	38
SEDAÇÃO/VIGÍLIA EM MODELO CRÔNICO .....	38
3.7 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE FUNÇÃO RENAL E	39
HEPÁTICA .....	39
3.8 ELETROFISIOLOGIA ( <i>VOLTAGE-CLAMP</i> ).....	39
<b>4 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	40
<b>5 RESULTADOS</b> .....	41
5.1 ESTUDO COMPORTAMENTAL PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO	41
ANSIOLÍTICO DE VITEXINA.....	41
5.2 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE EM MODELO AGUDO DE	45
CONVULSÃO.....	45
5.3 BIOENSAIOS EM MODELO CRÔNICO DE EPILEPSIA .....	47
5.3.1 <i>Kindling</i> por Indução Química.....	47
5.3.2 Avaliação do Desempenho Locomotor em Modelo Crônico .....	48
5.3.3 Avaliação dos Parâmetros Bioquímicos.....	49
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	66
REFERÊNCIAS .....	69
ANEXO.....	84

# 1 INTRODUÇÃO

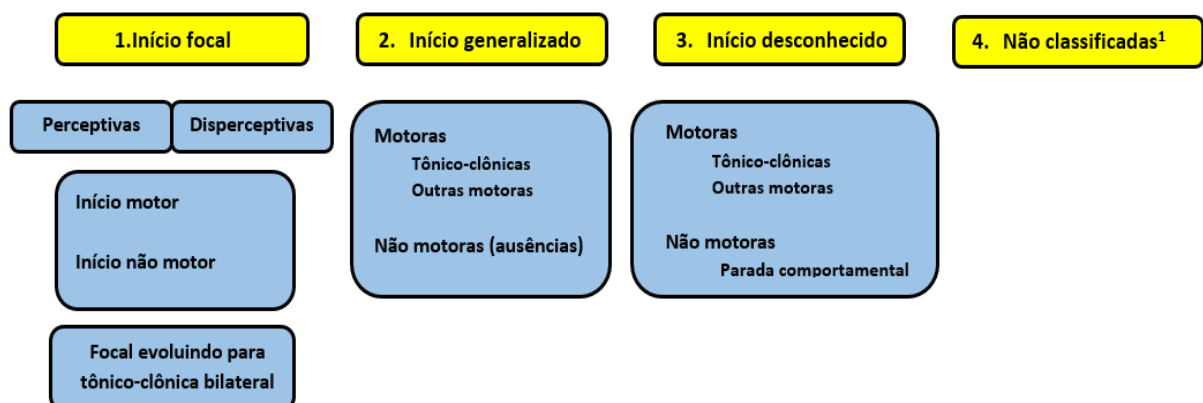
## 1.1 EPILEPSIA

A epilepsia é uma das doenças neurológicas mais comuns e afeta a população sem distinção de idade, raça e nacionalidade (BOER et al., 2008). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recentemente divulgou que essa doença chega a atingir 50 milhões de pessoas no mundo. Em países de alta renda, os casos novos anuais são entre 30 e 50 por 100.000 pessoas na população geral e em países de renda baixa e média, esse número pode ser até duas vezes maior (OMS, 2018).

A *International League Against Epilepsy* (ILAE), em 2014, instituiu a definição prática de epilepsia em três circunstâncias distintas: 1) ocorrência de, pelo menos, duas crises epiléticas não provocadas, com um intervalo (tempo) maior que 24 horas entre elas ou 2) uma crise epilética não provocada e a probabilidade/risco de recorrência após duas crises epiléticas não provocadas, nos próximos 10 anos ou 3) diagnóstico de síndrome epilética (FISHER, 2017).

Uma das principais características da epilepsia é a presença de crises epiléticas que se manifestam pela atividade anormal, excessiva e síncrona de neurônios, o que resulta em diversos fenômenos de acordo com as redes neuronais envolvidas (FISHER et al., 2005). A figura 1 retrata a classificação simplificada dos tipos de crises epiléticas conforme a última atualização da ILAE. Sumariamente, as crises são classificadas de acordo com o local de seu início (focal, generalizado ou desconhecido) em conjunto com os sintomas associados.

Figura 1 - Classificação operacional básica para os tipos de crises epiléticas



<sup>1</sup> Por informação inadequada ou impossibilidade de inserir nas outras categorias.

As crises de início focal podem, opcionalmente, manter o grau de percepção diante do acontecimento. Nesse contexto, quando a percepção é preservada pode ser chamada de crise parcial simples (consciência de si e do ambiente) ou se há comprometimento, é nomeada crise parcial complexa (perturbação no nível da consciência) (BERG et al., 2010).

A crise perceptiva pode apresentar alterações motoras (mãos, pés ou face), sensoriais (dormência e/ou formigamento), autonômicas (palidez e sudorese) ou psíquicas (medo e variação temporária da percepção da realidade). Por outro lado, a crise de início focal disperceptiva é a mais comum no adulto e pode ser precedida de sintomas prodrômicos (auras) ou crise parcial simples. O indivíduo não responde a estímulos e geralmente apresenta movimentos repetitivos com posterior sonolência, confusão mental e amnésia referente ao período de crise (FISHER et al., 2017).

Outra subcategoria de crises focais é a tônico-clônica bilateral generalizada (anteriormente conhecida como crise parcial secundariamente generalizada), que como a própria designação indica, caracteriza-se por início focal, porém se generaliza posteriormente (FISHER et al., 2017).

As crises de início generalizado envolvem redes neuronais distribuídas de forma bilateral, podem ser assimétricas e não incluem obrigatoriamente todo o córtex. Ademais, as crises generalizadas são divididas em motoras e não motoras (ausência), sendo que o primeiro termo indica a possibilidade de diversas manifestações motoras como (ZUBERI; SYMONDS, 2015):

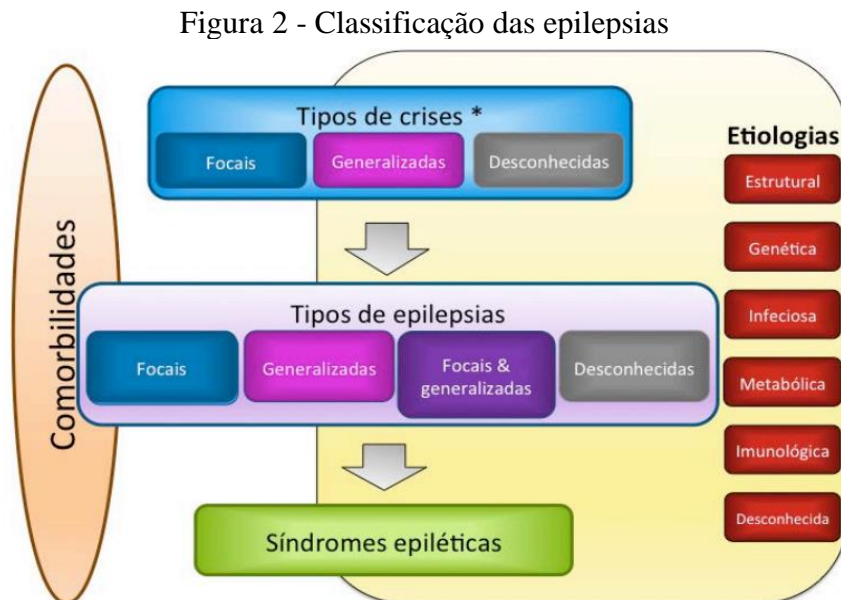
- a) Tônico-clônicas: ocorre aumento do tônus na fase inicial (tônica) e geralmente o paciente perde a consciência e a postura, ocorre extensão das costas, pescoço e pernas, flexão dos antebraços, desvio ocular e respiração ruidosa. Na fase clônica, de forma violenta, o corpo contrai e as extremidades se contorcem e esses eventos usualmente são acompanhados por apnéia, relaxamento esfínteriano e mordedura de língua, durante aproximadamente um minuto.
- b) Clônicas: espasmos rítmicos bilaterais que ocorrem em intervalos entre um a dois segundos.
- c) Tônicas: contração da musculatura axial, ou das raízes dos membros (crises tônicas axorizoméricas) ou do corpo todo, usualmente com duração superior a cinco a dez segundos;
- d) Mioclônica: contrações musculares breves isoladas ou em série;
- e) Atônicas: redução ou perda repentina do tônus muscular sem características mioclônicas ou tônicas com o envolvimento da cabeça, tronco ou membros.

- f) Espasmos epilépticos: contração de músculos axiais e flexão do tronco e abdução e elevação de ambos os membros superiores em posição saudatória.

As crises conhecidas como não motoras ou de ausência ocorrem principalmente na infância, duram aproximadamente 2 a 20 segundos e as manifestações clínicas evidenciam a perda repentina da consciência, que pode ser acompanhada de olhar fixo, inexistência de resposta a estímulos, manutenção postural, *flutter* palpebral e automatismos das mãos e face (TENNEY; GLAUSER, 2013).

As crises que inicialmente foram classificadas como de início desconhecido podem, a posteriori, ser classificadas como de início focal ou generalizado ou ainda se associarem a eventos comportamentais motores e não motores. As crises inseridas no grupo referem-se às situações onde há informações incompletas ou natureza incomum da crise. Além disso, essa categorização deve ocorrer de forma excepcional, quando há a certeza da presença de uma crise, mas sem certeza da classificação (FISHER et al., 2017).

A classificação dos tipos de epilepsia está correlacionada com o local de início da crise e dessa maneira, seguindo as características intrínsecas, ocorre a categorização das epilepsias (Figura 2).



Fonte: Scheffer, et al. 2017

Na definição dos tipos de epilepsia, foi acrescentado um grupo denominado Focais/Generalizadas uma vez que alguns pacientes apresentam tanto início focal quanto generalizado, como observado na Síndrome de Dravet e a Síndrome de Lennox-Gastaut. As

síndromes epilépticas englobam as características que ocorrem em conjunto com o tipo de crises, o eletroencefalograma (EEG) e as alterações observadas em exames de neuroimagem (SCHEFFER, et al. 2017).

Entre as causas das crises e/ou epilepsia, a etiologia estrutural se refere a uma anormalidade visível em estudos de neuroimagem estrutural que pode ter causa genética (mutações em genes, como o GPR56), adquirida (infecções, encefalopatia hipóxico-isquêmica e traumas) ou ambas. A epilepsia considerada de fundo genético compreende todas as mutações genéticas, conhecidas ou presumidas, e as crises epilépticas representam o sintoma central da doença, como o que ocorre na Epilepsia Neonatal Benigna Familiar (LOPES-CENDES, 2008).

As infecções estão entre as causas mais comuns de crise convulsiva ou, mesmo, epilepsia e são usualmente manifestadas na meningite, tuberculose, encefalites virais, infecções por citomegalovírus entre outros. Além disso, os distúrbios metabólicos como a deficiência cerebral de folato, aminoacidopatias e uremia também podem influenciar no surgimento da doença (LEE et al., 2018).

O fator imune também está entre as causas de epilepsia e esta condição limita-se à inflamação imuno-mediada no sistema nervoso central, como a que ocorre na encefalite anti-receptor NMDA e a encefalite anti-LGI1. Em diversas situações, o diagnóstico específico não é possível de se realizar, e nestes casos, a etiologia é considerada desconhecida (SCHEFFER, et al. 2017).

Como visto, a epilepsia é uma desordem neurológica crônica de causa variada. É consenso que as crises sejam desencadeadas por descargas anormais e excessivas dos neurônios excitatórios (glutamatérgicos) em diferentes estruturas cerebrais, bem como pela diminuição da ação de neurônios inibitórios (GABAérgicos), desencadeando hiperexcitabilidade com consequente aparecimento das crises (WERNER; COVENAS, 2011).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central (SNC). Sua ação é mediada por receptores glutamatérgicos que participam de forma vital na mediação das sinapses excitatórias. Na membrana pós-sináptica, o glutamato promove suas ações em dois grupos de receptores específicos classificados como ionotrópicos e metabotrópicos (REINER; LEVITZ, 2018).

O glutamato ao se ligar aos domínios extracelulares das subunidades dos receptores ionotrópicos provoca alterações na conformação de toda a proteína. Dessa maneira, ocorre o fluxo de cátions através da membrana plasmática o que leva a despolarização da célula pós-sináptica. Os receptores ionotrópicos são o N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-soxazol-4-propiónico (AMPA) e cainato (KA). Fisiologicamente os receptores

AMPA e KA são relacionados à transmissão sináptica rápida no SNC, enquanto que o NMDA permanece aberto por mais tempo, o que permite o fluxo significativo de cátions (FEATHERSTONE, 2009).

Os receptores NMDA possuem sete subunidades diferentes (GluN1, GluN2A, GluN2B, GluN2C, GluN2D, GluN3A e GluN3B) e considera-se que na fenda sináptica as subunidades mais presentes são a GluN1 e GluN2A e nas regiões extrasinápticas as subunidades GluN1 e GluN2B. Vários co-agonistas, como a glicina e a serina, atuam na modulação do receptor NMDA, contudo o principal neurotransmissor responsável por ativá-lo é o glutamato. Esse receptor é altamente permeável a cálcio e sódio, para promover na despolarização, e também a potássio para regular a repolarização. Além disso, o magnésio é o responsável pelo bloqueio desse receptor NMDA (PAOLETTI; BELLONE; ZHOU, 2013).

Os receptores AMPA e KA são também acoplados a canais iônicos permeáveis a sódio, potássio e cálcio. As subunidades GluR1 a GluR4 têm maior afinidade por AMPA, enquanto as subunidades GluR5 a GluR7 são seletivas para KA (PEREIRA, 2006).

Os receptores metabotrópicos foram descritos primeiramente em 1985 e até o momento foram identificados oito subtipos (mGluR1 a mGluR8), sendo que eles modulam a produção de segundo mensageiro via proteínas G (KUBO; ITO, 2004; MARCAGGI; ATTWELL, 2004). Os receptores metabotrópicos são divididos em 3 subfamílias com base na homologia da sequência de aminoácidos, mecanismos de transdução de sinal e farmacologia do receptor. O grupo I inclui as subfamílias mGluR1 e mGluR5, o grupo II a subfamília mGluR2 e mGluR3 e o grupo III inclui mGluR 4, 6, 7, 8 (PEREIRA, 2006).

Após liberação do glutamato na fenda sináptica e ligação do mesmo em seus receptores, sua ação é finalizada por proteínas de transporte específicas (EAAT1-5), que retiram o glutamato da fenda sináptica, realocando-o para neurônios ou células da glia. A retirada do glutamato da fenda sináptica é de grande importância, uma vez que o excesso de ação desse neurotransmissor pode causar morte neuronal. A excitotoxicidade mediada por glutamato está presente na etiogênese de diferentes distúrbios neurológicos, como isquemia, doença de Alzheimer, esquizofrenia e epilepsia (DONG; WANG; QIN, 2009).

Outro neurotransmissor essencial na regulação da transmissão dos impulsos nervosos é o GABA (ácido  $\gamma$ -aminobutírico). Este é o principal neurotransmissor inibitório do SNC (NAYLOR, 2010) e após a liberação na fenda sináptica, atua através de receptores ionotrópicos (GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>C</sub>) e metabotrópicos (GABA<sub>B</sub>), os quais apresentam diferentes sensibilidades farmacológicas, distribuição e características cinéticas (CIRANNA et al., 2003).

Os receptores GABA<sub>A</sub> e GABA<sub>C</sub> (ionotrópicos) estão diretamente acoplados a canais para íons de cloreto, gerando rápida resposta inibitória com consequente hiperpolarização neuronal. Por outro lado, os receptores GABA<sub>B</sub> (metabotrópicos) produzem inibição lenta e prolongada, uma vez que apresentam canais de cálcio e potássio ligados a proteína G. A ação inibitória do GABA é finalizada por meio de proteínas específicas de transporte (GAT1-4), que do mesmo modo do receptor, apresentam diferenças bioquímicas e farmacológicas entre si (MELDRUM; ROGAWSKI, 2007).

Quando a ação do GABA é diminuída, e, sobretudo, quando é sobrepujada por um predomínio relativo da neurotransmissão excitatória glutamatérgica, ocorre a maior predisposição do cérebro para o aparecimento de distúrbios neurológicos. Na patogenia das epilepsias, sobretudo nas localizadas, a diminuição da atividade GABAérgica se apresenta como hipótese coerente. Baseando-se nesta premissa, as vias GABAérgicas tornaram-se alvo de diferentes ferramentas neuroetológicas na indução de convulsões químicas em diferentes modelos experimentais, e também, alvo de diferentes fármacos usados na prática clínica para o controle da epilepsia (MELDRUM, 1989).

Diversas são as drogas utilizadas para prevenir as crises causadas pela epilepsia e o primeiro registro foi em 1857 ao se utilizar o sal de brometo de potássio (LOCOCK, 1857). Ao longo da evolução da química medicinal, outras opções terapêuticas surgiram e estes avanços foram divididos em três etapas importantes: politerapia “institucional”, monoterapia “dogmática” e politerapia “racional” (GUERREIRO, 2006).

A politerapia institucional iniciou-se com a introdução do fenobarbital em 1914, da fenitoína em 1938 e da carbamazepina e do valproato na década de 80. Era comum a utilização de associações de duas drogas no tratamento da epilepsia, contudo, a ocorrência de efeitos colaterais era proporcional à quantidade de drogas antiepilépticas usadas. Em vista disso, instituiu-se a monoterapia dogmática que priorizava a utilização de uma única droga com consequente observação da redução dos efeitos colaterais e comparativos da toxicidade de cada tratamento (GUERREIRO, 2006).

Na década de 80 a estratégia terapêutica foi modificada pois, pela primeira vez, houve a classificação da ILAE em relação as crises e síndromes epilépticas. Ademais, muitos estudos surgiram envolvendo a epidemiologia, história natural da doença e prognóstico, que impulsionaram avanços na neurobiologia e farmacologia. Esses conhecimentos permitiram a politerapia racional, com indicação da associação de drogas antiepiléptica de diferentes mecanismos de ação (GUERREIRO, 2006).

As drogas utilizadas no tratamento da epilepsia reduzem significativamente a frequência e/ou gravidade das crises e, geralmente, aumentam os processos inibitórios ou se opõe aos processos excitatórios. As drogas podem atuar diretamente em canais iônicos específicos ou influenciar indiretamente a síntese, o metabolismo ou a função de neurotransmissores ou receptores que controlam a abertura e o fechamento do canal (Tabela 1) (BROMFIELD; CAVAZOS; SIRVEN, 2006).

As canalopatias, no que se refere a epilepsia, podem ser resultado de alterações no funcionamento de canais iônicos. Como exemplo, os canais de  $K^+$  e  $Na^+$  dependentes de voltagem, quando sofrem mutações, alteram a modulação da excitabilidade neuronal e consequentemente contribuem para o desenvolvimento da epilepsia (PORTO et al., 2007; KÖHLING; WOLFART, 2016). Dado o importante papel dos canais iônicos no desdobramento da epilepsia, essas proteínas se tornaram alvos relevantes na procura por compostos com capacidade antiepiléptica.

Tabela 1 - Drogas antiepilépticas comumente utilizadas e seus mecanismos de ação

Droga	Bloqueio dos canais de sódio	Ação GABAérgica	Bloqueio dos Canais de Cálcio	Ação Glutamatérgica
Carbamazepina	++	-	-	-/?
Clonazepam	+	++	-	-/?
Diazepeam	-	++	-	-
Etossuximida	-	-	++	-/?
Gabapentina	-/?	-/?	-	-/?
Lamotrigina	++	-/?	-/?	+/?
Leviracetram	?	?	?	?
Fenobarbital	+	+	-	-/?
Fenitoína	++	-	-	-/?
Topiramato	++	+/?	-	+/?
Valproato	++	-	++	-

++ ação principal; + ação definida; +/? possível ação; -/? possivelmente sem ação; - sem ação

Fonte: Adaptado de Bromfield, Cavazos e Sirven (2006)

Os anticonvulsivantes podem causar efeitos adversos que variam desde comprometimento mínimo (vertigem, náusea, cefalaléia) até situações mais severas que demandam maior atenção (má formação fetal, depressão, leucopenia). É comum a presença de ataxia (fenitoína e carbamazepina), sedação (carbamazepina, benzodiazepínicos, fenobarbital, lamotrigina e gabapentina), má formação fetal (valproato e fenitoína), náuseas (valproato e etossuximida), reações de hipersensibilidade (fenitoína e carbamazepina), depressão

(fenobarbital), leucopenia e visão turva (carbamazepina), hipertrofia gengival, hirsutismo e anemia megaloblástica (fenitoína) (RANG, et al, 2004). Além disso, no uso contínuo é comum ocorrer dependência, declínio das funções cognitivas e desenvolvimento de tolerância (PERUCCA; GILLIAM, 2012).

Aproximadamente 20-30% dos pacientes com epilepsia permanecem refratários ao tratamento e essa condição envolve múltiplos fatores, como o tipo de doença, interações medicamentosas e aspectos genéticos. O resultado da resistência reflete negativamente na qualidade de vida do paciente e aumenta de forma significativa o risco de morte (DALIC; COOK, 2016).

Os fatores que envolvem a epilepsia/convulsão (desequilíbrio entre as vias GABAérgica e glutamatérgica) podem, dentro do contexto de outros neurotransmissores envolvidos e fatores muito mais complexos, também ser impostos como explicações razoáveis para outras patologias, como a ansiedade. Inúmeras observações evidenciam que ansiedade e epilepsia compartilham o funcionamento inadequado dos receptores GABA<sub>A</sub> e alterações nos canais iônicos, explicando, assim, o efeito ansiolítico e anticonvulsivante de substâncias GABAérgicas, como no caso de benzodiazepínicos (BEYENBURG et al., 2005).

Como citado, drogas que atuem aumentando a atividade GABAérgica e/ou diminuindo aquela glutamatérgica, podem ser, em alguns casos, empregadas tanto pela propriedade anticonvulsivante como por aquela ansiolítica (GORMAN, 2003). Além disso, devido a presença de alterações nos canais iônicos na epilepsia e ansiedade, drogas que atuem nesses alvos podem ser indicações terapêuticas dessas enfermidades (WASZKIELEWICZ et al., 2013).

