



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
RAQUEL CRISTINA DE SOUSA LIMA

Efeito da administração aguda das proteínas do látex
obtido da planta *Calotropis procera* no sistema nervoso
central de camundongos

FORTALEZA – CEARÁ
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

RAQUEL CRISTINA DE SOUSA LIMA

Efeito da administração aguda das proteínas do látex
obtido da planta *Calotropis procera* no sistema nervoso
central de camundongos

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado
Acadêmico em Ciências Fisiológicas da
Universidade Estadual do Ceará, como
requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Fisiológicas

Orientadora: Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes
Vasconcelos

FORTALEZA – CEARÁ

2009

RAQUEL CRISTINA DE SOUSA LIMA

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO AGUDA DAS PROTEÍNAS DO LÁTEX OBTIDO
DA PLANTA *Calotropis procera* NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE
CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada à
Coordenação do Curso de Pós-
Graduação em Ciências Fisiológicas
da Universidade Estadual do Ceará,
como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em
Ciências Fisiológicas

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos
Universidade Estadual do Ceará – UECE
Orientadora

Profa. Dra. Ana Maria
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Profa. Dra. Danielle Silveira Macêdo
Universidade Federal do Ceará – UFC
Suplente

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, responsável maior pela minha existência, por todas as graças que Ele derramou na minha vida e por ter me conduzido até aqui, muito obrigada Senhor.

Aos meus pais, Francisco das Chagas Lima Sobrinho e Rosânia Maria de Sousa Lima, por todo o amor e carinho, todo o apoio e dedicação, todos os ensinamentos, pela compreensão e incentivo nos momentos mais difíceis da minha vida e por dividirem comigo todos os momentos maravilhosos também. Amo muito vocês.

Aos meus irmãos, pela compreensão e apoio durante essa minha caminhada, principalmente nesse momento final.

À minha orientadora professora Dra. Silvânia Maria Mendes Vasconcelos, por todos os ensinamentos, pela sua disposição, boa vontade, dedicação e paciência, sua contribuição foi fundamental para que eu pudesse concluir mais essa etapa da minha vida acadêmica.

A todos os professores do Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas que colaboraram muito para a minha formação, em especial ao Professor Krishnamurti de Moraes Carvalho.

Aos meus colegas de mestrado que dividiram muitos momentos comigo e com quem eu também pude aprender bastante. Em especial à Vanessa Ximenes de Farias, que esteve mais perto de mim e com quem pude contar em vários momentos importantes.

Aos colegas de laboratório, em especial à Edna Maria Camelo Chaves, Sarah de Souza Escudeiro, José Eduardo Ribeiro Honório Júnior, Elaine Magalhães de Brito, Rodrigo Freitas Guimarães Lobato, Natália Martins Lima e Gabriel Teixeira Montesuma Sales, que contribuíram diretamente para desenvolvimento deste trabalho.

À Federação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico – FUNCAP, pelo apoio financeiro como bolsista.

EFEITO DA ADMINSTRAÇÃO AGUDA DAS PROTEÍNAS DO LÁTEX OBTIDO DA PLANTA *Calotropis procera* NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE CAMUNDONGOS. Raquel Cristina de Sousa Lima. Orientadora Professora Dra Silvânia Maria Mendes Vascelos. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Instituto Superior de Ciências Biomédicas.

RESUMO

A planta *Calotropis procera* pertence à família *Asclepiadaceae* e é popularmente usada por suas propriedades farmacológicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da administração aguda das proteínas do látex obtido da planta *Calotropis procera* no sistema nervoso central de camundongos. Para tanto os animais foram submetidos a vários modelos comportamentais de ansiedade, depressão e convulsão. Foi avaliado também o provável mecanismo de ação envolvido nas respostas observadas. As proteínas do látex foram administradas intraperitonealmente (5, 10, 50, 100 mg/kg) em camundongos machos e foram realizados os testes de campo aberto, placa furada, labirinto em cruz elevado, teste da barra giratória, nado forçado, suspensão da cauda, tempo de sono induzido por pentobarbital de sódio, convulsão induzida por estriçnina e por pilocarpina. Para avaliar o mecanismo de ação utilizamos agonista e antagonista das vias do glutamato e do ácido γ -aminobutírico nos testes de campo aberto, placa furada e suspensão da cauda. Foi observada uma redução da atividade locomotora após o tratamento com as doses de 50 e 100 mg/kg. Além disso, houve também uma diminuição no número de *rearing*, em todas as doses, e de *grooming*, nas doses de 50 e 100 mg/kg. No teste da placa furada, foi observada uma diminuição no número de explorações na dose mais alta. No teste do labirinto em cruz elevado foi observada uma diminuição do número de entradas em ambos os braços. Porém, houve um aumento do tempo de permanência nos braços fechados e diminuição nos braços abertos na dose de 100 mg/kg. Nos testes do nado forçado e suspensão da cauda, os animais tratados com a dose mais alta apresentaram um aumento no tempo de imobilidade. No teste do tempo de sono induzido pelo pentobarbital de sódio os animais tratados na dose mais alta apresentaram uma redução do tempo de latência para o sono e os animais tratados nas doses de 50 e 100 mg/kg apresentaram um aumento no tempo de sono total. Os resultados mostram que essas proteínas apresentam ação sedativa, ansiogênica e depressora sobre o sistema nervoso central, porém como houve um comprometimento da atividade locomotora nas doses mais altas isso pode ter interferido nos resultados de todos os outros testes. O mecanismo de ação dessas proteínas envolve a modulação do sistema dopaminérgico pelo sistema glutamatérgico. Portanto, podemos concluir que as proteínas do látex da *Calotropis procera* apresentam um efeito sedativo no sistema nervoso central em altas doses e provavelmente essa ação é realizada através da via glutamatérgica.

