

## Estudos comportamentais e das alterações histopatológicas em camundongos pré-tratados com *Bellis perennis* no modelo de convulsão induzido por pilocarpina

[Behavioral studies and histopathological changes in mice pretreated with *Bellis perennis* in pilocarpine-induced seizures.]

Thiago Henrique COSTA MARQUES<sup>1</sup>, Katricia M.F. CARDOSO<sup>2</sup>, Antonia Amanda C. DE ALMEIDA<sup>2</sup>, Adriana DA ROCHA TOMÉ<sup>3</sup>, Rivelilson Mendes DE FREITAS<sup>4,\*</sup>

<sup>1</sup>Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia de Produtos Naturais pela Universidade Federal do Piauí.

<sup>2</sup>Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí.

<sup>3</sup>Universidade Estadual do Ceará, Campus do Itaperi, Avenida Parajana 1700, Fortaleza, Ceará, Brazil.

<sup>4</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e Farmacologia de Produtos Naturais da Universidade Federal do Piauí.

Contactos / Contacts: Rivelilson Mendes DE FREITAS E-mail address: [rivelilson@pq.cnpq.br](mailto:rivelilson@pq.cnpq.br)

### Abstract

The aim of this study was to investigate the potential neuroprotective and anticonvulsant effects of ethanolic extract from flowers (EEF) of *B. perennis* in adult Swiss mice (2 months old) after seizures induced by pilocarpine. The animals were divided into 8 groups. The first group was treated with vehicle (0.05% Tween 80 dissolved in 0.9% saline) and the second with pilocarpine (400 mg/kg, P400 group). The third, fourth and fifth group were pretreated with EEF (50, 100 or 150 mg/kg) and 30 min later received P400 (EEF 50, EEF 100 or EEF 150 plus P400 groups), respectively. In turn, the remaining groups were treated with EEF alone (50, 100 or 150 mg/kg EEF 50, EEF 100 or EEF 150 groups), respectively. After treatment, the groups were observed for 24 h and then euthanized and their brains removed for histopathological analysis. All P400 group animals showed seizures that progressed to status epilepticus. Pre-treatment with EEF produced a significant reduction in those indices. P400 and EEF 50 plus P400 groups showed 87.5% and 37.5% of animals with brain damage in the hippocampus, respectively. In P400 group, the damage rate in striatum was 75%. In turn, this region has seen a reduction of 46.99% neuronal damage of those of EEF 50 plus P400 group. According to our results we suggest that the EEF may modulate epileptogenesis and promote anticonvulsant and neuroprotective mechanisms in model of seizures induced by pilocarpine.

**Keywords:** *Bellis perennis*; Behavioural; Histopathological analysis; Seizures; Pilocarpine.

### Resumo

O objetivo desse estudo foi investigar o potencial efeito neuroprotetor e anticonvulsivante do extrato etanólico das flores de *B. perennis* (EEF) em camundongos *Swiss* adultos (2 meses) após convulsão induzida por pilocarpina. Os animais foram divididos em 8 grupos. O primeiro grupo foi tratado com veículo (Tween 80 0,05% dissolvido em salina 0,9%) e o segundo com pilocarpina (400 mg/kg, grupo P400). Já o terceiro, quarto e quinto grupo foram tratados com EEF (50, 100 ou 150 mg/kg), e 30 min depois receberam P400 (grupos EEF 50, EEF 100 ou EEF 150 plus P400), respectivamente. Por sua vez, os demais grupos foram tratados somente com EEF (50, 100 ou 150 mg/kg; grupos EEF 50, EEF 100 ou EEF 150), respectivamente. Após os tratamentos, os grupos foram observados durante 24 h e em seguida eutanasiados e seus cérebros removidos para as análises histopatológicas. Todos os animais do grupo P400 apresentaram convulsões que progrediram para o estado de mal epilético. O pré-tratamento com EEF produziu uma redução significativa nesses índices. Os grupos P400 e EEF 50 plus P400 apresentaram 87,5% e 37,5% de animais com lesão cerebral no hipocampo, respectivamente. No corpo estriado dos animais do grupo P400 houve um comprometimento de 75%. Por sua vez, nessa região foi vista uma redução de 46,99% nesse comprometimento nos animais do grupo EEF 50 plus P400. De acordo com nossos resultados podemos sugerir que o EEF pode modular a epileptogênese e promover ação neuroprotetora e anticonvulsivante no modelo das convulsões induzidas por pilocarpina.

**Palabras Clave:** *Bellis perennis*; Comportamento; Histopatologia; Convulsão; Pilocarpina

**Recibido | Received:** 25 de Marzo de 2011.

**Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form:** 18 de Mayo de 2011.

**Publicado en línea | Published online:** 30 de Julio de 2011

**Declaración de intereses | Declaration of interests:** Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a FAPEPI pelo apoio financeiro.

**Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as:** Thiago Henrique COSTA MARQUES, Katricia M.F. CARDOSO, Antonia Amanda C. DE ALMEIDA, Adriana DA ROCHA TOMÉ, Rivelilson Mendes DE FREITAS. 2011. Estudos comportamentais e das alterações histopatológicas em camundongos pré-tratados com *Bellis perennis* no modelo de convulsão induzido por pilocarpina. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat 10(4): 338 – 350.

## INTRODUÇÃO

A epilepsia pode causar um importante impacto na vida social, escolar e emocional entre os indivíduos afetados, sendo uma das doenças mais prevalentes durante a infância e adolescência (Koneski and Casella, 2010). Atualmente, pode ser verificado um grande avanço no diagnóstico da epilepsia, no entanto, ainda são necessários estudos para esclarecer a sua fisiopatologia (Leite et al., 2010).

A epilepsia pode ser um fator de risco para problemas emocionais, para transtornos psiquiátricos (depressão), bem como pode estar relacionada a problemas comportamentais, especialmente aos problemas de conduta e ao Transtorno de Déficit de Atenção e Hiperatividade (Turky et al., 2008; Sherman et al., 2007; Thome-Souza et al., 2004).

Os sistemas de neurotransmissão envolvidos no modelo experimental de epilepsia induzido por pilocarpina, ainda não estão completamente definidos. Esse modelo de convulsão em animais é bastante utilizado para estudar a fisiopatologia do processo convulsivo, uma vez que reproduz alterações comportamentais, eletroencefalográficas e neuroquímicas que são semelhantes à epilepsia do lobo temporal em humanos. Esse modelo também pode ser utilizado para estudar o envolvimento dos diferentes sistemas de neurotransmissores como moduladores da epileptogênese, e ainda permite investigar as alterações comportamentais, histopatológicas e neuroquímicas relacionadas com a atividade epilética (Freitas, 2011).