## 1.2 ANSIEDADE

Segundo a OMS, transtornos mentais atingem aproximadamente 700 milhões de pessoas em todo o mundo, o que representa aproximadamente 13% do total de todas as doenças e desordens. Ao lado da depressão, a ansiedade ocupa uma das primeiras posições entre os transtornos mentais, chegando a acometer 264 milhões de pessoas ao redor do mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Acredita-se que os dados epidemiológicos da ansiedade sejam subestimados, uma vez que muitos casos são erroneamente diagnosticados ou não há procura por assistência médica. Em complemento, muitas regiões ao redor do mundo não possuem dados da incidência e prevalência da ansiedade, o que pode levar a estimativas falhas (GELFUSO et al., 2014).

Os distúrbios de ansiedade são mais comuns entre mulheres (4,6%) do que entre homens (2,6%) e no continente americano os números são de 7,7% para população feminina enquanto que os homens representam estimativa de 3,6%. No Brasil, 9,3% da população têm algum transtorno de ansiedade e dessa maneira o país lidera, em caráter global, a prevalência de casos patológicos de ansiedade (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

Em determinado grau, a ansiedade é importante para a adaptação e sobrevivência do indivíduo ao meio. Todavia, quando se torna excessiva, frequente e desproporcional é considerada um transtorno neurológico, com os inúmeros inconvenientes e complicadores de ordem social, econômica, médica e pessoal. Desordens nos níveis de ansiedade são responsáveis por incontáveis prejuízos, como queda no rendimento de tarefas, altas taxas de uso indiscriminado de medicamentos e baixo nível de qualidade de vida, dentre outros (EYSENCK, 2011).

De acordo com Cabrera e Sponholz (2002) a ansiedade patológica difere-se da adaptativa principalmente por afetar a autonomia (ansiedade desproporcional e sem causa aparente), intensidade (alto nível de sofrimento e baixa tolerabilidade), duração (persistente ou recorrente) e comportamento (prejuízo global).

Pacientes com ansiedade patológica, a partir de um gatilho (situação, pensamento ou sensação), parecem processar uma informação supostamente perigosa com maior intensidade em comparação com os indivíduos sem o distúrbio. A análise da situação que é considerada um perigo, fornece um vasto detalhamento e, dessa forma, surgem diversos pensamentos considerados catastróficos e indecisos, que levam a estratégias de enfrentamento consideradas não adaptativas (BYSTRITSKY et al., 2013).

Dentro da história da classificação de transtornos mentais, a categorização de transtornos de ansiedade surgiu tardiamente. A Classificação Internacional de Doenças (CID) e o Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-5) definem a separação dos subtipos que envolvem os transtornos de ansiedade de acordo com as características em comum (Quadro 1).

A ansiedade, de forma geral, é vista como um conjunto complexo de sintomas coexistentes que variam dependendo de fatores biológicos, genéticos e ambientais. Entre os elementos biológicos, por exemplo, sabe-se que anormalidades metabólicas e autonômicas podem culminar no aumento do nível de ansiedade (BYSTRITSKY et al., 2013).

Estudos moleculares mostraram que alguns genes (5-HT1A, 5-HTT, MAO-A, COMT, CCK-B, ADORA2A, CRHR1, FKBP5, ACE, RGS2/7 e NPSR1) interagem parcialmente uns com os outros e com fatores ambientais desencadeando o início da doença. Esses estudos

indicaram que 30 a 67% dos casos de ansiedade patológica podem ser provenientes de herança genética (DOMSCHKE; MARON, 2013).

Quadro 1 – Classificação e descrição dos transtornos de ansiedade

<b>Transtorno de ansiedade</b>	<b>Descrição</b>
Transtorno de ansiedade generalizada	Ansiedade flutuante, nervosismo, tremores, sensação de vazio na cabeça, palpitações, transpiração, tonturas, desconforto epigástrico e medo de doença ou acidente em relação a si e a pessoas próximas
Transtorno obsessivo compulsivo	Recorrência e persistência de comportamento compulsivo e pensamentos obsessivos que causam sofrimento ao indivíduo.
Transtorno do pânico	Ataques de pânico imprevisíveis que levam a dores torácicas, taquicardia, sensação de asfixia, tonturas, calafrios ou onda de calor, parestesias, despersonalização, desrealização, medo de morrer, perder o autocontrole ou a lucidez
Transtorno de estresse pós-traumático	Presença constante de memória e sonhos desagradáveis (de um evento traumático), agir ou sentir que o trauma está acontecendo novamente, desconforto psicológico intenso e reatividade fisiológica diante de situações ou pessoas que lembrem o trauma.
Agorafobia	Medo excessivo de sair de casa, viajar sozinho, lojas, multidões, locais e transporte públicos. Além disso entre os sintomas associados é comum a presença de sintomas depressivos e obsessivos (fobia social).
Fobias específicas	Medo irracional de um objeto ou situação altamente específica que pode interferir intensamente na vida do indivíduo ao provocar ataques de pânico ou fobia social.
Transtorno de ansiedade social	Medo ou ansiedade acentuada de exposição pública, de observação e de críticas, perda de autoestima, tremor, rubor, náuseas, urgência miccional e possibilidade de ataques de pânico.
Transtorno misto de ansiedade e depressão	Presença simultânea e sem predomínio tanto de ansiedade como de depressão.
Ansiedade da separação	Ansiedade excessiva em relação a possível separação de alguém próximo, principalmente na infância.
Mutismo seletivo	Falta de fala em situações onde há expectativa de conversa, mesmo que o indivíduo fale em outros momentos.

Fonte: Adaptado de Bandelow; Michaelis e Wedekind, 2017

Além disso, a gênese da ansiedade envolve alterações neuroquímicas moduladas por diversos neurotransmissores como as aminas (serotonina, dopamina e noradrenalina) e aminoácidos (GABA e glutamato), como também peptídeos (fator de liberação de corticotropina, corticotropina, colecistocinina) e esteroides (corticosterona) (BENSON et al., 2015).

Acredita-se que os pacientes com ansiedade patológica tenham regulação deficitária de noradrenalina e que aumentos ocasionais da atividade dessa monoamina podem ocorrer ao longo do transtorno. O bloqueio dos receptores de serotonina ou o bloqueio da síntese desse neurotransmissor produzem efeitos ansiolíticos, porém, sabe-se que a serotonina possui papel duplo na regulação da ansiedade, uma vez que no complexo amigdalóide, exerce efeito ansiogênico e na matéria cinzenta periaquedutal dorsal o efeito é ansiolítico. As vias dopaminérgicas, por sua vez, podem afetar os estados de ansiedade de várias maneiras e sabe-se que o bloqueio do receptor D2 promove efeitos ansiolíticos (RIBEIRO, BUSNELO, KAPCZINSKI, 1999).

As recentes evidências provenientes de ramos da neurociência indicam que na ansiedade patológica ocorre disfunção na modulação GABAérgica. No complexo amigdalóide, os sítios alostéricos no GABA<sub>A</sub> regulam com precisão a inibição neuronal GABAérgica e alterações nos níveis de moduladores endógenos, ou na subunidade do receptor GABA<sub>A</sub> estão envolvidos nos estados patológicos da doença. Nesse contexto, esse é um dos principais alvos moleculares de muitas drogas ansiolíticas, como no caso de benzodiazepínicos (GAUTHIER; NUSS, 2015).

As vias glutamatérgicas, em especial o receptor NMDA, são importantes para os transtornos de ansiedade. Evidências preliminares sugerem que o aumento e antagonismo das vias mediadas pelo NMDA são eficazes no tratamento de transtornos de ansiedade, embora não existam medicamentos glutamatérgicos aprovados para esta finalidade (BYSTRITSKY et al., 2013).

Diversos fármacos estão incluídos no tratamento farmacológico da ansiedade, muitos dos quais e, como ditos, também empregados no tratamento da epilepsia. A primeira classe desenvolvida, barbitúricos, é capaz de prolongar a duração da abertura dos canais de cloreto do receptor GABA, porém apresentaram altos índices de parada respiratória (DURANT, CHRISTMAS, NUTT, 2010). Em contrapartida, os benzodiazepínicos (aumentam a frequência de abertura dos canais de cloreto do receptor GABA) foram desenvolvidos como uma alternativa mais segura que os barbitúricos, no entanto, causam dependência física e psíquica (ATACK, 2011).

Outros medicamentos utilizados no tratamento da ansiedade como ansiolíticos não benzodiazepínicos e antidepressivos, muito embora extremamente úteis, também apresentaram perfis significativos de efeitos adversos (NASTASSJA, DAN, 2011).

Devido aos diversos efeitos adversos apresentados no tratamento da ansiedade, é comum que pacientes rescindam o tratamento diversas vezes até total recuperação. Além disso, um terço dos tratamentos utilizando ansiolíticos convencionais não evidenciam respostas significativas a qualquer um dos medicamentos utilizados (MAHE, BALOGH, 2000).

Existe, portanto, fundamental necessidade na busca e desenvolvimento de novos agentes ansiolíticos, uma vez que essa desordem mental aparece, inclusive, e muito comumente, como comorbidade de outros transtornos do SNC. De fato, Beyenburg e colaboradores (2005) mostraram que há uma relação entre epilepsia e outros transtornos do SNC, como ansiedade, chegando a uma taxa de 50 a 60% de pacientes portadores desta doença.

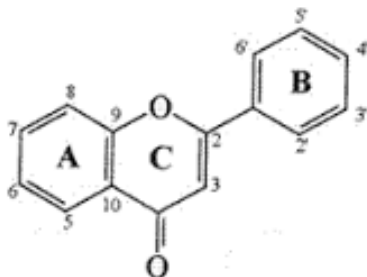
### 1.3. FLAVONOIDES

Os flavonoides representam importante classe de metabólitos secundários encontrados abundantemente no reino vegetal com presença principalmente em angiospermas (SIMÕES et al., 2004). Nas plantas, os flavonoides desempenham várias funções como ação antioxidante, proteção contra raios ultravioleta e visível, além de proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias. Inibem enzimas, atraem animais com finalidade de polinização e auxiliam na regulação hormonal de vegetais (HARBORE, WILLIANS, 2000).

Entre os seus efeitos farmacológicos, evidenciam-se as atividades no SNC, antitumoral, antioxidante, antiviral, anti-inflamatória, antiepasmódica, antimicrobiana, antimutagênica, antiulcerogênica e a atividade sobre a permeabilidade capilar, entre outras (SIMÕES et al., 2004).

Estruturalmente compartilham dois anéis aromáticos (A e B) que são ligados entre si por um heterociclo oxigenado (anel C) (GARCÍA-RODRÍGUEZ, MONTAÑO-RODRÍGUEZ E ALTAMIRANO-LOZANO, 2015) (Figura 3). Esta estrutura oxigenada, muitas vezes apresenta um açúcar conjugado, recebendo o flavonoide, neste caso, nome de heterosídeo, contudo, e quando este açúcar é inexistente, o flavonoide é classificado como aglicona ou genina. Nos heterosídeos, quando a ligação ocorre através de uma hidroxila, o flavonoide recebe o nome de *O*-heterosídeo e, quando ocorre através de um carbono, é denominado *C*-heterosídeo (SIMÕES et al., 2004).

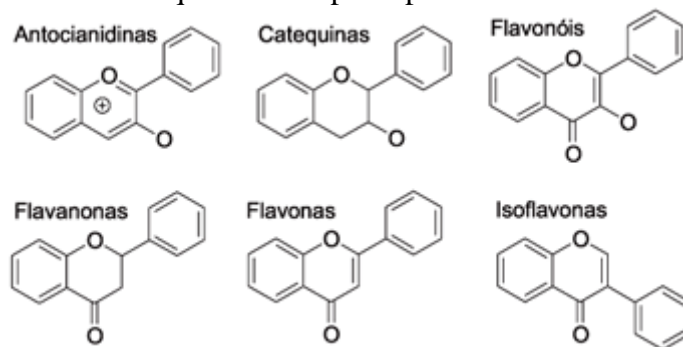
Figura 3 - Estrutura química básica e comum dos flavonoides



Fonte: García-Rodríguez, Montañó-Rodríguez e Altamirano-Lozano (2015)

Para dados e de acordo com a oxidação que ocorre no anel C são originadas as classes dos flavonoides (Figura 4), como por exemplo, as antocianidinas, catequinas, flavonóis, flavanonas, flavonas e isoflavonas (WINKEL-SHIRLEY, 2001).

Figura 4 - Estrutura química das principais classes dos flavonoides



Fonte: Março; Poppi; Scarminio (2008)

Para algumas das classes citadas, as novas descobertas científicas se referem ao seu potencial para o tratamento de doenças e desordens neurológicas, baseando-se, às vezes, nas suas propriedades anti-inflamatória e antioxidante e, por outras vezes, de se ligarem diretamente a receptores farmacológicos específicos (DOVICH; LAJOLO, 2011). Embora o mecanismo de ação dos flavonoides ainda seja um assunto de discussão, vários locais de ação foram relatados, incluindo receptores de adenosina, GABA<sub>A</sub>, δ-opioide, nicotínico, estrogênio e receptores de testosterona (WILLIAMS; SPENCER, 2012).

Os flavonoides surgem como potenciais moduladores da função cerebral ao agirem diretamente nos neurônios ou indiretamente através das células da glia. Estas ações são mediadas principalmente por (MATIAS; BUOSI; GOMES, 2016):

1. Promoção da diferenciação de células neuronais progenitoras em neurônios, redução da morte neuronal e aumento da neurogênese e da plasticidade sináptica em idade adulta;

2. Indução da secreção de fatores solúveis por astrócitos que atuam indiretamente sobre os neurônios, o que aumenta a diferenciação e reduz a morte neuronal;
3. Redução da reatividade astrocitária e o aumento da resposta antioxidante. Aumento da secreção de fatores neuroprotetores pelos astrócitos;
4. Diminuição da ativação microglial e da secreção de citocinas pró-inflamatórias por estas células.

Dentre as principais características destes compostos fenólicos, cita-se sua capacidade antioxidante determinada por hidroxilas presentes em sua estrutura, o que capacita esses metabólitos a doarem elétrons suportando a deslocalização em torno do sistema aromático. A capacidade antioxidante dos flavonoides é definida principalmente pela presença de hidroxilas em C3 e C4 (LIEN et al., 1999). Os flavonoides são reconhecidos por sua capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigênio e de influenciar o estado redox intracelular (SPENCER, 2009), além de promoverem neuroproteção através de suas atividades anti-inflamatórias ou pela ligação direta a receptores farmacológicos, por melhorarem a função neuronal e induzirem a neurogênese (SPENCER, 2008).

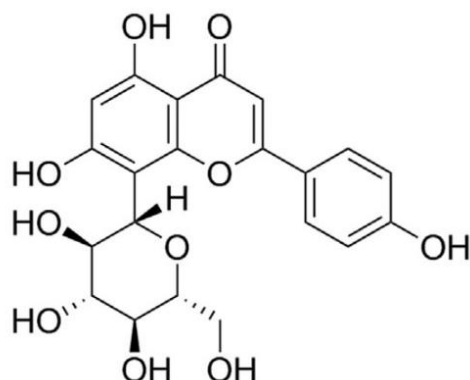
Após a ingestão, os flavonoides são metabolizados, absorvidos, atravessam a barreira hematoencefálica e a sua permeabilidade é influenciada por sua característica lipofílica e interação com transportadores de efluxo. Dessa maneira, diversos derivados de flavonoides foram considerados importantes no tratamento de doenças que acometem o SNC (YOUDIM; SHUKITT-HALE; JOSEPH, 2004).

No cérebro, flavonoides de várias classes são capazes de inibir a MAO-A e B, mediando assim uma possível atividade antidepressiva. Por outro lado, flavanóis, flavanonas e antocianinas podem agir de forma protetora contra processos inflamatórios, ao aumentar a fluxo sanguíneo cerebral. Algumas flavonas, por sua vez, podem interagir com o receptor GABA<sub>A</sub>, produzindo assim efeito sedativo, ansiolítico ou anticonvulsivante (JÄGER; SAABY, 2011). Esse fato, indica portanto a escolha plausível de flavonas para estudos que visem avaliar suas potenciais ações ansiolítica e anticonvulsivante.

### 1.3.1 Vitexina

A vitexina é uma flavona C-glicosilada (Figura 5) encontrada em diversas plantas como *Passiflora sp*, *Crataegus pinatifida*, *Serjania erecta*, *Vitex negundo* e *Pennisetum millet*, (ZHOU et al., 2009; GAITAN et al., 1989; CAO, et al 2011; ZHANG et al., 2011; MA et al., 2010).

Figura 5 - Estrutura química da vitexina



Fonte: He et al. (2016)

A vitexina apresenta uma gama ampla de efeitos farmacológicos (Tabela 2) e entre essas atividades, esse flavonoide destaca-se devido a sua ação no SNC, principalmente por seus efeitos protetores contra doenças neurológicas e psiquiátricas (HE et al.; 2016).

Tabela 2 - Atividades farmacológicas de vitexina

<b>ATIVIDADE FARMACOLÓGICA</b>	<b>FONTE</b>
Antioxidante	Borghini et al. (2013), Praveena et al. (2013)
Antineoplásica	Papi et al. (2013), Lee et al. (2012)
Antiviral	Krcatovic et al. (2008), Li et al. (2002)
Anti-inflamatória	Dong et al. (2011, 2013)
Antinociceptiva	Borghini et al. (2013), Demir; Ozkay; Can (2013)
Antiespasmódica	Gilani et al. (2006) Ragone et al. (2007)
Proteção cardiovascular	Dong et al. (2013)
Efeito protetor contra a obesidade	Kim et al. (2010), Galleano et al. (2012)
Efeito antitiroidiano	Gaitan et al. (1995)

Fonte: Adaptado de He et al. (2016)

A vitexina foi investigada em estudos quanto a sua ação protetora contra hipóxia e lesão por isquemia (MIN et al., 2015), em Doença de Alzheimer (CHOI et al., 2014, GUIMARÃES et al., 2015), contra a depressão (CAN; ÖZKAY; ÜÇEL, 2013) e também na ação sobre a aprendizagem e cognição (ABBASI et al., 2013, OLIVEIRA et al., 2014).

O estudo *in vivo* de Abbasi et al. (2013) demonstrou que o tratamento com vitexina reverteu significativamente o prejuízo da memória produzida por escopolamina e, apesar da não identificação do mecanismo de ação, sugeriu-se que esse efeito possa ter ocorrido por aumento do fluxo sanguíneo cerebral ou interação direta com o sistema colinérgico ou GABAérgico. Em complementação, o estudo de Oliveira et al. (2014) verificou que o

tratamento com vitexina provocou efeitos semelhantes dos agonistas dos receptores GABA<sub>A</sub> ao melhorar o desempenho cognitivo dos animais.

Em outro trabalho, o pré tratamento com vitexina preveniu significativamente a perda de células neuronais induzida por NMDA e reduziu o número de neurônios apoptóticos. A vitexina inibiu significativamente a apoptose neuronal induzida pela exposição de NMDA através do controle do equilíbrio de Bcl-2 e expressão do Bax e as clivagens de polimerase (ADP-ribose) e pró-caspase 3 (YANG et al., 2013).

Além disso, Abbasi e colaboradores (2012) observaram que a vitexina nas doses de 100 e 200  $\mu$ M (i.c.v) apresentou efeito neuroprotetor em convulsões induzidas por pentilenotetrazol PTZ. Estes resultados indicam que vitexina tem efeitos possivelmente relacionados à interação com o receptor GABA

Além disso, vitexina foi reconhecida por inibir expressão de mRNA de NMDAR, mGluR1 e mGluR5 e exercer efeito antioxidante em modelos de camundongos epiléticos induzidos pela pilocarpina, o que pode em parte explicar sua atividade neuroprotetora e antiepilética (ASEERVATHAM et al., 2016).

Apesar dos avanços e esforços citados, muito ainda precisa ser investigado para que se obtenham informações mais pronunciadas sobre as ações da vitexina. A escolha dessa flavona foi guiada principalmente por preceitos etnofarmacológicos e quimiotaxonômicos de plantas relacionadas à ansiedade e epilepsia, seguido de insuficientes estudos sobre a influência dos componentes majoritários sobre essas enfermidades, garantindo, pois, originalidade ao trabalho, de marcado interesse etnofarmacológico e biotecnológico.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial farmacológico de vitexina frente a sua ação ansiolítica e anticonvulsivante *in vivo* e investigar o mecanismo de ação, em canais iônicos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, em ensaios *in vivo*, a atividade ansiolítica de vitexina através dos modelos de labirinto em cruz elevado (LCE), teste de transição claro-escuro e teste do campo aberto;
- Avaliar, em ensaios *in vivo*, a atividade anticonvulsivante de vitexina através do uso de convulsivantes que antagonizem a neurotransmissão inibitória mediada por GABA (PTZ e Picrotoxina), bem como por meio de convulsivantes que sejam agonistas conhecidos da neurotransmissão excitatória glutamatérgica (NMDA e Ácido Caínico);
- Avaliar o efeito do tratamento crônico com vitexina sobre o modelo animal de convulsão induzida pelo pentilenotetrazol (*Kindling* químico);
- Avaliar, em ensaios *in vivo*, o efeito de vitexina em teste sobre a atividade locomotora e estado de sedação/vigília dos animais através dos testes do campo aberto (agudo) e teste da barra giratória (*rotarod*) (crônico);
- Caracterizar do ponto de vista neuroquímico o mecanismo de ação de vitexina através da ação em canais de sódio e potássio utilizando a técnica de *Voltage Clamp*, por meio de colaboração internacional.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 FÁRMACOS E REAGENTES

Dentre os consumíveis de maior relevância, adquiriu-se se diazepam (União Química), NMDA (Sigma Aldrich), ácido caínico (Sigma Aldrich), pentilenotetrazol (Sigma Aldrich), picrotoxina (Sigma Aldrich), DMSO (Sigma Aldrich) e o flavonoide vitexina (Cayman Chemical Company) com certificado de pureza e rastreabilidade por lote.

#### 3.2 ANIMAIS

Todos os procedimentos experimentais com animais seguiram as diretrizes descritas no Manual de Cuidados e Uso de Animais de Laboratório estabelecido pela Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento (SBNEC). As condutas ocorreram conforme indicações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e este trabalho obteve aprovação do comitê de ética da Universidade de Ribeirão Preto sob o número de registro 11/2015 (Anexo A).

Para esse estudo foram utilizados ratos da linhagem Wistar (150–180 g) adquiridos da empresa ANILAB (Paulínia-SP) e mantidos em biotério localizado na Universidade de Ribeirão Preto com condições controladas de luminosidade (12 horas no ciclo claro/escuro), ventilação, temperatura ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2$ ) e umidade (55%) com alimentação e água *ad libitum*. Os animais foram aclimatizados em sala experimental durante pelo menos 30 minutos antes de cada experimento. Todos os procedimentos experimentais foram filmados e estão disponíveis para consulta pública.