Palavras-chaves: *Calotropis procera*, sedação e glutamato.

ABSTRACT

Calotropis procera belongs to the family *Asclepidaceae* and is popularly used because of its pharmacological properties. The aim of this work is to assess the effect of acute administration of latex protein (LP) obtained from *C. procera* in central nervous system of mice. For such purpose several behavioral models of anxiety, depression and convulsion were performed, and the possible mechanism of action of LP was assessed. Latex proteins were intraperitoneally injected (5, 10, 50, 100 mg/kg) in male mice, and open field, hole-board, elevated plus maze, rota rod, forced swim, tail suspension, pentobarbital sleeping time, strychnine and pilocarpine induced convulsion tests were performed. In order to assess the possible mechanism of action, agonist and antagonist of glutamate and γ -aminobutyric acid were used in open field, hole-board and tail suspension test. It was observed a reduction in locomotor activity with LP 50 and 100 mg/kg; a reduction in rearing at all doses; and a reduction in grooming with LP 50 and 100 mg/kg. At hole-board test, a reduction in head-dipping after LP 100 mg/kg was seen. At elevated plus maze, it was observed a reduction in the number of entrances in both arms, although an increase in time of permanence in closed arms and a reduction in time of permanence in open arms were seen. At forced swimming and tail suspension tests, animals treated with the highest dose showed an increase in time of immobility. At pentobarbital sleeping time, animals treated with LP at highest dose showed a reduction in the latency time for sleeping, and the animals treated with LP 50 and 100 mg/kg showed an increase in the total sleeping time. These results show that LP show sedative, anxiogenic and depressant activities on central nervous system, although the reduction in locomotor activity may have interfered with the results of the other tests. The mechanism of action of LP involves glutamatergic system through a modulation of dopaminergic system. Thus, we conclude that LP from *C. procera*, at high doses, has a sedative effect on central nervous system, and this action probably occurs through glutamatergic system.

Key-words: *Calotropis procera*, sedation, glutamate.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

° C	- Graus centígrados
mg/kg	- Miligramas por quilo de peso
cm	- Centímetros
<i>C. procera</i>	- <i>Calotropis procera</i>
DA	- Dopamina
EPM	- Erro padrão da média
FD	- Fração dialisada
FND	- Fração não-dialisada
GABA	- Ácido γ -aminobutírico
ip	- Intraperitonealmente
g	- Gramas
MAO	- Monoaminaoxidase
NEBA	- Número de entradas nos braços abertos
NEBF	- Número de entradas nos braços fechados
OMS	- Organização Mundial da Saúde
rpm	- Rotações por minuto
SNC	- Sistema Nervoso Central
TPBA	- Tempo de permanência nos braços abertos
TPBF	- Tempo de permanência nos braços fechados
UECE	- Universidade Estadual do Ceará
UFC	- Universidade Federal do Ceará
(v/v)	- Relação entre dois volumes

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito da administração aguda das proteínas do látex da <i>Calotropis procera</i> no teste do campo aberto.....	36
Tabela 2	Efeito da administração aguda das proteínas do látex da <i>Calotropis procera</i> no teste de labirinto em cruz elevado.....	38
Tabela 3	Efeito da administração aguda das proteínas do látex da <i>Calotropis procera</i> no teste de tempo de sono induzido por pentobarbital de sódio.....	44
Tabela 4	Efeito da administração aguda das proteínas do látex da <i>Calotropis procera</i> no teste de convulsão induzida por estriçnina...	46
Tabela 5	Efeito da administração aguda das proteínas do látex da <i>Calotropis procera</i> no teste de convulsão induzida por pilocarpina.	48
Tabela 6	Efeito da administração aguda das proteínas do látex da <i>Calotropis procera</i> e do antagonista da via do glutamato (cetamina) isolados ou em associação nos testes do campo aberto, placa furada e suspensão da cauda.....	50
Tabela 7	Efeito da administração aguda das proteínas do látex da <i>Calotropis procera</i> , do agonista (diazepam) e do antagonista (flumazenil) da via do GABA isolados ou em associação nos testes do campo aberto, placa furada e suspensão da cauda,.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Efeito da administração aguda das proteínas do látex da <i>Calotropis procera</i> no teste da placa furada.....	39
Figura 2	Efeito da administração aguda das proteínas do látex da <i>Calotropis procera</i> no teste da barra giratória.....	40
Figura 3	Efeito da administração aguda das proteínas do látex da <i>Calotropis procera</i> no teste de suspensão da cauda.....	41
Figura 4	Efeito da administração aguda das proteínas do látex da <i>Calotropis procera</i> no teste de nado forçado.....	42

