



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**Efeito do Triterpeno $3\beta,6\beta,16\beta$ Trihidroxilup-20(29)-eno nas
convulsões induzidas por pentilenotetrazol: o papel da Na^+ , K^+
ATPase**

DISSERTAÇÃO

Iuri Domingues Della Pace

Santa Maria, RS, Brasil

2013

Efeito do Triterpeno 3 β ,6 β ,16 β Trihidroxilup-20(29)-eno nas convulsões induzidas por pentilenotetrazol: o papel da Na⁺, K⁺ ATPase

Por

Iuri Domingues Della Pace

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do Programa de Pós- Graduação em Farmacologia, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) com requisito parcial para obtenção do grau de

Mestre em Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes

Santa Maria, RS, Brasil

2013

Universidade Federal de Santa Maria

Centro de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Efeito do Triterpeno 3β , 6β , 16β , trihidroxilup-20(29)-eno nas convulsões induzidas por pentilenotretazol: papel da Na^+ , K^+ ATPase

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,

aprova a Dissertação de Mestrado

elaborada por

Iuri Domingues Della Pace

como requisito parcial para a obtenção do grau de

Mestre em Farmacologia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Luiz Fernando Freire Royes, Dr. (UFSM)

(Presidente/orientador)

Margareth Linde Athyde, Dra. (UFSM)

(1º membro da banca)

Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)

(2º membro da banca)

Santa Maria, 30 de Setembro de 2013

“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância”

(John F. Kennedy)

Dedico este trabalho aos meus pais.

Agradecimento

Como começar, se não começar agradecendo as duas pessoas, que mais importam na minha vida, meus pai Jorge e minha mãe Angela. Muito obrigado por me fazer esta pessoa que sou hoje, por formar todos os meus valores, caráter, por me dar todo o carinho, amor, me chingar na hora que precisava e me incentivar sempre que acabava deslizando de alguma maneira e ficando triste. AMO VOCÊS. Estas pessoas que sempre estavam ali e sempre irão estar do meu lado para o que acontecer na minha vida. Também quero agradecer ao meu irmão que sempre que preciso de alguém para conversar ou até mesmo brigar e descontar algumas coisas está ali (e claro né Mano, no financeiro também, huahauhau) obrigado por tudo.

A minha namorada que estava ali quando precisei, em alguns momentos bem complicados da minha vida neste ano, mas sempre ali do meu lado me ajudando, incentivando e me colocando sempre para cima, muito obrigado AMOR, TE AMO.

Aos meus orientadores Nando e Mi, que vou dizer, me aturam um pouquinho, desde o início, quando eu incomodava mais do que nunca indo à sala deles e pedindo para entrar no laboratório ou perguntando algo sobre (huahauhau). E principalmente pelos ensinamentos, por acreditar e pelo incentivo para que seguisse em frente sempre. Meu eterno reconhecimento a vocês, muito obrigado.

E o que dizer da nossa GRANDE FAMÍLIA BIOEX, nossa são tantas coisas que seria uma tese inteira só para agradecer e falar do que todos fizeram e fazem por mim até hoje. Quero agradecer primeiramente ao Leonardo (Léo), por todos ensinamentos e ao Leandro (Samuraiiiii) pelos ensinamentos e por fazer as dancinhas , que quando eu entrei no lab, lá no prédio 21 foram os primeiros e até hoje os meus “orientadores”, muito obriga-

do gurizada. E agora falar de todos aqui é difícil e vocês sabem disso, mas agradeço a todos vocês Fernanda (Fer, Lia) pela parceria desde sempre né gurizinho, Mauren (corção de preda, mala mor) pelo intensivo de trago e as discussões bêbados, Bibiana (Bibis) pelo lobisome do mato, Luiz (gordinho, Zé colmeia) que hoje ta igual a eu , Mauricio (Mau, Gugu, personal dance) por dançar lokão, Frederico (Fred, Sid) pelas risadas, Guilherme (Busa) pelos churras e tragos, Rogério (Rô) pelos Red label, Fernando (mandolante) pelas loucuras e acoar, Leandro (lelê) pela parceria, Mauro (Maurão), Brescianni (álcool gel), André (Dedé), pelos posos depois da ballare, Ana Paula (Aninha) pelas loucuras e ajuda em tudo, e ao pessoal eu está entrando agora, Marla(Bob), Fernanda (tiopental) , Alexandra (Ale), Luiz (equitezina), Mauro (Maurinho), muito obrigado pessoal, por tudo mesmo desde brigas que foram poucas, tragos que foram incontáveis e alguns que nem lembramos (huahauhau) ensinamentos, AMIZADE.

Ao pessoal do prédio 21, agora separados de nós por alguns metros, muito obrigado.

Aos professores e amigos Mauro e Ana Flávia pela oportunidade de conviver e aprender com vocês, que sempre que preciso posso contar.

Ao Professor Carlos não só por dançar lokão, mas pelos ensinamentos.

A Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de fazer parte do seu corpo discente.

Ao Programa de Pós-Graduação em farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria, seus professores e funcionários, por auxiliarem no meu crescimento profissional.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida.

E por fim, porém de maneira alguma menos importante agradeço a Deus, pelo dom da vida e por ter colocado todas essas pessoas maravilhosas e inesquecíveis no meu caminho.

RESUMO

Dissertação de Mestrado

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Universidade Federal de Santa Maria

Efeito do Triterpeno 3 β , 6 β , 16 β , trihidroxilup-20(29)-eno nas convulsões induzidas por pentilenotretazol: papel da Na⁺, K⁺ ATPase

Autor: Iuri Domingues Della Pace

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 30 de setembro de 2013

A epilepsia é uma síndrome caracterizada por crises espontâneas e recorrentes, resultado de descargas paroxísticas, excessivas e sincrônicas de uma população neural. Apesar do bom prognóstico, o elevado número de pacientes com epilepsia, que apresentam convulsões refratárias aos medicamentos, reflete a falta de um melhor entendimento dos distúrbios excitotóxicos característico desta doença. Desta forma, torna-se importante o entendimento dos mecanismos de indução e manutenção das convulsões, bem como, a busca por novos compostos anticonvulsivantes que possam evitar o desenvolvimento desta patologia. Como a nocicepção e a epilepsia possuem mecanismos em comum, e vários anticonvulsivantes são usados no tratamento da dor, foi investigado o efeito do Triterpeno 3 β ,6 β ,16 β Trihidroxilup-20(29)-eno (TTHL), um composto com propriedades antinociceptivas, nas convulsões induzidas pelo pentilenotretazol (PTZ). A administração do TTHL (30 mg/kg; p.o) aumentou a latência para a primeira convulsão mioclônica e tônico-clônica e reduziu a duração das convulsões generalizadas induzidas pelo PTZ. Além disso, a administração do TTHL reduziu a peroxidação lipídica e a carbonilação de proteínas, assim como, protegeu da inibição da captação de glutamato e da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase (subunidades α_1 e α_2/α_3) causadas pelo PTZ. Embora, o TTHL não mostrou uma atividade antioxidante *per se* e não alterou a ligação do [³H]flunitrazepam ao sítio para benzodiazepínico do receptor GABA_A, este composto protegeu das convulsões e da inibição da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase induzidos pela ouabaina. Estes resultados sugerem que a ação anticonvulsivante do TTHL é devido s manutenção da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase. De fato, os experimentos realizados no córtex cerebral *in vitro* mostraram que o PTZ (10 mM) reduziu a atividade da Na⁺,K⁺-ATPase e que a incubação prévia com TTHL (10 μ M) protegeu desta inibição. Dessa forma, estes dados indicam que a proteção exercida pela TTHL neste modelo de convulsão não está relacionado com atividade antioxidante ou a atividade GABAérgica. No entanto, estes resultados demonstraram que a proteção eficaz da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase, induzida por este composto, protege contra os danos excitotóxicos e oxidativos induzidos pelo PTZ.

Palavras-chaves: Triterpeno, convulsão, Na⁺, K⁺ ATPase, Dano oxidativo, Petilenotretazol, Ouabaina.

ABSTRACT

Dissertation of Master Degree

Post-Graduating Program in Pharmacology

Federal University of Santa Maria

Triterpene 3β , 6β , 16β trihidroxilup-20(29)-ene protects against excitability and oxidative damage induced by pentylenetetrazol: The role of Na^+ , K^+ -ATPase activity

Author: Iuri Domingues Della Pace

Advisor: Prof. Dr. Luiz Fernando Freire Royes

Date and Place: Santa Maria, September, 30th, 2013

Epilepsy is a syndrome characterized by spontaneous recurrent seizures, result of paroxysmal discharges, excessive or synchronous a neural population. Despite the good prognosis, the high number of patients with epilepsy who have seizures refractory to medication, reflects the lack of a better understanding of excitotoxic disorders characteristic of this disease. Thus, it becomes important to understand the mechanisms for induction and maintenance of seizures as well, the search for new antiepileptic compounds that may prevent the development of this pathology. As nociception and epilepsy have mechanisms in common and several anticonvulsant drugs are used in treatment of pain, we investigated the effect of triterpene 3β , 6β , 16β Trihidroxilup-20 (29)-ene (TTHL), a compound with antinociceptive properties in convulsions induced by pentylenetetrazol (PTZ). The TTHL administration (30 mg / kg, po) increased the latency to the first myoclonic seizures and tonic-clonic seizure and decreased the duration of generalized seizures induced by PTZ. In addition, the administration of TTHL reduced lipid peroxidation and protein carbonylation, as well as protected from inhibition of glutamate uptake and activity of the Na^+ , K^+ -ATPase ($\alpha 1$ and $\alpha 2/\alpha 3$ subunits) caused by PTZ. Although the TTHL showed no antioxidant activity per se and not alter the binding of [^3H] flunitrazepam to the site of the GABA_A receptor benzodiazepinic, this protected compound of convulsions and inhibition of Na^+ , K^+ -ATPase activity induced by ouabain. These results suggest that the anticonvulsant action is due TTHL's maintenance of Na^+ , K^+ -ATPase. In fact, the experiments performed in the cerebral cortex in vitro showed that PTZ (10 mM) reduced the activity of Na^+ , K^+ -ATPase and that preincubation with TTHL (10 mM) protected from this inhibition. Thus, these data indicate that the protection exerted by TTHL this seizure model is not related to antioxidant activity or GABAergic activity. However, these results demonstrate that effective protection of Na^+ , K^+ -ATPase activity induced by this compound protects against oxidative and excitotoxic damage induced by PTZ.

Key words: Triterpene, Seizure, Na^+ , K^+ -ATPase, Oxidative Damage, Pentylenetetrazol, Ouabain.

LISTA DE ABREVEATURAS

ABTS	Ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolona)-6 sulfônico
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
GABA _A	Ácido gama-aminobutírico
NMDA	N-metil D-Aspartato
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PTZ	Pentilenotetrazol
SNC	Sistema nervoso central
TTHL	Triterpeno 3 β ,6 β ,16 β Trihidroxilup-20(29)-eno

SUMARIOⁱ

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. EPILEPSIA	13
1.1.1. <i>Histórico</i>	13
1.1.2. <i>Epidemiologia</i>	14
1.1.3. <i>Tratamento</i>	15
1.1.4. <i>Modelos experimentais</i>	16
1.1.5. <i>Modelo de convulsões induzidas por PTZ</i>	16
1.2. Na^+, K^+ -ATPASE	18
1.2.1. <i>Aspectos gerais</i>	18
1.2.2. <i>Estrutura</i>	19
1.2.3. <i>Regulação</i>	20
1.2.4. <i>Epilepsia e Na^+, K^+-ATPase</i>	21
1.3. PLANTAS MEDICINAIS	23
1.3.1. <i>Combretum Leprosum Mart</i>	25
1.4. OBJETIVOS.....	27
1.4.1. <i>Objetivo geral</i>	27
1.4.2. <i>Objetivos específicos</i>	27
2. ARTIGO CIENTÍFICO	28
2.1. TRITERPENE 3B, 6B, 16B TRIHIDROXILUP-20(29)-ENE PROTECTS AGAINST EXCITABILITY AND OXIDATIVE DAMAGE INDUCED BY PENTYLENETETRAZOL: THE ROLE OF Na^+, K^+ -ATPASE ACTIVITY	28
2.1.1. <i>Título em português</i>	28
2.1.2. <i>Autores</i>	28
3. DISCUSSÃO	40
4. CONCLUSÕES PARCIAIS	45
5. REFERENCIAIS BIBLIOGRÁFICOS	46

APRESENTAÇÃO

No item **INTRODUÇÃO** está descrita uma breve revisão sobre os temas abordados nesta dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão sob a forma de artigo, o qual se encontra no item **ARTIGO CIENTÍFICO**. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste trabalho.

Os itens **DISCUSSÃO** e **CONCLUSÕES**, encontrados no final desta dissertação, apresentam interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho.

O item **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** refere-se somente as citações que aparecem nos itens **INTRODUÇÃO E DISCUSSÃO** desta dissertação.

1. INTRODUÇÃO

1.1.Epilepsia

1.1.1.Histórico

As crenças predominam na história da epilepsia. As pessoas com epilepsia da Roma antiga eram evitadas por medo de contágio. Na Idade Média, elas foram perseguidas como bruxas. Em 1494, foi lançado o manual de caça as bruxas, *Malleus maleficarum*, escrito por dois frades dominicanos vinculados à famigerada Inquisição Católica (MASIA SL, DEVINSKY O, 2000).

Os diferentes tipos de epilepsia e, por consequência, diferentes manifestações motoras, eram associados a nomes de diferentes espíritos ou deuses, geralmente malignos (MOREIRA, 2004). Na Grécia antiga, a epilepsia era considerada uma doença sagrada (*morbus sacer*). Já em 400 a.C., Hipócrates, o pai da Medicina, escreveu um texto no qual propôs que a epilepsia não era sagrada nem divina, e sim, uma doença relacionada ao cérebro, com possível origem hereditária, tentando fazer uma desconexão dos fenômenos físicos com as forças sobrenaturais. Muitos anos depois, em aproximadamente 129 d.C., Galeno fez as primeiras classificações das diferentes manifestações epiléticas, separando-as em: causas desconhecidas e as que eram resultado de outras doenças (MOREIRA, 2004).

Na idade média, diferentemente do que se acreditava na Grécia antiga, a epilepsia era considerada uma doença de origem demoníaca (*morbus demoniacus*). Além disso, no início do século XX, se acreditava que a epilepsia era uma doença transmissível pela respiração. Foi um período no qual se preconizou a vacinação contra o *Bacillus epilepticus* (YACUBIAN, 2000).

Quando se trata das bases da epileptologia moderna, destaca-se Hughlings Jackson, que definiu a epilepsia como “uma descarga súbita, excessiva e rápida da substância cinzenta”, definição que até hoje é aceita. Além disso, em 1879, Jackson estabeleceu as bases neuroanatômicas para os fenômenos epiléticos em seu texto “*Lectures on the Diagnosis of Epilepsy*” (GOMES, 2006). Atualmente, a epilepsia é um assunto desmistificado, porém, ainda é alvo de grande preconceito, devido a ideias controversas e errôneas sobre o assunto, levando a pessoa com epilepsia a ser discriminada, muitas vezes, pela sociedade (THOMAS; NAIR, 2011).

1.1.2. Epidemiologia

A epilepsia é um transtorno neurológico grave muito comum . Dentre os transtornos neurológicos, a epilepsia é um dos mais graves, atingindo cerca de 50 milhões de pessoas ao redor do mundo, sendo que 80% desses se encontram nos países em desenvolvimento (OMS, 2012). Dentre as possíveis consequências da epilepsia destacam-se as consequências profundas, incluindo morte súbita, problemas psicológicos e transtornos mentais. Também se associam à epilepsia problemas sociais e econômicos diretos e indiretos, como gastos relacionados à internação hospitalar e medicamentos, além da redução na capacidade de trabalho (NETO; MARCHETTI, 2005).

A prevalência de epilepsia ativa no mundo está entre 4/10:1000 habitantes (SANDER; SHORVON, 1996). Estudos sugerem que a incidência de epilepsia é maior nos países em desenvolvimento: As taxas de incidência anual de epilepsia oscilam entre 40 e 70/100.000 nos países desenvolvidos, se elevando para 122 a 190/100.000 nos países em desenvolvimento (SANDER; SHORVON, 1996). Estas altas taxas, nos países em desenvolvimento são atribuíveis a causas parasitárias (principalmente neurocisticercose), trau-

matismo crânio-encefálico e doenças cerebrovasculares (SENANAYAKE; ROMAN, 1993; CARPIO; HAUSER, 2009).

1.1.3.Tratamento

Após o diagnóstico clínico, os pacientes são tratados com a droga antiepiléptica ideal, de primeira escolha, de acordo com a crise convulsiva ou a síndrome epiléptica apresentada. No caso de o tratamento com a droga antiepiléptica de primeira escolha não ser efetivo, o médico ainda tem a escolha de alterar as doses ou o intervalo de administração da droga. Ainda assim, no caso de insucesso no tratamento, existe a possibilidade da utilização de drogas alternativas, para os determinados tipos de manifestação. Se, mesmo após o tratamento medicamentoso, o paciente não responder e as crises epiléticas continuarem não controladas, ele é classificado como paciente com epilepsia refratária.

O sucesso com a terapia das drogas antiepilépticas se aproxima de 70% dos pacientes. Entretanto, cerca de 30% dos pacientes são classificados como refratários e, muitas vezes, não responsivos em mais de 3 tentativas terapêuticas, com drogas antiepilépticas diferentes. Neste caso, terapias alternativas podem ser adotadas, como a cirurgia do foco epilético, dieta cetogênica, estimulação do nervo vago, ou outras terapias menos convencionais (SHNEKER & FOUNTAIN, 2003). Uma vez que um grande número de pacientes com epilepsia permanece refratário e não responsivo ao tratamento medicamentoso, surge a importância do estudo e do entendimento da fisiopatologia dos diferentes tipos de crises convulsivas e de síndromes epiléticas, para assim, sugerir novas terapias, ou mesmo testar novas drogas com potencial anticonvulsivante. Neste sentido, os modelos experimentais são de grande valia para a o estudo da fisiopatologia envolvida nestas mani-

festações, assim como para a identificação de novas drogas com valor preditivo antiepiléptico.