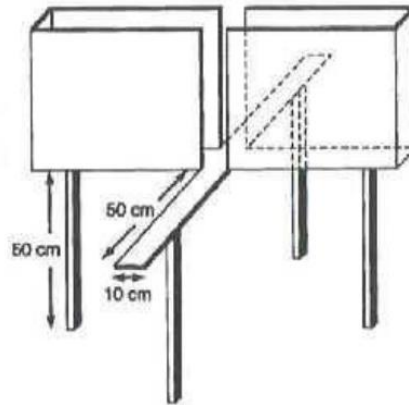
#### 3.3 BIOENSAIOS UTILIZADOS NO ESTUDO DOS EFEITOS ANSIOLÍTICOS

##### 3.3.1 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

O LCE utilizado (Figura 6) foi fabricado a partir de madeira MDF com elevação do chão a 50 cm, sendo constituído por dois braços abertos (50 x 10 cm) opostamente posicionados a dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm) e ligados entre si por um quadrante central (10 x 10 cm). Os braços abertos foram contornados por uma borda de acrílico transparente de 0,5 cm de altura para minimizar eventuais quedas dos animais durante os testes. Com o propósito de evitar

que os animais obtivessem dicas visuais do ambiente, ao redor do LCE foi colocada uma cortina cinza e opaca presa a um suporte posicionado lateralmente ao aparato.

Figura 6 - Ilustração do Labirinto em Cruz Elevado



Fonte: Salviano, 2013.

Nas sessões do LCE, foram avaliados parâmetros comportamentais clássicos comumente relatados na literatura, como (1) tempo de permanência nos braços abertos (TBA), (2) porcentagem de tempo nos braços abertos ( $100 \times \text{tempo no aberto} / (\text{tempo no aberto} + \text{tempo no fechado})$ ) (%TBA) e (3) tempo de permanência nos braços fechados (TBF).

Para tanto, os animais foram divididos entre grupos controles e experimentais (n=6 animais) e tratados via intraperitoneal, conforme esta divisão, 30 minutos antes dos experimentos propriamente ditos. O grupo controle negativo foi representado pela administração com solução salina 0,9% (i.p), o controle do veículo recebeu DMSO (1% em solução aquosa, i.p), enquanto o grupo controle positivo foi tratado com diazepam (2 mg/kg, i.p). Os grupos experimentais foram compostos separadamente de vitexina nas doses de 0,75, 1,25 e 2,5 mg/kg (i.p). Em todos os experimentos com roedores a vitexina foi solubilizada com solução aquosa de DMSO 1%.

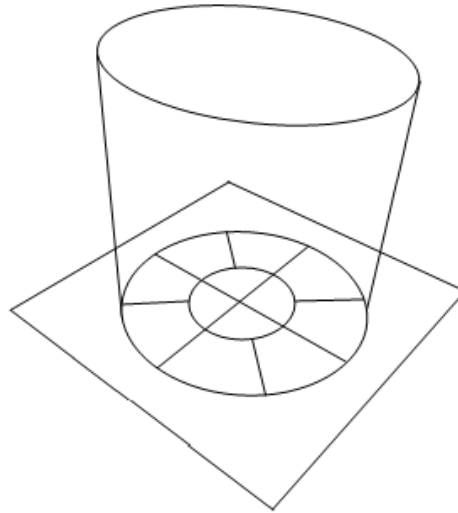
Inicialmente, os animais foram posicionados no centro do labirinto, voltados para o braço aberto e livres para a exploração durante cinco minutos. Após cada sessão, o animal foi reconduzido à sua caixa e o aparato foi higienizado com solução de etanol a 30%.

### 3.3.2 Teste do Campo Aberto (*Open Field*)

Para realização do teste de campo aberto foi utilizado o modelo OP0199 (*Insight*) com uma base em acrílico de 100 x 80 cm cercado por uma barreira de acrílico transparente (50 cm

de altura), sendo que nessa base encontrava-se desenhado o campo de teste de 60 cm de diâmetro devidamente dividido em seus quadrantes (Figura 7).

Figura 7 - Esquema representativo da arena utilizada no teste de campo aberto



Fonte: Autora

Para o Teste de Campo Aberto os animais foram divididos entre grupos (n=6 animais) controle negativo (solução salina 0,9%), controle do veículo (DMSO 1% em solução aquosa, i.p) controle positivo (DZP 2 mg/kg) e experimentais (vitexina nas doses de 0,75, 1,25 e 2,5 mg/kg) e tratados via intraperitoneal 30 minutos antes dos experimentos.

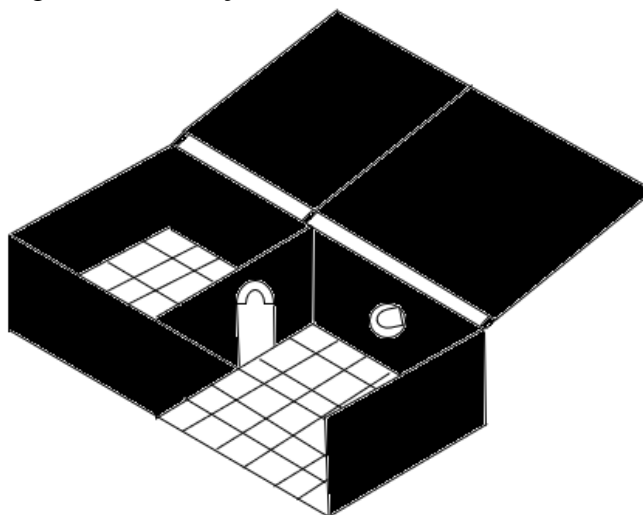
Os animais foram gentilmente colocados, separadamente, no quadrante central da plataforma circular e, ao longo de cinco minutos, analisados quanto a indicativos comportamentais relacionados a ansiedade e a potenciais ações no desempenho locomotor e estado de vigília/sedação dos animais: (1) atividade locomotora voluntária (número de vezes que as linhas foram cruzadas); (2) preferência do animal ao centro do campo do que áreas periféricas; (3) frequência de *rearings* (exploração vertical do ambiente) e (4) *groomings* (movimentos de autolimpeza).

### 3.3.3 Teste de Transição Claro-Escuro

A caixa claro-escuro é um aparato em acrílico (46 x 27 x 30 cm de altura) composto por dois compartimentos de igual tamanho, sendo um deles escuro e o outro diretamente iluminado por uma lâmpada fluorescente (fria) de 20 W. Uma porta de acesso liga os compartimentos permitindo, assim, o livre acesso entre ambos. Os dois compartimentos são

separados por uma placa de acrílico preta de 27 x 30 cm (base x altura) com uma abertura de 7,5 x 7,5 cm localizada no centro da divisão, ao nível do chão (Figura 8).

Figura 8 - Ilustração da caixa claro-escuro



Fonte: Autora

Os animais (n=6) receberam, via i.p, 30 minutos antes da avaliação, os tratamentos contendo separadamente diazepam 2 mg/kg (controle positivo), solução salina 0,9% (controle negativo), DMSO 1% (controle do veículo (CV), i.p) e vitexina nas doses de 0,75; 1,25 e 2,5 mg/kg.

Cada animal controle ou experimental foi posicionado separadamente no centro do compartimento iluminado, de frente para a abertura de acesso ao campo escuro. Foram avaliados durante cinco minutos o número de passagens para o campo claro e o tempo gasto neste lado do aparato, sendo considerada transição apenas quando o animal ultrapasse a abertura de acesso entre os campos claro/escuro com as quatro patas integralmente.

### 3.4 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE EM MODELO AGUDO

Para a avaliação da ação anticonvulsivante da vitexina em uma única administração, os grupos de animais (n=6) foram tratados com solução salina 0,9% (controle negativo, i.p), DMSO 1% (controle do veículo), diazepam 3 mg/kg (controle positivo, i.p) e diferentes doses de vitexina (1,25; 2,5 e 5 mg/kg, i.p).

Após 30 minutos da administração dos tratamentos, os animais receberam os respectivos agentes convulsivantes NMDA (150 mg/kg, i.p), ácido cáínico (30 mg/kg, i.p),

microtoxina (6 mg/kg, i.p) e PTZ (90 mg/kg, i.p), separadamente. Após a administração do agente convulsivante os animais foram filmados por 40 minutos na presença do convulsivante NMDA e microtoxina, 120 minutos no ensaio com ácido caínico e 30 minutos após utilização de PTZ.

Todos os animais foram observados quanto a ocorrência de crises, latência para a primeira crise e desempenho convulsivante por meio do índice de Racine (1972) modificado por Pinel & Rovner (1978) (Tabela 3) em comparação com os grupos controles.

Tabela 3 - Índice de desempenho convulsivante ( Racine modificado por Pinel & Rovner)

0	Nenhuma atividade de crise;
1	Movimentos orofaciais;
2	Mioclonia da cabeça;
3	Mioclonia da pata traseira;
4	Elevação;
5	Elevação e queda;
6	Mioclonia da cabeça e orelhas, movimentos clônicos, eventos sequenciais de elevação e queda;
7	Rotações, saltos violentos e vocalização;
8	Todos os comportamentos da classe 7 seguidos por períodos de hipertonia;

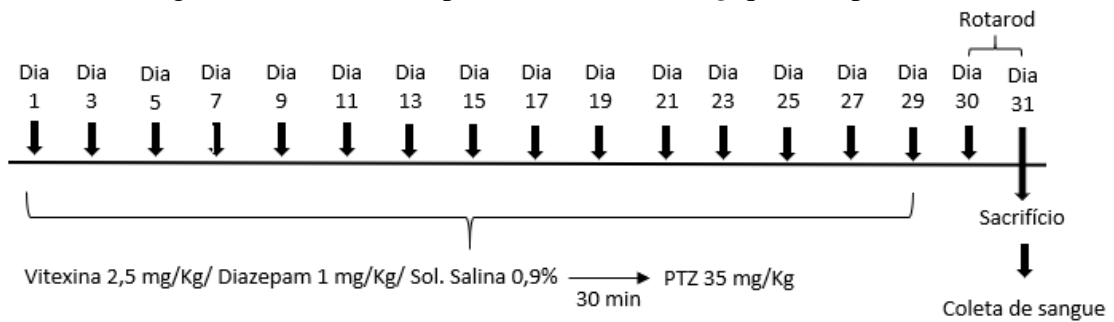
Fonte: Pinel; Rovner (1978)

### 3.5 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE EM MODELO CRÔNICO

#### 3.5.1 *Kindling* por Indução Química (PTZ)

O *kindling* foi induzido utilizando-se dose subconvulsivante (i.p) de PTZ (35 mg/kg) em dias alternados por 29 dias (15 injeções). Salina 0,9%, diazepam (1mg/Kg), DMSO 1% e vitexina foram administrados (i.p), de acordo com seus respectivos grupos, 30 minutos antes de cada injeção de PTZ (Figura 9). Os ratos foram observados por 30 minutos após a injeção de PTZ e os *scores* de crises foram registrados de acordo com o índice de Racine (1972) modificado por Pinel & Rovner (1978) (Tabela 3) em comparação com os grupos controles. A dose de vitexina (2,5 mg/kg, i.p) foi escolhida com base nos modelos agudos com PTZ.

Figura 9 - Protocolo experimental de *kindling* químico por PTZ

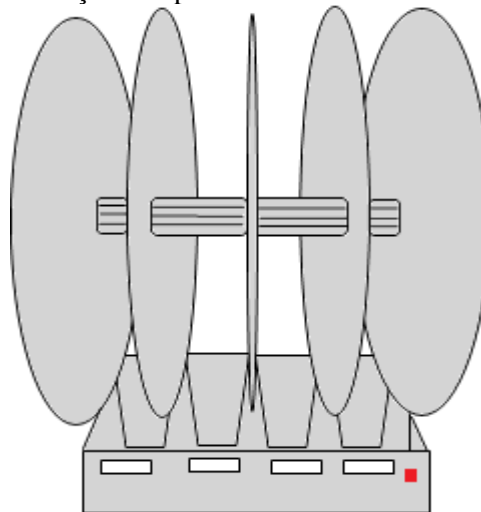


### 3.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA E ESTADO DE SEDAÇÃO/VIGÍLIA EM MODELO CRÔNICO

#### 3.6.1 Teste da Barra Giratória (*Rotarod*)

Para o teste da barra giratória foi utilizado o aparelho Acceler Rota-Rod, Jones & Roberts, for rats 7750; Ugo Basile, Comerio, Italy com cilindro de 3 cm de diâmetro. No modelo para ratos, são quatro divisões possibilitando assim o estudo simultâneo de 4 animais (Figura 10).

Figura 10 - Ilustração do aparelho rotarod utilizado em ratos



Fonte: Autora

Os animais, após 24 horas da finalização do *kindling* (dia 30, figura 9), foram submetidos a três sessões treino, na barra giratória, de 60 segundos cada (12 rpm). Somente aqueles que permaneceram por 1 minuto na barra de rolagem foram selecionados para os testes. No dia seguinte (dia 31, figura 9), os animais foram separadamente avaliados por um período de 60 segundos cada, observando-se o número de quedas.

### 3.7 AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DE FUNÇÃO RENAL E HEPÁTICA

Após realizar o experimento de rotarod, os animais foram anestesiados com pentobarbital na dose de 45 mg/kg, i.p, com subsequente coleta de amostra sanguínea, uma única vez, por punção intracardíaca. O soro foi obtido por centrifugação do sangue em microtubos sem anticoagulantes, a 250 g por 15 minutos. As análises sanguíneas dos animais foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas do Curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade de Ribeirão Preto, utilizando-se kits de diagnóstico padronizados (Labtest®) para as avaliações dos seguintes parâmetros bioquímicos: ureia, creatinina, aspartato aminotransferase- (AST ou TGO) e alanina aminotransferase (ALT ou TGP), em comparação com grupos controles e experimentais.

### 3.8 ELETROFISIOLOGIA (*VOLTAGE-CLAMP*)

Os ensaios de eletrofisiologia foram realizados por meio da técnica de *voltage-clamp* com dois eletrodos e oócitos da espécie *Xenopus laevis* (Figura 11). Tais experimentos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Toxicologia da *Katholieke Universiteit Leuven* (KU Leuven – Bélgica) pela aluna Erica Aparecida Gelfuso Rossete sob supervisão do Prof. Dr. Jan Tytgat.

Figura 11- Foto da espécie *Xenopus laevis* e coleção de oócitos



Fonte: Gelfuso (2017)

Os oócitos foram obtidos após cirurgia de ovariectomia parcial nas rãs com posterior injeção de cRNA correspondente à isoforma do canal iônico. Na Tabela 4, estão apresentadas

as isoformas dos canais de sódio ou potássio estudados, assim como o volume injetado de cRNA (faixa de concentração de 300-500ng/ $\mu$ l) e o tempo necessário para a expressão proteica.

Após a injeção de cada cRNA de escolha, os oócitos foram incubados em solução ND-96 contendo: 5,61 g de NaCl, 0,149 g de KCl, 0,265 g de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,203 g de MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O e 1,191 g de HEPES para 1L de água Milli-Q (pH 7,5 ajustado com NaOH), suplementada com 50 mg/L de sulfato de gentamicina.

Para os ensaios, inicialmente foi utilizada a concentração final de 10  $\mu$ M de vitexina previamente diluída em ND-96. Essa concentração foi adicionada na câmara contendo o oócito e imediatamente homogeneizada. Os protocolos de pulsos de voltagem utilizados para os registros das correntes variaram de acordo com o canal e suas respectivas isoformas analisadas.

Tabela 4 - Canais estudados por meio de voltage-clamp

Isoforma do canal	cRNA (300-500ng/ $\mu$ l)	Tempo para expressão
Na <sub>v</sub> 1.3	30 nl	2 – 3 dias
Na <sub>v</sub> 1.6	20 nl	2 – 3 dias
K <sub>v</sub> 1.1	20 nl	1 dia
K <sub>v</sub> 1.2	20 nl	1 dia
K <sub>v</sub> 1.4	20 nl	1 dia

Fonte: Adaptado de Gelfuso (2017)

Com relação aos dados, estes foram obtidos através de um amplificador GeneClamp 500 (Axon Instruments®, USA) conectado a um computador munido com sistema Windows XP (Microsoft®, USA) e *softwares* Complex 10.4 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), Excel 2010 (Microsoft Corp., Redmond, WA, EUA, 2010) e OriginPro 9.0 (OriginLab Corp., Northampton, MA, EUA, 2012).

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados e expressos em tabelas e gráficos produzidos por meio do programa *GraphPad Prism* (*GraphPad Software Corporation*, versão 7.0). Para comparação estatística dos resultados obtidos entre os diferentes grupos de tratamento e os respectivos controles, foi empregada a análise de variância ANOVA, seguido do pós-teste de *Newman-Keuls* ( $p < 0,05$ ).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ESTUDO COMPORTAMENTAL PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO ANSIOLÍTICO DE VITEXINA

O gráfico 1 ilustra os resultados da medida de TBA, %TBA, e TBF diante da administração de salina 0,9%, DMSO 1%, diazepam 2 mg/kg e diferentes doses de vitexina (0,75; 1,25 e 2,5 mg/kg) em LCE.

Na análise dos resultados em LCE, o DZP na dose de 2mg/kg (controle positivo) foi efetivo no aumento do tempo gasto nos braços abertos ( $222,83 \pm 26$  segundos). A efetividade do controle positivo valida o procedimento experimental e descarta a possibilidade de erros na execução do procedimento. De maneira oposta, animais do grupo controle negativo representado por solução salina 0,9% apresentaram tendência de não permanecer no braço aberto ( $14,5 \pm 15,14$  segundos), local que representa situação de perigo sendo, portanto, evitado em situações de ansiedade.

A análise de TBA, TBF e %TBA observada no gráfico 1 demonstrou que os tratamentos com vitexina nas doses de 0,75, 1,25 e 2,5 mg/kg aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) o TBA ( $68,33 \pm 28,31$ ,  $77,6 \pm 25,38$  e  $83,33 \pm 39,15$  segundos respectivamente) em comparação ao controle negativo, mas não produziram efeito estatisticamente significativo quando comparados ao controle positivo.

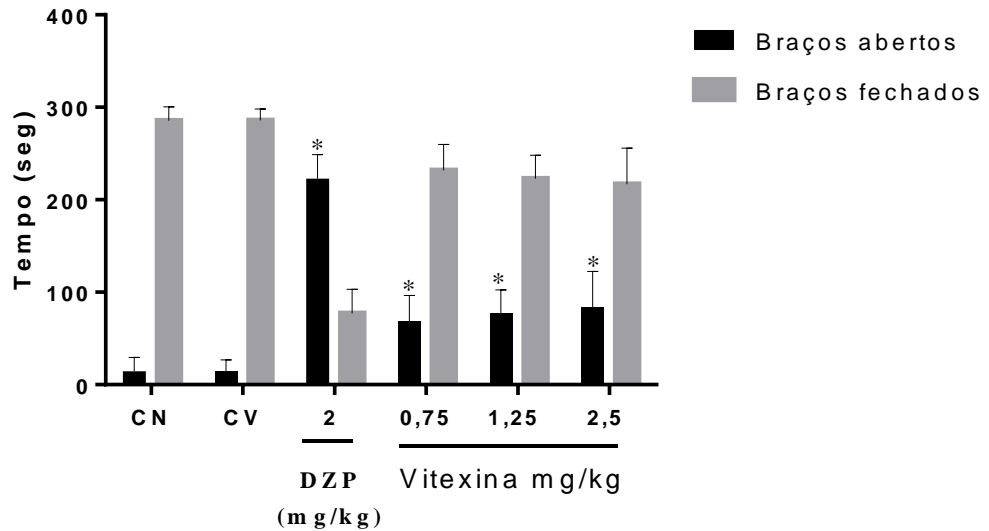
A %TBA (Gráfico 1B) demonstrou que o tratamento com DZP proporcionou preferência pelo braço aberto, pois os animais gastaram aproximadamente  $84,2 \pm 9,24\%$  do tempo nesse ambiente. Para os tratamentos com vitexina os valores de %TBA foram  $24,15 \pm 9,69$ ,  $27,10 \pm 8,8$  e  $24,5 \pm 8,73$  (%) para as doses de 0,75, 1,25 e 2,5 mg/kg respectivamente e para os animais que receberam solução salina a %TBA foi de  $5,18 \pm 5,37$  (%).

Os resultados do tratamento com as diferentes doses de vitexina indicaram aumento significativo ( $F(5,60) = 103,9$ ,  $p < 0,0001$ ) no tempo de permanência nos braços abertos em relação ao grupo controle negativo utilizado. Dessa maneira, foi possível observar o prolongamento da exposição ao risco com redução dos efeitos aversivos provocados pelos braços abertos do LCE.

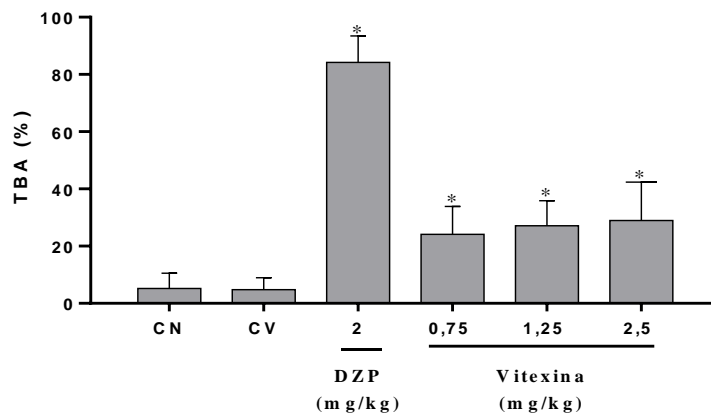
Os animais submetidos ao tratamento com salina 0,9 % (controle negativo), DMSO 1% (controle do veículo), diazepam (controle positivo) e diferentes doses de vitexina (0,75; 1,25 e 2,5 mg/kg) no teste de campo aberto são mostrados no gráfico 2.

Gráfico 1 - Efeito do tratamento de diferentes doses de vitexina na análise de TBA e TBF (A) e %TBA (B) em LCE. \* valores com diferença estatística comparados ao grupo TBA salina do experimento (CN) ( $p < 0,05$ ).