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	07
LISTA DE TABELAS.....	08
LISTA DE FIGURAS.....	09
1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1 Plantas medicinais.....	12
1.2 A espécie <i>Calotropis procera</i>	17
1.3 Fisiologia do comportamento.....	20
1.3.1 Glutamato.....	21
1.3.2 Ácido γ -aminobutírico (GABA).....	22
1.3.3 Dopamina.....	24
1.4 Justificativa.....	25
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 Objetivo geral.....	26
2.2 Objetivos específicos.....	26
3. METODOLOGIA.....	27
3.1 Preparação do látex.....	27
3.2 Animais.....	27
3.3 Protocolo de tratamento.....	28
3.4 Teste de campo aberto.....	28
3.5 Teste do labirinto em cruz elevado.....	29
3.6 Teste da placa furada.....	29
3.7 Teste da barra giratória (rota rod).....	30
3.8 Teste da suspensão da cauda.....	30
3.9 Teste do nado forçado.....	31
3.10 Teste do tempo de sono induzido por pentobarbital de sódio.....	32
3.11 Teste de convulsão induzida por estriçnina.....	32
3.12 Teste de convulsão induzida por pilocarpina.....	33
3.13 Investigação do mecanismo de ação.....	33
3.14 Análise estatística.....	34

4. RESULTADOS.....	35
4.1 Campo aberto.....	35
4.2 Labirinto em cruz elevado.....	37
4.3 Placa furada.....	39
4.4 Barra giratória (rota rod).....	40
4.5 Suspensão da cauda.....	41
4.6 Nado forçado.....	42
4.7 Tempo de sono induzido por pentobarbital de sódio.....	43
4.8 Convulsão induzida por estriçnina.....	45
4.9 Convulsão induzida por pilocarpina.....	47
4.10 Mecanismo de ação.....	49
4.10.1 Sistema glutamatérgico.....	49
4.10.2 Sistema GABAérgico.....	51
5. DISCUSSÃO.....	53
6. CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1. INTRODUÇÃO

O costume de utilizar plantas com fins terapêuticos é muito antigo e, durante muito tempo, era o único recurso para combater os males que afetavam a saúde humana. Isso ainda é comum em muitos países, principalmente nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, devido ao grande número de indivíduos com baixo poder aquisitivo e ao menor custo que essas plantas representam, já que muitas pessoas as cultivam nos quintais de suas casas.

No entanto, o uso indiscriminado de plantas medicinais pode originar sérios prejuízos a saúde, já que numa mesma espécie podem existir compostos benéficos e tóxicos. Para evitar esse tipo de efeito indesejável é necessário que essas atividades farmacológicas possam ser investigadas e comprovadas cientificamente a fim de que se possa garantir a segurança e a eficácia de determinada planta ou substância presente nela.

A planta *Calotropis procera* tem sido bastante estudada e já foram constatadas várias funções como antiinflamatória, antidiarréica, anticâncer, entre outras. Porém, não há estudos na literatura investigando a sua ação no sistema nervoso central.

1.1 Plantas medicinais

O homem explora a natureza para suprir as suas necessidades desde os tempos mais remotos, retirando dela alimentos, roupas, abrigo ou medicamentos (GARCIA, 1995). A utilização de plantas no tratamento e cura de doenças pode ser feito utilizando-as tanto na sua forma íntegra, como na forma de derivados, por exemplo, na forma de extratos, xaropes, etc. (SCHENKE *et al.*, 1985; GARCIA, 1995; CALIXTO, 2000; MACIEL *et al.*, 2002; ARNOUS *et al.*, 2005).

O conhecimento sobre as plantas medicinais sempre tem acompanhado a evolução do homem. Remotas civilizações primitivas perceberam a existência, ao lado das plantas comestíveis, de outras dotadas de maior ou menor toxicidade que, ao serem experimentadas no combate às doenças, revelaram, embora empiricamente, o seu potencial curativo (ARAÚJO *et al.*, 2007).