No modelo de epilepsia induzido por alta dose de pilocarpina, pode ser observada perda neuronal em várias áreas cerebrais, a saber: hipocampo, corpo estriado, amígdala, córtex piriforme, córtex entorrinal, tálamo e substância negra, sugerindo o envolvimento dessas diferentes áreas durante o estabelecimento do processo epilético (Borelli & Bozzi, 2002). Entre as áreas em que ocorre dano neuronal, o hipocampo e corpo estriado podem estar relacionados de forma importante com os mecanismos de instalação, propagação e/ou manutenção (epileptogênese) das convulsões límbicas (Marinho et al., 1998).

A epilepsia do lobo temporal é a forma mais comum de epilepsia. É caracterizada por convulsões recorrentes espontâneas que são, muitas vezes, bloqueadas por tratamentos com drogas antiepilépticas, e que pode estar associada à esclerose do hipocampo (Michotte et al., 2000). As convulsões podem ser caracterizadas como

manifestações clínicas resultantes de descargas neuronais anormais, produzindo uma superexcitação dos neurônios, podendo ocorrer também pela quebra do equilíbrio entre os mecanismos de neurotransmissão inibitórios e excitatórios (Zouhar et al., 1989). Os mecanismos de ativação, propagação e/ou manutenção da convulsão são amplamente estudados e pouco conhecidos. Muitos estudos foram e ainda estão sendo realizados utilizando o modelo de pilocarpina, no intuito de esclarecer os mecanismos cerebrais e o papel dos sistemas de neurotransmissão durante as convulsões.

Diante desses dados, decidimos investigar os efeitos do extrato etanólico das flores da planta medicinal *Bellis perennis* L., popularmente conhecida como margarida comum e amplamente distribuída no Brasil. Tradicionalmente na medicina popular, é usada no tratamento de reumatismo e como expectorante (Avato and Tava, 1995). Além disso, foi demonstrado que *B. perennis* possui propriedades cicatrizantes, antiinflamatórias, anti-hemorrágicas, anestésicas, antiparasitárias, antifúngicas, antimicrobianas e antioxidantes (Avato and Tava, 1995; Oberbaum et al., 2005; Morikawa et al., 2008; Kavacioğlu et al., 2010).

O estudo fitoquímico das raízes e flores de *B. perennis* demonstrou a presença de várias moléculas bioativas que explicam a sua ampla utilização farmacológica. Dentre estas biomoléculas pode ser verificada a presença de várias saponinas e flavonóides. Existem relatos sobre a presença de compostos voláteis na composição química dos óleos essenciais das folhas e flores desta espécie, no entanto estes compostos têm sido pouco investigados (Avato and Tava, 1995).

Baseado nesses argumentos, o objetivo do presente estudo foi investigar o efeito agudo do extrato etanólico das flores de *B. perennis* em parâmetros comportamentais e nas alterações histopatológicas observadas no hipocampo e corpo estriado de camundongos adultos durante a fase aguda das convulsões induzidas por pilocarpina.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Material vegetal e procedimento para obtenção do extrato etanólico das flores*

As flores da planta medicinal *B. perennis* para o referido estudo foi coletada no mês de Outubro pela manhã (07:00 am) na Fazenda Sítio São José localizada no município de Pacoti, na região do Maciço de Baturité, Ceará. As exsiccatas da espécie

(número 27.276) foram depositadas no Herbário Graziella Barroso da Universidade Federal do Piauí. A coleta das flores foi feita manualmente, sendo, então, lavada em água corrente, seguida de água destilada.

O material vegetal (310 g) foi seco em estufa a 50°C e, posteriormente, submetido à extração a frio com álcool etílico a 30%, sucessivamente. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida, obtendo-se então o extrato etanólico das flores com rendimento de 3,2%.

### **Procedimento experimental**

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, adultos (2 meses de idade, 25-30 g), provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal do Piauí. Durante todos os experimentos, os animais foram observados durante 24 h em gaiolas de acrílico de 30 x 30 x 30 cm<sup>3</sup> com no máximo 6 animais, em condições controladas (temperatura ambiente de 24-25°C e umidade de 50 a 60%), com ciclo claro/escuro alternado de 12 horas (07:00 am a 07:00 pm), recebendo ração padrão tipo Purina e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com o guia de cuidados e usos de animais de laboratório do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos da América (EUA), Washington, DC. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (nº do protocolo 077/2010).

Camundongos *Swiss* adultos machos foram divididos em oito grupos. O grupo controle foi tratado com veículo (Tween 80 0.05% dissolvido em solução salina 0,9%; i.p., n=8). O grupo P400 foi tratado com pilocarpina (400 mg/kg, i.p., n=8). Os grupos EEF 50, EEF 100 e EEF 150 foram tratados com extrato etanólico das flores (EEF) de *B. perennis* nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg (i.p., n=8), respectivamente. Os grupos EEF 50 plus P400, EEF 100 plus P400 e EEF 150 plus P400 foram pré-tratados com EEF nas mesmas doses dos grupos tratados somente com o extrato de *B. perennis*, e 30 min após o pré-tratamento receberam pilocarpina (400 mg/kg, i.p., n=8), respectivamente.

### **Estudo comportamental**

Os animais tratados e controles foram divididos em gaiolas contendo no máximo 6 animais e colocados em ambiente reservado, sendo feita à observação direta. Todos os grupos experimentais foram observados após

os tratamentos, de acordo com os protocolos experimentais, perfazendo um total de 24 horas de observação.

Os seguintes parâmetros foram observados: sinais colinérgicos periféricos (miose, piloereção, cromodacriorréia, salivação, diarreia e diurese), tremores, movimentos estereotipados (aumento da atividade de roer, coçar, mastigar e *wet-dog shakes* (ato de sacudir – semelhante a um cachorro molhado)), convulsões motoras (incluindo movimentos clônicos das extremidades superiores que ocorrem em aproximadamente 30 minutos após administração da pilocarpina), progredindo para o estado de mal epilético (caracterizado por convulsões motoras límbicas definidas como contínuas quando ocorrem por um período maior que 30 minutos) e ainda foi determinada a taxa de mortalidade em cada grupo experimental.

### **Estudos histopatológicos**

Após o período de observação de 24 h, todos os grupos foram sacrificados por decapitação. Seus cérebros foram removidos e fixados em formalina a 10% por 72 h para a realização das análises histopatológicas. Cortes sagitais, feitos em intervalos de 1 mm, foram obtidos a partir de um corte inicial próximo aos corpos mamilares. Para o estudo microscópico, secções de 10 µ foram feitas, coradas em Hematoxilina-Eosina (HE), e analisadas com auxílio de microscópio óptico. As áreas cerebrais foram observadas e classificadas de acordo com as descrições do Atlas de Paxinos and Watson (1986).

Todos os grupos foram observados durante 24 h, em seguida eutanasiados para remoção dos cérebros para realização dos estudos histopatológicos. O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada hipocampo e corpo estriado examinado (Bureau et al., 1994). Os animais foram definidos como tendo lesão cerebral quando havia pelo menos 50% de alteração no hipocampo ou corpo estriado conforme descrito anteriormente por Campêlo e colaboradores (2011).