1.1.4. Modelos experimentais

Os modelos experimentais são essenciais para a compreensão dos processos fisiopatológicos envolvidos nos diferentes tipos de manifestações epiléticas e convulsivas, uma vez que conseguem reproduzir, pelo menos em parte, as manifestações humanas. Além disso, os modelos experimentais são essenciais para a identificação de novas drogas com potencial antiepiléptico.

Para uma melhor compreensão dos modelos experimentais, podemos citar : os modelos experimentais mais conhecidos, pelo tipo de síndrome ou crise epilética que produzem, sendo classificados em focais e generalizados. Além disso, os modelos podem ser divididos também em modelos crônicos (modelos que apresentam crises recorrentes) - onde se destacam os modelos induzidos por Ácido Caínico e o modelo da pilocarpina - e modelos agudos (modelo de crise isolada), no qual se destaca os modelos de eletrochoque máximo e os induzidos pelo pentilenotetrazol (PTZ).

1.1.5. Modelo de convulsões induzidas por PTZ

Dentre os modelos, de convulsão generalizada, destaca-se o utilizado nesta dissertação; o modelo de convulsão induzida por PTZ, um antagonista de receptores GABA_A que, por inibir as correntes de cloreto associadas a este mesmo canal, potencializa a neurotransmissão excitatória e desencadeia convulsões. Originalmente o PTZ era utilizado como um cardioestimulante, até ter sido demonstrado um significativo potencial convulsi-

vante em ratos, camundongos, primatas e humanos (PITKÄNEN; SCHWARTZKROIN; MOSHÉ, 2006).

Em relação ao presente modelo foi descrito, em um estudo de ressonância magnética, que após a injeção de PTZ, em ratos, ocorre um aumento na ativação do núcleo talâmico anterior e no giro denteado hipocampal, além do córtex retrosplenial, antes do início das crises, sugerindo que a gênese das crises ocorrem nessas regiões encefálicas (BREVARD et al., 2006).

A injeção de PTZ induz, geralmente, quatro fenômenos comportamentais: *freezing*, espasmos mioclônicos, convulsões clônicas, e convulsões generalizadas tônico-clônicas. Além disso, doses graduais de PTZ podem reproduzir esses tipos de crises específicas. Assim, baixas doses podem induzir apenas o *freezing*, entretanto, já apresentando alterações nos sinais eletroencefalográficos. As altas doses podem induzir convulsões generalizadas. As manifestações convulsivas induzidas por PTZ se desenvolvem dentro de um período de 20 minutos após a aplicação (PITKÄNEN; SCHWARTZKROIN; MOSHÉ, 2006) sendo geralmente avaliado a latência para a primeira convulsão mioclônica, latência para a primeira tônico-clônica e duração da mesma..

Em relação às alterações neuroquímicas induzidas por esse agente convulsivante, têm sido demonstradas importantes reduções no sistema antioxidante e redução na atividade da enzima $\text{Na}^+, \text{K}^+ \text{-ATPase}$ (RAUCA; ZERBE; JANTZE, 1999; ERAKOVIC et al., 2001; SOUZA et al., 2009). Nesse sentido, demonstrou-se também que o PTZ pode induzir crises por inibir essa enzima através de uma interação direta com a estrutura protéica (DUBBERKE; VASILETS; SCHWARZ, 1998).

Além disso, em relação às alterações comportamentais induzidas por este modelo, sugere-se que o aumento na latência para o desenvolvimento das crises seja um forte indi-

cativo de ação anticonvulsiva, visto que drogas como o diazepam e o clonazepam aumentam esse parâmetro (DE SARRO et al., 1996).

Além disso, o presente composto é amplamente utilizado em testes para identificação de novas drogas com valor preditivo antiepiléptico e para *screening* de plantas (KUPFERBERG, 2001).

1.2. Na⁺,K⁺-ATPase

1.2.1.Aspectos gerais

A enzima Na⁺,K⁺-ATPase (EC 3.6.3.9), também conhecida como bomba de sódio, é uma enzima de membrana plasmática, responsável por catalisar a hidrólise do ATP, acoplado a essa hidrólise o transporte ativo de 3 Na⁺ para o meio extracelular e 2 K⁺ para o meio intracelular (HORISBERGER, 2004). Esta enzima foi descrita pela primeira vez em 1957, por Jens Christian Skou que demonstrou a existência de uma enzima transportadora de íons através da membrana plasmática. Posteriormente, em 1997, Skou foi laureado com o prêmio Nobel de química, graças a sua descoberta (THERIEN & BLOSTEIN, 2000). A Na⁺,K⁺-ATPase tem um importante papel na regulação do volume, pH e níveis de Ca²⁺ celulares, além do transporte de glicose dependente de Na⁺ e regulação da liberação de neurotransmissores no SNC (LINGREL, 1992). Dada a importância desta enzima na regulação celular, sabe-se que, em repouso, a Na⁺,K⁺-ATPase é responsável pelo consumo de aproximadamente 30% de todo ATP utilizado pelos mamíferos (CLAUSEN et al., 1991).

1.2.2. Estrutura

A Na^+, K^+ -ATPase pode ser encontrada em eucariotos superiores, como a *drosophila*, mas não nos eucariotos inferiores, como a levedura. É membro da família de bombas do tipo P, compartilhando algumas características comuns, como a função de hidrólise do ATP. Esta enzima é composta por 3 subunidades polipeptídicas (α , β e γ), sendo a unidade funcional mínima um heterodímero, composto por uma subunidade α e uma subunidade β , este dímero pode ainda estar co-localizado com uma proteína da família FXYD (KAPLAN, 2002; JORGENSEN et al., 2003). Pelo menos 4 isoformas distintas da subunidade α ($\alpha 1$ -4) foram identificadas até o momento. Da subunidade β , pelo menos 3 isoformas ($\beta 1$ -3) foram identificadas, sendo que estas subunidades podem interagir em uma série de combinações que serão expressas de maneira dependente do tecido e espécie em estudo (MOBASHERI et al., 2000, THERIEN & BLOSTEIN, 2000). A subunidade α contém os sítios de ligação para Na^+ , K^+ , ATP e também para o inibidor específico ouabaína (KAPLAN, 2002; JORGENSEN et al., 2003). As diferenças na sequência primária de aminoácidos entre as 4 subunidades α encontradas até o momento, em mamíferos, são mínimas, mas resultam em diferenças cruciais, principalmente no que diz respeito à sensibilidade a inibidores, como a ouabaína. De fato, enquanto as isoformas contendo subunidades $\alpha 2$ ou $\alpha 3$ possuem um IC_{50} para ouabaína de 28,4 nM, as isoformas contendo subunidades $\alpha 1$ possuem um IC_{50} de 89,4 μM , para este mesmo inibidor (NISHI et al., 1999b). Além disso, é importante mencionar que as subunidades catalíticas α são substratos para a fosforilação, pela proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e pela proteína quinase C (PKC), ou desfosforilação, por uma série de proteínas fosfatases, como a proteína fosfatase 1, proteína fosfatase 2A e a PP2B, importantes para a regulação da atividade e expressão na membrana plasmática da Na^+, K^+ -ATPase (BERTORELLO et al., 1991; APERIA et al.,

1992; FISONE et al., 1994; LOGVINENKO et al., 1996; BLANCO & MERCER, 1997; CHENG et al., 1997b). A subunidade β da Na^+, K^+ -ATPase é composta de aproximadamente 370 aminoácidos e um peso molecular aproximado de 55 kDa (KAPLAN, 2002; JORGENSEN et al., 2003). Esta proteína possui apenas um domínio transmembrana e a porção aminoterminal está exposta ao citosol. A função exata da subunidade β ainda não está completamente entendida, mas foi demonstrado que a subunidades α não exibe atividade ATPásica quando dissociada da subunidade β . Nesse contexto, tem sido sugerido que as principais funções da subunidade β da Na^+, K^+ -ATPase estão relacionadas à estabilização da conformação ótima da subunidade α na membrana plasmática, além de uma participação direta no ciclo reacional acoplado ao transporte iônico (KAPLAN, 2002; JORGENSEN et al., 2003).

1.2.3.Regulação

O mecanismos regulatórios da Na^+, K^+ -ATPase são ativados por alterações nas necessidades celulares. Neste sentido, tem se demonstrado que a atividade da Na^+, K^+ -ATPase é controlada por diversos fatores entre eles , atividade contrátil, treinamento físico, nutrição e estado eletrolítico (CLAUSEN, 1998). Dentre estes fatores regulatórios, a variação na concentração dos substratos Na^+ , K^+ e ATP é um dos mais simples e determinantes. A Na^+, K^+ -ATPase é ativada por Na^+ e ATP em sítios intracelulares e por K^+ em um sítio extracelular (THERIEN & BLOSTEIN, 2000). O K_m da Na^+, K^+ -ATPase para Na^+ está na faixa de 10-40 mM, que na maioria dos tecidos é um valor mais alto que a concentração intracelular de Na^+ no equilíbrio (THERIEN & BLOSTEIN, 2000). Assim, pequenas variações na concentração intracelular de Na^+ afetam profundamente a atividade da Na^+, K^+ -ATPase na maioria dos tecidos. No caso do K^+ , a concentração extracelular de K^+ tem me-

nos efeito sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase do que variações na concentração intracelular de Na^+ , provavelmente devido à alta afinidade deste íon por seus sítios de ligação na enzima e porque a concentração extracelular de íons K^+ é saturante para os sítios de ligação deste íon na Na^+, K^+ -ATPase. Por outro lado, tem sido mostrado que o K^+ pode agir como um antagonista competitivo da ligação do Na^+ em seus sítios de ligação na Na^+, K^+ -ATPase (THERIEN & BLOSTEIN, 2000). Assim, variações na concentração intracelular de K^+ poderiam alterar a atividade da enzima através de uma modificação na afinidade da mesma por íons Na^+ . No que diz respeito ao ATP, a Na^+, K^+ -ATPase apresenta uma cinética linear e um K_m de 300-800 μM para este substrato (THERIEN & BLOSTEIN, 2000).

Outro importante mecanismo de regulação da Na^+, K^+ -ATPase é a fosforilação de resíduos específicos na enzima, principalmente na subunidade α . Neste sentido, neurotransmissores, hormônios e outras substâncias agem diretamente na enzima ou em seus receptores de membrana específicos, podendo ativar vias de sinalização que regulam a atividade da Na^+, K^+ -ATPase. Dentre estas vias de sinalização, se destacam a via das quinases PKA e PKC.

1.2.4. Epilepsia e Na^+, K^+ -ATPase

No cérebro, a atividade da Na^+, K^+ -ATPase contribui de maneira crucial para a manutenção do gradiente eletroquímico responsável pelos potencial de repouso e ação e captação e liberação de neurotransmissores (STAHL; HARRIS, 1986). Conseqüentemente, mudanças na atividade da Na^+, K^+ -ATPase afetam diretamente a sinalização celular, a liberação de neurotransmissores e a atividade neuronal, assim como o comportamento do animal (MOSELEY et al., 2007). Neste contexto, um prejuízo ao funcionamento da Na^+, K^+ -ATPase ocasiona aumento ou diminuição da excitabilidade neuronal, dependendo do grau

de inibição induzido e do tipo neuronal afetado (GRISAR; GUILLAUME; DELGADO-ESCUETA, 1992). Ao encontro destes achados, o inibidor da Na^+, K^+ -ATPase, ouabaína, aumenta o influxo de cálcio em fatias de cérebro de ratos (FUJISAWA et al., 1965), causa convulsões em camundongos (JAMME et al., 1995), e liberação de glutamato por reversão do transportador dependente de Na^+ (LI; STYS, 2001).

Clapcote e colaboradores (2009) demonstraram que uma mutação na isoforma catalítica $\alpha 3$ - que reduz a atividade desta enzima em cerca de 42% no cérebro de camundongos - está associada com a hiperexcitabilidade no sistema nervoso central, sugerindo que a Na^+, K^+ -ATPase pode estar envolvida no controle da atividade epileptogênica. Adicionalmente, uma mutação na isoforma $\alpha 2$ tem sido relacionada com enxaqueca hemiplégica esporádica e crises epiléticas em humanos (GALLANTI et al., 2008).

Neste sentido, Dubberke e colaboradores (1998) demonstraram que o PTZ, um agente quimioconvulsivante clássico, inibe a enzima Na^+, K^+ -ATPase. Além disso, o grau de inibição da atividade da Na^+, K^+ -ATPase se correlaciona com a duração das convulsões induzidas pela administração intracerebral de ácido metilmalônico, de ácido glutárico ou injeção intraperitoneal de PTZ (FIGHERA et al., 2006; FURIAN et al., 2007; SOUZA et al., 2009), reforçando o papel importante da inibição da atividade Na^+, K^+ -ATPase nas convulsões induzidas por diversos agentes. Sabendo que vários pacientes epiléticos não respondem aos tratamentos farmacológicos convencionais e nem à terapias alternativas, se faz necessário a busca por novos compostos que possam ajudar na refrateriedade das crises epiléticas. Dessa forma, o estudo de extratos e princípios ativos de plantas, como as plantas medicinais, pode auxiliar na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos desta doença, assim como contribuir no tratamento das convulsões observadas nos pacientes.

1.3. Plantas Medicinais

Ao longo dos anos, os humanos encontraram na natureza meios para atender suas necessidades básicas, muitos dos quais serviram de remédio para o tratamento de várias doenças. Os primeiros registros documentam o uso de aproximadamente 1000 substâncias derivadas de plantas na Mesopotâmia. No Egito, o Papiro de Ebers, datado de 1500 a.C., documenta mais de 700 medicamentos, a maioria originária de plantas. Existem evidências que praticamente todos os povos utilizavam preparados a base de plantas para assegurar sua sobrevivência (LORENZI, MATOS, 2002; NEWMAN et al., 2008). Durante a Idade Média, a propriedade terapêutica das plantas era atribuída à existência de substâncias presentes nelas. Com o desenvolvimento e o avanço da química orgânica, houve a possibilidade de isolamento e purificação, a partir de extratos brutos, da(s) substância(s) responsável(eis) pelo(s) efeito(s) biológico(s) predominante(s). Esse grupo de substâncias, derivado do metabolismo secundário, denominou-se “princípios ativos” (LORENZI, MATOS, 2002; NORTON, 2005; ITOKAWA et al., 2008) .

Os metabólitos secundários eram considerados produtos de excreção do vegetal sem possuir função definida, sendo negligenciado seu estudo científico por muito tempo. Posteriormente, foi sugerido que essas substâncias serviriam para proteção das plantas frente às diversas situações, como defesa contra herbívoros e microorganismos, proteção contra raios ultravioletas, atração de polinizadores, entre outros (VERPOORTE, 2000; SAKLANI, KUTTI, 2008). A disponibilidade de princípios ativos quimicamente puros, juntamente aos avanços obtidos na fisiologia experimental no século XIX, possibilitou a descrição precisa dos efeitos destas substâncias, bem como a investigação de seu mecanismo de ação. Por exemplo, a atropina, princípio ativo isolado da planta *Atropa belladonna*, que contribuiu para a fundamentação da neurotransmissão colinérgica e para a teoria dos re-

ceptores farmacológicos; a reserpina, princípio ativo extraído da planta *Rauwolfia serpentina*, que propiciou o embasamento da neurotransmissão adrenérgica, serotoninérgica e dopaminérgica.

Outros princípios ativos que seguem a linha da atropina e reserpina são: o curare (isolado de *Chondodendron tomentosum*), nicotina (espécies de *Nicotiniana*), cocaína (espécies de *Erythroxylium*), glicosídeos cardíacos (espécies de *Digitalis*) e efedrina (*Ephedra sinica*); além de uma diversidade de outros princípios ativos isolados de plantas (FARNSWORTH, 1966; GILANI, RAHMAN, 2005; NEWMAN, 2008). É crescente a utilização de princípios ativos oriundos de plantas medicinais como importantes ferramentas farmacológicas e também para a indústria no desenvolvimento de novos medicamentos para o tratamento de diversas enfermidades, incluindo a dor e crises epiléticas (RISHTON, 2008). Estima-se que cerca de 25% de todos os medicamentos modernos são direta ou indiretamente derivados de plantas. Outro aspecto importante deve-se ao crescente interesse mundial nos últimos anos na utilização de fitofármacos como medicamentos complementares ou alternativos na prevenção ou alívio de muitas doenças (CALIXTO et al., 1998; 2000; 2005). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, devido à pobreza e à falta de acesso aos medicamentos modernos, a maioria da população que vive em países em desenvolvimento depende essencialmente das plantas medicinais como atenção primária à saúde (WHO, 1999; 2000; 2002; 2008; CALIXTO, 2000; GOLENIOWSKI et al., 2006; PHILLIPSON, 2007).

Entretanto, mesmo com a evidente utilização na clínica, poucas plantas têm sido estudadas cientificamente para a confirmação de sua qualidade, segurança e eficácia. De acordo com o exposto, é crescente a importância da pesquisa e descoberta de novos compostos de interesse terapêutico a partir de recursos naturais.

1.3.1. *Combretum Leprosum* Mart

Uma das espécies de *Combretum* encontrada no Brasil, nos estados do norte e nordeste, caatinga e pantanal matogrossense (MARINHO et al., 2002; CHAVES et al., 2007) é a *Combretum leprosum* Mart . Esta planta foi catalogada pelo botânico alemão Carl Friedrich Philipp von Martius, em 1867, e é um arbusto conhecido popularmente pelos nomes de mofumbo, cipoaba e carne-de-vaca.