Plantas medicinais são aquelas que quando administradas sob qualquer forma e por alguma via ao homem exercem algum tipo de ação farmacológica benéfica. Podem ser classificadas de acordo com a sua ordem de importância em: plantas empregadas diretamente na terapêutica, plantas que constituem matéria-prima para a manipulação e as plantas empregadas na indústria para a obtenção de princípios ativos ou como precursores em semi-síntese (GARCIA, 1995; FOGLIO *et al.*, 2006).

Países como China e Índia têm encontrado maneiras de legalizar e reconhecer o uso dessas plantas medicinais. Há mais de 5 séculos, a China utiliza o conhecimento popular das ervas e são utilizadas mais de 5 mil espécies como recurso terapêutico (FOGLIO *et al.*, 2006).

Muitas vezes as informações relativas às plantas medicinais são o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Apesar de não terem seus constituintes químicos identificados, as observações populares do uso e da eficácia das plantas medicinais contribuem para a divulgação das virtudes terapêuticas destas plantas, que são utilizadas com bastante frequência (MACIEL *et al.*, 2002).

Estimativa da Organização Mundial da Saúde (OMS) revela que cerca de 80% da população mundial utiliza, de alguma maneira, plantas medicinais como medicamentos e que no total cerca de 25.000 espécies de plantas são usadas na medicina tradicional. A maioria dos medicamentos obtidos a partir de plantas foram desenvolvidos com base no conhecimento folclórico (GARCIA, 1995).

Até o século XX, os recursos terapêuticos disponíveis eram exclusivamente originados das plantas medicinais e extratos vegetais. No século XX, surgiu a tendência de se isolar os princípios ativos (ARAÚJO *et al.*, 2007). Porém, apesar dos grandes avanços apresentados na medicina moderna nas últimas décadas, as plantas ainda têm uma contribuição importante no cuidado da saúde (CALIXTO, 2000).

As plantas medicinais e/ou seus derivados ainda estão sendo bastante estudados como agentes terapêuticos naturais, com o objetivo de prevenir, curar ou minimizar os sintomas das doenças, além do aspecto econômico, já que a utilização dessas plantas representa um custo menor e mais acessível à população e aos serviços públicos de saúde, quando comparado aos fármacos químicos, que, em geral, são mais caros devido às patentes tecnológicas envolvidas (TOLEDO *et al.*, 2003).

A medicina popular, principalmente baseada nas plantas, desfruta de uma posição respeitável hoje, especialmente nos países em desenvolvimento, onde a disponibilidade de serviços de saúde modernos é limitada. De acordo com a estimativa atual da OMS, em países desenvolvidos uma grande porção da população faz uso da medicina popular, especialmente de plantas medicinais. Embora exista um fácil acesso aos medicamentos modernos nesses países, o uso de plantas medicinais tem mantido sua popularidade por razões históricas e culturais. Por outro lado, nos países em desenvolvimento 65-80% da população depende exclusivamente das plantas medicinais para o cuidado básico da saúde (AGRA *et al.*, 2007).

As plantas medicinais estão distribuídas por todo o mundo, mas são mais abundantes nos países tropicais (CALIXTO, 2000). As florestas tropicais contêm mais da metade das espécies de plantas do mundo e menos de 1% têm sido pesquisadas com relação à atividade medicinal. As espécies localizadas na zona tropical têm de 3-4 vezes o número de constituintes químicos ativos do que aquelas localizadas em zonas temperadas (DI STASI, *et al.*, 2002).

Em termos mundiais, entre todos os medicamentos comercializados, cerca de 40% tiveram origem direta ou indiretamente de fontes naturais, salientando que 78% das drogas antibacterianas e 60% dos medicamentos antitumorais são derivados destes (DE LA CRUZ, 2005).

Devido à grande utilização de plantas medicinais, principalmente nos países mais pobres, a maioria das companhias farmacêuticas tem demonstrado um interesse renovado na investigação das plantas como fonte de novas estruturas para o desenvolvimento de novos agentes fitoterápicos padronizados, com sua eficácia, segurança e qualidade comprovados (CALIXTO, 2000; ARNOUS *et al.*, 2005). Isso tem contribuído para que a utilização dessas plantas seja encarada de uma maneira diferente, já que os profissionais de saúde têm o respaldo para recomendar seu uso. Entretanto, deve-se ter cuidado com relação à seleção correta da espécie vegetal, com o cultivo adequado, com a avaliação dos teores dos princípios ativos e com a manipulação e a aplicação na clínica médica (ARNOUS *et al.*, 2005).

No Brasil, é comum encontrarmos plantas medicinais sendo comercializadas em feiras-livres, mercados populares e sendo cultivadas em quintais residenciais. Isso ocorre tanto nas regiões mais pobres do país, como nas grandes cidades brasileiras (MACIEL *et al.*, 2002). Porém, com exceção da Amazônia, poucos estudos com plantas medicinais têm sido realizados em outras áreas florestais brasileiras como, Mata Atlântica, Caatinga, Pantanal e Cerrado (DI STASI *et al.*, 2002).