### **Análise Estatística**

Para a análise estatística, os resultados não paramétricos (percentagens) foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA) para múltiplas comparações e o teste *t*-Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste pelo programa GraphPad Prism versão 3.00 para Windows, GraphPad Software, San

Diego California USA. Copyright © 1994-1999 por GraphPad

software. Os dados paramétricos foram avaliados utilizando o teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas a partir de  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS

Todos os animais adultos tratados com pilocarpina (400 mg/kg, i.p.;  $n = 8$ ; P400), durante 24 h de observação, apresentaram sinais colinérgicos periféricos (SCP), movimentos estereotipados (ME), *wet-dog shakes*, tremores, convulsões motoras que progrediram para o estado de mal epilético. Nenhum animal tratado com P400 sobreviveu ao período de observação (Figura 1).

O pré-tratamento com EEF 50, 30 min antes da administração de pilocarpina produziu alterações comportamentais semelhantes ao do grupo P400. Nenhuma alteração nos índices de SCP e ME observados durante os estudos comportamentais no grupo P400 foi modificada pelo pré-tratamento com as três doses estudadas. Entretanto, no grupo EEF 150 plus P400 foi observada uma redução de forma significativa de 43% nos tremores, 72% nos índices das convulsões e do estado de mal epilético, como também se verificou uma redução na taxa de mortalidade de 100% em comparação ao grupo P400. Por sua vez, no grupo EEF 100 plus P400 foi observada uma redução de 67% nos índices das convulsões e do estado de mal epilético, como também se verificou uma redução na taxa de mortalidade de 23% em comparação ao grupo P400. Além disso, Por sua vez, no grupo EEF 50 plus P400 foi observada uma redução de 72 e 14% no índice do estado de mal epilético e na taxa de mortalidade em comparação ao grupo P400, respectivamente. Por fim, durante os estudos comportamentais nenhum dos animais tratados somente com veículo ou EEF (50, 100 ou 150 mg/kg) apresentaram alterações comportamentais características das convulsões induzidas por pilocarpina (Figura 1).

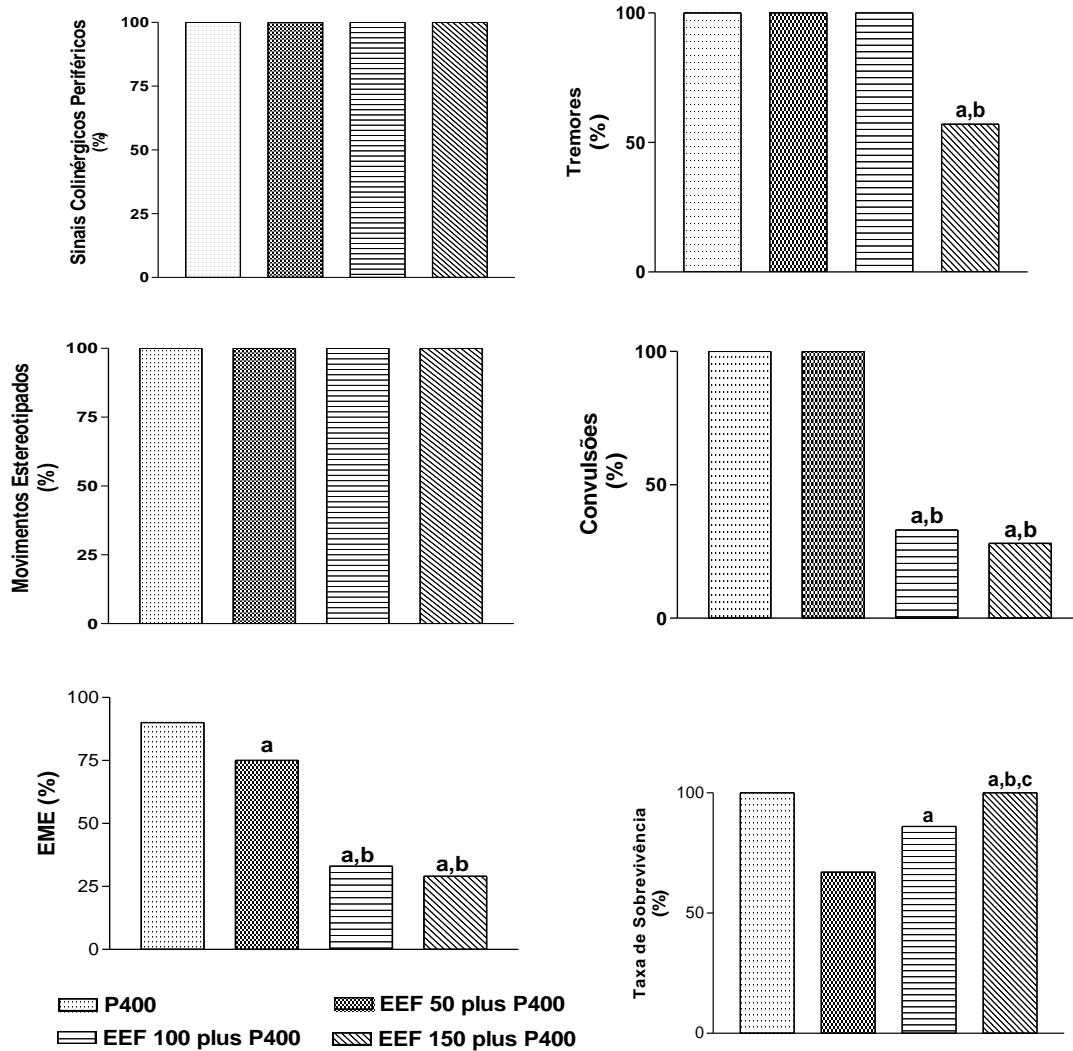
O grupo pré-tratado com EEF 150 e que após 30 min receberam P400, foi verificado uma redução de 43% nos tremores, 72% nos índices das convulsões e do estado de mal epilético, como também se verificou uma redução na taxa de mortalidade de 86% em comparação ao grupo EEF 50 plus P400. Além disso, foi verificado que no

grupo pré-tratado com EEF 150 e que após 30 min receberam P400, foi verificado uma redução de 43 e 67% nos tremores e na taxa de mortalidade em comparação ao grupo EEF 100 plus P400 (Figura 1).