Na medicina popular, infusões preparadas com as partes aéreas (tronco, folhas e flores) e raízes de *C. leprosum* são utilizadas como cicatrizante, para o tratamento de hemorragias, como sedativo, (FACUNDO et al, 2005), antitussígeno, expectorante (AGRA et al., 2007) e antiofídico (FERNANDES et al., 2007).

A partir das folhas e raízes de *Combretum leprosum* foram isolados o ácido arjunólico, o ácido mólico, ácidos graxos, o triterpeno $3\beta,6\beta,16\beta$ -trihidroxilup-20(29)-eno (TTHL), flavonóides glicosilados 3-O-metilquercetina e quercetina. Análises do extrato etanólico das folhas demonstraram que os monossacarídeos são os principais componentes (80%), os triterpenos representam 10%, estando entre eles o TTHL, que é um triterpeno pentacíclico. O extrato ainda contém 5% de oligossacarídeos e 3% de ácidos graxos (FACUNDO et al., 1993; 2005).

Medeiros et al. (2003) demonstraram que tanto o extrato etanólico da raiz de *C. leprosum* quanto um triterpeno isolado desta planta, o ácido arjunólico, reduziram o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Além disso, verificou-se que o extrato hidroalcoólico da casca desta espécie, administrado pela via oral, apresenta atividade ansiolítica e administrado pela via intraperitoneal apresenta atividade depressora central e relaxante muscular (ALMEIDA et al., 2003).

Existem vários mecanismos compartilhados por epilepsia e indução de dor (DE OLIVEIRA ET AL, 2011;. FREITAS, 2009;. KING ET AL, 2011). Nota-se que alguns anti-convulsivantes são usados clinicamente para tratar distúrbios dolorosos (FEUERBACH ET AL, 2009;. MARES E ROKYTA, 2009). Neste contexto, Longhi-Balbinot et al. (2009) demonstraram que o triterpeno 3 β , 6 β , 16 β -trihidroxilup-20 (29)-eno (TTHL) produziu efeito antinociceptivo significativo contra agonistas glutamatérgicos, NMDA e trans-ACPD que induzem nocicepção, sem causar qualquer diminuição locomotora detectável. Estes resultados experimentais sugerem que o efeito antinociceptivo da TTHL está intimamente relacionado a um efeito sobre o sistema glutamatérgico. Esta super estimulação do sistema glutamatérgico é um mecanismo comum para a dor e epilepsia, em função destes achados nós decidimos investigar o efeito da TTHL nas alterações comportamentais, eletroencefalográficas e neuroquímicas induzidas por PTZ em camundongos.

1.4.Objetivos

1.4.1. Objetivo geral

Determinar se o TTHL apresenta ação anticonvulsivante no modelo de convulsão induzido por PTZ em camundongos, bem como, seu possível mecanismo de ação.

1.4.2. Objetivos específicos

1- Avaliar qual a dose de TTHL que apresenta efeito protetor sobre as convulsões induzidas por PTZ ;

2-Avaliar o efeito do TTHL sobre o dano oxidativo induzido pelo PTZ;

3-Avaliar o envolvimento da enzima Na⁺, K⁺ -ATPase no possível efeito protetor induzido pelo TTHL;

4 -Determinar o potencial antioxidante in vitro do TTHL;

5-Determinar o efeito do TTHL sobre a neurotransmissão glutamatérgica (captação e ligação específica de glutamato);

6-Determinar o efeito do TTHL sobre a ligação específica ao sítio de benzodiazepínicos do receptor GABA_A.

2. ARTIGO CIENTÍFICO

2.1. Triterpene 3b, 6b, 16b trihidroxilup-20(29)-ene protects against excitability and oxidative damage induced by pentylentetrazol: The role of Na⁺,K⁺-ATPase activity

2.1.1. Título em português

Triterpeno 3 β , 6 β , 16 β , trihidroxilup-20(29)-eno protege contra a excitabilidade e dano oxidativo induzido por pentilenotetrazol: O papel da atividade da Na⁺, K⁺ -ATPase.

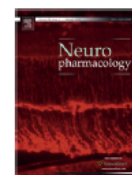
2.1.2. Autores

Iuri Domingues Della-Pace, Leonardo Magno Rambo, Leandro Rodrigo Ribeiro, André Luis Lopes Saraiva, Sara Marchesan de Oliveira, Cássia Regina Silva, Jar-del Gomes Villarinho, Mateus Fortes Rossato, Juliano Ferreira, Leandro M. de Carvalho, Fernanda de Oliveira Lima, Ana Flavia Furian, Mauro Schneider Oliveira, Adair Roberto Soares Santos, Valdir A. Facundo, Michele Rechia Fighera, Luiz Fernando Freire Royes.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Neuropharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/neuropharm

Triterpene 3 β , 6 β , 16 β trihidroxilup-20(29)-ene protects against excitability and oxidative damage induced by pentylenetetrazol: The role of Na⁺,K⁺-ATPase activity

Iuri Domingues Della-Pace^a, Leonardo Magno Rambo^b, Leandro Rodrigo Ribeiro^b, André Luis Lopes Saraiva^b, Sara Marchesan de Oliveira^b, Cássia Regina Silva^b, Jardel Gomes Villarinho^b, Mateus Fortes Rossato^b, Juliano Ferreira^b, Leandro M. de Carvalho^h, Fernanda de Oliveira Lima^h, Ana Flavia Furian^d, Mauro Schneider Oliveria^d, Adair Roberto Soares Santos^f, Valdir A. Facundo^g, Michele Rechia Figuera^e, Luiz Fernando Freire Royes^{c,*}

^a Centro de Ciências da Saúde, Laboratório de Bioquímica do Exercício (BioEx), Programa de Pós-Graduação em Farmacologia – Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^b Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^c Centro de Educação Física e Desportos, Departamento de Métodos e Técnicas Desportivas, Programa de Pós Graduação em Educação Física, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^d Centro de Ciências Naturais e Exatas, Laboratório de Neurotoxicidade, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^e Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Neuropsiquiatria, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

^f Centro de Ciências Biológicas, Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Trindade, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil

^g Departamento de Química, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho 78900-500, RO, Brazil

^h Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Caixa Postal 5051, CEP 97110-970 Santa Maria, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 March 2012

Received in revised form

24 October 2012

Accepted 26 October 2012

Keywords:

Triterpene

Seizures

Na⁺,K⁺-ATPase

Oxidative damage

Pentylenetetrazol

Ouabain

ABSTRACT

Administration of the compound triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihidroxilup-20(29)-ene (TTHL) resulted in antinociceptive activity in several pain models in mice. Because pain and epilepsy have common mechanisms, and several anticonvulsants are clinically used to treat painful disorders, we investigated the anticonvulsant potential of TTHL. Behavioral and electrographic recordings revealed that pretreatment with TTHL (30 mg/kg; i.g.) increased the latencies to the first clonic seizure to the tonic–clonic and reduced the duration of the generalized seizures induced by the GABA_A receptor antagonist PTZ (80 g; i.p.). The TTHL pretreatment also protected against PTZ-induced deleterious effects, as characterized by protein carbonylation, lipid peroxidation, [³H] glutamate uptake and the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase (subunits α_1 and α_2/α_3). Although TTHL did not exhibit DPPH, ABTS radical scavenging activity *per se* and does not alter the binding of [³H]flunitrazepam to the benzodiazepinic site of the GABA_A receptor, this compound was effective in preventing behavioral and EEG seizures, as well as the inhibition of Na⁺,K⁺-ATPase induced by ouabain. These results suggest that the protection against PTZ-induced seizures elicited by TTHL is due to Na⁺,K⁺-ATPase activity maintenance. In fact, experiments in homogenates of the cerebral cortex revealed that PTZ (10 mM) reduced Na⁺,K⁺-ATPase activity and that previous incubation with TTHL (10 μ M) protected against this inhibition. Collectively, these data indicate that the protection exerted by TTHL in this model of convulsion is not related to antioxidant activity or GABAergic activity. However, these results demonstrated that the effective protection of Na⁺,K⁺-ATPase elicited by this compound protects against the damage due to neuronal excitability and oxidation that is induced by PTZ.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Epilepsy is a neurological disorder characterized by behavioral and electroencephalographic (EEG) changes in a group of neurons in the central nervous system (CNS) (Dichter et al., 2007). This neurological disorder consists of a large group of neurological

* Corresponding author. Fax: +55 55 3220 8031.

E-mail address: nandoroyes@yahoo.com.br (L.F.F. Royes).

diseases with incidence of 0.5–1% in the general population (Andrade and Minassian, 2007). Our understanding of the pathophysiology of epilepsy has advanced dramatically in last 30 years, particularly in terms of its cellular physiology and genetic bases (Meldrum and Rogawski, 2007). Conversely, although single-drug therapies provide optimal seizure control in approximately 80% of all patients, seizure activity remains uncontrolled in a significant number of individuals, regardless of the type of therapy (Dichter et al., 2007).

From this point of view, several studies have suggested that a cascade of biological events, including overstimulation of the glutamatergic system, understimulation of the GABAergic system, and oxidative stress on selected targets as Na^+, K^+ -ATPase, underlies the development and propagation of epilepsy (Patsoukis et al., 2005; Souza et al., 2009). This finding is particularly important, considering that this ion-motive pump plays a key role in regulating and controlling nerve excitability (Vasilets and Schwarz, 1993). Based on the hypothesis that these selected targets are involved in epilepsy, an alternative approach to treatment of this disorder would be to use in order to prevent or slow the progression of seizures.

There are several mechanisms shared by epilepsy and pain induction (de Oliveira et al., 2011; Freitas, 2009; King et al., 2011). Of note, some anticonvulsants are used clinically to treat painful disorders (Feuerbach et al., 2009; Mares and Rokyta, 2009). In this context, Longhi-Balbinot et al. (2009) have demonstrated that triterpene $3\beta, 6\beta, 16\beta$ -trihydroxilup-20(29)-ene (TTHL) produced significant and specific antinociceptive action against glutamate-, NMDA- and trans-ACPD-induced nociception without causing any detectable locomotor impairment. These experimental findings suggest that the antinociceptive effect of TTHL is closely related to an effect on the glutamatergic system. Because overstimulation of glutamatergic system is a common mechanism for pain and epilepsy, we decided to investigate the effect of TTHL on PTZ-induced behavioral, electrographic and neurochemical alterations in mice.

2. Materials and methods

2.1. Animals

The experiments were conducted using Swiss mice (25–35 g) maintained in a controlled environment (12:12 h light–dark cycle, $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 55% relative humidity) with free access to food (Guabi, Santa Maria, Brazil) and water. All of the experimental protocols were developed with the goals of keeping the number of animals used to a minimum and maintaining these animals' wellbeing. All of the experiments were conducted in accordance with national and international standards (i.e., the Brazilian School of Animal Experimentation (COBEA) policy and the U.S. Public Health Service's Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals) and with the approval of the Ethics Committee to the Federal University of Santa Maria (113/2010).

2.2. Placement of cannula and surgical procedures for electrocorticographic recording

To determine whether TTHL protects against convulsions induced by ouabain and PTZ, a subset of animals was anesthetized with ketamine (100 mg/kg; i.p.) and xylazine (30 mg/kg; i.p.) and placed in a rodent stereotaxic apparatus. Under stereotaxic guidance, a cannula and a set of electrodes were implanted for the purpose of EEG recording. The guide cannula was glued to a multipin socket and inserted into the right ventricle through a previously opened skull orifice. Two screw electrodes were placed over the right (ipsilateral) and left (contralateral) parietal cortices (coordinates in mm: AP -4.5 , L 2.5) along with a ground lead positioned over the nasal sinus. The electrodes were connected to a multipin socket and fixed to the skull with dental acrylic cement.

All of the intracerebroventricular (i.c.v.) injections were performed with a needle (30 gauge) protruding 1 mm below a guide cannula. All drugs were injected during a period of 1 min with a Hamilton syringe, and an additional minute was allowed to elapse before the removal of needle to avoid backflow of drug through the cannula. The procedures for EEG recording were carried out as previously described (Cavalheiro et al., 1992). Briefly, the animals were allowed to habituate to

a Plexiglas cage (25 cm \times 25 cm \times 60 cm) for at least 30 min before the EEG recordings. Animals were subsequently connected to the lead socket that resides inside a Faraday's cage. The EEG recordings were executed using a digital encephalographer (Neuromap EQSA260, Neurotec LTDA, Itajubá, MG, Brazil). EEG signals were amplified, filtered (0.1–70.0 Hz, band pass), digitized (sampling rate 256 Hz) and stored on a PC for off-line analysis.

2.3. Reagents, drug administration protocol and seizure evaluation

All of the reagents were purchased from Sigma (St. Louis, USA). The drug TTHL was isolated from the flowers of *Combretum leprosum* by the Department of Organic Chemistry (Universidade Federal de Rondônia, Brazil) and characterized by spectral analyses (RMN- ^1H) and (RMN- ^{13}C) and by comparison with the spectrum literature data (Facundo et al., 1993); the drug showed a degree of purity greater than 98%. All reagents were dissolved in saline solution (0.9%) with the exception of triterpene, which was dissolved in saline plus DMSO/Tween 80. The final concentration of DMSO and Tween 80 did not exceed 10% and did not cause any effect *per se* (Fig. 1).

To evaluate the effect of TTHL on electroencephalographic, oxidative and neurochemical alterations in the cerebral cortex of mice induced by PTZ, the animals were treated with TTHL (1, 3, 10 or 30 mg/kg) or its vehicle by intragastric gavage (i.g.) (Longhi-Balbinot et al., 2012) 60 min before the systemic administration of PTZ (80 mg/kg; i.p.) (Zandieh et al., 2010). In the present study, we also evaluated the participation of Na^+, K^+ -ATPase in electroencephalographic alterations exerted by TTHL in this model of excitotoxicity. For this purpose, a subset of animals was treated with TTHL (30 mg/kg) or its vehicle (i.g.) 60 min before administration of ouabain (1 $\mu\text{g}/\text{site}$; i.c.v.) (Bageeta et al., 1995; Doggett, 1975).

The presence of seizures was monitored in all animals by electroencephalographic recordings. A 10-min baseline recording was obtained to establish an adequate control period. After this baseline recording, the animals were observed for the appearance of generalized tonic–clonic convulsive episodes for 20 min (Ferraro et al., 1999); tonic–clonic convulsive episodes were defined by generalized whole-body clonus involving all four limbs and the tail, rearing, wild running and jumping, followed by sudden loss of upright posture and autonomic signs, such as hypersalivation and defecation. During the 20-min observation period, the latency for generalized tonic–clonic convulsions was measured. The EEG recordings were visually examined for seizure activity, as defined by the occurrence of the following alterations in the recording leads (McColl et al., 2003): isolated sharp waves ($\geq 1.5\times$ baseline); multiple sharp waves ($\geq 2\times$ baseline) in brief spindle episodes (≥ 1 s and ≤ 5 s); multiple sharp waves ($\geq 2\times$ baseline) in long spindle episodes (≥ 5 s); spikes ($\geq 2\times$ baseline) plus slow waves; multispike ($\geq 2\times$ baseline, ≥ 3 spikes/complex) plus slow waves; and major seizure (repetitive spikes plus slow waves obliterating background rhythm, ≥ 5 s).

2.4. Ex vivo experiments

2.4.1. Tissue processing for neurochemical analyses

Immediately after the behavioral and electroencephalographic evaluation, animals were sacrificed by decapitation. The brain of each animal was later exposed by the removal of the parietal bone. The cerebral cortex was rapidly dissected on an inverted ice-cold Petri dish and homogenized in cold 30 mM Tris–HCl buffer (pH 7.4). This homogenate was used for determination of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), glutamate uptake, carbonyl content and Na^+, K^+ -ATPase activity.

2.4.2. Determination of Na^+, K^+ -ATPase activity

Na^+, K^+ -ATPase and its α isoforms were assayed as previously described (Nishi et al., 1999; Rambo et al., 2009). Briefly, the assay medium consisted of 30 mM Tris–HCl buffer (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM MgCl_2 and 50 μg of protein in the presence or absence of ouabain (1 mM); the final volume of

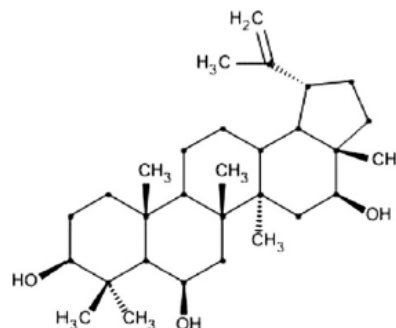


Fig. 1. Molecular structure of triterpene $3\beta, 6\beta, 16\beta$ -trihydroxilup-20(29)-ene.

this solution was 350 μ L. The reaction was started adding adenosine triphosphate to a final concentration of 5 mM. After 30 min at 37 °C, the reaction was stopped by adding 70 μ L of 50% (w/v) trichloroacetic acid. Saturating substrate concentrations for these compounds were used, and the reaction was linear with protein and time. The appropriate controls were included in the assays for non-enzymatic hydrolysis of ATP. The amount of inorganic phosphate (Lauren et al., 2007) released was quantified by a previously described colorimetric method (Fiske and Subbarow, 1927), using KH_2PO_4 as reference standard. The specific Na^+, K^+ -ATPase activity (nmol Pi/mg protein/min) was calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from the overall activity in the absence of ouabain.

In the same set of experiments, we investigated whether some Na^+, K^+ -ATPase α isoforms are selectively modulated by TTHL or PTZ. For this purpose, we used a previously described pharmacological approach that takes advantage of the isoform-specific sensitivity to ouabain (Nishi et al., 1999). Briefly, the assay medium consisted of 30 mM Tris–HCl buffer, pH 7.4; 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM MgCl_2 and 50 μ g of protein in the presence of 3 μ M (enough to inhibit Na^+, K^+ -ATPase isoforms containing α_2 and α_3 subunits) or 4 mM ouabain (sufficient to inhibit all isoforms).