A)



B)



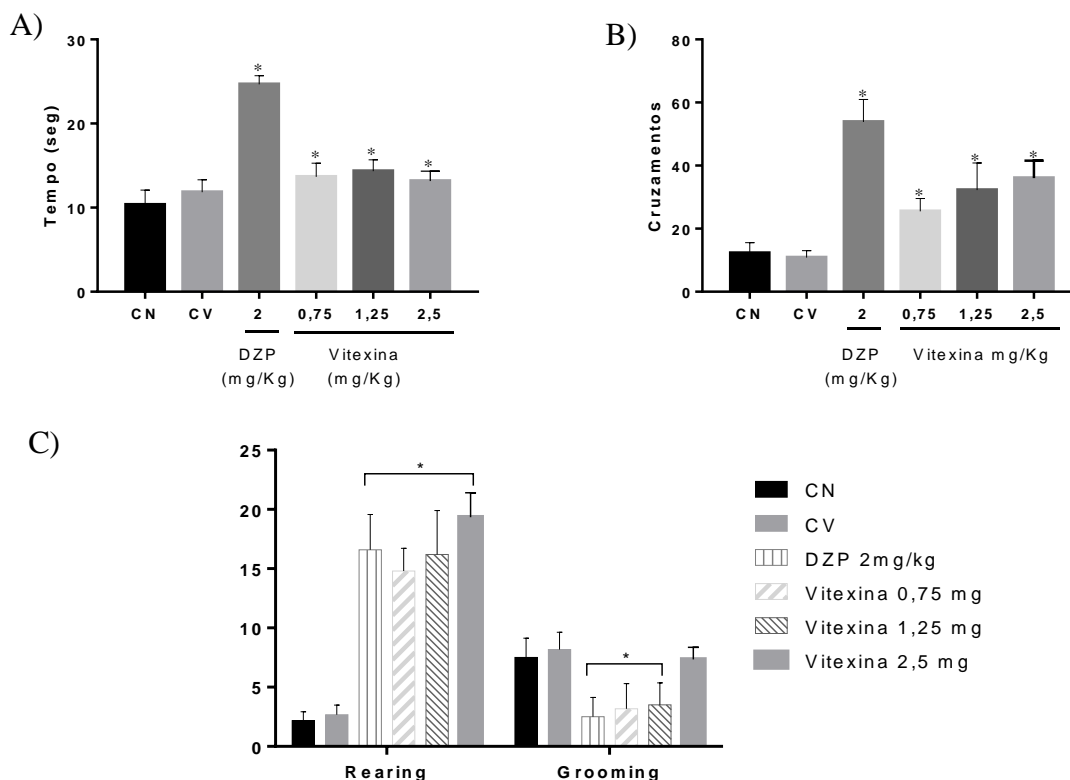
Na análise do tempo gasto em regiões centrais (gráfico 2A), é possível observar que animais tratados com DZP gastaram significativamente mais tempo nessa localização ( $24,66 \pm 1,03$  segundos) em comparação ao grupo que recebeu solução salina 0,9% ( $10,33 \pm 1,75$  segundos). Do mesmo modo, vitexina aumentou significativamente a preferência dos animais na região central quando comparada ao controle negativo ( $13,66 \pm 1,63$ ,  $14,33 \pm 1,36$  e  $13,16 \pm 1,16$  segundos para as doses de 0,75, 1,25 e 2,5 mg/kg respectivamente) ( $F(5,30) = 76,82$ ,  $p < 0,0001$ ).

O gráfico 2B mostra a quantidade de cruzamentos dos animais ao serem expostos no aparato por 5 minutos. É possível observar que todas as doses de vitexina aumentaram significativamente ( $F(5,26) = 45,33$ ,  $p < 0,0001$ ) o número de cruzamentos entre os quadrantes

(25,5±4,08, 32,2±8,61 e 36±5,56 segundos para as doses em ordem crescente) quando comparados ao controle negativo (12,2±3,34 segundos).

O gráfico 2C mostra os comportamentos de *rearing* e *grooming* observados nos animais submetidos ao teste de campo aberto. Nota-se que em relação à exploração vertical (*rearing*), os animais tratados com diazepam apresentaram 16,6±2,96 de *rearing* e vitexina 14,8±1,92, 16,2±3,7 e 19,33±2,06 para as doses de 0,75; 1,25 e 2,5 mg/kg respectivamente ( $F(5,27) = 67.49$   $p < 0.0001$ ). Esses resultados mostram o aumento desse comportamento nos animais tratados com o flavonoide, o que não foi observado no tratamento com solução salina 0,9% (2,16±0,75 segundos). No comportamento de *grooming*, percebe-se que DZP e vitexina nas doses de 0,75 e 1,25 mg/Kg (2,5±1,64; 3,16±2,13 e 3,5±1,87) ( $F(5,27) = 40.02$   $p < 0.0001$ ) desempenharam menor quantidade de autolimpeza quando comparados à solução salina 0,9% (7,5±1,64) e vitexina na maior dose (7,33±1,03), sendo esses últimos similares estatisticamente.

Gráfico 2 - Teste de campo aberto. (A) Tempo gasto no centro, (B) Número de cruzamentos e (C) *rearing* e *grooming*. \*  $p < 0,05$  valores com diferença estatística comparados ao grupo salina do experimento (CN).



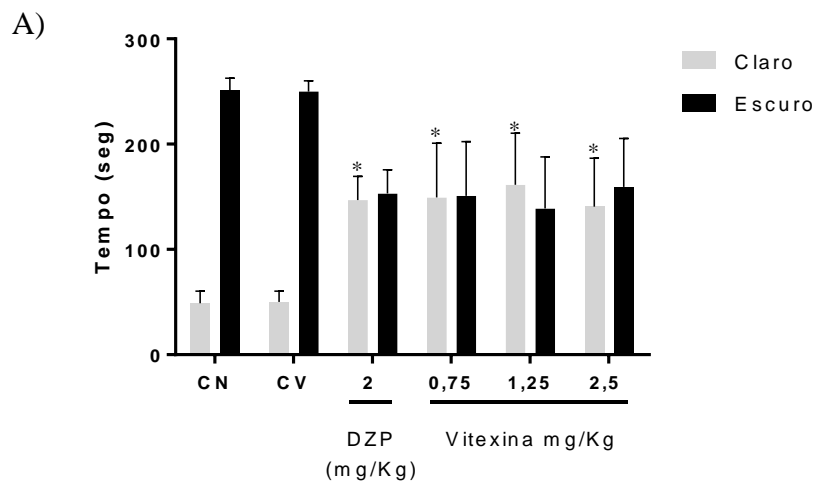
O teste de transição da caixa claro-escuro (Gráfico 3A) revelou que animais tratados com salina 0,9% ficaram 48,8±11,4 segundos no compartimento claro da caixa e os animais que receberam administração de DZP (2mg/kg) permaneceram 146±22,4 segundos. Os tratamentos

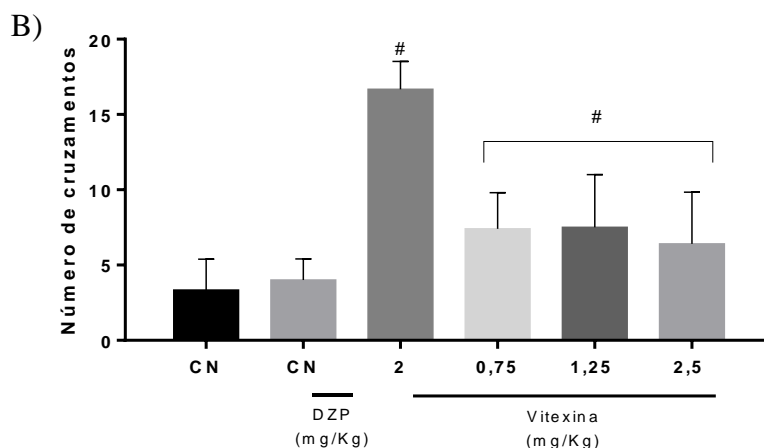
com vitexina 1,25; 2,5 e 5 mg/kg resultaram na permanência dos animais no compartimento claro em  $116,2 \pm 86$ ;  $108 \pm 57,8$  e  $56,3 \pm 61,2$  segundos, respectivamente ( $F(5,50) = 26,87$ ,  $p < 0,0001$ ). Todas as doses aumentaram o tempo de permanência do animal no compartimento claro, mas citam-se as doses de 1,25 e 2,5 mg/Kg por serem mais expressivas quanto ao aumento do tempo de permanência, quando comparadas ao controle negativo (solução salina).

Na avaliação de transição entre os compartimentos os animais tratados com solução salina mostraram cruzamento de  $2,8 \pm 2,06$  e os que receberam DZP tiveram transição de  $16,4 \pm 1,86$ . A vitexina quanto a esse parâmetro apresentou número de passagens de  $8,2 \pm 3,5$ ;  $7,2 \pm 4,08$ ;  $3,25 \pm 2,4$  para as doses de 1,25, 2,5 e 5,0 mg/kg respectivamente ( $F(5, 28) = 21,33$ ,  $p < 0,0001$ ) (Gráfico 3 B) indicando que esse composto aumenta a locomoção dos animais, quando comparado ao controle negativo.

Os resultados dos testes anteriormente citados, revelaram que, ao menos nas doses utilizadas, a vitexina apresenta atividade ansiolítica em animais expostos a situações ansiogênicas.

Gráfico 3 - Teste claro escuro. (A) Tempo de permanência nos braços claros e escuros e (B) número de cruzamentos. \* $p < 0,05$  valores com diferença estatística comparados ao grupo salina do experimento na permanência do ambiente claro (A) e # $p < 0,05$  valores com diferença estatística comparados ao grupo salina do experimento (B).





#### 4.2 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTICONVULSIVANTE EM MODELO AGUDO DE CONVULSÃO

Os resultados obtidos quanto a proteção contra convulsões induzidas por ácido caínico (30 mg/kg, i.p.), NMDA (90mg/kg), picrotoxina e PTZ nos bioensaios com vitexina são apresentados no gráfico 4. É possível observar que no grupo controle (salina) não houve proteção contra crise convulsiva, enquanto que no grupo controle (diazepam) a proteção foi de 100%.

Os animais que receberam as doses de vitexina e seguidamente ácido caínico e NMDA (separadamente), não evidenciaram proteção contra crises convulsivas em nenhuma das doses utilizadas (Gráfico 4 A e B). Por outro lado, os resultados dos grupos que foram avaliados diante da presença de picrotoxina e PTZ evidenciaram que o flavonoide em estudo confere proteção efetiva contra crises convulsivas score 8 em todas as doses utilizadas (Gráfico 4 C e D).

No tratamento com vitexina e presença do convulsivante picrotoxina houve proteção de 16,66% para a menor dose utilizada (1,25 mg/kg) e 50% para a dose de 2,5 mg/Kg. A maior dose administrada de vitexina (5 mg/kg) protegeu 100% dos animais contra as crises tônico-clônicas, sem diferença estatística, comparada ao grupo tratado com diazepam (Gráfico 4 C).

No tratamento com vitexina e administração de PTZ é possível observar que vitexina na dose de 1,25 mg/kg proporcionou proteção de 16,66% e a administração de vitexina 2,5 mg/kg protegeu 33,33% dos animais. A dose de 5 mg/kg conferiu proteção de 100% dos animais, representando este um resultado relevante, uma vez que se aproxima do resultado do fármaco utilizado comercialmente (diazepam), que também evidenciou proteção de 100% dos animais (Gráfico 4 D).

Quando se analisou o período de latência para início das crises tônico-clônicas em animais que receberam ácido caínico e NMDA como agentes convulsivantes, constatou-se que

com o tratamento com vitexina em todas as doses, não produziu diferença significativa do início para crise convulsiva quando comparados ao controle salina (Tabela 5).

Com relação à latência para o início das crises induzidas por PTZ e picrotoxina, constatou-se que houve um aumento significativo no tempo de latência após administração das doses nos dois convulsivantes utilizados (Tabela 5). Destaca-se o resultado observado no tratamento com vitexina 5 mg/kg que, como o DZP, protegeu todos os animais contra crise convulsiva.

Gráfico 4 - Porcentagem de animais protegidos contra crises convulsivas tônico-clônicas desencadeadas pelo convulsivante ácido caínico (A), NMDA (B), picrotoxina (C) e PTZ (D). \* valores sem diferença estatisticamente significativos.

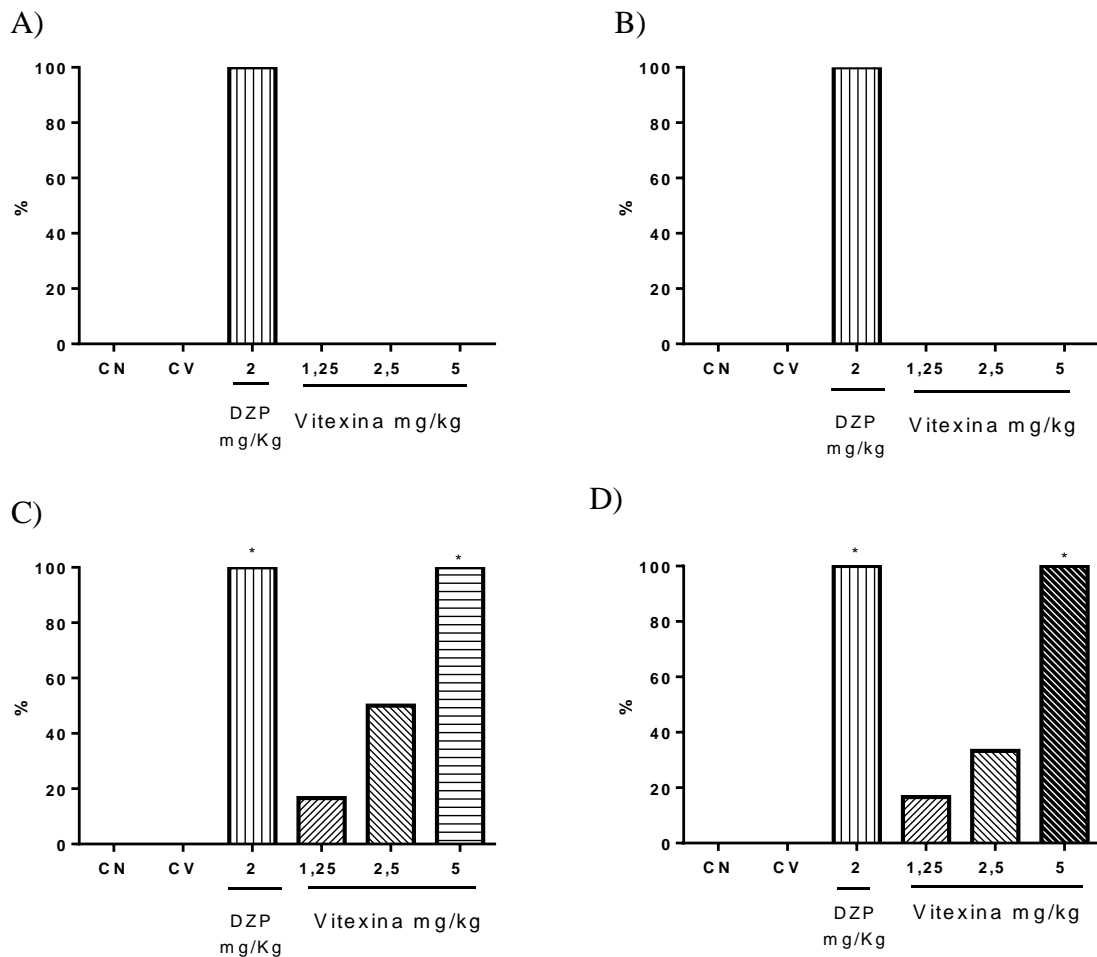


Tabela 5 - Tempo de Latência para início das crises de classe 8 em modelo agudo. \*p<0,05 valores estatisticamente significativos comparados entre as doses. #p<0,05 valores estatisticamente significativos comparados com o controle salina do experimento (CN).

Convulsivante	Latência para o início da crise em segundos					
	CN	CV	DZP (2mg/kg)	Vitexina (1,25mg/kg)	Vitexina (2,5 mg/kg)	Vitexina (5 mg/kg)
NMDA (150 mg/kg)	4409,50 ± 92,48	4326,30 ± 43,49	-	4403,83 ± 98,63	4514,50 ± 63,59	4548,50 ± 70,52
Ácido Caínico (30 mg/Kg)	4491,33 ± 77,88	4546,33 ± 77,52	-	4693,0 ± 74,59	4404,83 ± 116,83	4468,72 ± 124,72
PTZ (90mg/Kg)	77,4 ± 14,63	78,00 ± 7,38	-	53,66 ± 9,07*	141,2 ± 29,08*#	*# -
Picrotoxina (6 mg/Kg)	1101,0 ± 47,29	1103,66 ± 47,99	-	745,8 ± 65,35*#	1396,6 ± 43,14*#	*# -

CN = Controle Negativo; CV = Controle do veículo; DZP = Diazepam; - sem crise

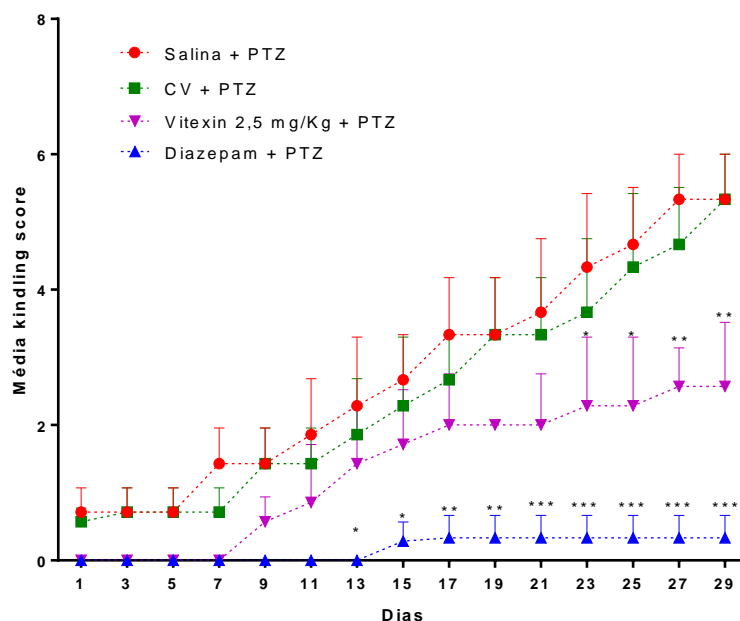
Diante do exposto, os resultados sugerem que o tratamento com vitexina, nas doses utilizadas, não é eficaz na presença de convulsivantes agonistas conhecidos da neurotransmissão excitatória glutamatérgica (NMDA e ácido caínico), contudo, perante convulsivantes que antagonizam a neurotransmissão inibitória mediada por GABA (PTZ e Picrotoxina), o tratamento com vitexina se mostrou significativamente eficiente e de forma claramente dependente da dose.

### 4.3 BIOENSAIOS EM MODELO CRÔNICO DE EPILEPSIA

#### 4.3.1 *Kindling* por Indução Química

O tratamento repetido com PTZ em dose subconvulsivante (35 mg/kg, i.p.) em dias alternados (29 dias, 15 injeções) induziu *kindling* químico com sucesso. Os animais tratados com diazepam (1 mg/kg, i.p) exibiram uma redução significativa na incidência de crises como também a gravidade das convulsões. O pré tratamento com vitexina (2,5 mg/kg) reduziu tanto a incidência como a gravidade de convulsões durante os repetidos tratamentos com PTZ. Além todos os animais mostraram redução da severidade das crises, em comparação ao grupo salina (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Efeito do pré-tratamento com vitexina no desenvolvimento de crise induzida por PTZ em modelo crônico (*Kindling*). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , e \*\*\* $p < 0.001$  em comparação com o grupo controle salina+PTZ

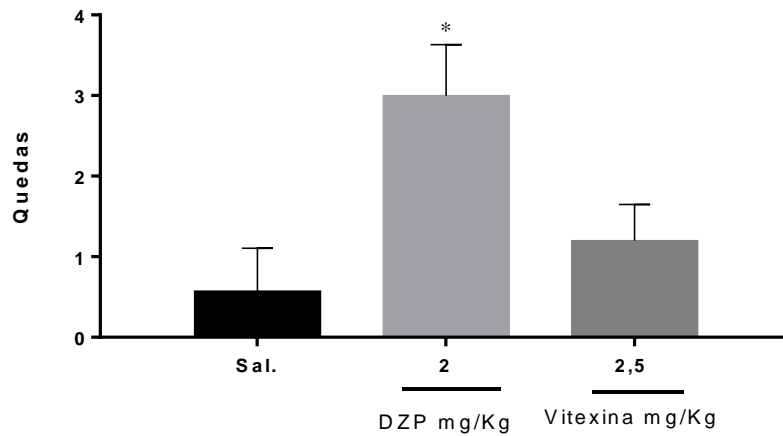


A latência da crise convulsiva (indicador de limiar para ictogênese) foi determinada através do tempo entre a injeção de PTZ e a ocorrência da primeira crise convulsiva (score 8) no último dia de estimulação. Diante dos resultados, verificou-se que os animais que receberam solução salina 0,9% durante todos os dias de tratamento mostram tempo médio para o início da primeira crise de  $190,2 \pm 52,36$  segundos, enquanto que os grupos que receberam administração de diazepam e vitexina (separadamente) não manifestaram crise de classe 8.

#### 4.3.2 Avaliação do desempenho locomotor em modelo crônico

Um dia após a última administração dos respectivos tratamentos, os animais foram treinados e, no dia seguinte, observados quanto a seu desempenho locomotor no rotarod. A investigação pode ser observada no gráfico 6 e observa-se que os animais tratados com diazepam apresentaram número superior de quedas no *rotarod* ( $3,4 \pm 0,63$ ), enquanto os animais apenas com administração de salina apresentaram média de  $0,57 \pm 0,53$ . Os resultados mostraram que vitexina na dose de 2,5 mg/kg, não altera a atividade motora e o estado de alerta dos animais ( $1,2 \pm 0,44$ ), se assemelhando estaticamente aos animais que receberam solução salina durante todo o tratamento crônico.