As latências para a instalação da primeira convulsão e do estado de mal epilético foram apresentadas na Figura 2. Em nosso estudo houve um aumento de 68, 245 e 282% no tempo para instalação da primeira convulsão nos grupos EEF 50 plus P400, EEF 100 plus P400 e EEF 150 plus P400, respectivamente, bem como foi verificado um aumento de 160, 231 e 250% na latência do estado de mal epilético em comparação ao grupo P400, respectivamente (Figura 2). Quando comparamos o tempo para instalação da primeira convulsão entre os grupos pré-tratados com EEF e que após 30 min receberam P400, foi verificado um aumento de 127 e 111% no grupo EEF 150 plus P400 em comparação aos grupos EEF 50 plus P400 e EEF 100 plus P400, respectivamente. Já o grupo EEF 100 plus P400 demonstrou um aumento de 105% no tempo para instalação da primeira convulsão em comparação ao grupo EEF 50 plus P400.

Associado ao aumento do tempo de instalação da primeira convulsão foi verificado um aumento de 159, 232 e 249% no tempo de instalação do estado de mal epilético nos grupos EEF 50 plus P400, EEF 100 plus P400 e EEF 150 plus P400 em comparação ao grupo P400, respectivamente. Por sua vez, os grupos EEF 150 plus P400 e EEF 100 plus P400 demonstraram um aumento de 35 e 28% no tempo de instalação do estado de mal epilético em comparação ao grupo EEF 50 plus P400, respectivamente (Figura 2).

A Tabela 1 descreve as principais alterações histopatológicas observadas no corpo estriado de camundongos adultos. Por sua vez, apenas nos animais que foram pré-tratados com EEF (50 mg/kg), 30 minutos antes da administração de pilocarpina houve uma redução de 58,34 % no número de animais com lesão cerebral, e daqueles que apresentaram convulsão e EME foi detectado alteração histopatológica no corpo estriado em apenas dois animais (16,66%) do grupo EEF 50 plus P400. Também foi detectada uma redução de 42,58% no grau de comprometimento do corpo estriado no grupo EEF 50 plus P400, quando comparado ao grupo P400.

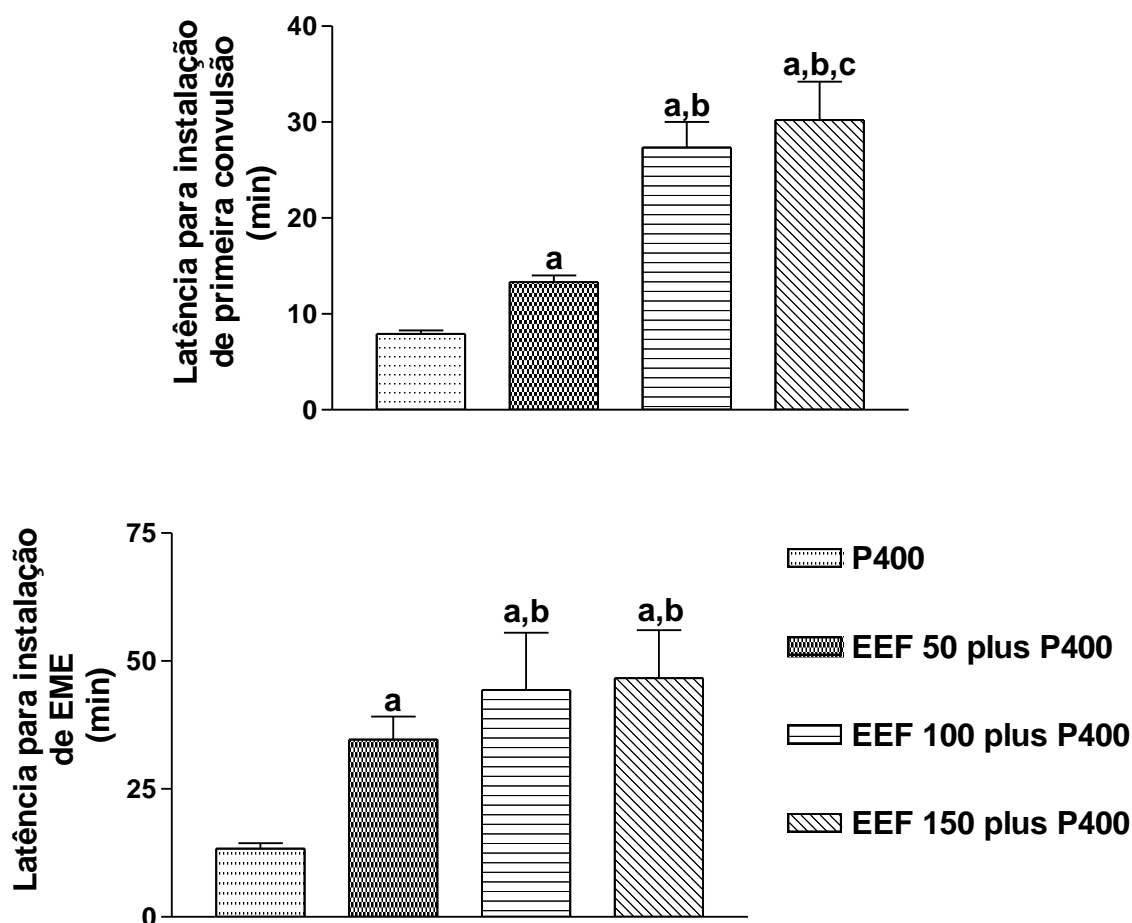


**Figura 1.** Efeito de pré-tratamento com extrato etanólico das flores de *B. perennis* em camundongos adultos após convulsões induzidas por pilocarpina. Os grupos foram tratados conforme procedimento experimental. E, após os tratamentos, os animais foram observados por 24 h para a determinação da frequência dos sinais colinérgicos periféricos (SCP), movimentos estereotipados (ME), tremores, convulsões, estado de mal epiléptico (EME) e taxa de sobrevivência. Os resultados dos estudos comportamentais foram expressos em percentagens. <sup>a</sup> $p < 0,05$  quando comparado ao grupo P400 (Teste do  $\chi^2$ ); <sup>b</sup> $p < 0,05$  quando comparado ao grupo EEf 50 plus P400 (Teste do  $\chi^2$ ); <sup>c</sup> $p < 0,05$  quando comparado ao grupo EEf 100 plus P400 (Teste do  $\chi^2$ ).

Os grupos tratados somente com veículo (grupo controle) ou extrato etanólico das flores (grupos EEf 50, EEf 100 e EEf 150) não apresentaram nenhuma alteração histopatológica no corpo estriado e hipocampo (Tabelas 1 e 2, respectivamente). Por sua vez, a Figura 3 demonstra os efeitos do pré-tratamento com EEf de *B. perennis* no corpo estriado de camundongos após convulsão induzida por pilocarpina.