A Amazônia possui mais de 300 espécies de fitoterápicos que são utilizados popularmente no tratamento de doenças infecciosas e parasitárias, vetores, problemas crônico-degenerativos, emagrecimento, regulação da menstruação, procedimento abortivo e antídoto de veneno de cobra. Apesar de toda essa riqueza, menos de 1% das plantas tropicais tiveram seus usos potenciais corretamente investigados, restando uma imensidão de espécies praticamente desconhecidas em termos químicos e farmacológicos (GARCIA, 1995; ARAÚJO *et al.*, 2007).

O estudo do uso tradicional das plantas e dos seus produtos na região Nordeste do Brasil tem aumentado gradualmente durante os últimos anos e resultou em um significativo número de publicações nessa área (AGRA *et al.*, 2007). O Nordeste brasileiro é reconhecido por sua rica biodiversidade, principalmente com relação a plantas e habitats e abrange desde a Floresta Amazônica, Mata Atlântica, sistema de mangues e dunas costeiras, até florestas secas e savanas, sendo que o principal ecossistema do Nordeste do Brasil é o bioma “caatinga” (AGRA *et al.*, 2007).

O cerrado brasileiro também possui uma flora muito rica e bem caracterizada, onde muitas plantas são usadas como remédios naturais pelas pessoas que vivem nessa área. Essas plantas são usadas para doenças como esquistossomose, leishmaniose, malária, infecções fúngicas e bacterianas, entre outras (ALVES *et al.*, 2000).

O Brasil exporta um volume considerável de espécies medicinais na forma bruta ou na forma de seus subprodutos, porém os estudos envolvendo as espécies nativas ainda estão muito incipientes (RODRIGUES e CARVALHO, 2001).

Grande parte das plantas nativas brasileiras ainda não possui estudos e são usadas empiricamente, sem respaldo científico quanto à eficácia e segurança. Em um país como o Brasil, com enorme biodiversidade, é crescente o número de pesquisas, mas ainda existe uma grande quantidade de moléculas a serem descobertas oriundas do reino vegetal (FOGLIO *et al.*, 2006).

Segundo dados da OMS, 85% da população mundial utiliza plantas medicinais para tratar agravos à saúde. No Brasil, os percentuais são próximos, estima-se que 82% da população brasileira utiliza produtos a base de ervas e entre os fitoterápicos mais utilizados estão a babosa, usada no tratamento de queimaduras; o boldo e a carqueja, indicados para má digestão; a hortelã, utilizada como expectorante; o alho, para o tratamento de gripes e resfriados e redução de colesterol; e a calêndula, a andiroba e copaíba como antiinflamatórios e anti-sépticos (DE LA CRUZ, 2005).

No Ceará, existe o Projeto Farmácias Vivas, um programa de fitoterapia que tem como finalidade estabelecer a fitoterapia na rede pública de saúde. No entanto, para a maioria das plantas nativas não existem estudos científicos que justifiquem a sua utilização e seu uso é baseado principalmente na tradicionalidade. O uso tradicional é de fundamental importância, porém para que uma planta seja utilizada em nível de saúde pública é fundamental estabelecer sua segurança, eficácia e garantir a qualidade das preparações.

1.2 A espécie *Calotropis procera*

O gênero *Calotropis* R. Br. (*Asclepiadaceae*) contém cerca de seis espécies de arbustos distribuídos na África e Ásia tropical e subtropical. Duas das três espécies que estão presentes na Índia, *Calotropis gigantea* e *Calotropis procera*, são de grande importância econômica (PARI *et al.*, 1998).

O gênero *Calotropis* é encontrado por toda a Índia. As espécies *C. gigantea* e *C. procera* são bastante similares com relação às ações químicas e fisiológicas. Suas flores, folhas, raízes e látex são muito utilizados como remédio para doença de pele, para conter irritações, aliviar a dor e do ponto de vista médico-legal podem ser usadas para abortos, suicídios, homicídios, já que seu soro contém substâncias tóxicas (TOMAR *et al.*, 1970).

A espécie *C. gigantea* possui propriedades purgativas e é usada no tratamento de hanseníase, úlceras, tumores, doenças do sono, do fígado e abdômen. Seu suco é usado como anti-helmíntico e laxativo (LHINHATRAKOOL e SUTTHIVAIYAKIT, 2006). Apresenta, ainda, atividade analgésica, sendo utilizada para dores, tipo dor de dente, dor de cabeça, ansiedade, epilepsia e distúrbios mentais (ARGAL e PATHAK, 2006).