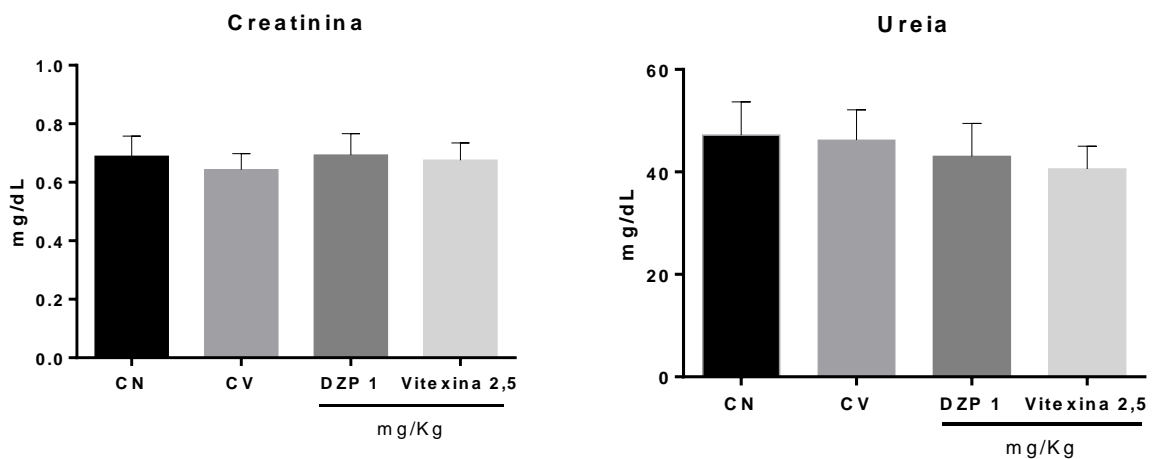
Gráfico 6 - Teste de *rotarod* em modelo crônico. \*  $p < 0,05$  diferem estatisticamente.

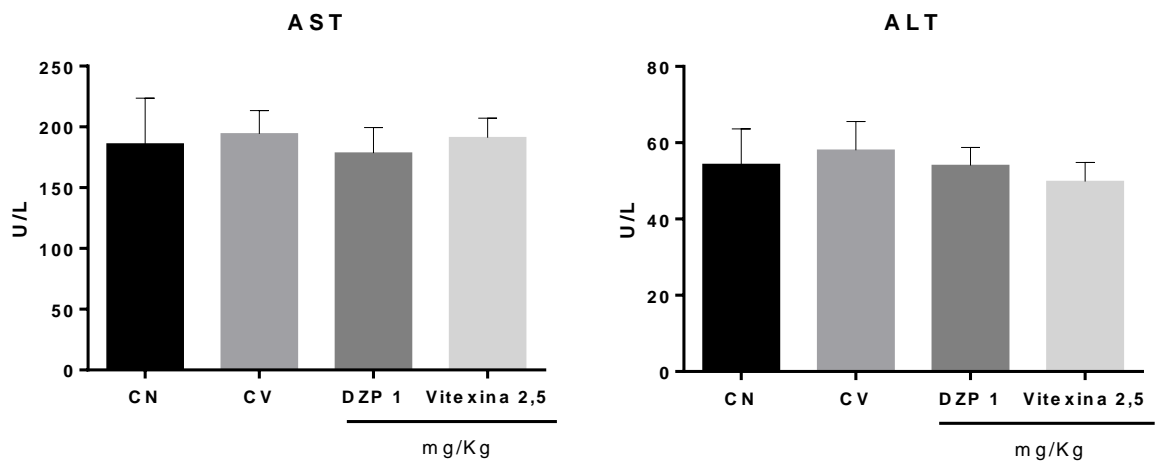


### 5.3.3 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Os níveis plasmáticos de ureia, creatinina, AST e ALT podem ser observados no gráfico 7. Conforme se verifica, o tratamento crônico com vitexina não provocou alterações estatisticamente significativas em nenhum dos parâmetros avaliados em comparação com o grupo controle negativo.

Gráfico 7 - Parâmetros bioquímicos de ratos tratados em modelo crônico com vitexina

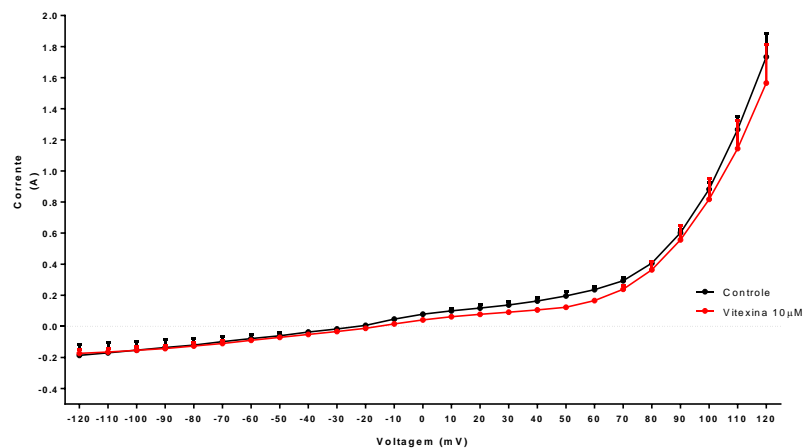




#### 4.4 ELETROFISIOLOGIA (*VOLTAGE-CLAMP*)

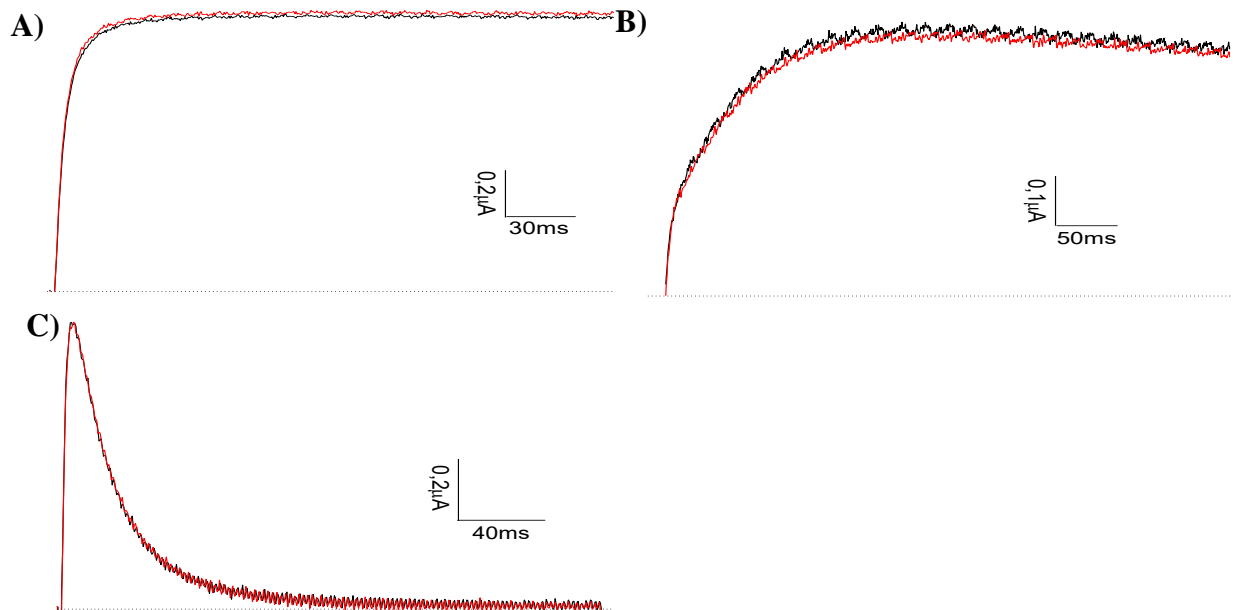
Inicialmente, o potencial efeito citotóxico de vitexina foi investigado em oócitos desprovidos da expressão para qualquer canal iônico em estudo (*oócitos nus*) na presença ou ausência do flavonoide na concentração de 10  $\mu\text{M}$ . Como observado no gráfico 8, nenhum efeito citotóxico relevante foi apresentado para vitexina, ao menos na concentração avaliada.

Gráfico 8 - Ensaio de citotoxicidade em oócitos nus para o flavonoide vitexina



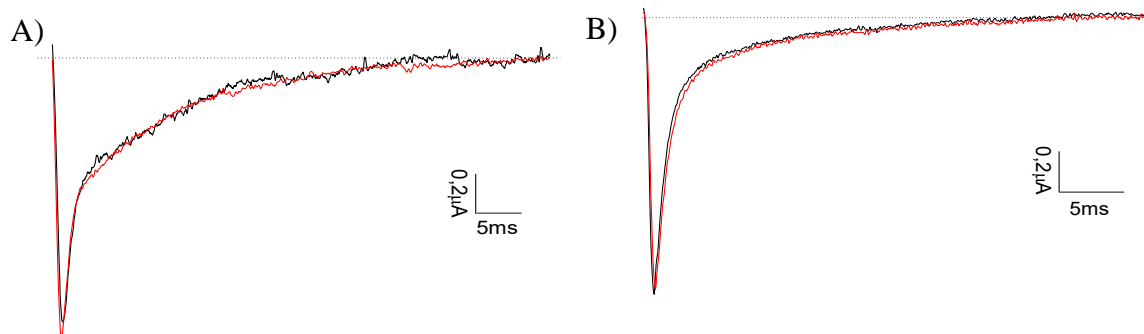
Os dados obtidos para o vitexina na concentração de 10  $\mu\text{M}$  evidenciaram que não houve modulações importantes na ativação e/ou inativação das seguintes isoformas de canais de potássio estudadas  $k_v$  1.1 (Gráfico 9 A),  $k_v$  1.2 (Gráfico 9 B) e isoforma  $k_v$  4.2 (Gráfico 9 C) e para as isoformas de canais de sódio Nav 1.3 (Gráfico 10 A) e Nav 1.6 (Gráfico 10 B).

Gráfico 9 - Estudo da interação vitexina com as diferentes isoformas de canais de  $K^+$  estudadas. A : isoforma  $k_v$  1.1, B: isoforma  $k_v$  1.2 e C: isoforma  $k_v$  4.2



Tracejados na cor preta são resultados de registros sem a adição vitexina e tracejados na cor vermelha são registros após a adição do flavonoide ( $10 \mu\text{m}$ ). a) Isoforma  $k_v$  1.1; b) Isoforma  $k_v$  1.2; c) Isoforma  $k_v$  1.4.

Gráfico 10 - Estudo da interação de vitexina com as diferentes isoformas de canais de  $Na^+$  estudadas. A: isoforma Nav 1.3 e B: Nav 1.6



Tracejados na cor preta são resultados de registros sem a adição do flavonoide e tracejados na cor vermelha são registros após a adição do flavonoide. a) Isoforma Nav 1.3; b) Isoforma Nav 1.6.

## 5 DISCUSSÃO

Os modelos animais representam uma ferramenta fundamental na análise de psicopatologias de origem genética, ambiental ou farmacológica, pois podem manifestar sintomas homólogos àqueles de pacientes com um distúrbio específico (SHEKHAR ET AL., 2001; KUMAR; BHAT; KUMAR, 2013).

Modelos animais de ansiedade são classificados pela utilização de resposta condicionada ou também como aqueles que empregam estímulos interoceptivos/exteroceptivos (DIVEKAR, et al., 2011; KUMAR; BHAT; KUMAR, 2013). O primeiro grupo envolve respostas a eventos estressantes que muitas vezes causam sofrimento ao animal, e o segundo, inclui paradigmas etológicos ou reações a estímulos de estresse que não promovem dor ou desconforto durante a investigação (BOURIN et al., 2007).

De acordo com Bourin (2007), os modelos LCE, campo aberto e caixa de transição claro-escuro são categorizados entre aqueles que apresentam resposta incondicionada. Por conseguinte, essas explorações não demandam manuseio de técnicas que causem sofrimento expressivo nos animais.

O LCE é um modelo animal que representa um importante instrumento para investigação das bases psicológicas e neuroquímicas de ansiedade, essencialmente para rastrear drogas que modulam esse transtorno (BOURIN, 2015). Originalmente, foi introduzido por Montgomery (1955), no formato de Y, com o objetivo de avaliar a capacidade de exploração e medo dos animais. A posteriori Handley e Mithani (1984) desenvolveram o atual modelo (formato de cruz) sendo este validado comportamental, fisiológica e farmacologicamente para ratos (PELLOW, et al. 1985) e para camundongos por Lister (1987).

O LCE utiliza estímulos incondicionados de medo, sendo então dispensável a utilização de choques elétricos ou privação de água/alimento como estímulo aversivo, o que representa um teste mais humanizado quando comparado aos testes que utilizam estímulos dolorosos ou de privação. É considerado um teste rápido, simples e de baixo custo (PELLOW et al., 1985), baseado na aversão natural de camundongos e ratos a locais abertos e elevados (GRAEFF, GUIMARÃES, 1998). Dessa maneira, os animais exploram todo o ambiente, mas tipicamente permanecem no braço fechado por mais tempo, de modo a se sentirem protegidos (MORATO, BRANDÃO, 1997).

De acordo com os critérios citados acima, considera-se que o aumento no TBA e/ou %TBA sejam indicadores comportamentais de efeito ansiolítico no LCE (PITTA, 2013). Na

avaliação realizada no LCE, o tratamento com vitexina, em comparação com o grupo controle negativo, provocou maior permanência nos braços abertos.

O trabalho de Soulimani et al., (1997) avaliou o efeito da mistura de vitexina (0,5 mg/kg), isovitexina (0,5 mg/kg) e maltol (0,4 mg/kg) em camundongos submetidos ao Teste da Escada (*Staircase*) e observou-se que nas condições citadas, não houve indicativo de atividade ansiolítica. Portanto, os resultados do estudo de Soulimania et al., (1997), quando confrontados com nossos resultados, evidenciam que a resposta ansiolítica de vitexina está diretamente associada ao aumento da dose desse flavonoide.

É perceptível em nossas avaliações que todos os grupos tratados com vitexina apresentaram melhora no TBA em comparação ao controle negativo. Estes grupos em questão se apresentaram estatisticamente distintos, mostrando que o flavonoide beneficia a percepção ansiolítica do animal diante do ambiente aversivo.

O uso de flavonoides em desordens do SNC está associado ao fato de serem compostos com significativa atividade antioxidante, prevenindo de modo consequente o estresse oxidativo, que representa uma das causas de distúrbios que afetam o SNC. Ademais, são capazes de modular atividades enzimáticas e receptores, sendo, então, considerados importantes na terapêutica por meio de múltiplos alvos (GROSSO et al., 2013).

Alguns estudos evidenciam que plantas medicinais com presença desse flavonoide de forma majoritária, são comumente citadas por apresentarem significativa atividade ansiolítica, sendo muitas vezes esse efeito associado a vitexina (MIYASAKA; ATALLAH; SOARES, 2007; LEAL et al., 2016). A indicação de vitexina como responsável pelo efeito ansiolítico em plantas se deve ao fato de que compostos majoritários, em sua grande maioria, serem de fato os responsáveis pela atividade medicinal (ALEIXO, 2014).

Para agregar informações ao LCE, outro teste de grande valia foi implementado, inclusive para a certificação dos resultados obtidos. O teste de campo aberto, ou *open field*, foi desenvolvido por Hall em 1934, como meio de avaliação emocional de animais, alcançando posteriormente o status de um dos principais modelos comportamentais da psicobiologia animal (WALSH, 1976). Esse teste fornece uma avaliação fácil e rápida de comportamento, não requerendo treinamento prévio do animal (SEIBENHENER, 2015).

O teste de campo aberto baseia-se na teoria de que forças evolutivas selecionaram uma resposta comum em animais diante de estímulos específicos como áreas grandes, iluminadas, abertas e desconhecidas (CHOLERIS, et al., 2001). Esse teste foi previamente descrito como um ensaio para avaliar a atividade locomotora, mas também pode ser empregado para mensurar a ansiedade. O tempo de exploração em regiões centrais é medida seletiva de ansiedade e dessa

maneira, roedores quando ansiosos ficam por mais tempo perto das paredes e animais não ansiosos exploram por mais tempo as regiões centrais (CARTER; SHIEH, 2015).

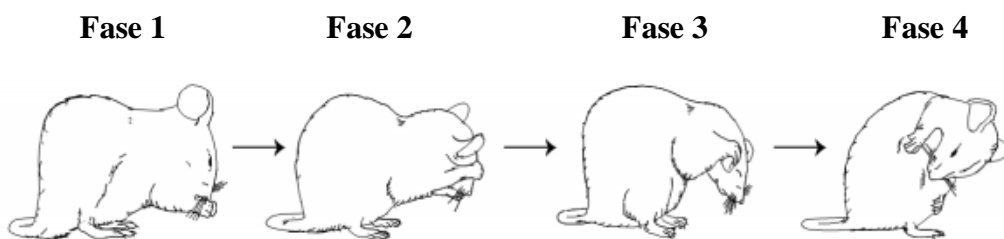
Em nossas avaliações, vitexina não apresentou resultados estatisticamente semelhantes ao controle positivo utilizado, contudo, aumentou a preferência dos animais na região central quando comparado ao controle negativo (solução salina 0,9%). Esses resultados sustentam o que foi observado no LCE, indicando que vitexina apresenta atividade ansiolítica ao reduzir a apreensão de animais diante de ambientes estressantes.

Entre outras observações possíveis no campo aberto, é de grande relevância realizar a verificação quanto ao comportamento de autolimpeza (*grooming*) e exploração vertical (*rearing*). O *grooming* é uma resposta ao deslocamento do animal para um ambiente novo e sua observação visa compreender a relação estresse-ansiedade. Esse comportamento inato dos animais pode ocorrer como naturalmente ou a partir de estímulos biológicos significantes. Sua principal finalidade etológica é o cuidado com a superfície corporal (RIBEIRO, 2016).

De acordo com Kalueff et al. (2016) esse comportamento é demasiadamente sensível a diferentes tipos de manipulações (genéticas, ambientais e farmacológicas) e usualmente é relatado em pesquisas por se assemelhar ao comportamento de autolimpeza dos seres humanos.

Como pode ser observado na figura 12 o *grooming* tem uma estrutura sequenciada definida que consiste em movimentos estereotipados. A primeira fase é caracterizada por movimentos simétricos em forma de elipse ao redor do nariz. As patas direita e esquerda realizam movimentos maiores ou menores de forma alternada. Na fase 2 ocorrem movimentos unilaterais, com a pata, que avançam até a região das vibrissas mistaciais, localizadas abaixo dos olhos. A fase 3 é caracterizada por movimentos em série, amplos e bilaterais que ocorrem concomitantemente com duas patas friccionando a parte superior da cabeça. O movimento se inicia em direção ao pescoço e ascende de uma forma que passa por cima das orelhas em direção ao rosto do animal. Ao final, na fase 4 ocorrem os movimentos prolongados de lambidas do corpo (BERRIDGE et a., 2005; VELOSO, 2012).

Figura 12 - Movimentos padrões presentes no *grooming*



Fonte: Adaptado de Berridge et al. (2005)

Os animais tratados com vitexina (0,75 e 1,25 mg/kg) e expostos ao aparato apresentaram redução na frequência de *grooming*. De acordo Estanislau et al. (2013) e Díaz-Morán et al., 2014, a prática de autolimpeza é considerada um marcador emocional e sua repetição é indicativo de aumento da ansiedade assim como a diminuição sugere redução desse elemento emocional.

Para além da avaliação do *grooming* e tempo no centro, a resposta comportamental do rato é caracterizada tipicamente por exploração vertical. O comportamento de *rearing* é caracterizado pelo posicionamento vertical do animal, que levanta a cabeça e patas dianteiras, apoiando-se sobre as patas traseiras não necessariamente andando pelo ambiente. Em suma, a expressão do *rearing* está ligado ao ato exploratório inerente a novidade de exposição ao campo aberto e é influenciado por aspectos como ansiedade e medo (FIGUEREDO, 2010; SEIBENHENER; WOOTEN, 2015).

Após a administração de um fármaco, o aumento do número de *rearing*, associado a outros parâmetros, pode indicar a possibilidade de efeito ansiolítico do mesmo. Em contrapartida, a diminuição deste comportamento pode indicar resultado oposto ao efeito ansiolítico e ainda englobar aspectos sedativos (MEDEIROS, 2015).

Ao se analisarem os dados do campo aberto, tendo em vista o parâmetro acima citado, a implicação observada no tratamento com vitexina indica aumento na frequência *rearing*, com sugestão de atividade ansiolítica. Além disso, no teste de campo aberto, pode-se também avaliar a possibilidade de sedação do animal provocada pelo tratamento, ao se analisar a locomoção do animal na periferia do aparato. Esse teste avalia a locomoção espontânea dos animais e de acordo com os resultados, a vitexina, em todas as doses utilizadas, não causa prejuízos locomotores nos animais.

Avaliar a ansiedade em modelos de roedores é fundamental, porém, complexo. Dessa maneira, é indispensável utilizar vários testes e medidas para assim fortalecer a avaliação dos resultados (BOUWKNECHT; PAYLOR, 2008).

Nesse intuito, o procedimento experimental denominado teste de transição claro-escuro foi utilizado para avaliar a tendência exploratória natural dos roedores e a propensão a evitar um local não familiar. Esse teste foi desenvolvido em ratos por Crawley e Goodwin (1980), que observaram que drogas ansiolíticas aumentavam o número de cruzamentos entre compartimentos e, dessa maneira, um aumento na transição entre o ambiente claro e escuro é considerado reflexo de atividade ansiolítica de uma droga em teste (BOURIN; HASCÖET, 2003). Estudos posteriores revelaram que o tempo de permanência no compartimento

iluminado também reflete o comportamento de ansiedade, uma vez que a esquivas de ambientes claros é um comportamento inato do animal (CHAOULOFF; DURAND; MORMÈDE, 1997; BOURIN; HASCOËT, 2003; ARRANT; SCHRAMM-SAPYTA; KUHN, 2013).

Os efeitos tranquilizantes de plantas consagradas por apresentarem essa ação, muitas vezes é proveniente do sinergismo de flavonoides com outros metabólitos secundários. A exemplo disso, cita-se a ação depressora do SNC de *Passiflora edulis* causada pela ação combinada de flavonoides e alcaloides de suas partes aéreas (SILVA, 2015).

Na caixa claro escuro, houve aumento na quantidade de transições entre os compartimentos para os grupos que receberam vitexina como tratamento. O número total de transições é um índice de atividade locomotora e assim podemos inferir que vitexina, nessa avaliação não causa comprometimento locomotor/sedação.