Já na Tabela 2, as principais mudanças histopatológicas no hipocampo dos camundongos adultos podem ser verificadas. Por sua vez, apenas nos animais pré-tratados com EEf (50 mg/kg, 30 min

antes da administração de pilocarpina, apresentaram uma redução de 58,33% no número de animais com lesão cerebral, e daqueles que apresentaram convulsão e EME foi detectado alteração histopatológica no hipocampo em três animais (25%) apenas no grupo EEf 50 plus P400. Também foi detectada uma redução de 49,76% no grau de comprometimento do hipocampo no grupo EEf 50 plus P400, quando comparado ao grupo P400 (Tabela 2). Além disso, na Figura 4 os efeitos do pré-tratamento com EEf de *B. perennis* no hipocampo de camundongos pode ser verificado após convulsão induzida por pilocarpina.



**Figura 2.** Efeito de pré-tratamento com extrato etanólico das flores de *B. perennis* em camundongos adultos durante convulsões induzidas por pilocarpina nas latências para instalação da primeira convulsão e do estado de mal epiléptico (EME).

Os resultados das latências foram expressos em minutos como a média  $\pm$  S.E.M. do número de animais usados nos experimentos. <sup>a</sup> $p < 0,05$  quando comparado ao grupo P400 (ANOVA e o teste *t* de Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste); <sup>b</sup> $p < 0,05$  quando comparado ao grupo EEF plus P400 (ANOVA e o teste *t* de Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste); <sup>c</sup> $p < 0,05$  quando comparado ao grupo EEF 100 plus P400 (ANOVA e o teste *t* de Student-Newman-Keuls como *post hoc* teste).

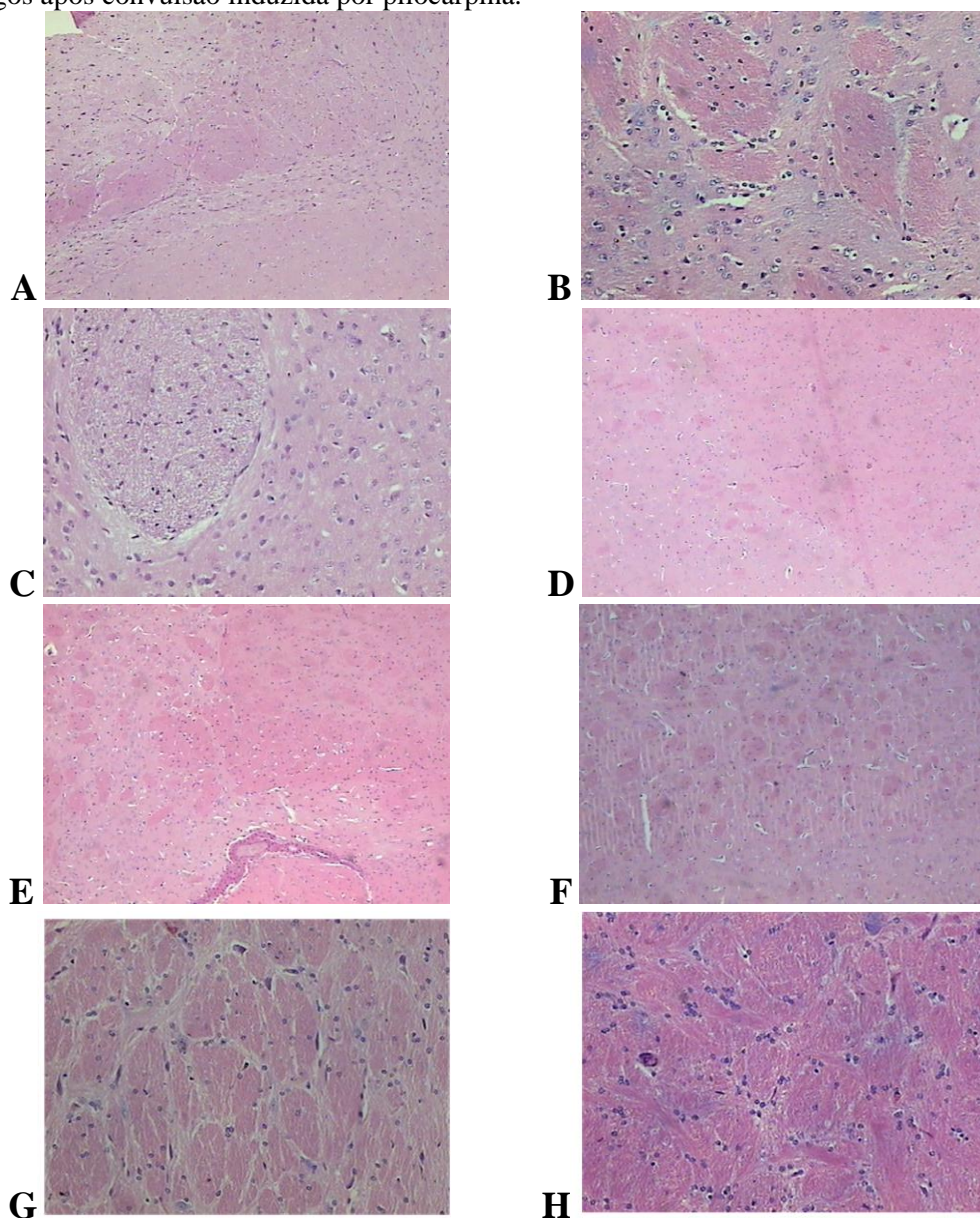
Tabela 1

Efeito de pré-tratamento com extrato etanólico das folhas de *B. perennis* nas alterações histopatológicas estriatais observadas em camundongos adultos após convulsões induzidas por pilocarpina.

Alterações histopatológicas no corpo estriado				
Grupos	Ratos com lesão (%)	Severidade da lesão (%)	Número de animais com lesão / grupo	Número total de animais / grupo
<b>P400</b>	<b>75</b>	<b>57.49 ± 0.92</b>	<b>06</b>	<b>08</b>
<b>EEF 50 PLUS P400</b>	<b>25</b>	<b>10.50 ± 0.72</b>	<b>02</b>	<b>08</b>
<b>EEF 100 PLUS P400</b>	<b>00</b>	<b>0</b>	<b>00</b>	<b>08</b>
<b>EEF 150 PLUS P400</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>08</b>
<b>EEF 50</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>08</b>
<b>EEF 100</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>08</b>
<b>EEF 150</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>08</b>

Os animais foram tratados conforme o procedimento experimental. E após os tratamentos todos os grupos foram observados durante 24 h. O grau de comprometimento estriatal (severidade da lesão) foi expresso como a média ± S.E.M. dos escores do dano cerebral do número de animais com lesão no corpo estriado. Os animais foram definidos como tendo lesão cerebral quando havia pelo menos 50% de comprometimento no corpo estriado. <sup>a</sup>p<0,05, quando comparado ao grupo P400 (Teste do Qui-quadrado); <sup>b</sup>p<0,05, quando comprado ao grupo P400 (ANOVA e teste *t*-Student-Newman-Kewls *post hoc* teste).

**Figura 3.** Efeitos do pré-tratamento com extrato etanólico das flores de *B. perennis* no corpo estriado de camundongos após convulsão induzida por pilocarpina.