A espécie *C. procera* é conhecida vulgarmente como algodão de seda, leiteiro, queimadeira e ciúme (MELO *et al.*, 2001). Ela é amplamente distribuída na Ásia, África e América do Sul e é abundante no Nordeste brasileiro (RAMOS *et al.*,

2006, RAMOS *et al.*, 2007, SOARES *et al.*, 2005), desenvolvendo-se em solos pobres e locais com baixo nível de pluviosidade (MELO *et al.*, 2001).

Essa espécie é conhecida por produzir grande quantidade de látex (RAMOS *et al.*, 2007) que é fonte de vários compostos biologicamente ativos, incluindo glicosídeos, taninos, proteínas, entre outros. A caracterização dos compostos do látex da *Calotropis procera* apóia a hipótese que sua secreção natural está envolvida nos mecanismos de defesa da planta. Independente disso, os componentes do látex parecem induzir efeitos biológicos interessantes, uma vez que, a planta é conhecida por suas potencialidades farmacológicas (SOARES *et al.*, 2005).

O látex pode ser fracionado, por um protocolo simples baseado em centrifugação e diálise, em látex não dialisável, que corresponde à maioria das proteínas; látex dialisável, que corresponde às moléculas de pequeno tamanho; e a borracha do látex, que é altamente insolúvel em água (RAMOS *et al.*, 2006).

As contribuições científicas que descrevem as atividades pró- e antiinflamatória do látex da *C. procera* são originárias principalmente de grupos de pesquisa da Índia, onde ela é largamente explorada na medicina popular (SHIVKAR e KUMAR, 2003; ARYA e KUMAR, 2005; ALENCAR *et al.*, 2006). No sistema medicinal tradicional da Índia ela tem sido usada para o tratamento de várias doenças como hanseníase, úlceras, hemorróidas, tumores, doenças de pele, reumatismo e dores (SHIVKAR e KUMAR, 2003; ARYA e KUMAR, 2005; CHOEDON *et al.*, 2006). Trabalhos anteriores usando diferentes partes da planta têm defendido seu uso para uma variedade de doenças, além da aplicação como antídoto para veneno de cobra (Nandkarn *apud* SOARES *et al.*, 2005) e ação bactericida (RAMOS *et al.*, 2007).

Na medicina tradicional da Arábia Saudita as partes aéreas da *C. procera* eram comumente usadas para o tratamento de várias doenças como febre, dor, espasmo muscular e constipação (MOSSA *et al.*, 1991).

O látex da *C. procera* possui propriedades farmacológicas tais como atividades pró e antiinflamatória, antinociceptiva (SOARES *et al.*, 2005), antipirética e anti-diarréica, entre outras (KUMAR *et al.*, 2001; RAMOS *et al.*, 2007). Além destas, o exudato da *C. procera* é popularmente explorado por reduzir a infecção epidérmica fúngica (RAMOS *et al.*, 2006) e dor de dente. Foram encontradas ainda atividade analgésica, purgativa e relaxante muscular (MOSSA *et al.*, 1991).

Soares *et al.* (2005) demonstraram uma atividade antinociceptiva para a proteína do látex da *C. procera* em roedores, cuja propriedade analgésica parece ser independente do sistema opióide, o que justifica o seu uso medicinal popular como analgésico.

O látex da *C. procera* pode apresentar atividades contrárias. As atividades antiinflamatória e antinociceptiva estão presentes na fração não dialisável do látex, enquanto a atividade pró-inflamatória está presente na fração dialisável (ALENCAR *et al.*, 2006). O látex, administrado localmente, induz uma intensa resposta inflamatória caracterizada por aumento de permeabilidade vascular, edema e intensa infiltração celular (PADHY e KUMAR, 2005). A administração local induz uma resposta inflamatória mediada por histamina e prostaglandinas (ARYA e KUMAR, 2005). O efeito pró-inflamatório do látex ocorre via liberação de histamina dos mastócitos e pela presença de histamina no próprio látex (SHIVKAR e KUMAR, 2003; KUMAR e SHIVKAR, 2004).

O látex obtido da *C. procera* também mostrou efeito tóxico sobre ovos e larvas do mosquito *Aedes aegypti* (Linn). Essa propriedade pode vir a ter um impacto na saúde pública e na saúde ambiental como uma alternativa para o controle químico convencional de populações do mosquito resistentes aos inseticidas (RAMOS *et al.*, 2006). Além do efeito larvicida contra o *Aedes aegypti* também foi demonstrado esse efeito contra os mosquitos *Anopheles stephens* e, *Culex quinquefasciatus* (SINGH *et al.*, 2005).

Em outro estudo, Ramos *et al.* (2007) demonstraram que as frações não-dialisáveis do látex e a borracha do látex possuem respostas imunológicas e

alergênicas muito semelhantes, o que pode ser atribuído à presença, na borracha do látex, de proteínas naturalmente encontradas na fração não-dialisável.