As várias abordagens investigativas da atividade anticonvulsivante de um composto incluem principalmente o uso de modelos animais, uma vez que estes oferecem medidas objetivas de manifestações clínicas. Os compostos responsáveis pela indução química utilizados nesse trabalho não se referem a modelos animais de epilepsia, contudo são amplamente utilizados como modelos de crises epiléticas aguda e representam rápida triagem da ação anticonvulsivante dos compostos (KANDRATAVICIUS et al., 2014).

O glutamato é um importante neurotransmissor e tem ampla distribuição no SNC juntamente com seus receptores. O sistema glutamatérgico (metabolismo, mecanismos de liberação, receptores e transportadores) tem papel evidente em múltiplos aspectos do desenvolvimento e funcionamento normal do cérebro, conectando-se muitas vezes com a presença de distúrbios neurológicos, como a epilepsia (MARMIROLI; CAVALETTI, 2012).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do SNC e ao ser liberado na fenda sináptica ativa os receptores ionotrópicos NMDA, AMPA e KA, que agregam no mesmo complexo proteico transmembranar, o sítio de ligação para glutamato e o canal iônico. Essa neurotransmissão influencia pontualmente no fluxo de íons e, de modo consequente, o estado eletroquímico da membrana pós-sináptica (RUGGIERO et al., 2011). Nessa perspectiva, compostos agonistas de receptores ionotrópicos de glutamato são potentes pró convulsivantes e usualmente são empregados em modelos experimentais de crises epiléticas (LASOÑ; CHLEBICKA; REJDAK, 2013; SILVA, 2013).

Entre os convulsivantes utilizados, o NMDA é um agonista exógeno dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA que tem a capacidade de deixar permear em célula pós-sináptica íons de  $\text{Na}^+$  e o  $\text{Ca}^{+2}$ , levando à superestimulação dos neurônios. Esse composto sintético é capaz de produzir efeitos similares ao L-glutamato e L-aspartato, porém, com maior

potência quanto à despolarização de neurônios (LEONARD, 1991). A ativação dos receptores NMDA produz uma corrente de ascensão e decaimento lentos e, deste modo, acarreta um potencial excitatório pós-sináptico mais prolongado (GIBB, 2004).

O ácido caínico é um análogo cíclico do glutamato e agonista dos receptores glutamatérgicos. Foi obtido pela primeira vez em 1953 através do isolamento feito em algas vermelhas da espécie *Diginea simplex*, contudo, só em 1979 a propriedade excitatória foi atribuída a esse composto (COUTINHO et al., 2014). Os receptores do ácido caínico (KA) são menos abundantes que os receptores NMDA e AMPA, contudo, são amplamente distribuídos, sugerindo que estejam presentes na maioria das células neuronais (SILVA, 2013). Essas macromoléculas são principalmente permeáveis aos íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  e, em menor proporção, ao  $\text{Ca}^{2+}$ . O fluxo intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  é significativo na plasticidade sináptica e nos efeitos tóxicos e pró-convulsivantes do cainato (VINCENT; MULLE, 2009). De forma concomitante, a neurotoxicidade também se relaciona com a inibição pré-sináptica da liberação de GABA, visto que o cainato reduz potenciais sinápticos inibitórios dependentes de GABA na região hipocampal CA1 (SILVA, 2013).

Outro ponto que merece atenção sobre os receptores KA, é sua capacidade de induzir a liberação de glutamato, uma vez que já foi comprovado que a ativação desses receptores resulta no aumento da concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  em sinaptossomas hipocampais (LASOÑ; CHLEBICKA; REJDAK, 2013; SILVA, 2013). Esses elementos indicam que moduladores seletivos de receptores KA podem ser alvos potenciais na investigação de fármacos antiepilépticos e, dessa maneira, os antagonistas desses receptores podem reverter crises em modelos de crises induzidas quimicamente (SILVA, 2013).

Outras implicações no desenvolvimento da epilepsia se associam a alterações na sinalização GABAérgica, sendo essa uma hipótese coerente, pois a perturbação de um sistema inibitório reflete diretamente na predominância excitatória, especialmente mediadas por glutamato (KAILA et al., 2014).

A picrotoxina é um agente paroxístico frequentemente utilizado para bloquear a atividade dos receptores neuronais de GABA e há duas hipóteses propostas para explicar a sua ação (QIAN, 2004). A primeira teoria sugere que a picrotoxina atua como um bloqueador não competitivo dos canais de cloreto do receptor  $\text{GABA}_A$  (RHO; DONEVAN; A ROGAWSKI, 1996). Dessa maneira, acredita-se que a ação ocorra diretamente nos canais iônicos, e não nos sítios de reconhecimento do GABA (OLSEN, 2006). Por outro lado, há evidências de que a picrotoxina atua como um antagonista não competitivo para os receptores GABA (NEWLAND; CULL-CANDY, 1992).

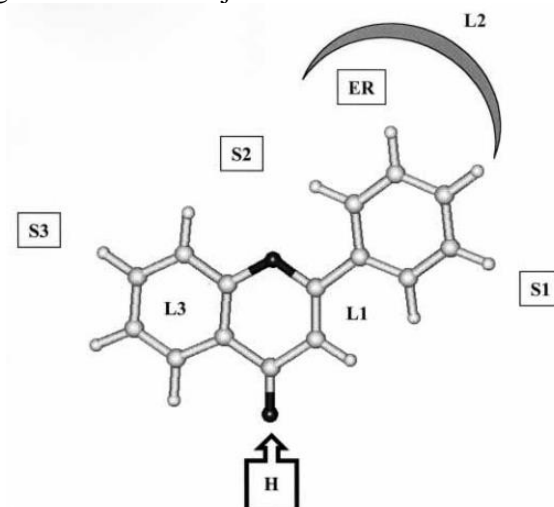
O PTZ é um composto largamente utilizado em estudos experimentais na triagem pré-clínica de substâncias com potencial anticonvulsivante. É um antagonista não competitivo dos receptores GABA<sub>A</sub>, que ao se ligar nesse receptor resulta no bloqueio do canal de Cl<sup>-</sup> em algumas áreas do SNC como, complexo amiloide, córtex pré-frontal e líquido cefalorraquidiano (ASADI-SHEKAARI et al., 2014). Há indícios que sugerem que o PTZ também atue ao promover alterações na permeabilidade da membrana celular a potássio, por meio de mecanismos dependentes de voltagem (MADEJA, 1996).

Na avaliação da atividade anticonvulsivante por meio do uso de convulsivantes agonistas da neurotransmissão excitatória glutamatérgica (ácido caínico e NMDA) não foi possível observar proteção dos animais contra crises convulsivas. Ademais, os animais não apresentaram aumento no tempo de latência para início da crise.

Em contrapartida, quando foram utilizados convulsivantes que antagonizem a neurotransmissão inibitória mediada por GABA (picrotoxina e PTZ), a vitexina apresentou proteção contra crise convulsiva diante do aumento da dose. Esses resultados corroboram com os obtidos por Abbasi et al. (2012) que utilizaram tratamento com vitexina (50, 100 e 200 µM intracerebroventricular) e perceberam que esse flavonoide prolongou significativamente a latência para o início de crise clônica mínima (contração mioclônica repentina e involuntária de todo corpo) induzida por PTZ. Além disso, a vitexina (100, 200 µM, i.c.v) prolongou significativamente a latência para crise generalizada tônico-clônica (extensão tônica total de ambos os membros anteriores e posteriores) na presença de PTZ, quando comparada ao controle utilizado.

A representação de um modelo de interação de flavonoides, mais especificamente uma flavona (como a vitexina), com o sítio benzodiazepínico foi evidenciado por Marder et al. (2001) (Figura 13). Esse trabalho mostrou a presença de uma região com alta densidade eletrônica (ER), adjacente à bolsa lipofílica (L2) que tem capacidade de interação com C5'. Além disso, verificou-se uma região doadora de pontes de hidrogênio (H) que reflete diretamente na interação com a carbonila da posição 4. Juntamente a essas informações, esse modelo designou três regiões de restrição de volume (S1, S2 e S3) próximas às posições C3', C7 e C8, que representam restrição no tamanho dos substituintes nessas posições. Finalmente, são vistas três bolsas lipofílicas (L1, L2 e L3) que refletem em interações com regiões aromáticas do núcleo benzopirano e com substituintes do anel B e, dessa maneira, os autores justificam que essas características sejam relevantes para a baixa afinidade pelo sítio benzodiazepínico.

Figura 13 - Flavona ajustada ao modelo farmacofórico



**H** representa um sítio doador de ponte de hidrogênio; **S1**, **S2** e **S3** denotam regiões de restrições de volume; **L1**, **L2** e **L3** representam bolsas lipofílicas e **ER** indica uma região de alta densidade eletrônica.

Fonte: Marder e Paladini (2002)

De forma adicional ao acima exposto, as flavonas, como a vitexina, apresentam um grupamento hidroxila ligado a C4' que resulta em efeito negativo sobre a afinidade com o receptor (MARDER et al., 2001). Ademais, HUEN et al. (2003) relatam que para os flavonoides apresentarem relevante afinidade, é importante que exista substituição por uma hidroxila em C2', o que não é verificado na estrutura de vitexina. Além desses fatores, esse flavonoide apresenta uma molécula de glicose na posição C8, que, como indicado da figura 13, está próxima a uma região de restrição de volume no receptor o que, conseqüentemente, prejudica a ligação com o receptor.

Em concordância com o referido, Provensi (2007) mostra em seu trabalho que a vitexina não apresenta interação com o sítio benzodiazepínico, visto que esse flavonoide não foi capaz de deslocar a ligação de [<sup>3</sup>H]-flunitrazepam em membranas sinaptosomais de córtex cerebral de ratos, mesmo em concentrações relevantes. Dessa maneira, o efeito anticonvulsivante de vitexina pode se relacionar à interação com outros sítios de GABA que não seja o benzodiazepínico ou a potencialização da ação de agentes benzodiazepínicos endógenos (CAMPBELL; CHEBIB; JOHNSTON, 2004).

A triagem tradicional em modelos animais de epilepsia sugere a utilização de metodologias de caráter crônico para complementar o que é observado em experimentação aguda. O modelo de epilepsia de abrasamento (*Kindling*) utilizando estímulo químico subconvulsivante, administrado de forma repetida e intermitente, permite observar o desenvolvimento da atividade convulsiva generalizada (MCNAMARA, 1984).

A primeira descrição do *kindling* foi fornecida por Goddard (1967) que, baseado no experimento realizado por Herberg e Watkins (1966), demonstrou que a estimulação elétrica repetida de áreas límbicas resulta em convulsões. Uma das escalas da intensidade do abrasamento animal, baseada no tipo de crise comportamental, foi proposta por Racine (1972) e posteriormente adaptada por Pinel e Rovner (1978). Esta última escala varia de 0 a 8, onde na marca 8 o animal apresenta o quadro mais grave de crise (PINEL; ROVNER, 1978).

Além de métodos elétricos, o abrasamento pode ser realizado quimicamente e envolve a administração sistemática de substâncias convulsivantes. O *kindling* químico (abrasamento ou sensibilização) é mais fácil e rápido, quando comparado ao *kindling* elétrico e não necessita de cirurgia cerebral ou implante de eletrodos. Diferentes substâncias convulsivas são utilizadas, como os antagonistas do receptor GABA<sub>A</sub> (PTZ, picrotoxina e bicuculina) e NMDA. Dentre estes modelos, o *kindling* utilizando PTZ é um modelo amplamente aceito para estudar os efeitos de novas moléculas antiepilépticas (DHIR, 2012). De acordo com Agarwal et al. (2011), o abrasamento por PTZ em animais prejudica a memória de longo prazo e promove comprometimento cognitivo e estreita similaridade com a epilepsia clínica.

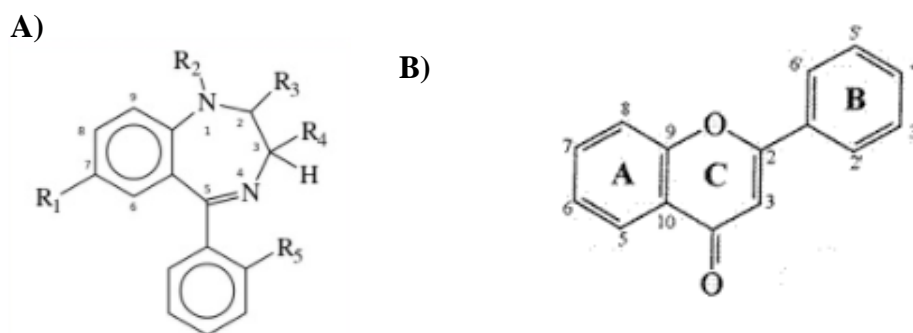
O termo abrasamento se refere ao processo no qual a atividade epileptiforme é desencadeada por estimulação elétrica ou química de estruturas cerebrais (RACINE, 1972). A sensibilização afeta inicialmente poucos circuitos elétricos. Contudo, ocorre ao longo do tempo o envolvimento de circuitos adicionais, culminando no desenvolvimento de uma resposta patológica acentuada diante de estímulos recebidos repetidamente. Dessa maneira, administrações de doses subconvulsivante de um agente químico levam, em animais, ao aumento na atividade convulsivante que resulta em crises generalizadas (GUPTA et al., 2003).

Em relação aos mecanismos envolvidos no *kindling* por PTZ, acredita-se que ocorram mudanças neuroquímicas e neurofisiológicas caracterizadas por alterações nos sistemas GABAérgicos, glutamérgicos e sistemas de defesa antioxidante que resultam em significativa atrofia, perda neuronal seletiva e astrocitose no hipocampo (ERKEC; ARIHAN, 2015).

As observações em nosso trabalho mostraram que os ratos tratados apenas PTZ e salina no modelo de *kindling* tiveram aumento gradual da intensidade das convulsões em comparação com os ratos do grupo controle (diazepam) e o pré tratamento com vitexina inibiu o abrasamento induzido por PTZ. Desta maneira, a atividade anticonvulsivante de vitexina frente a substâncias que antagonizam a neurotransmissão inibitória mediada por GABA (PTZ), tanto em ensaio agudo como em crônico, sugere que esse flavonoide exerça sua atividade antiepiléptica devido á modulação ne neutotransmissores GABAérgico.

Por outro lado, evidências experimentais mostraram que os flavonoides exercem a atividade antiepiléptica pela modulação do receptor GABA<sub>A</sub>, uma vez que são estruturalmente semelhantes aos benzodiazepínicos (CHOUDHARY; BIJJEM; KALIA, 2011) (Figura 14).

Figura 14 - Estrutura geral dos benzodiazepínicos (A) e flavonoides (B).



Fonte: A- Mizuno et al. (2008) e B-Abdenassar e Belhattab (2011).

A estrutura química base dos benzodiazepínicos consiste em um benzênico fundido a um heterocíclico (diazepínico), que apresentam grupamentos substituintes que podem ser modificados sem a perda da ação. Para maior atividade dos benzodiazepínicos, alguns detalhes estruturais são importantes como (MIHIC; HARRIS, 2012):

- a) presença de metila ligado ao átomo de nitrogênio na posição 1;
- b) grupo captor de elétrons (CL, CF<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>) na posição 7 (efeito eletrônico causado por átomo ou grupo de átomos ligado à cadeia carbônica, que provoca diminuição da densidade eletrônica em determinada região da estrutura molecular);
- c) grupo fenila 9 (ou grupo fenila com um substituinte eletronegativo, na posição orto) na posição 5.

Em 1995, Zhang e colaboradores desenvolveram um modelo farmacofórico de interação agonistas/antagonistas com o sítio benzodiazepínico. Essa construção englobava requisitos gerais necessários para reconhecimento de ligantes, como uma região com característica doadora, outra com perfil aceptora, uma bifuncional (doadora/aceptora) de pontes de hidrogênio e demarcação de três bolsas lipofílicas e três regiões de restrição de volume (interações estéricas negativas).

Fundamentadas nesse protótipo, muitas investigações abordando flavonoides e sua relação estrutura-atividade foram realizadas. Como resultado, foi identificado que é de grande relevância para a ligação com o sítio benzodiazepínico que a molécula seja de estrutura planar ou quase planar. Ademais, a presença do grupo funcional carbonila em C4 no anel

benzoflavônico parece ser uma premissa importante para interação de pontes de hidrogênio com o sítio doador. Em complementação, substituições em C6 e C3' por grupamentos eletronegativos e em C2' por hidroxila, levam a intensificação da afinidade pelo receptor (DEKERMENDJIAN et al., 1999).

De fato, e a semelhança com os benzodiazepínicos, os flavonoides apresentam anéis aromáticos que deixam a estrutura mais próxima ao planar, principalmente as flavonas e, de acordo com Zarghi et al. (2005), essas características são essenciais para potencialização da ligação com o receptor, que se intensifica na presença de um segundo anel aromático.

Abbasi et al. (2012) associam a ação anticonvulsivante de vitexina ao complexo receptor GABA<sub>A</sub>-benzodiazepínico, uma vez que o pré-tratamento com flumazenil (antagonista benzodiazepínico) suprimiu os efeitos anticonvulsivantes dessa flavona. Esse resultado está em concordância com o que foi obtido em nosso trabalho até o momento, que pressupõe a ação de vitexina no receptor GABAérgico.

Outros estudos científicos evidenciaram o papel antiepiléptico/anticonvulsivante dos flavonoides. É estabelecido que a progressão da epileptogênese se correlaciona intimamente com a produção excessiva de radicais livres. De acordo com Naziroğlu et al. (2013), o surgimento de convulsões induzidas por espécies reativas de oxigênio em animais está correlacionado com a inibição da enzima glutamato descarboxilase pelos radicais livres de oxigênio, resultando na diminuição no conteúdo do córtex cerebral do neurotransmissor GABA. Dessa maneira, devido à natureza fenólica desses metabólitos e sua significativa ação antioxidante, ocorre efeito protetor do cérebro diante do estresse oxidativo, sobretudo em avaliações crônicas (DINIZ et al., 2015).

Segundo Procházková, Boušová e Wilhelmová (2011) a capacidade dos flavonoides de prevenir lesões causadas por radicais livres ocorre por diversos mecanismos, citando-se a captura direta de espécies reativas de oxigênio, ativação de enzimas antioxidantes, atividade quelante de metais, inibição de oxidases, aumento dos níveis de ácido úrico e aumento das propriedades de antioxidantes de baixo peso molecular.

Investigações anteriores avaliaram a propriedade antioxidante de vitexina em testes baseados em reações química e ensaios celulares. Resultados de Zhang et al. (2014) com método de ácido tiobarbitúrico, poder de redução do íon ferro (FRAP), eliminação de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) entre outros, evidenciaram que vitexina apresenta, considerável atividade antioxidante.

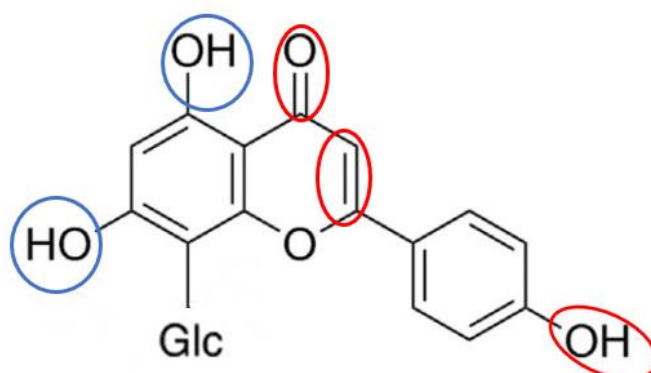
Em nível celular, a vitexina demonstrou efeitos protetores contra o dano oxidativo em eritrócitos induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que pode ter ocorrido pela subjugação direta do radical livre de

oxigênio e da proteção da atividade da enzima antioxidante nas células e dos grupamentos sulfidríla presentes na proteína da membrana eritrocitária (AN et al., 2015). De acordo com Praveena et al. (2013), o papel do anel B é dominante no composto quando comparado com os anéis A e C para a atividade antioxidante. Ademais, a presença de glicosídeo na posição C8 do anel A reduziu a entalpia de dissociação de ligações influenciando diretamente na capacidade de doação de hidrogênio do anel B e, assim, resultando no comportamento antioxidante de vitexina (PRAVEENA et al., 2013).

De acordo com o estudo cinético de Pannala et a. (2001), há características estruturais importantes que elevam a atividade anticonvulsivante de vitexina (Figura 15). A posição do grupo hidroxila no anel B tem papel importante na presença da atividade antioxidante. Assim, a posição *para* (C4) favorece essa ação, sendo que será reduzida ou ausente quando o grupo hidroxila estiver em posições *orto* e *meta*. Além disso, a presença de dupla ligação C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>, conjugada ao grupo 4-oxo (C<sub>4</sub>), no anel C (como observado nessa flavona) é essencial à atividade antioxidante e grupos hidroxila nas posições 5 e 7 do anel A são de menor importância (PRAVEENA et al., 2013).

Considerando que a neurotoxicidade observada durante as crises epiléticas pode ser associada ao estresse oxidativo, esses resultados sugerem que o pré-tratamento com vitexina pode produzir um aumento na atividade antioxidante das enzimas antioxidantes investigadas, bem como reduzir a formação de radicais livres, sugerindo uma explicação parcial para o efeito antioxidante de vitexina, especialmente no modelo crônico.

Figura 15 - Relação estrutura atividade de vitexina



Em vermelho, grupamentos mais importantes na atividade antioxidante e, em azul, são substituintes menos importantes.

Fonte: Adaptado de Pannala et a., 2001.

A disparidade entre excitação e inibição é o mecanismo mais óbvio que leva à hiperexcitabilidade e, conseqüentemente, a convulsões. No cérebro, esse desequilíbrio é representado pelo aumento da neurotransmissão glutamatérgica e/ou supressão de neurotransmissão GABAérgica. Embora a compreensão desse sistema seja fundamental na fisiopatologia e tratamento da epilepsia, outros elementos estruturais como os canais iônicos de sódio e os de potássio são de grande relevância em conjunto com a hiperexcitabilidade (DINUZZO et al., 2014).

Os canais de sódio são fundamentais para a geração e transmissão coordenada de potenciais de ação em todo o SNC, sendo os responsáveis pela despolarização da membrana. Dessa maneira, desempenham um papel central na gênese e tratamento da epilepsia e medicamentos como carbamazepina e fenitoína agem no bloqueio desses canais (KAPLAN; ISOM; PETROU, 2016). Dentre as isoformas de canais de sódio relacionadas com a epilepsia estão descritas Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav 1.5, Nav 1.6, Nav 1.7 (EIJKELKAMP et al., 2012). Para esse trabalho, as isoformas avaliadas foram Nav 1.3 (responsável pela propagação de potenciais pós-sináptico de dendritos) e Nav 1.6 (responsável pela geração de potencial de ação e propagação) (DINUZZO et al., 2014).