2.4.3. Determination of glutamate uptake

For the assay of [^3H] glutamate uptake, a synaptosomal preparation was obtained from isotonic Percoll/sucrose discontinuous gradients at 4 °C as previously described (Dunkley et al., 1986). Briefly, homogenates from the cerebral cortex (10% [w/v]) were made in 5 mM HEPES and 320 mM sucrose (pH 7.4), and centrifuged twice at 1000 \times g for 5 min, to produce a pellet (P1) and a supernatant (S1). The S1 was centrifuged twice at 10,000 \times g for 20 min to produce a second pellet (P2) and a second supernatant (S2); supernatant S2 was discarded. Pellet P2 was re-suspended in buffer HEPES/sucrose and was subjected to a 16, 10, 7.5% Percoll solution density gradient centrifugation at 15,000 \times g for 20 min. The synaptosomal fractions were isolated, suspended and homogenized in Krebs' buffer (pH 7.4), containing (in mM) 145 NaCl, 5 KCl, 1.2 $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.3 $\text{MgSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20 HEPES, 10 glucose and 1.2 CaCl_2 ; the homogenate was then centrifuged twice at 15,000 \times g for 20 min. The supernatant was removed, and the pellet was re-suspended in Krebs' buffer. The synaptosomal fraction used for analysis contained approximately 1 mg of protein per ml. This fraction also contained approximately 5% contamination from fragments of the inner and outer mitochondrial membranes, microsomes, myelin, and neural and glial plasma membranes (Dunkley et al., 1986; Miguels et al., 1999). After the synaptosomal preparation, the [^3H] glutamate uptake step was carried out at 37 °C for 5 min following the addition of the synaptosomes (100 μ g of protein/tube); the uptake step was stopped by centrifugation (16,000 \times g for 1 min at 4 °C). The level of radioactivity in the synaptosomal pellet was measured in a Packard Model 1409 scintillation counter following the addition of the scintillation liquid to the pellet. The specific glutamate uptake was calculated as the difference between total uptake at 37 °C and the non-specific uptake at 4 °C. Under our experimental conditions, the specific uptake was 95 ± 13 pmol/min/mg protein.

2.4.4. Measurement of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS)

The level of TBARS content was measured as previously described (Ohkawa et al., 1979). Briefly, the homogenates were diluted to 1:2 (v/v) in type I ultrapure water and incubated in a medium containing 0.2 ml of brain homogenate, 0.1 ml of 8.1% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.4 ml of acetic acid buffer (500 mM, pH 3.4), and 0.75 ml of 0.81% thiobarbituric acid (TBA). The mixture volume was increased up to 2 ml with type I ultrapure water, and the mixture was heated at 95 °C for 90 min in a water bath using a glass ball as a condenser. The absorbance of each sample within the supernatant was measured at 532 nm in a Hitachi U-2001 spectrophotometer (Hitachi Instruments Incorporation, Schaumburg, IL, USA).

2.4.5. Measurement of the protein carbonyl content

The total protein carbonyl content was determined by a previously described method (Yan et al., 1995) that was adapted for brain tissue (Schneider Oliveira et al., 2004). Briefly, 1 ml aliquots of the homogenates containing 759–800 μ g protein/ml in each sample were mixed with 0.2 ml of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH, 10 mM) or 0.2 ml HCl (2 M). After incubation at room temperature for 1 h in a dark, room, 0.6 ml of denaturing buffer (150 mM sodium phosphate buffer, pH 6.8, containing 3% SDS), 1.8 ml of heptane (99.5%), and 1.8 ml of ethanol (99.8%) were added sequentially and mixed by vortex agitation for 40 s; the mixture was then centrifuged for 15 min. Next, the protein that was isolated from the interface was washed two times with 1 ml of ethyl acetate/ethanol 1:1 (v/v) and suspended in 1 ml of denaturing buffer. Each DNPH sample was read at 370 nm in a Hitachi U-2001 spectrophotometer against the corresponding HCl sample (blank); the level of total carbonylation was calculated using a molar extinction coefficient of 22,000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ as previously described (Levine et al., 1990).

2.5. In vitro experiments

2.5.1. DPPH, ABTS radical and anion superoxide radical scavenging activity

The hydrogen atom capacity or the electron donation capacity of the respective extracts was computed from the bleaching property of the purple-colored methanol solution of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). The stable DPPH radical

scavenging activity was determined by Blois method (1958). The samples and reference were dissolved in ethanol (75%) and mixed with DPPH solution (final concentration 0.15 mM). The remaining DPPH amount was measured at 520 nm using a Unico 4802 UV–visible double beam spectrophotometer (USA). The results were compared to that of n-acetylcysteine (NAC), which was employed as the reference. The antioxidant capacity was calculated as compared to a blank tube containing DPPH solution and ethanol (100% oxidation). The experiments were run in triplicate, and the results were conveyed as average values with S.E.M. (standard errors of the mean).

The ABTS radical [2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] scavenging ability was measured using slight modifications of an existing protocol (Fernandes et al., 2008). The ABTS radical cation was generated by mixing the ABTS stock solution (7 mM) with potassium persulfate (140 mM) and allowing the resultant mixture in the dark at room temperature for 16 h before use. Prior to the assay, the ABTS stock solution was diluted with a $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (100 μ M, pH 7.4) buffer solution (ratio 1:88). The ABTS solution (1 ml) was added to glass test tubes containing different concentrations of TTHL (1–100 μ M). The tubes were incubated for 30 min at room temperature. The scavenging capacity was measured at 734 nm against the corresponding blank. The superoxide radical scavenging activity was performed according a previously described method (Zhao et al., 2006). The determination is performed with the hypoxanthine/xanthine oxidase (HPX/XOD) system, which is based on the enzymatic generation of the $\text{O}_2^{\cdot -}$ species from the oxidation of hypoxanthine to xanthine and uric acid. The produced free radical reduces the absorbing probe nitrobluetetrazolium (NBT) to formazan at pH 7.4, indicated by a color change when monitored at 560 nm.

2.5.2. Na^+, K^+ -ATPase activity

It was presumed that the behavioral effects of PTZ and TTHL are due to its capacity to alter Na^+, K^+ -ATPase activity by directly interacting with the enzyme; therefore, this activity was measured directly. A subset of animals were killed by decapitation and had their brains rapidly removed and placed in an inverted ice-cold Petri dish. The cerebral cortex was homogenized in cold 10 mM Tris–HCl buffer (pH 7.4), and the experiments were performed at a final volume of 500 μ L. The homogenates were pre-incubated for 30 min at 37 °C with increasing concentrations of TTHL (1 and 10 μ M). After 30 min of incubation, the homogenates were incubated with PTZ (10 mM) during 20 min. The concentration of PTZ used in the current study was chosen based previous studies that have demonstrated a direct interaction of the PTZ with Na^+, K^+ -ATPase (Dubberke et al., 1998). After the incubation period, the Na^+, K^+ -ATPase and its α isoforms were determined as previously described (Nishi et al., 1999; Rambo et al., 2009).

2.5.3. [^3H]flunitrazepam binding

The cerebral cortex from each animal was thawed and homogenized in 10 ml of homogenization buffer A (10 mM Tris–HCl, 300 mM sucrose, and 2 mM EDTA, pH 7.4) per gram of tissue. This homogenate was centrifuged at 1000 \times g for 10 min at 4 °C. The resulting supernatant was centrifuged at 16,000 \times g for 20 min at 4 °C. The resulting pellet was then re-suspended in 1 ml of homogenization buffer and frozen at -70 °C until analyzed.

The binding of [^3H]flunitrazepam to the benzodiazepinic site of GABA_A receptors was determined by first washing the cell membrane preparation in the following manner: individual aliquots were diluted with five volumes of wash buffer B (50 mM Tris–HCl and 2 mM EDTA, pH 7.4); the aliquots were mixed and centrifuged at 16,000 \times g for 10 min at 4 °C; and the samples were incubated for 30 min at 37 °C. This washing procedure was repeated twice, and the final pellet was re-suspended in binding assay buffer C (20 mM HEPES and 1 mM EDTA, pH 7.4). The protein concentration of each sample was determined by a spectrophotometric protein dye-binding assay based on a previously described method that uses bovine serum albumin as the standard (Bradford, 1976). The incubation was carried out in duplicate in polycarbonate tubes (total volume 500 μ L) containing 50 mM Tris–HCl (pH 7.4), 0.5 mg of protein membrane and TTHL (0.1, 1 and 10 μ M). Diazepam (10 μ M) was used as a positive control. The incubation was started by adding 1 nM [^3H]flunitrazepam (85.8 Ci/mmol) and was run in ice for 60 min. The reaction was stopped by vacuum filtration, and each filter was washed with 15 ml of cold 10 mM Tris–HCl buffer. The filters were placed individually in polycarbonate tubes, and 1 ml of scintillation liquid was added. The radioactivity of each sample was determined using a Packard Tri-Carb 2100TR liquid scintillation counter. The non-specific binding of each sample was determined by adding 100 μ M non-radioactive flunitrazepam to the medium in parallel assays. The specific binding of each sample was considered as the difference between total binding and non-specific binding. The results were expressed as percentage inhibition of TTHL on specific binding [^3H]flunitrazepam. Protein content was measured colorimetrically by a previously described method (Bradford, 1976) that used bovine serum albumin (1 mg/ml) as the standard.

2.5.4. [^3H] glutamate binding

For membrane preparation, the cerebral cortex from three mice were homogenized (1:20, w/v) in homogenization buffer (10 mM Tris–acetate, 320 mM sucrose, 1 mM MgCl_2). The homogenate was centrifuged at 4 °C 1000 \times g for 15 min, and the supernatant (S1) was collected from this initial centrifugation. The initial pellet (P1)

was homogenized again and subjected to an identical centrifugation, and the resulting supernatant (S1') was combined with S1. The combined supernatant was centrifuged at 4 °C at 16,000 × g for 15 min, and the resulting pellet (P2) was re-suspended (1:20, w/v) in 10 mM Tris–acetate (pH 7.4) without sucrose and placed on ice for 30 min. After this incubation, the membrane solution was centrifuged at 4 °C at 16,000 × g for 15 min, the supernatant was discarded and the pellet was re-suspended in the same buffer. This last wash sequence was repeated more than three times, and the resulting membranes were frozen at –20 °C for 48 h. After this period, the membranes were defrosted, re-suspended (1:20, w/v) in 10 mM Tris–acetate and incubated at 37 °C for 30 min. Next, the membranes were centrifuged and washed in the same conditions as described above four additional times, and they were frozen at –20 °C. On the assay day, the membranes were centrifuged and washed four additional times. After the last centrifugation, the pellets were re-suspended in 10 mM Tris–acetate (pH 7.4), and the protein content was determined using a previously described method (Bradford, 1976).

The glutamate binding experiments were carried out in the presence of sodium to target glutamate binding to the transporters that depend on sodium for their activity as previously described (Dalcin et al., 2007). The incubations were carried out in triplicate in polycarbonate tubes (total volume 500 µL) containing 50 mM Tris–acetate/120 mM NaCl, pH 7.4, 50 µg of protein membrane and TTHL (1–10 µM). The level of [³H] glutamate binding was evaluated in the presence of 10 µM *t*-transpyrrolidine-2,4-dicarboxylate (PDC), a substrate inhibitor of glutamate transporters. The experimental controls did not contain TTHL. The incubation step was started by adding 40 nM [³H] glutamate (0.3 µCi), and the process was run at 30 °C for 30 min. The reaction was stopped by vacuum filtration, and each filter was washed with 20 ml of cold 10 mM Tris–acetate buffer. The filters were placed individually in polycarbonate tubes, and 1 ml of scintillation liquid was added to each tube. The radioactivity of each sample was determined using a Packard Tri-Carb 2100TR liquid scintillation counter. The non-specific binding of each sample (10–20% of the total binding) was determined by adding 40 µM non-radioactive glutamate to the medium in parallel assays. The specific binding of each sample was considered as the difference between total binding and non-specific binding. The results were expressed as percentage of specific binding.

2.6. Statistical analysis

Statistical analysis was carried out by one- or two-way analysis of variance (ANOVA), and only *F*-values at a significance level of *P* < 0.05 are presented. Post-hoc

analyses were carried out when appropriate using the Student–Newman–Keuls test. All data are expressed as the mean ± S.E.M.

3. Results

3.1. Dose response curve of TTHL on convulsions induced by PTZ

Fig. 2 shows the effect of the acute administration of TTHL (1, 3, 10 and 30 mg/kg) on PTZ-induced behavioral seizures, as characterized by the latencies to the first tonic–clonic and the generalized convulsions. Electroencephalographic recordings confirmed that the behavioral seizures were elicited by PTZ (80 mg/kg; i.p.) (Fig. 2C); these seizures were characterized by the occurrence of multispikes plus slow waves and major seizure activity. The multispikes plus slow waves correlated with myoclonic jerks, which are characteristic of clonic convulsions. The generalized convulsions appeared in the EEG recordings as the major seizure activity and were characterized by 2–3 Hz high-amplitude activity. After the ictal discharge, post-ictal EEG suppression and slow waves were observed, and this activity correlated with behavioral catalepsy. In the present study we showed that pretreatment with TTHL (30 mg/kg i.g.) increased the latency to first clonic seizure [*H* (5) = 20.96, *P* < 0.001, Fig. 2G] and the latency to the tonic–clonic [*H* (5) = 14.46, *P* > 0.05 Fig. 2H] but reduced the duration of generalized seizures [*H* (5) = 17.33, *P* < 0.01 Fig. 2I] induced by PTZ (80 mg/kg; i.p.). The EEG recordings confirmed that systemic administration of TTHL (30 mg/kg) protected against PTZ-induced behavioral seizures (Fig. 2F). However, a lower dose of TTHL (1–10 mg/kg) was not capable of altering both behavior and EEG seizures induced by PTZ (Fig. 2G–I and data not shown). Thus, we decided to select only the dosage of TTHL (30 mg/kg) that had anticonvulsant effects for the investigation of

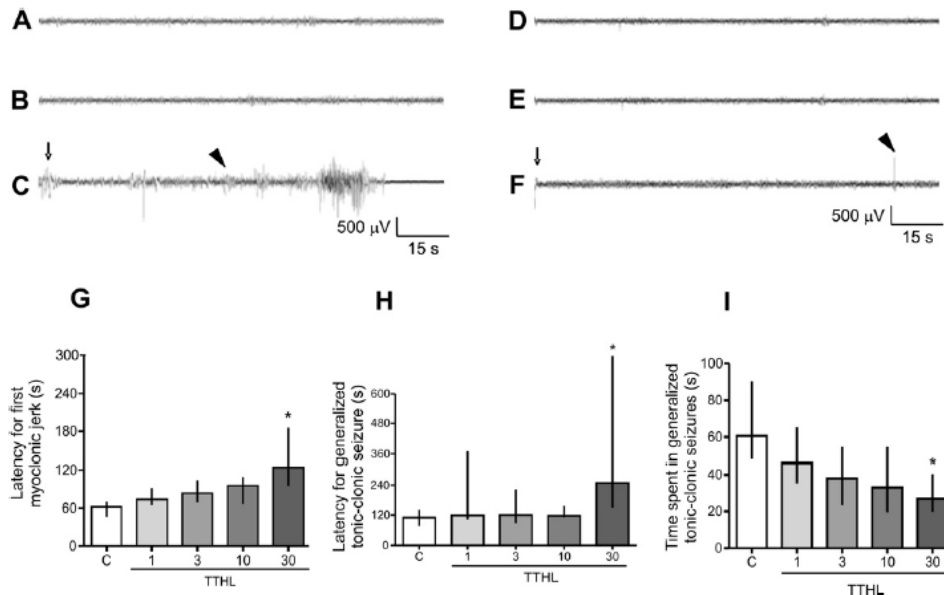


Fig. 2. Several representative electroencephalographic recordings of the animals treated with vehicle (A–C) or TTHL (30 mg/kg; p.o.) (D–F). The basal period is showed in recording A and D. Recordings B and E show a period after the vehicle or TTHL treatment, respectively. Recordings C and F show the period after PTZ injection (80 mg/kg, i.p.) in vehicle- and TTHL-treated animals, respectively. The arrows indicate the time of the PTZ injection; the arrowheads indicate the EEG patterns associated with clonic seizures. The calibration bars denote 500 µV and 15 s. The effect of TTHL administration (0, 1, 3, 10 and 30 mg/kg, p.o.) on the convulsive behavior induced by PTZ (80 mg/kg, i.p.) is showed in Figures G (latency for first myoclonic jerk), H (latency for generalized tonic-clonic seizure), and I (time spent in generalized tonic-clonic seizures). The data are presented as median and interquartile range for *n* = 8–9 animals per group. **p* < 0.05 compared with the control group (Kruskal–Wallis test).

the action of TTHL on neurochemical alterations following the injection of PTZ.

3.2. Involvement in TTHL in [³H]flunitrazepam binding, specific [³H] glutamate binding and antioxidant activity in vitro

To determine whether the prevention exerted by TTHL in this model of convulsion may result from an interaction with GABA_A receptors, we performed a [³H]flunitrazepam binding assay in membranes from the cerebral cortex of mice. A statistical analysis revealed that the incubation of TTHL (1–10 μM) did not alter the binding of [³H]flunitrazepam to the benzodiazepinic site of GABA_A receptors or to [³H] glutamate (Fig. 3C–D). A statistical analysis also revealed that TTHL (1–100 μM) did not exhibit ABTS and DPPH radical scavenging activity (Fig. 3A–B). The effect of TTHL (1–100 μM) against enzymatically generated O₂^{•-} radicals was also evaluated, but no antioxidant activity was observed for concentrations of TTHL ranging from 1 to 100 μM (data not shown).