**A** - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos adultos observados por 24 h após administração do veículo - Tween 80 0,05% (dissolvido em solução salina 0,9%), i.p.;  $n=8$ , controle) (Hematoxilina – Eosina (HE) - X40);

**B** - Perda neuronal, gliose, atrofia e degeneração no corpo estriado de camundongos adultos que apresentaram convulsão, estado epiléptico e que foram sacrificados 24 h após a administração de P400 (400 mg/kg, i.p.,  $n=8$ ) (HE X40);

**C** - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos adultos pré-tratados com extrato etanólico das flores (50 mg/kg, i.p.) e que após 30 min receberam pilocarpina (400 mg/kg, i.p.,  $n=8$ , EEf 50 plus P400) (HE X40).

**D** - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos adultos pré-tratados com extrato etanólico das flores (100 mg/kg, i.p.) e que após 30 min receberam pilocarpina (400 mg/kg, i.p.,  $n=8$ , EEf 100 plus P400) (HE X40).

**E** - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos adultos pré-tratados com extrato etanólico das flores (150 mg/kg, i.p.) e que após 30 min receberam pilocarpina (400 mg/kg, i.p.,  $n=8$ , EEf 150 plus P400) (HE X40).

**F** - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos adultos pré-tratados com extrato etanólico das flores (50 mg/kg, i.p.,  $n=8$ , EEf 50) (HE X40).

**G** - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos adultos pré-tratados com extrato etanólico das flores (100 mg/kg, i.p.,  $n=8$ , EEf 100) (HE X40).



**H** - Ausência de alterações histopatológicas no corpo estriado de camundongos adultos pré-tratados com extrato etanólico das flores (150 mg/kg, i.p.,  $n=8$ , EEF 150) (HE X40).

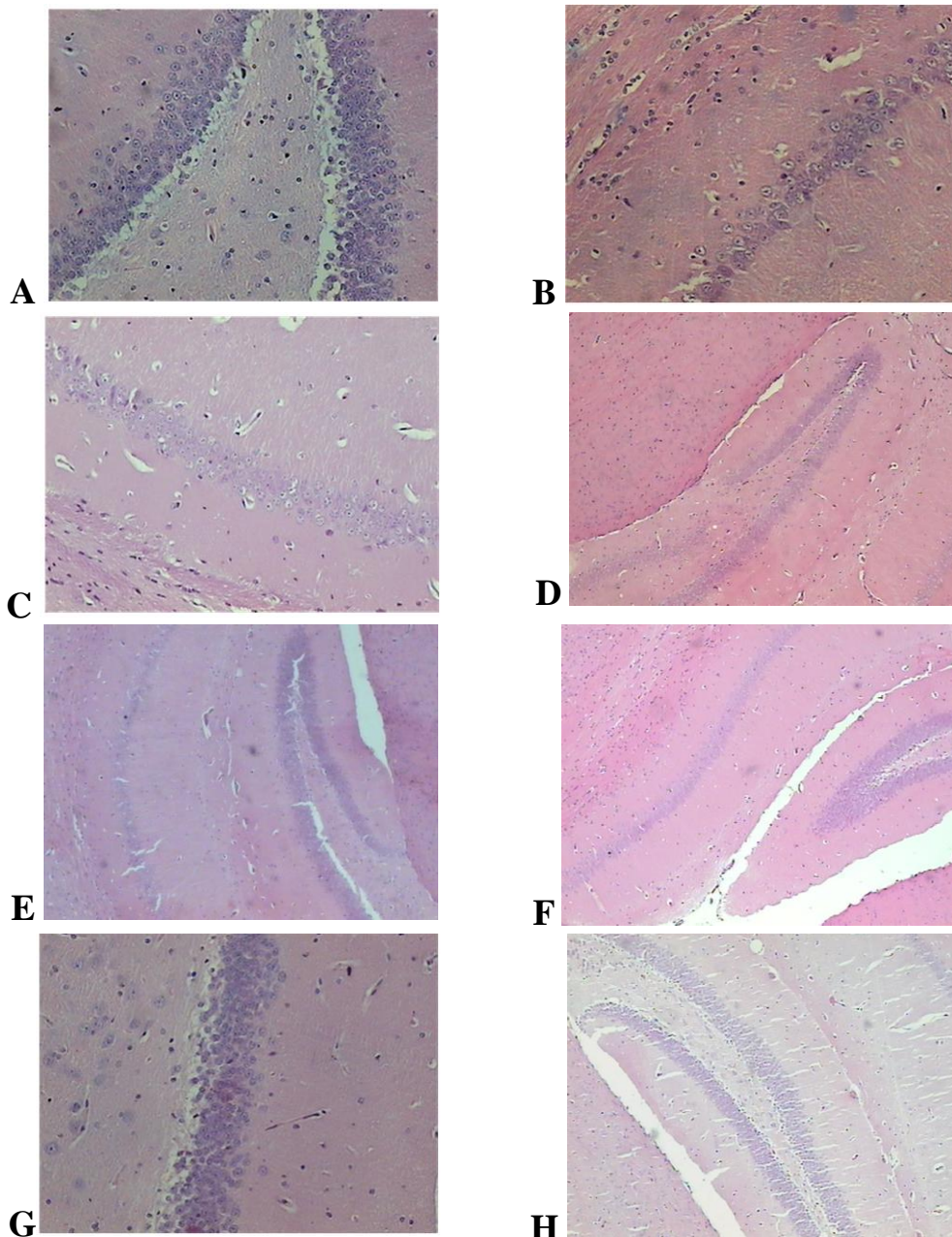
**Tabela 2**

Efeito de pré-tratamento com extrato etanólico das folhas de *B. perennis* nas alterações histopatológicas hipocámpais observadas em camundongos adultos após convulsões induzidas por pilocarpina.

Alterações histopatológicas no hipocampo				
Grupos	Ratos com lesão (%)	Severidade da lesão (%)	Número de animais com lesão / grupo	Número total de animais / grupo
<b>P400</b>	<b>87.50</b>	<b>61.92 ± 0.73</b>	<b>07</b>	<b>08</b>
<b>EEF 50 PLUS P400</b>	<b>37.5<sup>a</sup></b>	<b>16.75 ± 0.72<sup>b</sup></b>	<b>03</b>	<b>08</b>
<b>EEF 100 PLUS P400</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>08</b>
<b>EEF 150 PLUS P400</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>03</b>	<b>08</b>
<b>EEF 50</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>08</b>
<b>EEF 100</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>08</b>
<b>EEF 150</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>00</b>	<b>08</b>

Os animais foram tratados conforme o procedimento experimental. E após os tratamentos todos os grupos foram observados durante 24 h. O grau de comprometimento hipocámpal (severidade da lesão) foi expresso como a média ± S.E.M. dos escores do dano cerebral do número de animais com lesão hipocámpal. Os animais foram definidos como tendo lesão cerebral quando havia pelo menos 50% de comprometimento no hipocampo. <sup>a</sup> $p<0,05$ , quando comparado ao grupo P400 (Teste do Qui-quadrado); <sup>b</sup> $p<0,05$ , quando comprado ao grupo P400 (ANOVA e teste *t*-Student-Newman-Kewls *post hoc* teste).