Os canais de potássio contribuem para a repolarização e hiperpolarização da membrana, limitando, assim, a excitabilidade neuronal. Além disso, participam de vias de sinalização celular e molecular que regulam a vida e a morte neuronal, como a apoptose, a fosforilação de canais ou proliferação celular (VILLA; COMBI, 2016). Como dito para os canais de sódio, o estudo de isoformas de canais de potássio também é de grande interesse tendo como as principais Kv 1.1 e 1.2 (responsável pela propagação de potenciais de ação e liberação de vesículas) e Kv 4.2 (responsável pela retropropagação de potenciais de ação em dendritos) (DINUZZO et al., 2014).

A investigação do potencial de ação de vitexina foi realizada separadamente em diferentes isoformas de canais iônicos de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>. No estudo do efeito citotóxico, a vitexina não apresentou resultado relevante ao menos na concentração avaliada e os resultados da eletrofisiologia mostram que o mecanismo de ação antiepiléptico desse flavonoide não envolve ações nos principais canais de sódio ou potássio, alguns dos quais usados nesse trabalho.

Do ponto de vista farmacológico, a concentração de 10 µM da vitexina no *voltage-clamp* é considerada alta e foi escolhida por seu caráter eliminatório. Dessa maneira, como nenhum efeito foi observado para a vitexina nessa concentração em canais de sódio ou potássio, nenhuma outra concentração foi estudada. Os dados obtidos são suficientes para descartar a ação da vitexina nas referidas isoformas. Portanto, é possível concluir que as ações

anticonvulsivantes/ansiolíticas desse flavonoide, ao menos para as isoformas estudadas, não se relacionam com a modulação negativa ou positiva de canais de sódio ou potássio, respectivamente.

Esses resultados, mesmo que não evidenciem um possível mecanismo de ação da vitexina, desempenham papel relevante na procura por alvos moleculares, uma vez que é imprescindível determinar absolutamente onde os compostos exercem seu modo de ação ou ausência de atividade (NAVIDHAMIDI; GHASEMI; MEHRANFARD, 2017).

Compreender a farmacodinâmica de um composto é de grande importância para uma investigação, sobretudo quando se trata de transtornos neurológicos que envolvem vários mecanismos como a epilepsia (SILVA; CABRAL, 2008). A maioria das drogas antiepilépticas age suprimindo a excitação neuronal superabundante via bloqueio canais iônicos dependentes de voltagem ( $\text{Na}^+$   $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ ) ou aumentam a ação inibitória mediada pelo GABA. Entretanto, o tratamento atualmente disponível não previne a epileptogênese, sugerindo-se, assim, que outros mecanismos estejam envolvidos no desenvolvimento dessa patologia e que novas descobertas podem promover a elaboração de terapias mais eficazes (NAVIDHAMIDI; GHASEMI; MEHRANFARD, 2017).

Dessa maneira e com base nos dados evidenciados, acredita-se que a vitexina, ao menos com as isoformas de canais estudadas, expressa mecanismos diferentes do bloqueio da despolarização celular que tem como consequência o bloqueio de crises epiléticas. Como mencionado, vários outros mecanismos estão presentes na epilepsia, portanto, demonstrar que a vitexina tenha ação anticonvulsivante e antiepiléptica não necessariamente sob os principais canais iônicos envolvidos, causa o despertar de novas possibilidades farmacodinâmicas de drogas, que podem significar uma nova alternativa mais efetiva de tratamento.

Além de investigar o mecanismo de ação de um composto, é importante determinar outros possíveis efeitos de um tratamento contínuo. Para tanto, ao final do tratamento crônico com vitexina, os animais foram submetidos ao teste de *rotarod* que tem sido amplamente utilizado na triagem de novos agentes anticonvulsivantes para determinar sua neurotoxicidade que pode levar a déficits neurológicos, como sedação, ataxia, hiperexcitabilidade e deficiência motora. Vale ressaltar que a locomoção, quando alterada, e a presença de atividade sedativa, podem perturbar a análise dos resultados da ação anticonvulsivante impedindo a observação dos elementos do score utilizado (KUMARI; MISHRA; TIWARI, 2015).

Os resultados mostraram que a vitexina na dose de 2,5 mg/kg não provocou sedação ou comprometimento locomotor nos animais após o tratamento crônico. Essa observação indica que os paradigmas comportamentais observados no ensaio anticonvulsivante, tanto agudo

quanto crônico, não foram influenciados pela presença de um possível impedimento locomotor. Desse modo, os resultados obtidos mostram que, de fato, a vitexina apresenta ação anticonvulsivante e antieplética, invalidando a possibilidade de interferência sedativa/locomotora.

Outro aspecto muito importante a ser avaliado em estudos *in vivo*, é a toxicidade das substâncias, principalmente quando administradas em caráter crônico. Dessa maneira, foram dosados níveis séricos de ureia e creatinina, que são indicadores bioquímicos de função renal e AST e ALT, parâmetros de função hepática.

A creatinina é um composto endógeno obtido por meio do metabolismo muscular da creatina e é totalmente filtrada, já que não está ligada a proteínas. Dessa maneira, seu nível plasmático manifesta diretamente a taxa de filtração glomerular e altos níveis indicam deficiência renal (CHITALIA et al., 2001).

A ureia é um composto orgânico sintetizado no fígado a partir do catabolismo proteico, sendo sua concentração estreitamente relacionada a dieta e doenças hepáticas. É uma substância com filtração renal que tem, em parte, reabsorção tubular e dessa maneira, é importante realizar a dosagem de ureia simultaneamente com creatinina para análise de função renal (MIZOI; DEZOTI; VATTIMO, 2008). A dosagem sérica de AST (TGO) se justifica, pois, é essa uma enzima encontrada, entre outros lugares, no citosol e mitocôndria dos hepatócitos. Portanto, a AST é um indicador de dano mitocondrial especialmente em regiões hepáticas que sofrem hipóxia e injúria tóxica (AMACHER, 1998). A ALT é encontrada em altas concentrações no citoplasma do fígado, o que torna o seu aumento mais específico de lesão hepática (OZER et al., 2008).

Os parâmetros bioquímicos podem variar entre as diferentes linhagens de uma dada espécie e também em função da dieta, sexo e idade do animal. Desta forma, os laboratórios que usualmente fazem dosagem bioquímica em ratos determinam os valores de referência de acordo com os animais que possuem no experimento em questão, previamente ou durante cada experimento (MELO et al., 2012). Em nossas avaliações, a ausência de intervalo de referência em estudo precedente levou a necessidade da presença de animais não tratados com nenhuma substância e mantidos igualmente aos animais que receberam diversas administrações dos compostos em estudo, sendo possível dessa maneira confrontar os resultados entre os diferentes grupos.

Como visto, nenhum dos parâmetros, nem renal, nem hepático, apresentaram alterações significativas em sua concentração. Dessa maneira, pode-se inferir que o tratamento crônico com vitexina não provoca danos de função hepatorenal, sendo aparentemente seguro ao menos em nossas condições de teste.

Finalmente, de acordo com a possibilidade de ação da vitexina em um ponto chave da ansiedade e epilepsia, essa flavona é, portanto, um composto de grande interesse etnofarmacológico, farmacêutico e biotecnológico, sobretudo quando se considera a importância epidemiológica dessas enfermidades em nível da saúde pública mundial.

## 6 CONCLUSÃO

Em conclusão aos estudos realizados, observou-se que a vitexina, nas doses utilizadas, apresenta atividade ansiolítica. Além disso, esse flavonoide mesmo que não tenha apresentado significativo efeito em ensaios utilizando NMDA e ácido caínico, evidenciou expressiva ação anticonvulsivante seletiva no decurso dos experimentos que utilizaram convulsivantes que antagonizam a neurotransmissão inibitória mediada por GABA (PTZ e Picrotoxina).

Destaca-se que, quando a vitexina foi utilizada como tratamento agudo de animais tratados PTZ como convulsivante, essa flavona protegeu os animais em até 100% contra crises tônico-clônicas na maior dose utilizada (5mg/kg). Esse resultado é fortalecido e complementado pelas observações do modelo crônico, onde vitexina reduziu a gravidade das convulsões durante o tratamento contínuo com PTZ.

Foi observado também que a vitexina não apresentou efeito citotóxico e o mecanismo de ação anticonvulsivante/antiepiléptico e ansiolítico de vitexina em nível molecular não envolve ações nos canais de sódio ou potássio. Contudo, e diante dos resultados anteriores, acredita-se que há a possibilidade da participação da via GABAérgica no mecanismo de ação da vitexina ou então da participação de mecanismos antioxidantes, como reportado pela literatura evidenciada.

Em complemento, o tratamento com doses contínuas de vitexina demonstrou-se seguro com base na observação da ausência de sedação e comprometimento da atividade locomotora e não ocorrência de manifestações e complicações renal ou hepática

## REFERÊNCIAS

- ABBASI, E. et al. Effects of Vitexin on Scopolamine-Induced Memory Impairment in Rats. **The Chinese Journal Of Physiology**, [s.l.], v. 56, n. 3, p.184-189, 2013.
- ABBASI, E. et al. Neuroprotective Effects of Vitexin, a Flavonoid, on Pentylentetrazole-Induced Seizure in Rats. **Chemical Biology & Drug Design**, [s.l.], v. 80, n. 2, p.274-278, 23 maio 2012.
- ABDENASSAR, H.; BELHATTAB, R. Antioxidant and antimicrobial activities of Rhamnus alaternus L. extracts. **Research**, v. 1, n. 1, p.1-96, jan. 2011.
- AGARWAL, N. B. et al. Effect of lamotrigine, oxcarbazepine and topiramate on cognitive functions and oxidative stress in PTZ-kindled mice. **Seizure**, v. 20, p. 257–262, 2011.
- ALEIXO, G. C. **Efeito dos óleos essenciais e compostos majoritários sobre endósporos de *Clostridium botulinum*** 2014. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.
- AMACHER, D. E. Serum Transaminase Elevations as Indicators of Hepatic Injury Following the Administration of Drugs. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.119-130, abr. 1998.
- AN, F et al. Attenuation of oxidative stress of erythrocytes by the plant-derived flavonoids vitexin and apigenin. **Pharmazie**, China, v. 70, n. 11, p.724-732, 2015.
- ARRANT, A. E.; SCHRAMM-SAPYTA, N. L.; KUHN, C. M. Use of the light/dark test for anxiety in adult and adolescent male rats. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 256, p.119-127, nov. 2013.
- ASADI-SHEKAARI, M. et al. Potential Mechanisms Involved in the Anticonvulsant Effect of Walnut Extract on Pentylentetrazole-Induced Seizure. **Medical Principles And Practice**, [s.l.], v. 23, n. 6, p.538-542, 2014.
- ASEERVATHAM, G. S. B. et al. Expression pattern of NMDA receptors reveals antiepileptic potential of apigenin 8-C-glucoside and chlorogenic acid in pilocarpine induced epileptic mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 82, p.54-64, ago. 2016.
- ATACK, J. R. GABA<sub>A</sub> receptor subtype-selective modulators. I. A2/α3-selective agonists as non-sedating anxiolytics. *Current topics in medicinal chemistry*, [s.l.], v. 11, n. 9, p.1176-1202, 1 maio 2011.

BANDELOW, B.; MICHAELIS, S.; WEDEKIND, D. Treatment of anxiety disorders. **Dialogues clin neurosci.**, [s.l.], v.19, n. 2, jun. 2017.

BENSON, C. et al. Biogenic Amines and the Amino Acids GABA and Glutamate: Relationships with Pain and Depression. **Modern Trends In Pharmacopsychiatry**, [s.l.], p.67-79, 2015.

BERG, A. T. et al. Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**, [s.l.], v. 51, n. 4, p.676-685, abr. 2010.

BEYENBURG, S. et al. Anxiety in patients with epilepsy: Systematic review and suggestions for clinical management. **Epilepsy & Behavior**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.161-171, set. 2005.

BOER, H. M.; MULA, M.; SANDER, J.W. The global burden and stigma of epilepsy. **Epilepsy & Behavior**, v. 12, p. 540-546, 2008.

BORGHI, S. M. et al. Vitexin inhibits inflammatory pain in mice by targeting TRPV1, oxidative stress, and cytokines. **J. Nat. Prod.** v. 76, p. 1141 - 1149, 2013.

BOURIN, M. Animal models for screening anxiolytic-like drugs: a perspective. **Translational Research**, Nantes, v. 17, n. 3, p.295-303, 2015.

BOURIN, M. et al. Animal models of anxiety in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, [s.l.], v. 21, n. 6, p.567-574, dez. 2007.

BOURIN, M.; HASCOËT, M. The mouse light/dark box test. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 463, n. 1-3, p.55-65, fev. 2003.

BOUWKNECHT, J. A.; PAYLOR, R. Pitfalls in the interpretation of genetic and pharmacological effects on anxiety-like behaviour in rodents. **Behavioural Pharmacology**, [s.l.], v. 19, n. 5-6, p.385-402, set. 2008.

BROMFIELD, E. B.; CAVAZOS, J. E.; SIRVEN, J. I. **An Introduction to Epilepsy**. Estados Unidos: American Epilepsy Society, 2006.

BYSTRITSKY, A. et al. Current Diagnosis and Treatment of Anxiety Disorders. **Pharmacy And Therapeutics**, [s.l.], v. 38, n. 1, p.41-44, 2013.

CABRERA, C. C.; SPONHOLZ J. A. Ansiedade e insônia. Em: N. J. Botega (Org.). **Prática psiquiátrica no hospital geral: interconsulta e emergência**. Porto Alegre: ArtMed, 2002. p. 251-268.

CAMPBELL, E. L.; CHEBIB, M.; JOHNSTON, G. A.R. The dietary flavonoids apigenin and (-)-epigallocatechin gallate enhance the positive modulation by diazepam of the activation by GABA of recombinant GABA<sub>A</sub> receptors. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 68, n. 8, p.1631-1638, out. 2004.

CAN, Ö. D.; ÖZKAY, Ü. D.; ÜÇEL, U. İ. Anti-depressant-like effect of vitexin in BALB/c mice and evidence for the involvement of monoaminergic mechanisms. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 699, n. 1-3, p.250-257, jan. 2013.

CAO, D. et al. Antioxidant Properties of the Mung Bean Flavonoids on Alleviating Heat Stress. **Plos One**, [s.l.], v. 6, n. 6, p.1-9, 10 jun. 2011.

CARTER, M.; SHIEH, J. Animal Behavior. **Guide to Research Techniques In Neuroscience**, [s.l.], p.39-71, 2015.

CHAOULOFF, F.; DURAND, M.; MORMÈDE, P. Anxiety- and activity-related effects of diazepam and chlordiazepoxide in the rat light/dark and dark/light tests. **Behavioural Brain Research**, [s.l.], v. 85, n. 1, p.27-35, abr. 1997.

CHITALIA, V.C et al. Cost-benefit analysis and prediction of 24-hour proteinuria from the spot urine protein-creatinine ratio. **Clinical Nephrology**, p.436-447, 2001.

CHOI, H. J. et al. Vitexin, an HIF-1alpha inhibitor, has anti-metastatic potential in PC12 cells. **Mol. Cells**, [s.l.], v. 22, n. 3, p. 291-299, 2006.

CHOI, J. S. et al. Effects of C-glycosylation on anti-diabetic, anti-Alzheimer's disease and anti-inflammatory potential of apigenin. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 64, p.27-33, fev. 2014.

CHOLERIS, E., THOMAS, A. W., KAVALIERS, M., PRATO, F. S. A detailed ethological analysis of the mouse open field test: effects of diazepam, chlordiazepoxide and an extremely low frequency pulsed magnetic field. **Neurosci. Biobehav**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.235-260, maio 2014.

CHOUDHARY, N.; BIJJEM, K. R. V.; KALIA, A. N. Antiepileptic potential of flavonoids fraction from the leaves of *Anisomeles malabarica*. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 135, n. 2, p.238-242, maio 2011.

CIRANNA, L. et al. Role of GABA A and GABA B receptors in GABA-induced inhibition of rat red nucleus neurons. **Neurosci Lett**, [s.l.] v. 34, n. 3, p.221-224, maio 2003.

COUTINHO, A. S. et al. Convulsão e epilepsia. In: FUNCHAL, Claudia; DANI, Caroline. **Neurociência: modelos experimentais em animais**. Porto Alegre: **EdiPUCRS e Editora Metodista IPA**, 2014. p. 195.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary Report of a Simple Animal Behavior Model for the Anxiolytic Effects of Benzodiazepines. **Pharmacology Biochemistry & Behavior**, [s.l.], v. 13, n. 2, p.167-170, 1980.

DALIC, L.; COOK, M. Managing drug-resistant epilepsy: challenges and solutions. **Neuropsychiatric Disease And Treatment**, [s.l.], v. 12, p.2605-2616, out. 2016.

DEKERMENDJIAN, K. et al. Structure–Activity Relationships and Molecular Modeling Analysis of Flavonoids Binding to the Benzodiazepine Site of the Rat Brain GABA<sub>A</sub> Receptor Complex. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 42, n. 21, p.4343-4350, out. 1999.

DEMIR OZKAY, U., CAN, O.D. Anti-nociceptive effect of vitexin mediated by the opioid system in mice. **Pharmacol. Biochem. Behav**, [s.l.], v. 109, p. 23-30, ago. 2013.

DHIR, A. Pentylentetrazol (PTZ) *kindling* model of epilepsy. **Current Protocols In Neuroscience**, [s.l.], p.1-12, jan. 2012.

DÍAZ-MORÁN, S. et al. Relationships of open-field behaviour with anxiety in the elevated zero-maze test: Focus on freezing and grooming. **World Journal Of Neuroscience**, [s.l.], v. 04, n. 01, p.1-11, 2014.

DINIZ, T. C. et al. The Role of Flavonoids on Oxidative Stress in Epilepsy. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [s.l.], v. 2015, p.1-9, 2015.

DINUZZO, M. et al. Physiological bases of the K<sup>+</sup> and the glutamate/GABA hypotheses of epilepsy. **Epilepsy Research**, [s.l.], v. 108, n. 6, p.995-1012, ago. 2014.

DIVEKAR, A. et al. The pharmacological evaluation of *Foeniculum vulgare* Miller for anti-anxiety. **Imperial Journal of Pharmacology & Toxicology**, v. 1, n.1, p.16–20, 2011.

DOMSCHKE, K.; MARON, E. Genetic Factors in Anxiety Disorders. **Anxiety Disorders**, [s.l.], p.24-46, 2013.

DONG, L. et al. Vitexin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts by attenuating inflammatory response and apoptosis. **Food Chem. Toxicol**, v. 49, n. 12, p. 3211-3216, dez. 2011.

DONG, L.Y. et al. Cardioprotection of vitexin on myocardial ischemia/reperfusion injury in rat via regulating in- flammatory cytokines and MAPK pathway. **Am. J. Chin. Med.** [s.l.], v. 41, n. 06, p.1251-1266, jan. 2013.

DONG, X.; WANG, Y. QIN, Z. Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Acta Pharmacologica Sinica**, [s.l.], v. 30, n. 4, p.379-387, abr. 2009.

DOVICH, S. S.; LAJOLO, F. M. Flavonoides e sua relação com doenças do Sistema Nervoso Central. **Soc. Bras. Alim. Nutr**, São Paulo, v. 36, n. 2, p.123-135, 2011.

DURANT C; CHRISTMAS D; NUTT, D. **The pharmacology of anxiety. *Curr Top Behav Neurosci***, [s.l.], v. 2, p. 303-330, 2010.

EIJKELKAMPN, N. et al. Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels. **Brain: a journal of neurology**, [s.l.], n. 135, v. 9, p.2585-2612, 2012.

ERKEC, O. E; ARIHAN, O. **Pentylentetrazole Kindling Epilepsy Model**. *Epilepsi*, v. 21, n.1, p. 6-12, 2015.

ESTANISLAU, C. et al. Context-dependent differences in grooming behavior among the NIH heterogeneous stock and the roman high and low-avoidance rats. **Neurosci Res**. v. 77, p.187-201, 2013.

EYSENCK, M. W; DERAKSHAN, N. **New perspectives in attentional control theory. *Personal Individ Differ***, v. 50, n. 9, p. 955-960, maio 2011.

FEATHERSTONE, D. E. Intercellular Glutamate Signaling in the Nervous System and Beyond. **Acs Chemical Neuroscience**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.4-12, 9 out. 2009.

FIGUEREDO, L. Z. P. **MEMÓRIA EMOCIONAL DE RATOS SELECIONADOS NO CAMPO ABERTO EM ALTO E BAIXO REARING**: aquisição, consolidação e extinção no condicionamento de medo. 2010. 143 f. Tese (Doutorado) - Curso de Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2010.

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

FISHER, R. S. et al. Operational classification of seizure types by the International League Against Epilepsy: Position Paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, [s.l.], v. 58, n. 4, p.522-530, 8 mar. 2017.

GAITAN, E. et al. Antithyroid and goitrogenic effects of millet: role of C-glycosylflavones. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 68, n. 4, p. 707-714, abr.1989.

GAITAN, E. et al. Antithyroid effects in vivo and in vitro of vitexin: a C-glycosylflavone in millet.. **The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [s.l.], v. 80, n. 4, p.1144-1147, abr. 1995.

GALLEANO, M. et al. Flavonoids and metabolic syndrome. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 1259, n. 1, p.87-94, jul. 2012.

GARCÍA-RODRÍGUEZ, M. C.; MONTAÑO-RODRÍGUEZ, A. R.; ALTAMIRANO-LOZANO, M. A. Modulation of hexavalent chromium-induced genotoxic damage in peripheral blood of mice by epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its relationship to the apoptotic activity. **Journal Of Toxicology And Environmental Health, Part A**, [s.l.], v. 79, n. 1, p.28-38, 29 dez. 2015.

GAUTHIER, I.; NUSS, P. Anxiety disorders and GABA neurotransmission: a disturbance of modulation. **Neuropsychiatric Disease And Treatment**, [s.l.], p.165-175, jan. 2015.

GELFUSO, E. A. R. **Os alcaloides eritrínicos (+)-eritravina e (+)-11- $\alpha$ -hidroxieritravina**: efeitos antiepiléptico, neuroprotetor e na preservação da memória/cognição em animais submetidos ao modelo de pilocarpina.. 2017. 113 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2017.