3.3. Involvement in TTHL lipid peroxidation and protein carbonylation in ex vivo

In the present study, we showed that the injection of a consultant dose of PTZ (80 mg/kg) induced an increase in lipid peroxidation [*F*(3,22) = 5.38, *P* < 0.05, Fig. 4A] and protein carbonylation [*F*(3,24) = 4.37, *P* < 0.05, Fig. 4B] in the cerebral cortex. In addition, our data showed that pretreatment with TTHL (30 mg/kg i.g.) protected against these deleterious effects induced by PTZ. These experimental data suggest that anticonvulsant effect exerted by TTHL protects against increases in protein carbonyl and TBARS after PTZ injection.

3.4. TTHL effect on glutamate uptake and Na⁺,K⁺-ATPase activity in ex vivo

Considering that some selected targets, such as Na⁺,K⁺-ATPase and glutamate transporters, might lead to the enhancement of neuronal excitability and the appearance of convulsions (Rambo et al., 2009), we decided to investigate whether TTHL pretreatment protects against PTZ-induced deleterious effects; the level of this protection is characterized here by glutamate uptake and Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition. A statistical analysis showed that pretreatment with TTHL (30 mg/kg; i.g.) protected against inhibition of the total activity of Na⁺,K⁺-ATPase induced by PTZ [*F*(3, 19) = 5.06, *P* < 0.05, Fig. 5A], as well as that of the Na⁺,K⁺-ATPase subunits α₁ [*F*(3,19) = 5.91, *P* < 0.05, Fig. 5B] and α₂/α₃ [*F*(3,19) = 3.72, *P* < 0.05, Fig. 5C]. A statistical analysis also revealed that the administration of TTHL (30 mg/kg; i.g.) had no effect on [³H] glutamate uptake *per se* [*F*(1,19) = 1.54; *P* > 0.05], but the administration of TTHL was effective against PTZ-induced [³H] glutamate uptake inhibition [*F*(3,19) = 14.02, *P* < 0.05, Fig. 6]. These experimental results suggest that the inhibition of the Na⁺,K⁺-pump and inhibition of [³H] glutamate uptake contribute to the ictogenic activity of PTZ. In addition, the anticonvulsant effect exerted by pretreatment with TTHL involves the Na⁺,K⁺-ATPase activity maintenance.

3.5. TTHL effect on ouabain-induced convulsions and Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition ex vivo

To determine whether the prevention exerted by TTHL in this model of convulsion may result from an Na⁺,K⁺-ATPase maintenance, we investigated the effect of TTHL on seizures induced by ouabain, which is a Na⁺,K⁺-ATPase inhibitor. As depicted in the

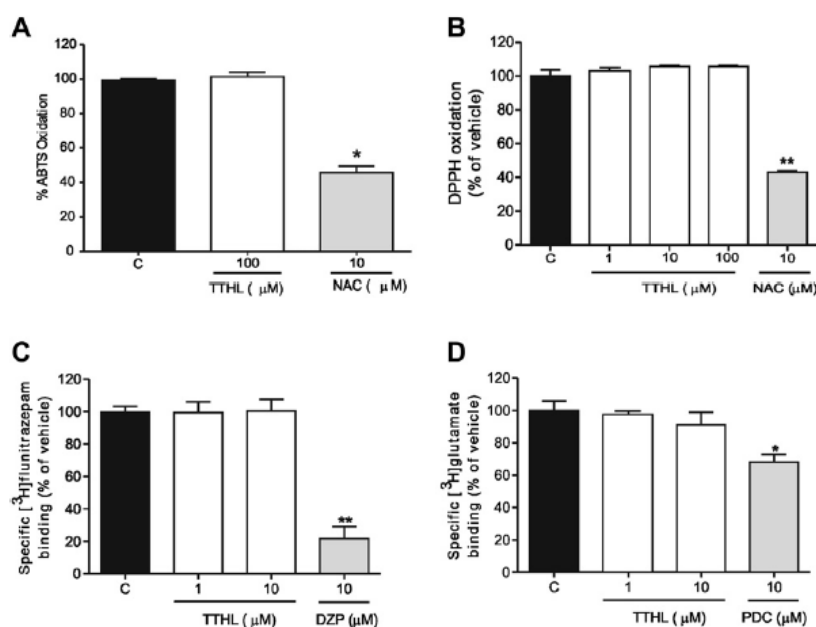


Fig. 3. The effect of TTHL (100 μM) or N-acetylcysteine (10 μM) on the ABTS scavenger assay (A) (*n* = 4/triplicate). The effect of TTHL (1–100 μM) or N-acetylcysteine (10 μM) on the DPPH scavenger assay (B) (*n* = 4/triplicate). The effect of TTHL (1 or 10 μM) or diazepam (DZP, 10 μM) on [³H]-flunitrazepam binding in mice cerebral cortex membranes (C) (*n* = 4/triplicate); The effect of TTHL (1 or 10 μM) or trans-2,3-*l*-trans-pyrrolidine-2,3-dicarboxylic acid (PDC, 10 μM) on sodium-dependent [³H]-glutamate binding in mice cerebral cortex membranes (*n* = 4/duplicate). The data are presented as the mean ± S.E.M. **P* < 0.05 or ***P* < 0.01 compared with the control group (One-way ANOVA followed by Student Newman–Keuls' test).

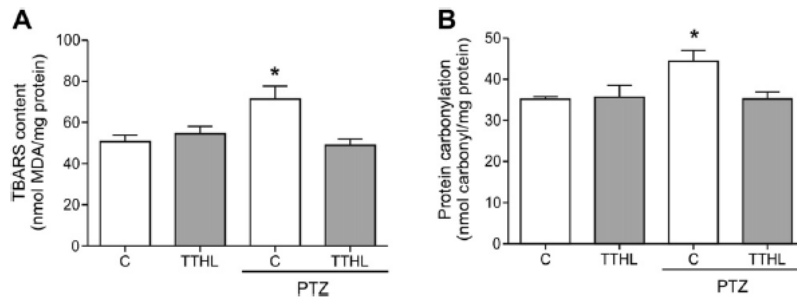


Fig. 4. The effect of TTHL administration (30 mg/kg, p.o.) on TBARS (A) and protein carbonyl (B) content in the mice cerebral cortex after PTZ injection (80 mg/kg, i.p.). The data are presented as the mean \pm S.E.M. for $n = 8-9$ animals per group. * $P < 0.05$ compared with the control group.

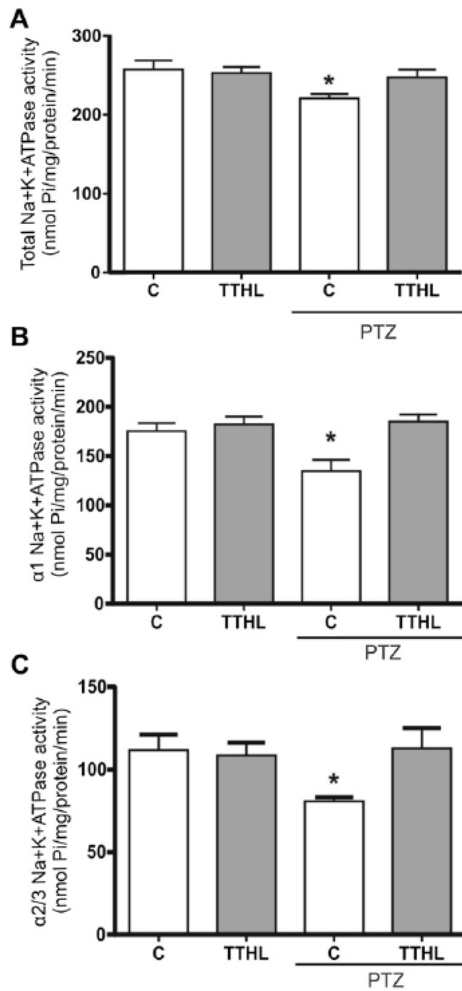


Fig. 5. The effect of TTHL administration (30 mg/kg, p.o.) on the total (A), $\alpha 1$ (B) and $\alpha 2/3$ (C) Na⁺,K⁺-ATPase isoforms activity after PTZ (80 mg/kg, i.p.). The data are presented as the mean \pm S.E.M. for $n = 8-9$ animals per group. * $P < 0.05$ compared with the control group.

representative EEG recordings (Fig. 7C), an ouabain injection at a fully convulsive dose (1 μ g/i.c.v.) caused the appearance of clonus of the left forelimb and/or left hind limb and head; these behaviors were accompanied by rotational behavior. The seizures were defined by episodes consisting of the simultaneous occurrence of at least two of the following alterations in all four recording leads: high-frequency complexes, polyspike complexes, or high-voltage synchronized spike activity. A statistical analysis also revealed that pretreatment with TTHL (30 mg/kg, i.g.) increased the latency to the tonic-clonic [H(5) 9.64 = $P < 0.05$; Fig. 7G] and reduced the duration of generalized seizures [H(5) = 17.33, $P < 0.05$; Fig. 7H] (1 μ g/i.c.v.). The EEG recordings confirmed that behavioral seizures were elicited by injection of ouabain (Fig. 7C) and that the behavioral seizures were prevented by the systemic administration of TTHL (Fig. 7F). In addition, the pretreatment with TTHL (30 mg/kg; i.g.) protected against inhibition of the total activity of Na⁺,K⁺-ATPase induced by ouabain (1 μ g/i.c.v.) [$F(3, 19) = 5.06$, $P < 0.05$, Fig. 8A], as well as that of the subunits $\alpha 2/\alpha 3$ [$F(3, 19) = 3.72$, $P < 0.05$, Fig. 8C].

3.6. TTHL effect on Na⁺,K⁺-ATPase activity in vitro

To determine whether PTZ decreases Na⁺,K⁺-ATPase activity by directly interacting with the enzyme, PTZ (10 mM) and TTHL (1, 10 μ M) were added directly to the reaction medium containing the cerebral cortex homogenates. A statistical analysis revealed that the inhibitory effect of PTZ (10 mM) on Na⁺,K⁺-ATPase activity in homogenates is not isoform-specific, as it occurred in the presence of 4 mM ouabain (inhibiting all isoforms) [$F(3, 40) = 9.44$, $P < 0.05$,

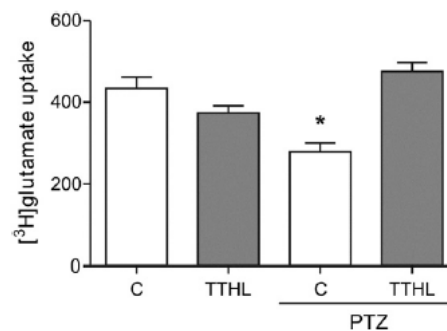


Fig. 6. The effect of TTHL administration (30 mg/kg, p.o.) on [³H]glutamate uptake after PTZ injection (80 mg/kg, i.p.). The data are presented as the mean \pm S.E.M. for $n = 8-9$ animals per group. * $P < 0.05$ compared with the control group.

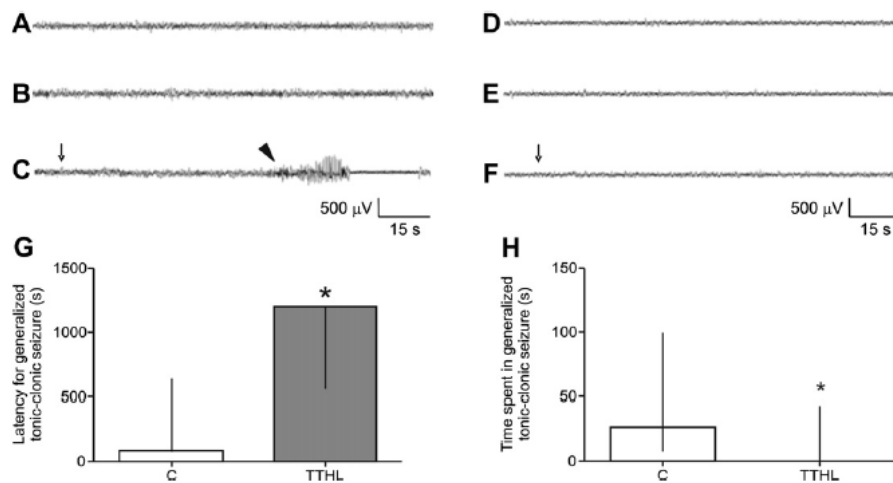


Fig. 7. Several representative electroencephalographic recordings from animals treated with the vehicle (A–C) or TTHL (30 mg/kg, p.o.) (D–F). The basal period is shown in recording A and D. Recordings B and E show the period after vehicle or TTHL treatment, respectively. Recordings C and F show the period after ouabain injection (1 μ g/5 μ L, i.c.v.) in vehicle- and TTHL-treated animals, respectively. The arrows indicate the ouabain injection; the arrowheads indicate the EEG patterns associated with clonic seizures. The calibration bars are 500 μ V and 15 s. The effect of TTHL administration (30 mg/kg, p.o.) on the convulsive behavior induced by ouabain (1 μ g/5 μ L, i.c.v.) is shown in Figures G (latency for generalized tonic-clonic seizure) and H (time spent in generalized tonic-clonic seizure). The data are presented as median and interquartile range for $n = 8$ –9 animals per group. * $p < 0.05$ compared with the control group (Mann–Whitney test).

Fig. 9A) and 3 μ M ouabain (inhibiting Na^+ , K^+ -ATPase isoforms containing α_2/α_3) [$F(3, 40) = 6.70$; $P < 0.05$, Fig. 9B]. A statistical analysis also showed that previous incubation with TTHL (10 μ M) protected against Na^+ , K^+ -ATPase inhibition induced by PTZ (10 mM) [$F(3, 40) = 4.11$; $P < 0.05$, Fig. 9C]. This result reinforced the idea that the effective protection exerted by TTHL in this model of seizure involves the maintenance of Na^+ , K^+ -ATPase activity.

4. Discussion

According to the World Health Organization, approximately 50 million people in the world have epilepsy. Despite progress in understanding the pathogenesis of the disorder, there remain a significant number of patients with poorly controlled seizures (at least 20% of patients) regardless of the type of therapy. An alternative approach to treatment of this disorder would be to use of drugs to prevent or slow the progression of seizures. The results presented in the present report show, for the first time, the anti-convulsant properties of TTHL. The systemic administration of TTHL in mice protected against behavioral and electrographic seizures *in vivo* and neurochemical alterations *ex vivo* (increases in oxidative stress and inhibition of glutamate uptake and Na^+ , K^+ -ATPase activity in the cerebral cortex) induced by PTZ, a GABA_A receptor antagonist. However, the incubation of TTHL *in vitro* did neither scavenged free radicals nor altered flunitrazepam and sodium-dependent glutamate binding, indicating that the TTHL anticonvulsant effect was unrelated with its direct antioxidant action or interaction with GABA_A receptor and glutamate transporters. Conversely, the TTHL pretreatment was effective in preventing behavioral and electrographic seizures and Na^+ , K^+ -ATPase inhibition induced by ouabain, an inhibitor of Na^+ , K^+ -ATPase. Moreover, the results presented in this report show that PTZ exert an isoform-specific inhibitory effect on Na^+ , K^+ -ATPase activity in homogenates, an action prevented by the incubation with TTHL. These experimental findings imply Na^+ , K^+ -ATPase as a target for TTHL, which may underlie its protection against ouabain and PTZ-induced seizures and neurochemical alterations.

In the current study, we have confirmed and extended previous findings that PTZ, a chemical convulsant that affects several neurotransmitter systems, elicits behavioral and electrographic seizures, increases oxidative stress and inhibits glutamate uptake and Na^+ , K^+ -ATPase activity *in vivo* (Rambo et al., 2009; Souza et al., 2009). Moreover, the treatment with TTHL by oral route prevented PTZ-induced seizures and neurochemical alterations. Knowing that the antagonism of the GABA_A receptor has been considered the main mechanism for biological actions of PTZ (Zandieh et al., 2010), we determined whether the prevention exerted by TTHL in this model of convulsion may result in part from a direct interaction with the GABA_A receptor using the [^3H]flunitrazepam binding assay *in vitro*. Of note, the binding of [^3H]flunitrazepam to the benzodiazepine site of the GABA_A receptor is sensitive to GABA_A receptor agonists that interact with several sites in the receptor (Lauren et al., 2007). The results presented in this report revealed that TTHL incubation did not alter the binding of [^3H]flunitrazepam to the GABA_A receptor in cerebral cortex membranes, suggesting that the anticonvulsant effect exerted by TTHL is not closely related to GABA_A ergic pathway.