**Figura 4.** Efeitos do pré-tratamento com extrato etanólico das flores de *B. perennis* no hipocampo de camundongos após convulsão induzida por pilocarpina.



- A** - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos adultos observados por 24 h após administração do veículo - Tween 80 0,05% (dissolvido em solução salina 0,9%), i.p.;  $n=8$ , controle) (Hematoxilina – Eosina (HE) - X40);
- B** - Perda neuronal, gliose, atrofia e degeneração no hipocampo de camundongos adultos que apresentaram convulsão, estado epiléptico e que foram sacrificados 24 h após a administração de P400 (400 mg/kg, i.p.,  $n=8$ ) (HE X40);
- C** - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos adultos pré-tratados com extrato etanólico das flores (50 mg/kg, i.p.) e que após 30 min receberam pilocarpina (400 mg/kg, i.p.,  $n=8$ , EEF 50 plus P400) (HE X40).
- D** - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos adultos pré-tratados com extrato etanólico das flores (100 mg/kg, i.p.) e que após 30 min receberam pilocarpina (400 mg/kg, i.p.,  $n=8$ , EEF 100 plus P400) (HE X40).
- E** - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos adultos pré-tratados com extrato etanólico das flores (150 mg/kg, i.p.,  $n=8$ , EEF 150 plus P400) (HE X40).
- F** - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos adultos pré-tratados com extrato etanólico das flores (100 mg/kg, i.p.,  $n=8$ , EEF 50) (HE X40).

**G** - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos adultos pré-tratados com extrato etanólico das flores (150 mg/kg, i.p.,  $n=8$ , EEf 100) (HE X40).

**H** - Ausência de alterações histopatológicas no hipocampo de camundongos adultos pré-tratados com extrato etanólico das flores (150 mg/kg, i.p.,  $n=8$ , EEf 150) (HE X40).

## DISCUSSÃO

Fazendo uso do modelo de convulsão induzido por pilocarpina foi possível avaliar o efeito farmacológico do extrato etanólico das flores de *B. perennis* em parâmetros comportamentais de camundongos adultos durante a fase aguda do processo convulsivo. Após a administração aguda de pilocarpina, todos os camundongos apresentaram as seguintes alterações comportamentais (miose, piloereção, cromodacriorréia, salivação, diarreia, diurese, tremores e movimentos estereotipados). Estas alterações comportamentais foram contínuas até a instalação das convulsões motoras límbicas, incluindo movimentos clônicos das extremidades superiores que ocorreram em 100% dos animais. No mesmo grupo, as convulsões progrediram para o desenvolvimento do estado de mal epilético em todos os animais, bem como foi observada uma taxa de mortalidade de 100% dos animais desse grupo.

Nossos resultados quanto às alterações comportamentais em roedores após convulsões induzidas por pilocarpina estão de acordo com as observações descritas anteriormente por outros estudos (Marinho et al., 1998; Santos et al., 2008; Freitas et al., 2009). No presente estudo, demonstrou-se que administração intraperitoneal de EEf nas doses de 50, 100 ou 150 mg/kg reduz o número de animais que apresentam convulsões e estado de mal epilético induzido por pilocarpina, e também reduz a taxa de mortalidade. Já que foi evidenciada durante 24 h uma redução dos parâmetros comportamentais relacionados ao processo convulsivo induzido por pilocarpina. Os resultados sugerem que o extrato etanólico pode apresentar uma importante ação anticonvulsivante no modelo de convulsão induzido por pilocarpina, provavelmente pela potencialização ou aumento da neurotransmissão inibitória. No entanto, novos estudos devem ser conduzidos para esclarecer o mecanismo de ação central em nível de neurotransmissores e da densidade de receptores durante a fase aguda dessas convulsões.

Estudos anteriores demonstram a fisiopatologia do processo convulsivo induzido por pilocarpina, por meio de estudos em nível neuroquímico em regiões cerebrais envolvidas com a epileptogênese dessas convulsões (Eraković et al., 2000; Barros et al., 2007; Xavier et al., 2007; Freitas et al., 2009). Dessa forma,

decidimos investigar os efeitos do extrato etanólico das flores de *B. perennis* nesse modelo, uma vez que a literatura demonstra várias propriedades farmacológicas para espécie em estudo (Siatka & Kašparová, 2010; Kavalcioglu et al., 2010).

Em nossos estudos histopatológicos observamos um alto número de animais com lesão cerebral e um comprometimento significativo das áreas investigadas no grupo P400. Além disso, foi possível detectar no corpo estriado e hipocampo de animais pré-tratados com as três doses de EEf, 30 minutos antes da administração de pilocarpina, uma redução significativa no número de animais com lesão cerebral e no grau de comprometimento da área analisada nos animais que apresentaram convulsão e EME.

No modelo de epilepsia induzido por pilocarpina, foi verificado que todos os animais tratados com as doses de 100 e 150 mg/kg não apresentaram alterações no hipocampo e corpo estriado durante a fase aguda de convulsões. No entanto, o hipocampo e corpo estriado dos animais do grupo tratado com a menor dose durante essa fase, apresentaram um menor comprometimento das áreas investigadas.

A morte neuronal observada no hipocampo e corpo estriado dos animais após convulsão induzida por pilocarpina pode ser atribuída a excitotoxicidade produzida pelo sistema glutamatérgico (Cavalheiro et al., 1994). Entretanto, nossos estudos histopatológicos de animais pré-tratados com o extrato etanólico das flores, demonstraram um bloqueio total do dano neuronal no corpo estriado e hipocampo nas doses de 100 e 150 mg/kg e uma diminuição de 67 e 57,14% com a menor dose nessas duas áreas cerebrais investigadas, respectivamente. Os dados da literatura sugerem que o estresse oxidativo pode estar envolvido na instalação das convulsões induzidas por pilocarpina, provavelmente pelo aumento da produção de radicais livres e há uma diminuição da atividade das defesas antioxidantes enzimáticas (Shults & Haas, 2005; Freitas et al., 2005; Chatuverdi & Beal, 2008). Nossos dados demonstram um possível efeito neuroprotetor do EEf durante essas convulsões, embora novos estudos devam ser conduzidos para tentar esclarecer o mecanismo de ação desse extrato. Não podemos ainda sugerir se os efeitos são decorrentes da remoção de radicais livres produzidos durante as convulsões ou pela modulação dos sistemas de neurotransmissão, mas os dados obtidos

revelam um possível efeito neuroprotetor e anticonvulsivante do EEF em camundongos adultos no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.

### CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que as convulsões induzidas por pilocarpina apresentam alterações comportamentais e histopatológicas características da atividade epiléptica em camundongos adultos. O pré-tratamento agudo com o extrato etanólico das flores de *B. perennis* demonstrou um significativo efeito anticonvulsivante e neuroprotetor. Devido aos seus efeitos neurofarmacológicos proeminentes verificados em nossos experimentos durante a fase aguda das convulsões, novos estudos neuroquímicos com a espécie precisam ser realizados nesse modelo, para esclarecer seu mecanismo de ação e justificar o uso desta planta medicinal, como um potencial agente terapêutico para o tratamento da epilepsia.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a FAPEPI pelo apoio financeiro.

### REFERÊNCIAS

- Avato P, Tava A. 1995. Acetylenes and Terpenoids of *Bellis perennis*. **Phytochemistry** 40: 141 - 147.
- Barros DO, Xavier SM, Barbosa CO, Silva RF, Freitas RL, Maia FD, Oliveira AA, Freitas RM, Takahashi RN. 2007. Effects of the vitamin E in catalase activities in hippocampus after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. **Neurosci Lett** 416: 227 - 230.
- Borelli E, Bozzi Y. 2002. Dopamine D<sub>2</sub> receptor signaling controls neuronal cell death induced by muscarinic and glutamatergic drugs. **Mol Cell Neurosci** 19: 263 - 271.
- Bureau YRJ, Peredery O, Persinger MA. 1994. Concordance of quantitative damage within the diencephalon and telencephalon following systemic pilocarpine (380 mg/kg) or lithium (3 mEq/kg)/pilocarpine (30 mg/kg) induced seizures. **Brain Res** 648: 265 - 269.
- Campêlo LML, Feitosa CM, Tomé AR, Freitas RM. 2011. Avaliação do potencial neuroprotetor do óleo essencial de *Citrus limon* em hipocampo e corpo estriado de camundongos após convulsões induzidas pela pilocarpina. **Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat** 10: 116 - 126.
- Cavalheiro EA, Fernandes MJ, Turski L, Naffah-Mazzacoratti MG. 1994. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. **Epilepsia** 35: 1 - 11.
- Chatuverdi RK, Beal MF. 2008. Mitochondrial approaches for neuroprotection. **Ann N Y Acad Sci** 1147: 395 - 412.
- Eraković V, Zupan G, Varljen J, Laginja J, Simonić A. 2000. Lithium plus pilocarpine induced status epilepticus – biochemical changes. **Neurosci Res** 36: 157 - 166.
- Freitas RM, Souza FCF, Vasconcelos SMM, Viana GSB, Fonteles MMF. 2005. Oxidative stress in the hippocampus after status epilepticus in rats. **FEBS J** 272: 1307 - 1312.
- Freitas RM. 2009. The evaluation of effects of lipoic acid on the lipid peroxidation, nitrite formation and antioxidant enzymes in the hippocampus of rats after pilocarpine-induced seizures. **Neurosci Lett** 455: 140-144.
- Freitas RM. 2011. Neurotransmitter systems involved in epilepsy model: A literature review. **Rev Neurocienc – in press**.
- Kavalcioğlu N, Açıık L, Demirci F, Demirci B, Demir H, Baser KH. 2010. Biological activities of *Bellis perennis* volatiles and extracts. **Nat Prod Commun** 5: 147 - 150.
- Koneski JAS, Casella EB. 2010. Attention deficit and hyperactivity disorder in people with epilepsy. Diagnosis and implications to the treatment. **Arq Neuropsiquiatr** 68: 107 - 114.
- Leite RAA, Otaduy MCG, Silva GEG, Ferreira MLB, Aragão MFV. 2010. Diagnostic methods for extra-temporal neocortical focal epilepsies: present and future. **Arq Neuropsiquiatr** 68: 119 - 126
- Marinho MMF, Sousa FCF, Bruin VMS, Vale MR, Viana GSB. 1998. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. **Neurochem Int** 33: 299 - 306.
- Michotte Y, Khan GM, Smolders I, Ebinger G. 2000. Anticonvulsant effect and neurotransmitter modulation of focal and systemic 2-chloroadenosine against the development of pilocarpine-induced seizures. **Neuropharmacol** 39: 2418 - 2432.
- Morikawa T, Li X, Nishida E, Nakamura S, Ninomiya K, Matsuda H, Oda Y, Muraoka O, Yoshikawa M. 2008. Perenniosides I-VII,

- Acylated Triterpene Saponins with Antihyperlipidemic Activities from the Flowers of *Bellis perennis*. **J Nat Prod** 71: 828 - 835.
- Oberbaum M, Galoyan N, Lerner-Geva L, Singer R, Grisaru S, Shashar D, Samueloff A. 2005. The effect of the homeopathic remedies *Arnica montana* and *Bellis perennis* on mild postpartum bleeding - A randomized, double-blind, placebo-controlled study - preliminary results. **Complement Ther Med** 13: 87 - 90.
- Paxinos G, Watson C. 1986. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Second Edition. Academic Press, New York.
- Santos LF, Freitas RL, Xavier SM, Saldanha GB, Freitas RM. 2008. Neuroprotective actions of vitamin C related to decreased lipid peroxidation and increased catalase activity in adult rats after pilocarpine-induced seizures. **Pharmacol Biochem Behav** 89: 1 - 5.
- Sherman EM, Slick DJ, Connolly MB, Eylr KL. 2007. Neurological correlates and health-related quality of life in severe pediatric epilepsy. **Epilepsia** 48: 1083 - 1091.
- Shults CW, Haas R. 2005. Clinical trials of coenzyme Q<sub>10</sub> in neurological disorders. **Biofactors** 25: 117 - 126.
- Siatka T, Kašparová M. 2010. Seasonal variation in total phenolic and flavonoid contents and DPPH scavenging activity of *Bellis perennis* L. **Flowers**. 15: 9450 - 9461.
- Thome-Souza S, Kuczynski E, Assumpção F. 2004. Which factors may play a pivotal role on determining the type of psychiatric disorder in children and adolescents with epilepsy? **Epilepsy Behav** 5: 988 - 994.
- Turky A, Beavis JM, Thapar AK, Kerr MP. 2008. Psychopathology in children and adolescents with epilepsy: an investigation of predictive variables. **Epilepsy Behav** 12: 136 - 144.
- Xavier SM, Barbosa CO, Barros DO, Silva RF, Oliveira AA, Freitas RM. 2007. Vitamin C antioxidant in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. **Neurosci Lett** 420: 76 - 79.
- Zouhar A, Mares P, Liskova-Bernasdova K, Mudrochova M. 1989. Motor and electrocorticographic epileptic activity induced by bicuculline in developing rats. **Epilepsia** 30: 501 - 510.