As proteínas do látex exibiram uma forte citotoxicidade para diferentes linhagens de células cancerosas (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Estas, marcadamente reduzem o influxo de células, liberação de mediadores e o estresse oxidativo, associado a artrite (KUMAR e ROY, 2007). Além disso, sua propriedade antioxidante é comparável a da vitamina C (OLALYEA e ROCHA, 2007).

1.3 Fisiologia do comportamento

O sistema nervoso central (SNC) é formado por bilhões de células entre neurônios e neuróglio. Os neurônios são os responsáveis pela transmissão da informação, enquanto a neuroglia pela sustentação, nutrição e proteção dos neurônios (WILLIS JR, 2004).

A transmissão da informação pode ocorrer através de sinapses químicas, na qual a transmissão do impulso de dá através da liberação de um neurotransmissor, pela célula pré-sináptica, que vai atuar em receptores específicos nas células pós-sinápticas (GRABOWSKI, 2002).

Dependendo do canal iônico que vai ser aberto, após a ligação do neurotransmissor, pode ser gerada uma despolarização ou uma hiperpolarização da membrana pós-sináptica. A abertura de canais de sódio ou cálcio gera uma despolarização que pode originar um potencial de ação, enquanto a abertura dos canais de cloro e potássio gera uma hiperpolarização que vai dificultar a geração de um potencial de ação (WILLIS JR, 2004).

A remoção do neurotransmissor da fenda sináptica é fundamental para o funcionamento normal das sinapses. Se o neurotransmissor ficasse por tempo indeterminado na fenda sináptica ele iria influenciar a célula pós-sináptica por tempo excessivamente longo. Para que isso não ocorra, o neurotransmissor é removido da

fenda sináptica rapidamente por três modos básicos: difusão do neurotransmissor para fora da fenda sináptica, movendo-se ao longo de seus gradientes de concentração; degradação enzimática; e captação celular, muitos neurotransmissores são ativamente transportados de volta para os neurônios que os liberam (recaptação) ou são transportados para a neuroglia adjacente (GRABOWSKI, 2002).

Os efeitos dos neurotransmissores nas sinapses químicas podem ser modificados de várias maneiras: a síntese do neurotransmissor pode ser estimulada ou inibida; a liberação dos neurotransmissores pode ser bloqueada ou aumentada; a remoção do neurotransmissor pode ser estimulada ou inibida (inibição da metabolização ou da recaptação); e o sítio receptor pode ser bloqueado ou ativado. Uma substância que aumente a transmissão sináptica ou que imite os efeitos de um neurotransmissor natural é chamada de agonista, enquanto uma substância que bloqueie a ação de um neurotransmissor é chamada de antagonista (RANG *et al.*, 2004; OLIVEIRA e SENA, 2006).

Os principais neurotransmissores no SNC são as amina biogênicas, os aminoácidos, ATP e outras purinas e os gases. Dois outros aminoácidos são importantes neurotransmissores inibitórios o ácido gama-aminobutírico (GABA) e a glicina. Até um terço de todas as sinapses encefálicas usam GABA. Os medicamentos ansiolíticos, como o diazepam, são agonistas do GABA. As aminas biogênicas prevalentes no sistema nervoso incluem a norepinefrina, a epinefrina, a dopamina e a serotonina. A norepinefrina, a epinefrina e a dopamina são catecolaminas e sua inativação ocorre por recaptação pelo botão terminal, com posterior reciclagem de volta às vesículas sinápticas ou destruição pelas enzimas catecol-O-metiltransferase (COMT) e monoaminaoxidasas (MAO) (GRABOWSKI, 2002; OLIVEIRA e SENA, 2006).

1.3.1 Glutamato

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório no SNC e tem uma distribuição ampla e uniforme (RANG *et al.*, 2004). Quase todos os neurônios excitatórios, no SNC, e talvez metade das sinapses no encéfalo comunicam-se via glutamato. Logo após sua liberação das vesículas sinápticas, ele é ativamente transportado de volta para os botões sinápticos e para a neuróglia vizinha, por transportadores específicos (GRABOWSKI, 2002). O metabolismo do glutamato é complexo, pode servir tanto como fonte de energia, quanto como reserva de amônia, sendo também material plástico importante na síntese protéica. Seu metabolismo no SNC gera a possibilidade dele agir como neurotransmissor ou servir como precursor da síntese do GABA. O L-glutamato pode ser sintetizado, em terminais centrais tanto a partir da glicose, via ciclo de Krebs e transaminação do α -cetoglutarato, quanto a partir da glutamina, um produto de síntese da neuroglia, levado aos neurônios e convertido pela glutaminase em glutamato (SILVA, 2006).