Various central nervous system disorders have been associated with the reactive oxygen species (ROS) generation, such as seizures (Rambo et al., 2009; Souza et al., 2009). ROS can damage essential cellular constituents such as lipids and proteins, which can be measured by identification of their by products malondialdehyde and protein carbonyl, respectively (Souza et al., 2009). We observed that PTZ-induced cerebral cortex increase of TBARS (including malondialdehyde) and production and protein carbonylation *ex vivo*, indicating that oxidative stress occurs as a consequence of seizures, thereby contributing to seizure-induced brain damage. In this context, a number of natural products have been demonstrated to have direct antioxidant and anticonvulsant effects (Jiang et al., 1993; Lian et al., 2008). Moreover, there has been an increasing interest in the biochemical effects of medicinal plants with antioxidant properties, as they could be candidates for the prevention of oxidative damage associated with epilepsy (Noda et al., 1997). We showed that TTHL pretreatment protected against the

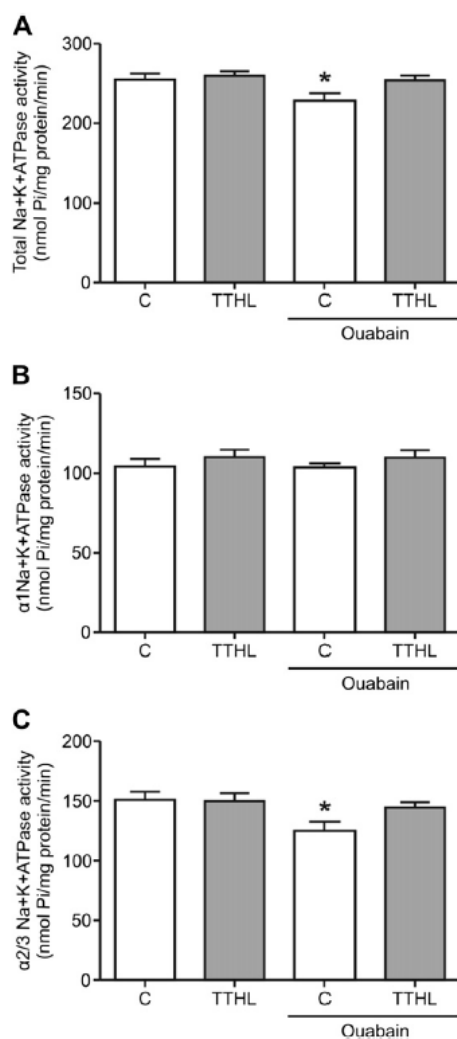


Fig. 8. The effect of TTHL administration (30 mg/kg, p.o.) on total (A), $\alpha 1$ (B) and $\alpha 2/3$ (C) Na⁺,K⁺-ATPase isoforms activity after ouabain injection (1 μ g/5 μ L, i.c.v.). The data are presented as the mean \pm S.E.M. for $n = 8-9$ animals per group. * $P < 0.05$ compared with the control group.

electrographic seizures and the oxidative damage elicited by PTZ *ex vivo*. However, our data revealed that TTHL did not present any direct action against the DPPH, ABTS and anion superoxide radicals. The enzymatically generated O₂^{•-} radical is a free radical more representative of the reactivity of the radical species generated under physiological conditions. Considering that this anion superoxide radical has a higher oxidation potential (+0.94 V) (Halliwell and Gutteridge, 2007) compared to the relative stable DPPH• free radical, it also corroborated the results obtained by the DPPH and ABTS methods, in which we did not observe an antioxidant activity of TTHL. These results suggest that the protection of PTZ-induced convulsion and oxidative damage elicited by TTHL was not due to its direct action on DPPH, ABTS and anion superoxide radicals generation, and that other mechanisms might be used to explain the currently reported effects.

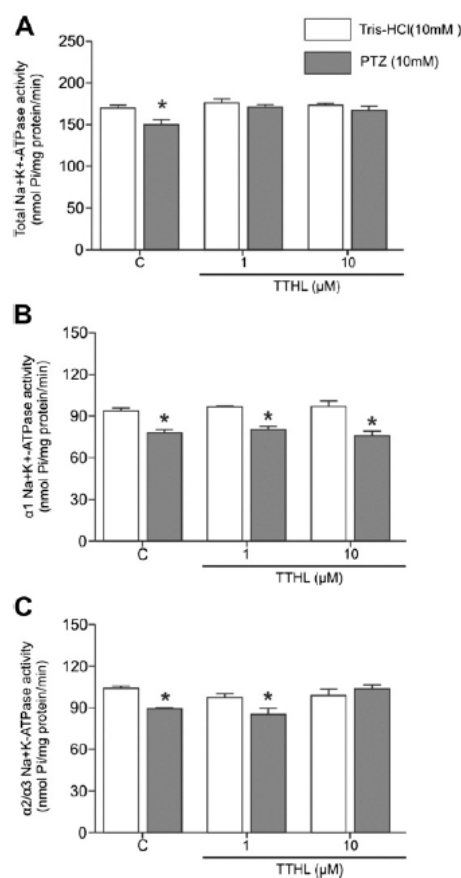


Fig. 9. The effect of TTHL (1 or 10 μ M) in the presence or absence of PTZ (10 mM) on total (A), $\alpha 1$ (B) and $\alpha 2/3$ (C) Na⁺,K⁺-ATPase isoforms activity in the homogenate of the cerebral cortex of mice. The data are presented as the mean \pm S.E.M. for $n = 8-9$ animals per group. * $P < 0.05$ compared with the respective control-Tris groups.

A large body of literature has accumulated that indicates that in human and experimental epilepsy, Na⁺,K⁺-ATPase activity is altered (Rambo et al., 2009; Souza et al., 2009). Moreover, the Na⁺,K⁺-ATPase inhibitor ouabain causes electrographically recorded seizures in mice (Jamme et al., 1995). It is also remarkable that decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity has been found in the post-mortem epileptic human brain (Grisar et al., 1992). In addition, a mutation in the Na⁺,K⁺-ATPase α subunit gene has been associated with epilepsy in humans (Jurkat-Rott and Lehmann-Horn, 2004). Accordingly, the results presented in this report reveal that PTZ treatment *in vivo* inhibited total and subunits $\alpha 1$ and $\alpha 2/3$ Na⁺,K⁺-ATPase activity, an effect prevented by the pretreatment with TTHL. Knowing that there is a strong correlation between Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition and the duration of PTZ-induced convulsions (Figuera et al., 2006) and that oxidative damage may be a consequence of seizures, the maintenance of the Na⁺,K⁺-ATPase activity produced by the treatment with TTHL may be related not only with its anticonvulsant effect, but also with its protection against oxidative damage. The behavioral and EEG recordings reinforce this assumption because an injection of the Na⁺,K⁺-ATPase inhibitor ouabain caused the appearance of seizures

and reduction of total and α_2/α_3 subunit Na^+/K^+ -ATPase activity, both effects protected by TTHL pretreatment.

Na^+/K^+ -ATPase is an ubiquitous plasma membrane protein that plays a key role in the maintenance of intracellular electrolyte homeostasis in virtually all tissues (Skou and Esmann, 1992). In the central nervous system (CNS), Na^+/K^+ -ATPase activity significantly accounts for the maintenance of the electrochemical gradient across the plasma membrane underlying resting and action potentials and modulation of neurotransmitter release and uptake (Stahl and Harris, 1986). In line with this view, recent studies have demonstrated that glutamate transporters and Na^+/K^+ -ATPase are part of the same macromolecular complexes and operate as a functional unit to regulate glutamatergic neurotransmission in astrocytes and neurons (Rose et al., 2009; Zhang et al., 2009). As a consequence, a decrease of Na^+/K^+ -ATPase activity directly affects neurotransmitter signaling, neural activity and animal behavior. Accordingly, the Na^+/K^+ -ATPase inhibition causes seizures in mice (Jamme et al., 1995) and glutamate release by reversal of Na^+ -dependent transporter in the rat spinal cord (Li and Stys, 2001). Because glutamate is the principal excitatory neurotransmitter, it inevitably plays a role in the initiation and spreading of seizures (Danbolt, 2001). Our data reveal that administration of PTZ decreases [^3H] glutamate uptake and that TTHL pretreatment prevented this effect. This result is particularly important considering that the activity of glutamate transporters can be impaired by several indirect mechanisms, including ROS formation and the reduction of Na^+/K^+ -ATPase activity (Rambo et al., 2009; Souza et al., 2009). Although the exact mechanism through which PTZ reduces glutamate uptake is still unknown, it is tempting to propose that a reduction in Na^+/K^+ -ATPase decreases glutamate uptake because it depends on Na^+ gradients across cell membrane (Trotti et al., 1997).

Finally, our results showed that PTZ (10 mM) inhibited the Na^+/K^+ -ATPase activity without isoform specificity when added directly to the reaction medium containing the cortex homogenates. These data agree with several studies that have demonstrated that millimolar concentrations of PTZ affect a variety of ion-selective channels and neurotransmitter receptors (Bloms et al., 1992; Walden et al., 1984) and inhibit the Na^+/K^+ -ATPase with K_i values approximately 10–20 mM (Dubberke et al., 1998). In addition, we showed that previous incubation with TTHL (10 μM) protected against α_2/α_3 Na^+/K^+ -ATPase inhibition induced by PTZ. The selective protection exerted by TTHL *in vitro* demonstrates differing roles of α_1 - and α_2/α_3 isoforms in neuronal excitability. For example, in excitability cells, the catalytic α_1 -subunit of Na^+/K^+ -ATPase is relatively ROS- and ouabain-resistant. Conversely, α_2/α_3 Na^+/K^+ -ATPase are ouabain-sensitive and ROS-vulnerable (Karpova et al., 2010). In addition, the results presented in this report suggest that the α_2/α_3 Na^+/K^+ -ATPase maintenance elicited by TTHL protects against neuronal excitability and oxidative damage induced by PTZ. In agreement with this view, our data reveal that pretreatment with TTHL also protects against the inhibition of the total activity of Na^+/K^+ -ATPase and that of subunits α_2/α_3 induced by convulsive doses of ouabain.

In summary, the present results provide convincing evidence that the systemic administration of TTHL, a pentacyclic triterpene isolated from *C. leprosum*, protects against seizures and neurochemical alterations induced by convulsant agent PTZ. Furthermore, the results presented in this report revealed that the action elicited by TTHL is not due to its direct antioxidant action or interaction with GABA_A receptor, but the mechanism involves the Na^+/K^+ -ATPase activity maintenance. Therefore, TTHL could be a new therapeutic approach for preventing seizures and some of their deleterious effects.

References

- Andrade, D.M., Minassian, B.A., 2007. Genetics of epilepsies. *Expert Rev. Neurother.* 7, 727–734.
- Bagetta, G., Iannone, M., Palma, E., Rodino, P., Granato, T., Nistico, G., 1995. Lack of involvement of nitric oxide in the mechanisms of seizures and hippocampal damage produced by kainate and ouabain in rats. *Neurodegeneration* 4, 43–49.
- Bloms, P., Musshoff, U., Madeja, M., Musch-Nittel, K., Kuhlmann, D., Spener, F., Speckmann, E.J., 1992. Suppression of a ligand operated membrane current by the epileptogenic agent pentylene-tetrazol in oocytes of *Xenopus laevis* after injection of rat brain RNA. *Neurosci. Lett.* 147, 155–158.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cavalheiro, E.A., Fernandes, M.J., Turski, L., Mazzacoratti, M.G., 1992. Neurochemical changes in the hippocampus of rats with spontaneous recurrent seizures. *Epilepsy Res. Suppl.* 9, 239–247, discussion 247–238.
- Dalcin, K.B., Rosa, R.B., Schmidt, A.L., Winter, J.S., Leipnitz, G., Dutra-Filho, C.S., Wannmacher, C.M., Porciuncula, L.O., Souza, D.O., Wajner, M., 2007. Age and brain structural related effects of glutamic and 3-hydroxyglutamic acids on glutamate binding to plasma membranes during rat brain development. *Cell. Mol. Neurobiol.* 27, 805–818.
- Danbolt, N.C., 2001. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 65, 1–105.
- de Oliveira, D.G., Nunes, P.M., Aruin, A.S., Dos Santos, M.J., 2011. Grip force control in individuals with hand osteoarthritis. *J. Hand Ther.* 24, 345–355.
- Dichter, M.A., Hauser, W.A., Vinters, H.V., Pedley, T.A., 2007. General treatment considerations. In: Jerome Engel, T.A.P., Aicardi, Jean, A Dichter, Marc, Moshé, Solomon (Eds.), *Epilepsy: a Comprehensive Textbook*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Doggett, N.S., 1975. The effect of ouabain and digitoxin on hexobarbitone sleeping time in the mouse. *Psychopharmacologia* 41, 305–308.
- Dubberke, R., Vasilets, L.A., Schwarz, W., 1998. Inhibition of the Na^+ , K^+ pump by the epileptogenic pentylene-tetrazole. *Pflügers Arch.* 437, 79–85.
- Dunkley, P.R., Jarvie, P.E., Heath, J.W., Kidd, G.J., Rostas, J.A., 1986. A rapid method for isolation of synaptosomes on Percoll gradients. *Brain Res.* 372, 115–129.
- Facundo, Valdir A., A., C.H.S., Silveira, Edilberto R., Braz-Filho, Raimundo, Hufford, Charles D., 1993. Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*. *Phytochemistry* 32, 411–415.
- Fernandes, D.C., Regasini, L.O., Velloso, J.C., Pauletti, P.M., Castro-Gambao, I., Bolzani, V.S., Oliveira, O.M., Silva, D.H., 2008. Myeloperoxidase inhibitory and radical scavenging activities of flavones from *Pterogyne nitens*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 56, 723–726.
- Ferraro, T.N., Golden, G.T., Smith, G.G., St Jean, P., Schork, N.J., Mulholland, N., Ballas, C., Schill, J., Buono, R.J., Berrettini, W.H., 1999. Mapping loci for pentylene-tetrazol-induced seizure susceptibility in mice. *J. Neurosci.* 19, 6733–6739.
- Feuerbach, D., Lingenhoehl, K., Olpe, H.R., Vassout, A., Gentsch, C., Chaperon, F., Nozulak, J., Enz, A., Bilbe, G., McAllister, K., Hoyer, D., 2009. The selective nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ agonist JN403 is active in animal models of cognition, sensory gating, epilepsy and pain. *Neuropharmacology* 56, 254–263.
- Figuera, M.R., Royes, L.F., Furián, A.F., Oliveira, M.S., Fiorenza, N.G., Frussa-Filho, R., Petry, J.C., Coelho, R.C., Mello, C.F., 2006. GM1 ganglioside prevents seizures, Na^+ , K^+ -ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylene-tetrazole. *Neurobiol. Dis.* 22, 611–623.
- Fiske, C.H., Subbarow, Y., 1927. The nature of the "inorganic phosphate" in voluntary muscle. *Science* 65, 401–403.
- Freitas, R.M., 2009. Investigation of oxidative stress involvement in hippocampus in epilepsy model induced by pilocarpine. *Neurosci. Lett.* 462, 225–229.
- Crisar, T., Guillaume, D., Delgado-Escueta, A.V., 1992. Contribution of Na^+ , K^+ -ATPase to focal epilepsy: a brief review. *Epilepsy Res.* 12, 141–149.
- Halliwel, B., Gutteridge, J.C.M., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, Oxford.
- Jamme, I., Petit, E., Divoux, D., Gerbi, A., Maixent, J.M., Nouvelot, A., 1995. Modulation of mouse cerebral Na^+ , K^+ -ATPase activity by oxygen free radicals. *Neuroreport* 7, 333–337.
- Jiang, Y., Chen, L., Sun, C.W., Zhong, G.G., Qi, H., Ma, X.Y., Xu, J.D., 1993. Influence of 11 ginsenoside monomers on action potentials of myocardiocytes. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 14 (Suppl.), S8–S12.
- Jurkat-Rott, K., Lehmann-Horn, F., 2004. The patch clamp technique in ion channel research. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5, 387–395.
- Karpova, L.V., Akkuratov, E.E., Brodskaja, O.M., Boldyrev, A.A., 2010. The Na^+ pump and intracellular signaling mechanisms. *Biofizika* 55, 1022–1029.
- King, A.M., Salome, C., Dinsmore, J., Salome-Grosjean, E., De Ryck, M., Kaminski, R., Valade, A., Kohn, H., 2011. Primary amino acid derivatives: compounds with anticonvulsant and neuropathic pain protection activities. *J. Med. Chem.* 54, 4815–4830.
- Lauren, H.B., Lopez-Picon, F.R., Kukko-Lukjanov, T.K., Uusi-Oukari, M., Holopainen, I.E., 2007. Status epilepticus alters zolpidem sensitivity of [^3H]flunitrazepam binding in the developing rat brain. *Neuroscience* 146, 802–811.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Meth. Enzymol.* 186, 464–478.
- Li, S., Stys, P.K., 2001. Na^+ (+)- K^+ (+)-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na^+ (+)-dependent transport in spinal cord white matter. *Neuroscience* 107, 675–683.