GELFUSO, E. et al. Anxiety: A Systematic Review of Neurobiology, Traditional Pharmaceuticals and Novel Alternatives from Medicinal Plants. **Cns & Neurological Disorders - Drug Targets**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.150-165, fev. 2014.

GIBB, A. J. NMDA receptor subunit gating – uncovered. **Trends In Neurosciences**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.7-10, jan. 2004.

GILANI, A.H., et al. Antispasmodic effects of Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) is mediated predominantly through K<sub>p</sub> -channel activation. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol**, [s.l.], v. 99, n. 5, p. 365-373, nov. 2006.

GODDARD, G. V. Development of Epileptic Seizures through Brain Stimulation at Low Intensity. **Nature**, [s.l.], v. 214, n. 5092, p.1020-1021, jun. 1967.

GORMAN, J. M. New molecular targets for antianxiety interventions. **The Journal of Clinical Psychiatry**. [s.l.], v. 64, p. 28-35.2003.

GRAEFF, F. G.; GUIMARÃES, F. S. Medicamentos Ansiolíticos. In: Fundamentos de Psicofarmacologia. São Paulo: **Ateneu**, 1999. p.123-160.

GROSSO, C. et al. The Use of Flavonoids in Central Nervous System Disorders. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 20, n. 37, p.4694-4719, nov. 2013.

GUERREIRO, C. A. M. História do Surgimento e Desenvolvimento das Drogas Antiepilépticas. **J Epilepsy Clin Neurophysiol**, Campinas, v. 1, n. 12, p.18-21, 2006.

GUIMARÃES, C. C. et al. The glycosylated flavonoids vitexin, isovitexin, and quercetrin isolated from *Serjania erecta* Radlk (Sapindaceae) leaves protect PC12 cells against amyloid- $\beta$  25-35 peptide-induced toxicity. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 86, p.88-94, dez. 2015.

GUPTA, Y.; KUMAR, M.V.; SRIVASTAVA, A. Effect of *Centella asiatica* on pentylenetetrazole-induced kindling, cognition and oxidative stress in rats. **Pharmacol Biochem Behav.** [s.l.], v. 74, p. 579–585, 2003.

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

HARBORE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry.** [s.l.], v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HE, M. et al. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 115, p.74-85, dez. 2016.

HERBERG, L. J.; WATKINS, P. J. Epileptiform Seizures induced by Hypothalamic Stimulation in the Rat: Resistance to Fits following Fits. **Nature**, [s.l.], v. 209, n. 5022, p.515-516, jan. 1966.

HUEN, M. S.Y. et al. Naturally occurring 2'-hydroxyl-substituted flavonoids as high-affinity benzodiazepine site ligands. *Biochemical pharmacology*, [s.l.], v. 66, n. 12, p.2397-2407, dez. 2003.

JÄGER, A.; SAABY, L. Flavonoids and the CNS. **Molecules**, [s.l.], v. 16, n. 2, p.1471-1485, 10 fev. 2011.

KAILA, K. et al. GABA actions and ionic plasticity in epilepsy. **Current Opinion In Neurobiology**, [s.l.], v. 26, p.34-41, jun. 2014.

KALUEFF, et al. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nature Reviews Neuroscience**, [s.l.], v. 17, n. 1, p. 45-59, dez. 2016.

KANDRATAVICIUS, L. et al. Animal models of epilepsy: use and limitations. **Neuropsychiatric Disease And Treatment**, [s.l.], p.1693-1705, set. 2014.

KAPLAN, D. I.; ISOM, L. L.; PETROU, S. role of sodium channels in epilepsy. *Cold spring harbor perspectives in medicine*, [s.l.], v. 6, n. 6, p.1-18, 3 maio 2016.

KIM, J. et al. Vitexin, orientin and other flavonoids from *Spirodela polyrhiza* inhibit adipogenesis in 3T3-L1 cells. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 24, n. 10, p.1543-1548, 19 ago. 2010.

KÖHLING, Rüdiger; WOLFART, Jakob. Potassium Channels in Epilepsy. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, [s.l.], v. 6, n. 5, p.1-24, maio 2016.

KRCATOVIC, E. et al. Inhibition of tobacco mosaic virus infection by quercetin and vitexin. **Acta Virol**, [s.l.], p. 52, n. 2, p. 119-124, 2008.

KUBO, M.; ITO, E. Structural dynamics of an ionotropic glutamate receptor. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, [s.l.], v. 56, n. 3, p.411-419, 14 maio 2004.

KUMAR, V.; BHAT, Z. Al.; KUMAR, D. Animal models of anxiety: A comprehensive review. **Journal Of Pharmacological And Toxicological Methods**, [s.l.], v. 68, n. 2, p.175-183, set. 2013.

KUMARI, S.; MISHRA, C. B.; TIWARI, M. Design, synthesis and pharmacological evaluation of N-[4-(4-(alkyl/aryl/heteroaryl)-piperazin-1-yl)-phenyl]-carbamic acid ethyl ester derivatives as novel anticonvulsant agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 25, n. 5, p.1092-1099, mar. 2015.

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

LEAL, A. E. B. P. et al. ATIVIDADE ANSIOLÍTICA E SEDATIVA DE ESPÉCIES DO GÊNERO PASSIFLORA – um mapeamento científico e tecnológico. **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v. 9, n. 3, p.323-336, 2016.

LEE, C. et al. Apoptosis triggered by vitexin in U937 human leukemia cells via a mitochondrial signaling pathway. **Oncology Reports**, [s.l.], v. 28, n. 5, p.1883-1888, 30 ago. 2012.

LEE, V. L. L. et al. Treatment, Therapy and Management of Metabolic Epilepsy: A Systematic Review. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 19, n. 3, p.871-891, 15 mar. 2018.

LEONARD, B. E. The NMDA receptor. Edited by Watkins and Collingridge. IRL Press, 1990. Pages: xviii + 242. ISBN 0-19-963125-5. **Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental**, [s.l.], v. 6, n. 4, p.333-333, dez. 1991.

LI, Y.L. et al. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge. **J. Ethnopharmacol**, v.79, n. 3, p. 365-368, 2002.

LIEN, E. J., et al. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 285–294, 1999.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, n. 2, p. 180-185, 1987.

LOCOCK, C. [Letter]. *Lancet*, p. 136-138, 1857.

LOPES-CENDES, I. The genetics of epilepsies. **Jornal de Pediatria**, [s.l.], p.33-39, 15 set. 2008.

MA, L.Y. et al. The pharmacokinetics of C-glycosyl flavones of Hawthorn leaf flavonoids in rat after single dose oral administration. **Phytomedicine** [s.l.], v. 17, n. 8-9, p.640-645, jul. 2010.

MADEJA, M. et al. Mechanism of action of the epileptogenic drug pentylenetetrazol on a cloned neuronal potassium channel. **Brain Research**, [s.l.], v. 722, n. 1-2, p.59-70, maio 1996.

MAHE, V.; BALOGH, A. Long-term pharmacological treatment of generalized anxiety disorder. **Int Clin Psychopharmacol**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.99-105, 2000.

MARCAGGI, P.; ATTWELL, D. Role of glial amino acid transporters in synaptic transmission and brain energetics. **Glia**, [s.l.], v. 47, n. 3, p.217-225, 2004.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, [s.l.], v. 31, n. 5, p.1218-1223, 2008.

MARDER, M. et al. Molecular modeling and QSAR analysis of the interaction of flavone derivatives with the benzodiazepine binding site of the GABA<sub>A</sub> receptor complex. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.323-335, fev. 2001.

MARMIROLI, P.; CAVALETTI, G. The Glutamatergic Neurotransmission in the Central Nervous System. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 19, n. 9, p.1269-1276, 1 mar. 2012.

MATIAS, I.; BUOSI, A. S.; GOMES, F. C. A. Functions of flavonoids in the central nervous system: Astrocytes as targets for natural compounds. **Neurochemistry International**, [s.l.], v. 95, p.85-91, maio 2016.

MCNAMARA, J. Kindling: an animal model of complex partial epilepsy. **Annals Of Neurology**, [s.l.], v. 16, n. 16, p.72-76, 1984.

MEDEIROS, K. A. A. L. **Efeito do geraniol no comportamento e no padrão de ondas cerebrais de ratos**. 2015. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Sergipe, São Cristóvão, 2015.

MELDRUM, B. GABAergic mechanisms in the pathogenesis and treatment of epilepsy. **British Journal Of Clinical Pharmacology**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.3-11, fev. 1989.

MELDRUM, B.S; ROGAWSKI, M.A. Molecular targets for antiepileptic drug development. **Neurotherapeutics**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.18-61, jan. 2007.

MELO, M. G. D. et al. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Scientia Plena**, São Cristóvão, v. 8, n. 4, p.1-6, 2012.

MIHIC, S. J.; HARRIS, R. A. Hipnóticos e sedativos. In: BRUNTON, Laurence L. et al. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. Porto Alegre, p. 457, 2012.

MIN, J. W. et al. Vitexin reduces hypoxia–ischemia neonatal brain injury by the inhibition of HIF-1alpha in a rat pup model. **Neuropharmacology**, [s.l.], v. 99, p.38-50, dez. 2015.

MIYASAKA, L. S.; ATALLAH, Álvaro N; SOARES, Bernardo. Passiflora for anxiety disorder. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, [s.l.], v. 24, n. 1, jan. 2007.

MIZOI, C. S.; DEZOTI, C.; VATTIMO, M. F. F. Função renal de pacientes de unidade de terapia intensiva: creatinina plasmática e proteína carreadora do retinol urinário. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [s.l.], v. 20, n. 4, p.385-393, dez. 2008.

MIZUNO, K. et al. Metabolic Activation of Benzodiazepines by CYP3A4. **Drug Metabolism And Disposition**, [s.l.], v. 37, n. 2, p.345-351, 12 nov. 2009.

MONTGOMERY, K.C. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J. Comp Physiol Psychol.**, [s.l.], v. 48, p. 254-260, 1995.

MORATO, S.; BRANDÃO, M. L. Paradoxical increase of exploratory behavior in the elevated plus-maze by rats exposed a two kinds of aversive stimuli. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 30, 1113-1120, 1997.

NASTASSJA, K; DAN. J. S. **Pharmacotherapy of anxiety disorders: a critical review. Dialogues Clin Neurosci**, v. 13, n. 4, p.423-437, 2011.

NAVIDHAMIDI, M.; GHASEMI, M.; MEHRANFARD, Nasrin. Epilepsy-associated alterations in hippocampal excitability. **Reviews In The Neurosciences**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.307-334, 1 jan. 2017.

NAYLOR, D. E. Glutamate and GABA in the balance: Convergent pathways sustain seizures during status epilepticus. **Epilepsia**, [s.l.], v. 51, p.106-109, 1 jul. 2010.

NAZIROĞLU, M. et al. Capparis ovata modulates brain oxidative toxicity and epileptic seizures in pentylentetrazol-induced epileptic rats. **Neurochemical Research**, [s.l.], v. 38, n. 4, p.780-788, 2013.

NEWLAND, C F; CULL-CANDY, S G. On the mechanism of action of picrotoxin on GABA receptor channels in dissociated sympathetic neurones of the rat. **The Journal Of Physiology**, [s.l.], v. 447, n. 1, p.191-213, 1 fev. 1992.

OLIVEIRA, D. R. et al. Flavones from *Erythrina falcata* are modulators of fear memory. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.1-18, 5 ago. 2014.

OLSEN, R. W. Picrotoxin-like channel blockers of GABAA receptors. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 103, n. 16, p.6081-6082, 10 abr. 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Epilepsy**. February. 2018.

OZER, J. et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, [s.l.], v. 245, n. 3, p.194-205, mar. 2008.

PANNALA, A. S. et al. Flavonoid b-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and biophysical research communications**. v. 282. p. 1161-1168, 2001.

PAOLETTI, P.; BELLONE, C.; ZHOU, Q. NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, [s.l.], v. 14, n. 6, p.383-400, jun. 2013.

PAPI, A. et al. Vitexin-2-O-xyloside, raphasatin and (-)-epigallocatechin-3-gallate synergistically affect cell growth and apoptosis of colon cancer cells. **Food Chem.** [s.l.], v. 138, n. 2-3, p.1521-1530, jun. 2013.

PELLOW, S. et al. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods.**, [s.l.], v. 14, n. 13, p.149-167, 1985.

PEREIRA, E. M. **Avaliação do papel de receptores NMDA para glutamato na nociceção orofacial aguda e crônica em ratos**. 2006. 135 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná., Curitiba, 2006.

PERUCCA, Piero; GILLIAM, Frank G. Adverse effects of antiepileptic drugs. **The Lancet Neurology**, [s.l.], v. 11, n. 9, p.792-802, set. 2012.

PINEL, J. P; ROVNER, L. I. Experimental epileptogenesis: kindling-induced epilepsy in rats. **Experimental Neurology**, [s.l.], v. 58, n. 15, p.190-202, jan. 1978.

PITTA, F. D. **Histamina intra-amídala modula a memória aversiva de camundongos submetidos à Esquiva Inibitória, mas não à reexposição no Labirinto em Cruz Elevado**. 2013. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Departamento de Psicologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

PORTO, L. A. et al. O Papel dos Canais Iônicos nas Epilepsias e Considerações Sobre as Drogas Antiepilépticas: Uma breve revisão. **Journal Of Epilepsy And Clinical Neurophysiology**, [s.i], v. 13, n. 4, p.169-175, 2007.

PRAVEENA, R. et al. Experimental and DFT studies on the antioxidant activity of a C-glycoside from *Rhynchosia capitata*. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s.l.], v. 103, p.442-452, fev. 2013.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUĽOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 82, n. 4, p.513-523, jun. 2011.

PROVENSÍ, G. **INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANSIOLÍTICA DE *Passiflora alata* Curtis (PASSIFLORACEAE)**. 2007. 135 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

QIAN, H.. Picrotoxin Accelerates Relaxation of GABAC Receptors. **Molecular Pharmacology**, [s.l.], v. 67, n. 2, p.470-479, 17 nov. 2004.

RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure. **Electroencephalography And Clinical Neurophysiology**, [s.l.], v. 32, n. 3, p.281-294, mar. 1972.

RAGONE, M.I. et al. The spasmolytic effect of *Aloysia citriodora*, Palau (South American cedron) is partially due to its vitexin but not isovitexin on rat duodenum. **J. Ethnopharmacol**, [s.l.], v. 113, n. 2, p. 258-266, set. 2007.

RANG, H.P. et al. Farmacologia. Rio de Janeiro – Elsevier, 5ª edição, 2004.

REINER, A.; LEVITZ, J. Glutamatergic Signaling in the Central Nervous System: Iontropic and Metabotropic Receptors in Concert. **Neuron**, [s.l.], v. 98, n. 6, p.1080-1098, jun. 2018.

RHO, J M; DONEVAN, S D; A ROGAWSKI, M. Direct activation of GABAA receptors by barbiturates in cultured rat hippocampal neurons. **The Journal Of Physiology**, [s.l.], v. 497, n. 2, p.509-522, 1 dez. 1996.

RIBEIRO L., BUSNELLO, J. V, KAPCZINSKI F. Neurofisiologia dos transtornos da ansiedade. IN: BERNIK MA. **Benzodiazepínicos: quatro décadas de experiência**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p. 45-57. 1999.

RIBEIRO, M. P. P. **EFEITO DO DIAZEPAM SOBRE O GROOMING INDUZIDO POR CONTENÇÃO EM RATOS**. 2016. 30 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Mestrado em Análise do Comportamento, Departamento de Psicologia Geral e Análise do Comportamento, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RUGGIERO, R. N. et al. Neurotransmissão glutamatérgica e plasticidade sináptica: aspectos moleculares, clínicos e filogenéticos. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 44, n. 2, p. 143-156, 2011.

SALVIANO, M. F. **Análise fisiológica e comportamental de modelos animais desenvolvidos geneticamente para o estudo da ansiedade e da Doença de Alzheimer**. 2013.

111 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Ciências do Comportamento, Instituto de Psicologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SCHEFFER, I. E. Classificação das epilepsias da ILAE: Relatório da Comissão de Classificação e Terminologia da ILAE. **Epilepsia**, [s. l.], v. 4, n. 54, p.512-521, 2017.

SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. **Journal Of Visualized Experiments**, [s.l.], n. 96, p.1-6, 6 fev. 2015.

SHEKHAR, A. et al. Summary of a National Institute of Mental Health workshop: developing animal models of anxiety disorders. **Psychopharmacology**, [s.l.], v. 157, n. 4, p.327-339, 1 out. 2001.

SIEGEL, G.J. Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects. 6<sup>a</sup>. Ed. Philadelphia: **Lippincott Williams & Wilkins**, 1999.

SILVA, J. A. **EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DA PASSIFLORA INCARNATA L. SOBRE A ANSIEDADE EM HUMANOS**. 2015. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências da Nutrição, Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

SILVA, J. C. **Atividade antiepiléptica do peptídeo Neuropolybina e de um análogo: estudo eletroencefalográfico e potencial alvo farmacológico**. 2013. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SIMÕES, C.M.O. et al. Farmacognosia, da planta ao medicamento. 5 ed Florianópolis: Ed. **UFRGS**: 2004. 821p.

SOULIMANI, C. et al. Behavioural effects of Passiflora incarnata L. and its indole alkaloid and flavonoid derivatives and maltol in the mouse, *J. Ethnopharmacol.*, [s.l.], v. 57, n.1, p. 11-20, 1997.

SPENCER, Jeremy P. E. Flavonoids: modulators of brain function? **British Journal Of Nutrition**, [s.l.], v. 99, n. -1, p.60-77, maio 2008.

TENNEY, J. R.; GLAUSER, T. A. The Current State of Absence Epilepsy: Can We Have Your Attention?. **Epilepsy Currents**, [s.l.], v. 13, n. 3, p.135-140, maio 2013.

VELOSO, A. W. N. **Curso temporal e distribuição regional da autolimpeza de ratos em resposta a diferentes estressores ambientais**. 2012. 43 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Mestrado em Análise do Comportamento, Universidade Federal de Londrina, Londrina, 2012.

VILLA, C.; COMBI, R. Potassium Channels and Human Epileptic Phenotypes: An Updated Overview. **Frontiers In Cellular Neuroscience**, [s.l.], v. 10, p.1-8, 30 mar. 2016.

VINCENT, P.; MULLE, C. Kainate receptors in epilepsy and excitotoxicity. **Neuroscience**, [s.l.], v. 158, n. 1, p.309-323, jan. 2009.

WALSH, R. N., CUMMINS, R. A. The open field test: a critical review. **Psychol. Bull.**, [s.l.], v. 83, p. 482-504, 1976.

WASZKIELEWICZ, A. M. et al. Ion Channels as Drug Targets in Central Nervous System Disorders. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 20, n. 10, p.1241-1285, 1 mar. 2013.

WERNER, F.M.; COVENAS, R. Classical Neurotransmitters and Neuropeptides Involved in Generalized Epilepsy: A Focus on Antiepileptic Drugs. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 18, n. 32, p.4933-4948, 1 nov. 2011.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P.E. Flavonoids, cognition, and dementia: Actions, mechanisms, and potential therapeutic utility for Alzheimer disease. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 52, n. 1, p.35-45, jan. 2012.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 126, n. 2, p.485-493, 1 jun. 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Depression and Other Common Mental Disorders**. Global Health Estimates, 2017.

YANG, S.H. et al. The Novel p53-Dependent Metastatic and Apoptotic Pathway Induced by Vitexin in Human Oral Cancer OC2 Cells. **Phytotherapy research**, [s.l.], v. 27, n. 8, p.1154-1161, 13 set. 2012.

YOUDIM, K. A.; SHUKITT-HALE, Barbara; JOSEPH, James A. Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 37, n. 11, p.1683-1693, dez. 2004.

ZARGHI, A. et al. Synthesis and anticonvulsant activity of new 2-substituted-5-(2-benzyloxyphenyl)-1,3,4-oxadiazoles. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 15, n. 7, p.1863-1865, abr. 2005.

ZHANG, J. et al. Studies on the active components and antioxidant activities of the extracts of *Mimosa pudica* Linn. from southern China. **Pharmacogn. Mag.**, [s.l.], v. 7, n. 25, p.35-39, 2011.

ZHANG, W. et al. Development of a comprehensive pharmacophore model for the benzodiazepine receptor. **Drug Design and Discovery**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.193-248; 1995.

ZHANG, Y. et al. Purification and Characterization of Flavonoids from the Leaves of *Zanthoxylum bungeanum* and Correlation between Their Structure and Antioxidant Activity. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 8, p.1-11, 26 ago. 2014.

ZHOU, J. et al. Vitexin 6, a novel lignan, induces autophagy and apoptosis by activating the Jun N-terminal kinase pathway. **Anticancer Drugs**, [s.l.], v. 24, p. 928-936, 2013.

ZHOU, Y. et al. Vitexins, nature-derived lignan compounds, induce apoptosis and suppress tumor growth. **Clin. Cancer Res**, [s.l.], v. 15, p. 5161-5169, 2009.

ZUBERI, S. M.; SYMONDS, J. D. Update on diagnosis and management of childhood epilepsies. **Jornal de Pediatria**, [s.l.], v. 91, n. 6, p.567-577, nov. 2015.

## ANEXO



---

Ribeirão Preto, 7 de março de 2016

Prezado(a) Pesquisador (a) Rene de Oliveira Beleboni,

Vimos por meio desta informar que Comitê de Ética em Pesquisa para Seres Humanos da Universidade de Ribeirão Preto CEP/UNAERP analisou e aprovou sem restrições, o Projeto intitulado **“ATIVIDADES ANSIOLÍTICAS E ANTICONVULSIVANTES DE VITEXINA: ESTUDO DE NEUROETOLOGIA E NEUROQUÍMICA.”**, tendo como pesquisador(a) Rene de Oliveira Beleboni, registrado sobre o **ComÉt: 11/2015**

Temos ciência de que os estudos estão sendo conduzidos na Universidade de Ribeirão Preto.

Solicitamos que nos encaminhe os relatórios parciais e finais, bem como envie-nos possíveis emendas, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança do estudo para que possamos fazer o devido acompanhamento.

Atenciosamente,

*Profª Drª Luciana Rezende Alves Oliveira*

**Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa para Seres Humanos  
Universidade de Ribeirão Preto**