- Lian, X.Y., Xu, K., Stringer, J.L., 2008. Oral administration of fructose-1,6-diphosphate has anticonvulsant activity. *Neurosci. Lett.* 446, 75–77.
- Longhi-Balbinot, D.T., Pietrovski, E.F., Gadotti, V.M., Martins, D.F., Facundo, V.A., Santos, A.R., 2009. Spinal antinociception evoked by the triterpene 3beta, 6beta, 16beta-trihydroxylup-20(29)-ene in mice: evidence for the involvement of the glutamatergic system via NMDA and metabotropic glutamate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 623, 30–36.
- Longhi-Balbinot, D.T., Lanznaster, D., Baggio, C.H., Silva, M.D., Cabrera, C.H., Facundo, V.A., Santos, A.R., 2012. Anti-inflammatory effect of triterpene 3beta, 6beta, 16beta-trihydroxylup-20(29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. *J. Ethnopharmacol.* 142, 59–64.
- Mares, J., Rokyta, R., 2009. Algesia after epileptic seizure. *Physiol. Res.* 58, 279–285.
- McColl, C.D., Home, M.K., Finkelstein, D.I., Wong, J.Y., Berkovic, S.F., Drago, J., 2003. Electroencephalographic characterisation of pentylenetetrazole-induced seizures in mice lacking the alpha 4 subunit of the neuronal nicotinic receptor. *Neuropharmacology* 44, 234–243.
- Meldrum, B.S., Rogawski, M.A., 2007. Molecular targets for antiepileptic drug development. *Neurotherapeutics* 4, 18–61.
- Migues, P.V., Leal, R.B., Mantovani, M., Nicolau, M., Gabilan, N.H., 1999. Synaptosomal glutamate release induced by the fraction Bc2 from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*. *Neuroreport* 10, 67–70.
- Nishi, A., Snyder, G.L., Naim, A.C., Greengard, P., 1999. Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of DARPP-32 dephosphorylation in neostriatal neurons. *J. Neurochem.* 72, 2015–2021.
- Noda, Y., Yamada, K., Nabeshima, T., 1997. Role of nitric oxide in the effect of aging on spatial memory in rats. *Behav. Brain Res.* 83, 153–158.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95, 351–358.
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Georgiou, C.D., Angelatou, F., Matsokis, N.A., Panagopoulos, N.T., 2005. Thiol redox state and lipid and protein oxidation in the mouse striatum after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure. *Epilepsia* 46, 1205–1211.
- Rambo, L.M., Ribeiro, L.R., Oliveira, M.S., Furian, A.F., Lima, F.D., Souza, M.A., Silva, L.F., Retamoso, L.T., Corte, C.L., Puntel, G.O., de Avila, D.S., Soares, F.A., Figuera, M.R., Mello, C.F., Royes, L.F., 2009. Additive anticonvulsant effects of creatine supplementation and physical exercise against pentylenetetrazol-induced seizures. *Neurochem. Int.* 55, 333–340.
- Rose, E.M., Koo, J.C., Antflick, J.E., Ahmed, S.M., Angers, S., Hampson, D.R., 2009. Glutamate transporter coupling to Na, K-ATPase. *J. Neurosci.* 29, 8143–8155.
- Schneider Oliveira, M., Flavia Furian, A., Freire Royes, L.F., Rechia Figuera, M., de Carvalho Myskiw, J., Gindri Fiorenza, N., Mello, C.F., 2004. Ascorbate modulates pentylenetetrazol-induced convulsions biphasically. *Neuroscience* 128, 721–728.
- Skou, J.C., Esmann, M., 1992. The Na, K-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 24, 249–261.
- Souza, M.A., Oliveira, M.S., Furian, A.F., Rambo, L.M., Ribeiro, L.R., Lima, F.D., Dalla Corte, L.C., Silva, L.F., Retamoso, L.T., Dalla Corte, C.L., Puntel, G.O., de Avila, D.S., Soares, F.A., Figuera, M.R., de Mello, C.F., Royes, L.F., 2009. Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia* 50, 811–823.
- Stahl, W.L., Harris, W.E., 1986. Na⁺, K⁺-ATPase: structure, function, and interactions with drugs. *Adv. Neurol.* 44, 681–693.
- Trotti, D., Rizzini, B.L., Rossi, D., Haugeto, O., Racagni, G., Danbolt, N.C., Volterra, A., 1997. Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. *Eur. J. Neurosci.* 9, 1236–1243.
- Vasilets, L.A., Schwarz, W., 1993. Structure-function relationships of cation binding in the Na⁺/K⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* 1154, 201–222.
- Walden, J., Lehmenkuhler, A., Speckmann, E.J., Witte, O.W., 1984. Continuous measurement of pentylenetetrazol concentration by a liquid ion exchanger microelectrode. *J. Neurosci. Meth.* 11, 187–192.
- Yan, L.J., Traber, M.G., Packer, L., 1995. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins. *Anal. Biochem.* 228, 349–351.
- Zandieh, A., Maleki, F., Hajimirzabeigi, A., Zandieh, B., Khalilzadeh, O., Dehpour, A.R., 2010. Anticonvulsant effect of celecoxib on pentylenetetrazole-induced convulsion: modulation by NO pathway. *Acta Neurobiol. Exp. (Wars)* 70, 390–397.
- Zhang, D., Hou, Q., Wang, M., Lin, A., Jarzyllo, L., Navis, A., Raissi, A., Liu, F., Man, H.Y., 2009. Na, K-ATPase activity regulates AMPA receptor turnover through proteasome-mediated proteolysis. *J. Neurosci.* 29, 4498–4511.
- Zhao, H., Dong, J., Lu, J., Chen, J., Li, Y., Shan, L., Lin, Y., Fan, W., Gu, G., 2006. Effects of extraction solvent mixtures on antioxidant activity evaluation and their extraction capacity and selectivity for free phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Agric. Food Chem.* 54, 7277–7286.

3. DISCUSSÃO

A epilepsia é uma síndrome caracterizada por crises espontâneas e recorrentes, resultado de descargas paroxísticas, excessivas e sincrônicas de uma população neural (ENGEL et al., 1996). Em todo o mundo, a incidência de epilepsia varia conforme a região geográfica. Nos países em desenvolvimento, em que há deficiência no atendimento médico, subnutrição e enfermidades, esse número pode chegar a 2%. Já nos países desenvolvidos a incidência é de aproximadamente 1%. No Brasil, a epilepsia é uma condição neurológica que atinge 1,8% da população onde o uso de medicamentos é uma das terapias mais utilizadas e promove resultados animadores ao controlar cerca de 70% dos casos (FERREIRA et al., 2009). Entretanto, estima-se que cerca de 30% pacientes continuam a ter crises, sem remissão, apesar de tratamento adequado com drogas antiepilépticas. Desta forma, dado o elevado número de pacientes com epilepsia que apresentam convulsões refratárias aos fármacos disponíveis, torna-se importante o entendimento dos mecanismos de indução e manutenção de convulsões. Além disso, visto os problemas que as atuais drogas disponíveis apresentam, fica clara a necessidade da procura de novos fármacos ativos nos diversos tipos e variações desta patologia e com menor incidência de efeitos colaterais e toxicidade. Entre as diversas fontes de novas drogas, destaca-se a pesquisa com produtos naturais, que possui grande potencial para fornecer compostos ativos sobre o Sistema Nervoso Central.

Nesse sentido os resultados apresentados neste estudo demonstraram que a administração sistêmica de TTHL em camundongos protege contra alterações comportamentais e eletroencefalográficas induzidas pelo PTZ, um antagonista do receptor de GABA_A. A administração sistêmica do presente composto também protegeu contra as alterações neuro-

químicas induzidas pelo PTZ, caracterizadas aqui pelo aumento no conteúdo de proteínas carbonis, espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, inibição da captação de glutamato e da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase no córtex cerebral de camundongos. No entanto, é importante ressaltar que TTHL não possui ação antioxidante e não altera a ligação do flunitrazepam e glutamato *per se*, o que sugere que o efeito anticonvulsivante exercido por tal composto não está relacionado com ação antioxidante direta bem como a interação com o receptor GABA_A e transportadores de glutamato. Por outro lado, o pré-tratamento com TTHL foi eficaz na prevenção de convulsões comportamentais e eletroencefalográficas induzidas pela administração intracerebroventricular de ouabaina, um inibidor de Na^+, K^+ -ATPase. Além disso, os resultados apresentados neste estudo revelaram que o PTZ exerce um efeito inibitório sobre a atividade da Na^+, K^+ -ATPase em homogeneizados de córtex e que administração de TTHL no meio de incubação protege contra esta inibição. Estes dados experimentais sugerem que a enzima Na^+, K^+ -ATPase pode ser como um alvo para ação protetora exercida pelo TTHL.

A enzima Na^+, K^+ -ATPase é uma proteína de membrana plasmática que desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase intracelular eletrolítica em todos os tecidos (SKOU ESMANN, 1992). No Sistema Nervoso Central, a atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase mantém o gradiente eletroquímico em repouso e modula a liberação e recaptção de neurotransmissores (STAHL E HARRIS, 1986). Corroborando com este ponto de vista, recentes estudos têm demonstrado que os transportadores de glutamato e Na^+, K^+ -ATPase fazem parte dos mesmos complexos de macromoléculas e operam como uma unidade funcional para regular a neurotransmissão glutamatérgica em astrócitos e neurônios (ROSE ET AL, 2009; ZHANG ET AL., 2009). Como consequência, achados experimentais dão conta que uma inibição da atividade da presente enzima provoca convulsões (JAMME ET AL., 1995) e induz a uma liberação de glutamato pela reversão de

transportador Na^+ -dependente (LI E STYS , 2001). Neste contexto, nossos dados revelam que a administração de PTZ diminui ligação $[\text{}^3\text{H}]$ glutamato e que o pré-tratamento TTHL impediu este efeito. Este resultado é particularmente importante considerando que a atividade dos transportadores de glutamato pode ser prejudicada por vários mecanismos indiretos, incluindo a formação de espécies reativas ao oxigênio bem como a inibição da atividade da enzima Na^+, K^+ -ATPase (RAMBO ET AL, 2009 ; SOUZA ET AL, 2009). Embora o mecanismo exato pelo qual o PTZ reduz captação de glutamato ainda não esta totalmente esclarecido, é possível inferir que uma redução na atividade Na^+, K^+ -ATPase diminui a captação de glutamato (TROTTI ET AL. , 1997). De fato, nossos resultados mostraram que PTZ (10 mM) inibiu a atividade da Na^+, K^+ -ATPase sem isoforma especificidade quando adicionado diretamente ao meio de reação contendo os homogeneizados de córtex .

Estes dados estão de acordo com estudos que demonstraram que as concentrações em milimolar de PTZ afeta uma variedade de íons, canais e receptores (WALDEN ET AL , 1984) e inibem o Na^+, K^+ -ATPase com K_i com valores aproximadamente de 10 e 20 mM (DUBBERKE ET AL. , 1998). Além disso, foi mostrado que a incubação prévia com TTHL (10 mM) protege contra inibição da $\alpha 2/ \alpha 3$ da Na^+, K^+ -ATPase induzida por PTZ. A proteção seletiva exercida pelo TTHL *in vitro* ressalta o importante papel das isoformas $\alpha 1$ e $\alpha 2/ \alpha 3$ na excitabilidade neuronal. Cabe salientar que a subunidade catalítica $\alpha 1$ da enzima Na^+, K^+ -ATPase é relativamente resistente a ouabaína e especies reativas ao oxigênio. Por outro lado, as subunidades $\alpha 2/ \alpha 3$ da mesma são sensíveis a ouabaína e vulneráveis ao ataque de radicais livres (KARPOVA ET AL.,2010). Desta forma, nossos achados experimentais sugerem que a manutenção da atividade das subunidades $\alpha 2/ \alpha 3$ da enzima Na^+, K^+ -ATPase induzida por TTHL protege contra a excitabilidade neuronal e danos oxidativos induzido por PTZ. Corroborando com esta hipótese foi demonstrado que o pré-tratamento

com TTHL protege contra a inibição da atividade total bem como das subunidades $\alpha 2/ \alpha 3$ da enzima Na^+, K^+ -ATPase após a administração de doses convulsivas de ouabaína.

Sabe-se que o antagonismo do receptor de GABA_A é considerado o principal mecanismo de ações biológicas induzidas pelo PTZ (ZANDIEH ET AL. , 2010). Desta forma decidiu-se investigar se a prevenção exercida pelo TTHL neste modelo de convulsão poderia resultar, em parte, a partir de uma interação direta com o receptor de GABA_A . Para isso, foi utilizado o ensaio de ligação [^3H] flunitrazepam *in vitro*. Cabe salientar que a ligação de [^3H] flunitrazepam ao sitio do benzodiazepínico é sensível ao agonista do receptor de GABA_A (LAUREN ET AL., 2007). Neste contexto, nossos resultados revelaram que a incubação com TTHL não altera a ligação de [^3H] flunitrazepam ao receptor GABA_A em membranas do córtex cerebral, sugerindo que o efeito anticonvulsivante exercido pelo TTHL não está intimamente relacionada com o sistema GABAérgico.

No presente estudo foi demonstrado que administração de PTZ induziu a um aumento na lipoperoxidação e na carbonilação proteica sugerindo o envolvimento de radicais livres nas convulsões induzidas por PTZ. Cabe salientar que o tratamento prévio com TTHL protegeu contra o dano oxidativo induzido por este agente convulsivante. No entanto, nossos dados revelaram que TTHL não apresentou qualquer ação direta contra ABTS (ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolona)-6 sulfônico), DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e ânion superóxido sugerindo que a efetiva proteção exercida pelo TTHL não se deva por sua ação direta sobre radical orgânico (DPPH , ABTS) bem como ânion superóxido.

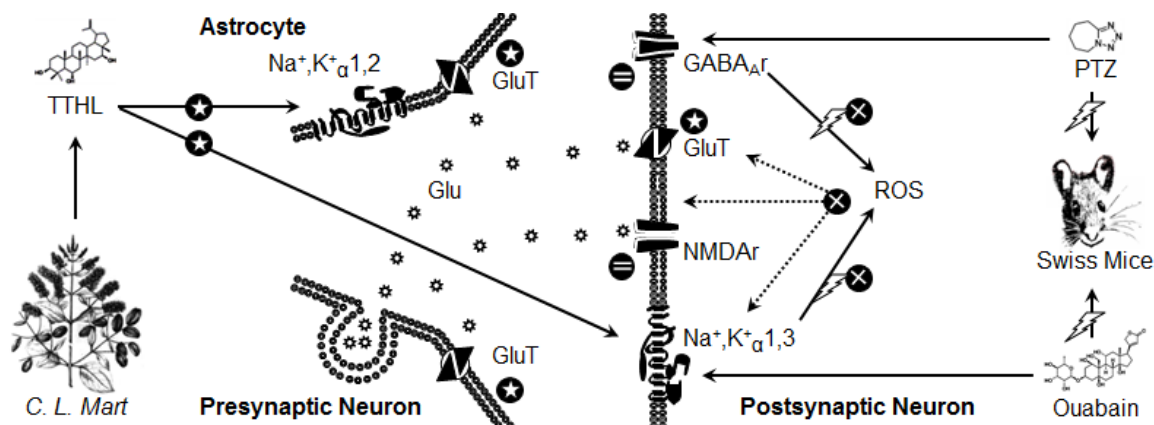
Os resultados apresentados no presente estudo fornecem evidências que a administração sistêmica de TTHL, um triterpeno pentacíclico isolado de *C. Leprosum Mart.* , protege contra crises epilépticas e alterações neuroquímicas induzidas pelo agente convulsivante PTZ. Além disso, os resultados apresentados neste estudo sugerem que a ação anti-

convulsivante exercida pelo TTHL não é devido a sua ação antioxidante direta ou interação com o receptor de GABA_A. Entretanto a manutenção da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase exercido por este composto pode representar uma nova abordagem terapêutica para a prevenção de convulsões em pacientes com epilepsia.

4. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

Os resultados apresentados fornecem evidências convincentes que a administração sistêmica de TTHL, um triterpeno pentacíclico isolado de *C. leprosum*, protege contra convulsão e alterações neuroquímicas induzidas pelo agente convulsivante PTZ. Além disso, os resultados apresentados neste relatório revelou que a ação provocada por TTHL não é devido a sua ação antioxidante direta ou a interação com o receptor de GABA_A, mas o mecanismo envolve a manutenção da atividade da Na⁺, K⁺-ATPase. Portanto, o TTHL pode ser uma nova abordagem terapêutica para a prevenção de convulsões e alguns os seus efeitos deletérios.



5. REFERENCIAIS BIBLIOGRÁFICOS

AGRA, M.F., et al. **Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil.** Journal of Ethnopharmacology. v. 111, p. 383-95. 2007.

ALMEIDA, F.R.C., et al. **Estudo dos efeitos ansiolítico e relaxante muscular de *Combretum leprosum* MART. & EICHER.** In: XXXV Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Águas de Lindóia, S.P. v. 1, p. 191. 2003

APERIA, A.; IBARRA, F.; SVENSSON, L.B.; KLEE, C.; GREENGARD, P. **Calcineurin mediates alpha-adrenergic stimulation of Na⁺,K(+)-ATPase activity in the renal tubule cells.** Proceedings of National Academy Science United States of America, v. 89, p; 7394-7397, 1992.

BERTORELLO, A.M.; APERIA, A.; WALAAS, S.I.; NAIRN, A.C.; GREENGARD, P. **Phosphorylation of the catalytic subunit of Na⁺,K⁺-ATPase inhibits the activity of the enzyme.** Proceedings of National Academy Science United States of America, V. 88, p. 11359-11362, 1991.

BLANCO, G.; MERCER, R.W. **Regulation of the alpha 2 beta 1 and alpha 3 beta 1 isozymes of the Na⁺,K⁺-ATPase by Ca²⁺, PKA, and PKC.** Annals of the new York Academy of Sciences, v. 834, p. 572-575, 1997

BRADFORD M. M. (1976) **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Analytical biochemistry 72, 248-254.

BREVARD, M.E.; KULKARNI, P.; KING, J.A.; FERRIS, C.F. **Imaging the neural substrates involved in the genesis of pentylene-tetrazol-induced seizures.** Epilepsia, v.47, p.745-754, 2006.

CALIXTO, J.B. **Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents).** Brazilian Journal of Medical and Biological Research. v. 33, p. 179-189. 2000.

CALIXTO, J.B. **Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view.** Journal of Ethnopharmacology. v. 100, p. 131-4. 2005.

CALIXTO, J.B., et al. **A review of the plants of the genus phyllanthus: Their Chemistry, Pharmacology and therapeutic potencial.** Medical Research Review. v. 8, p. 225-228. 1998.

CARPIO, A.; HAUSER, W. A. **Epilepsy in the developing world.** Curr Neurol Neurosci Rep, v. 9, n. 4, p. 319-326, 2009.

CHAVES, E.M.F.; BARROS, R.F.M.; ARAÚJO, F.S. **Flora Apícola do Carrasco no Município de Cocal, Piauí, Brasil.** Revista Brasileira de Biociências. v. 5, p. 555-557. 2007.

CHENG, X.J.; FISONE, G.; AIZMAN, R.; LEVENSON, R.; GREENGARD, P.; APERIA, A. **PKA-mediated phosphorylation and inhibition of Na(+)-K(+)-ATPase in response to beta-adrenergic hormone.** The American Journal of Physiology, v. 273, p. 893-903, 1997b.

CLAPCOTE, S. J. et al. **Mutation I810N in the alpha3 isoform of Na⁺,K⁺-ATPase causes impairments in the sodium pump and hyperexcitability in the CNS.** Proc Natl Acad Sci U S A, v. 106, n. 33, p. 14085-14090, 2009.

CLAUSEN, T. **Clinical and therapeutic significance of the Na⁺,K⁺ pump*.** Clin

CLAUSEN, T.; VAN HARDEVELD, C.; EVERTS, M. E. **Significance of cation transport in control of energy metabolism and thermogenesis.** Physiol Rev, v. 71, n. 3, p. 733-774, 1991.

DE SARRO, G. et al. **Azirino[1, 2-d][1, 4]benzodiazepine derivatives and related 1,4-benzodiazepines as anticonvulsant agents in DBA/2 mice.** Gen Pharmacol, v. 27, n. 7, p. 1155-1162, 1996.

DUBBERKE, R.; VASILETS, L. A.; SCHWARZ, W. **Inhibition of the Na⁺,K⁺ pump by the epileptogenic pentylenetetrazole.** Pflugers Arch, v. 437, n. 1, p. 79-85, 1998.

DUBBERKE, R., VASILETS, L.A., SCHWARZ, W.. **Inhibition of the Na⁺, K⁺ pump by the epileptogenic pentylenetetrazole.** Pflugers Arch. 437, 79 e 85, 1998.

ENGEL, J. Jr. Introduction to temporal lobe epilepsy. Epilepsy Research, v. 26, p. 141-150, 1996.

ERAKOVIC, V. et al. **Altered activities of rat brain metabolic enzymes caused by pentylenetetrazol kindling and pentylenetetrazol--induced seizures.** Epilepsy Res, v. 43, n. 2, p. 165-173, 2001.

FACUNDO, V.A., et al. **Arjunolic Acid in the Ethanolic Extract of *Combretum leprosum* Root and its Use as a Potential Multi-Functional Phytomedicine and Drug for Neurodegenerative Disorders: anti-inflammatory and anticholinesterasic activities.** Journal Brazilian Chemical Society. v. 16, p. 1309-1312. 2005.

FACUNDO, V.A., et al. **Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*.** Phytochemistry. v. 32, p. 411-415. 1993.

FARNSWORTH, N. R. **Biological and phytochemical screening of plants.** Journal of Pharmaceutical Science. v. 55, p. 225-276. 1966.

FERNANDES, F.F.A., et al. **Evaluation of antiofidic activity of *Combretum leprosum* Mart Fruit Extract.** In: XXXIX Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental, Ribeirão Preto, S.P. p. 09.089, 2007.

FIGHERA, M. R. et al. **GM1 ganglioside prevents seizures, Na⁺,K⁺-ATPase activity inhibition and oxidative stress induced by glutaric acid and pentylene-tetrazole.** Neurobiol Dis, v. 22, n. 3, p. 611-623, 2006.

FISKE, C.H.; SUBBAROW, Y.J.. **The nature of the "inorganic phosphate" in voluntary muscle.** Science, v. 65, p. 401-403, 1927.

FISONE, G.; CHENG, S.G.; NAIRIN, A.C.; CZERNIK, A.J., HEMMINGS, H.C.; JR.; HOOG, J.O.; BERTORELLO, A.M., KAISER, R.; BERGMAN, T.; JORNVALL, H. **Identification of the phosphorylation site for cAMP-dependent protein kinase on Na⁺,K⁺-ATPase and effects of site-directed mutagenesis.** The Journal of Biological Chemistry, v. 269, p. 9368-9373, 1994.

FREITAS, C. S. **Avaliação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva da Baccharis illinita DC (Asteraceae).** 2009. 116 f. Tese (Doutorado em Farmacologia)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FUJISAWA, H. et al. **Movement of Radioactive Calcium in Brain Slices and Influences on It of Protoveratrine Ouabain Potassium Chloride and Cocaine.** Japanese Journal of Pharmacology, v. 15, n. 4, p. 327-&, 1965.

FURIAN, A. F. et al. **Methylene blue prevents methylmalonate-induced seizures and oxidative damage in rat striatum.** Neurochem Int, v. 50, n. 1, p.164-171, 2007.

GALLANTI, A. et al. **A novel de novo nonsense mutation in ATP1A2 associated with sporadic hemiplegic migraine and epileptic seizures.** J Neurol Sci, v. 273, n. 1-2, p. 123-126, 2008.

GILANI, A.H.; RAHMAN, A.U. **Trends in ethnopharmacology.** Journal of Ethnopharmacology. v.100, p. 43-49. 2005.

GOLENIOWSKI, M.E., et al. **Medicinal plants from the "Sierra de Comechingones", Argentina.** Journal of Ethnopharmacology. v. 107, p. 324-341. 2006

GOMES, M. M. **History of epilepsy: a epistemologic point of view.** Journal of Epilepsy and Clinical Neurophysiology, v. 12, n. 3, 2006.

GRISAR, T.; GUILLAUME, D.; DELGADO-ESCUETA, A. V. **Contribution of Na⁺,K⁽⁺⁾-atpase to focal epilepsy: a brief review.** Epilepsy res, V. 12, N. 2, P. 141-149, 1992.

GUPTA YK, VEERENDRA KUMAR MH, SRIVASTAVA AK. (2003) **Effect of Centella asiatica on pentylenetetrazole-induced kindling, cognition and oxidative stress in rats.** Pharmacol Biochem Behav 74:579–585.

HORISBERGER, J. D. **Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump.** Physiology (Bethesda), v. 19, p. 377-387, 2004.

ITOKAWA, H.; MORRIS-NATSCHKE, S.L.; AKIYAMA, T.; LEE, K.H. **Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery.** Nature Medicine. v. 62, p. 263-280. 2008.

JAMME, I. et al. **Modulation of mouse cerebral Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase activity by oxygen free radicals.** Neuroreport, v. 7, p. 333-337., 1995.

JAMME, I., PETIT, E., DIVOUX, D., GERBI, A., MAIXENT, J.M., NOUVELOT, A.,. **Modulation of mouse cerebral Na⁺, K^(p)-ATPase activity by oxygen free radicals.** Neuroreport 7, 333 e 337, 1995.

JORGENSEN, P.L.; HAKANSSON, K.O.; KARLISH, S.J. **Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions.** Annual Review of Physiology, v. 65, p. 817-849, 2003.

KAPLAN, J. H.; **Biochemistry of Na,K-ATPase.** Annual Review of Biochemistry. V. 71, p. 511-535, 2002.

KARPOVA, L.V., AKKURATOV, E.E., BRODSKAIA, O.M., BOLDYREV, A.A.. **The Na⁺ pump and intracellular signaling mechanisms**. Biofizika 55, 1022 e 1029, 2010.

KUPFERBERG, H. **Animal models used in the screening of antiepileptic drugs**. Epilepsia, v. 42 Suppl 4, p. 7-12, 2001.

LAUREN, H.B., LOPEZ-PICON, F.R., KUKKO-LUKJANOV, T.K., UUSI-OUKARI, M., HOLONPAINEN, I.E.,. **Status epilepticus alters zolpidem sensitivity of [3H]flunitrazepam binding in the developing rat brain**. Neuroscience 146, 802 e 811, 2007.

LECUONA E., LUQUIN S., AVILA J., GARCIA-SEGURA L. M. AND MARTIN-VASALLO P. (1996) **Expression of the beta 1 and beta 2(AMOG) subunits of the Na,KATPase in neural tissues: cellular and developmental distribution patterns**. Brain research bulletin 40, 167-174.

LEES, G.J. **Inhibition of sodium-potassium-ATPase: a potentially ubiquitous mechanism contributing to central nervous system neuropathology**. Brain Res Brain Res Rev 16:283-300, 1991

Li, S., Stys, P.K., **Na⁺-K⁺-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na⁺-dependent transport in spinal cord white matter**. Neuroscience 107, 675 e 683, 2001.

LI, S.; STYS, P.K.. **Na(+)-K(+)-ATPase inhibition and depolarization induce glutamate release via reverse Na(+)-dependent transport in spinal cord White matter**. Neuroscience, v. 107, p. 675-683, 2001.

LINGREL, J. B. **Na, K-ATPase: isoform structure, function, and expression**. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, v. 24, p. 263-270, 1992.

LOGVINENKO, N.S.; DULUBOCA, I.; FEDOSOVA, N.; LARSSON, S.H.; NAIRIN, A.C., ESMANN, M.; GREENGARD, P.; APERIA, A. **Phosphorylation by protein kinase C of serine-23 of the alpha-1 subunit of rat Na⁺,K⁺-ATPase affects its conformational**

equilibrium. Proceedings of National Academy Science United States of America, v. 20, p. 9132-9137, 1996.

LONGHI-BALBINOT, D.T., et al. **Spinal antinociception evoked by the triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20(29)-ene in mice: Evidence for the involvement of the glutamatergic system via NMDA and metabotropic glutamate receptors.** European Journal of Pharmacology. v. 623, 30-36. 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J .A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas.** Nova Odessa, S.P. Instituto Plantarum, 2002. ISSN: 85-86714-18-6

MARINHO, I.V., et al. **Espécies vegetais da caatinga utilizadas pelas abelhas indígenas sem ferrão como fonte de recursos e local de nidificação.** In: I Congresso Brasileiro de Extensão Universitária. João Pessoa, 2002.

MEDEIROS, C.M., ET AL. **Atividade Analgésica E Antinflamatória Do Extrato Etanólico Da Raiz De Combretum Leprosum Mart.** (Combretaceae) (06.032). IN: XXXV Congresso Brasileiro De Farmacologia E Terapêutica Experimental, Águas De Lindóia, S.P. V. 1. P. 134, 2003

MOBASHERI A., AVILA J., COZAR-CASTELLANO I., BROWNLEADER M. D., TREVAN M., FRANCIS M. J., LAMB J. F. AND MARTIN-VASALLO P. **Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions.** Bioscience reports 20, 51-91, 2000.

MOREIRA, S.R. **Epilepsia: concepção histórica, aspectos conceituais, diagnóstico e tratamento.** Mental, v. 3, p. 107-122, 2004.

MOREL, P. et al. **Effects of 4- hydroxynonenal, a lipid peroxidation product, on dopamine transport and Na⁺/K⁺ ATPase in rat striatal synaptosomes.** Neurochem Int, 33:531-540, 1998.

MOSELEY, A. E. et al. Deficiency in Na,K-ATPase alpha isoform genes alters spatial learning, motor activity, and anxiety in mice. *J Neurosci*, v. 27, n. 3, p. 616-626, 2007.

NETO, J. G.; MARCHETTI, R. L. **Aspectos epidemiológicos e relevância dos transtornos mentais associados à epilepsia.** *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v. 27, p. 323-328, 2005.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; KINGSTON, D.G.I. **Natural Products as Pharmaceuticals and Sources for Lead Structures.** In: wermuth, c.g. *the practice of medicinal chemistry*. 3 ed. Elsevier. P. 159-186. 2008. ISBN: 978-0-12-374194-3

NISHI A., SNYDER G. L., NAIRN A. C. AND GREENGARD P. (1999a) **Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of DARPP-32 dephosphorylation in neostriatal neurons.** *Journal of neurochemistry* 72, 2015-2021.

NORTON, S. **The origins of pharmacology in the 16th century.** *Mol. Interv.* v. 5, p. 144-149. 2005.

OHKAWA, H. et al. **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.** *Anal Biochem* 95:351-358, 1979.

OMS, O. M. D. S. **Epilepsy: Fact sheet number 999. 2012.** Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/index.html> >.

PATSOUKIS N, ZERVOUDAKIS G, GEORGIU CD, ANGELATOU F, MATSOKIS NA, PANAGOPOULOS NT. **Thiol redox state and lipid and protein oxidation in the mouse striatum after pentylenetetrazol-induced epileptic seizure.** *Epilepsia* 46:1205–1211, 2005.

PENG L., MARTIN-VASALLO P. AND SWEADNER K. J. **Isoforms of Na,K-ATPase alpha and beta subunits in the rat cerebellum and in granule cell cultures.** *J Neurosci* 17, 3488-3502, 1997.

PHILLIPSON, J.D. **Phytochemistry and pharmacognosy**. *Phytochemistry*. v. 68, p. 2960-2972. 2007.

PIERRE, S. et al. **Ginkgo biloba extract (EGb761) protects Na,K-ATPase isoforms in nonfailing and failing myocardium**. *Neuroreport* 10:47-51, 1999.

PIETROVSKI, E.F., et al. **Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3 β , 6 β , 16 β - tridroxilup-20(29)-ene obtained from flowers of *Combretum leprosum* in mice**. *Pharmacology Biochemistry Behavior*. v. 83, p. 90-99. 2006.

PITKÄNEN, A.; SCHWARTZKROIN, P. A.; MOSHÉ, S. L. **Models of Seizure and Epilepsy**. USA: Elsevier, 2006.

RAUCA, C.; ZERBE, R.; JANTZE, H. **Formation of free hydroxyl radicals after pentylenetetrazol-induced seizure and kindling**. *Brain Res*, v. 847, n. 2, p. 347-351, 1999.

REBROV, I.G.; KARPOVA, M.N.; ANDREEV, A.A.; KUZINA, O.S.; KALININA, M.S.; ABROSIMOV, I.Y.; BELYKH, N.P. **Effect of single injection of pentylenetetrazole in a subconvulsive dose on Cl⁻ conductance of the GABA_A-receptor complex**. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, v.139, p.13-16, 2004.

RIBEIRO, M.C.; DE AVILA, D.S.; SCHNEIDER, C.Y.; HERMES, F.S.; FURIAN, A.F.; OLIVEIRA, M.S.; RUBIN, M.A.; LEHMANN, M.; KRIEGLSTEIN, J.; MELLO, C.F. **alpha-Tocopherol protects against pentylenetetrazol- and methylmalonate-induced convulsions**. *Epilepsy Research*, v.66, p.185-194, 2005.

RISHTON, G.M. **Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues**. *American Journal of Cardiology*. v. 101, p. 43-49. 2008.

ROSE, E.M., KOO, J.C., ANTFLICK, J.E., AHMED, S.M., ANGERS, S., HAMPSON, D.R., . **Glutamate transporter coupling to Na, K-ATPase**. *J. Neurosci*. 29, 8143 e 8155, 2009.

SAKLANI, A.; KUTTY, S.K. **Plant-derived compounds in clinical trials.** Drug Discovery Today. v. 13, p. 161-171. 2008.

SANDER, J. W.; SHORVON, S. D. **Epidemiology of the epilepsies.** J Neurol Neurosurg Psychiatry, v. 61, n. 5, p. 433-443, 1996.

SENANAYAKE, N.; ROMAN, G. C. **Epidemiology of epilepsy in developing countries.** Bull World Health Organ, v. 71, n. 2, p. 247-258, 1993.

SHNEKER, B.F.; FOUNTAIN, N.B.. Epilepsy. **Disease-a-Month**, v. 49, p. 426-478, 2003.

SKOU, J.C., ESMANN, M.,. **The Na, K-ATPase.** J. Bioenerg. Biomembr. 24, 249 e 261, 1992.

SOUZA, M.A.; OLIVEIRA, M.S.; FURIAN, A.F.; RAMBO, L.M.; RIBEIRO, L.R.; LIMA, F.D.; DALLA, CORTE, L.C.; SILVA, L.F.; RETAMOSO, L.T.; DALLA, CORTE, C.L.; PUNTEL, G.O.; DE, AVILA, D.S.; SOARES, F.A.; FIGHERA, M.R.; DE,MELLO, C.F.; ROYES, L.F.. **Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress.** Epilepsia, v. 50, p. 811-823, 2009.

STAHL, W. L.; HARRIS, W. E. Na⁺,K⁺-ATPase: structure, function, and interactions with drugs. Adv Neurol, v. 44, p. 681-693, 1986.

STAHL, W.L., HARRIS, W.E.,. **Na⁺, K⁺-ATPase: structure, function, and interactions with drugs.** Adv. Neurol. 44, 681 e 693, 1986.

THERIEN, A. G.; BLOSTEIN, R. **Mechnisms of sodium pump regulation.** American Journal of Physiology Cell Physiology, V. 279, p. 541-566, 2000.

THOMAS, S. V.; NAIR, A. **Confronting the stigma of epilepsy.** Ann Indian Acad Neurol, v. 14, n. 3, p. 158-163, 2011.

TROTTI, D., RIZZINI, B.L., ROSSI, D., HAUGETO, O., RACAGNI, G., DANBOLT, N.C., VOLTERRA, A.. **Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism.** Eur. J. Neurosci. 9, 1236 e 1243, 1997.

VERPOORTE, R. **Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology.** Journal of Pharmacy Pharmacology. v. 52, p. 253-262. 2000.

WALDEN, J., LEHMENKUEHLER, A., SPECKMANN, E.J., WITTE, O.W.,. **Continuous measurement of pentylenetetrazol concentration by a liquid ion exchanger microelectrode.** J. Neurosci. Meth. 11, 187 e 192, 1984.

WHO. **World Health Organization.** General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 80 p., 2000.

WHO. **World Health Organization.** Tradicional Medicine. 2008. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/print/html>.

WHO. **World Health Organization.** WHO monographs on selected medicinal plants. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 295 p. 1v. 101, 1999.

WHO. **World Health Organization.** WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 74 p., 2002.

YACUBIAN, E.M.T. **Epilepsia, da antiguidade ao Segundo milênio: saindo das sombras.** São Paulo, Brasil: Lemos Editorial, 2000.

YAN, L.J.; TRABER, M.G.; PACKER, L. **Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human low-density lipoproteins.** Anal Biochem 228:349-351, 1995.

ZANDIEH, A., MALEKI, F., HAJIMIRZABEIGI, A., ZANDIEH, B., KHALILZADEH, O., DEHPOUR, A.R.,. **Anticonvulsant effect of celecoxib on pentylenetetrazole-induced**

convulsion: modulation by NO pathway. Acta Neurobiol. Exp. (Wars) 70, 390 e 397, 2010.

ZHANG, D., HOU, Q., WANG, M., LIN, A., JARZYLO, L., NAVIS, A., RAISSI, A., LIU, F., MAN, H.Y.,. **Na, K-ATPase activity regulates AMPA receptor turnover through proteasome- ediated proteolysis.** J. Neurosci. 29, 4498 e 4511, 2009.