Existem quatro tipos de receptores de glutamato: ácido-N-metil-D-aspartico (NMDA), ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propionico (AMPA), cainato e metabotrópico. Os três primeiros tipos são receptores ionotrópicos, denominados de acordo com seu agonista específico. Os receptores metabotrópicos são receptores acoplados a proteína G ligados a sistemas de segundos mensageiros intracelulares e compreendem oito subtipos (RANG *et al.*, 2004).

Em geral, parece que os receptores NMDA e metabotrópicos desempenham um papel particular nas alterações adaptativas a longo prazo no cérebro. Já os receptores cainato e AMPA são principalmente responsáveis pela transmissão excitatória rápida. Certos anestésicos e agentes psicomiméticos bem conhecidos, tais como cetamina e fenciclidina são agentes bloqueadores seletivos dos canais operados pelo NMDA (RANG *et al.*, 2004).

1.3.2 Ácido γ -aminobutírico (GABA)

Os neurônios GABAérgicos se encontram localizados difusamente no SNC, tanto no cérebro como na medula espinhal, fazendo parte de circuitos locais

inibitórios. O GABA exerce suas funções fisiológicas através da interação com duas classes de receptores, designados de $GABA_A$ e $GABA_B$. Ambos os tipos de receptores coexistem em muitas áreas cerebrais, podendo haver predominância de um tipo sobre o outro dependendo da região (SILVA, 2006).

Ao interagir com os receptores $GABA_A$, o GABA promove de forma dose-dependente, a abertura de canais iônicos seletivos para o cloro. Nessas condições, o gradiente eletroquímico promove um influxo de cloro para o interior dos neurônios, hiperpolarizando a membrana e inibindo as descargas neuronais (SILVA, 2006).

O receptor $GABA_A$ é uma molécula complexa que além do sítio de ligação para o GABA possui mais duas outras regiões de ligação. Uma delas se liga a álcool e barbitúricos, caracterizando-se por uma região sedativo-hipnótica, enquanto a outra aceita benzodiazepínicos, sendo caracterizada por uma região ansiolítica. As drogas que se ligam à região sedativo-hipnótica aumentam diretamente o influxo de íons cloreto, agindo como o GABA, e quanto mais alta a dose dessas drogas, maiores serão seus efeitos inibitórios sobre os neurônios. Já as drogas que se ligam as regiões ansiolíticas aumentam a ligação do GABA a sua região receptora, portanto, a disponibilidade do GABA determina a potência de uma droga ansiolítica (LIAISON, 2002).

As várias proteínas que constituem o receptor $GABA_A$, além de possuírem sítios de acoplamento para o GABA e para as substâncias antagonistas, possuem sítios de ligação para barbitúricos, benzodiazepínicos, anestésicos esteróides e etanol (SILVA, 2006).

Barbitúricos anticonvulsivantes, hipnóticos sedativos, etanol e anestésicos aumentam a atividade do receptor do GABA, o que explica seu efeito depressivo no SNC (SILVA, 2006). Substâncias capazes de manter os canais ionotrópicos ligados aos receptores do GABA, levam a um efeito ansiolítico (OLIVEIRA e SENA, 2006). Os agonistas benzodiazepínicos, como o tradicional diazepam e midazolam, de uso mais atual, manifestam efeitos ansiolíticos, anticonvulsivantes, sedativos, amnésicos e miorelaxante. Por sua vez, antagonistas como o flumazenil, ocupam o receptor

benzodiazepínico, bloqueando as ações dos agonistas (OLIVEIRA e SENA, 2006; SILVA, 2006).

Os ansiolíticos, quando utilizados em doses elevadas e/ou por um tempo prolongado, poderão antagonizar o efeito estimulante dos antidepressivos em função da elevação da atividade GABAérgica (OLIVEIRA e SENA, 2006).

1.3.3. Dopamina

A dopamina tem sido bastante relacionada com vários distúrbios da função cerebral como doença de Parkinson, esquizofrenia e distúrbio do déficit de atenção (BRESSAN *et al.*, 2001; HOWES *et al.*, 2009).

A dopamina tem sua distribuição mais abundante no corpo estriado, sistema límbico e hipotálamo. Dessa forma ela age sobre o controle motor, o comportamento e controle endócrino (RANG *et al.*, 2004). Atualmente, já foram identificados 5 tipos de receptores dopaminérgicos ($D_1 - D_5$), que são habitualmente relacionados aos dois grupos inicialmente descritos – D_1 e D_2 . A família D_1 inclui os receptores D_1 e D_5 , enquanto a família D_2 engloba os outros receptores (SILVA, 2006).

As vias dopaminérgicas centrais participam do controle de uma série de fenômenos comportamentais e motores. Sua ação tem sido relacionada com doenças como esquizofrenia e Pankinson. Na hipótese dopaminérgica da esquizofrenia, propõem-se que os sistemas dopaminérgicos centrais encontram-se hiperativos. Essa hiperatividade poderia ser consequência de um excesso de liberação de dopamina ou uma resposta aumentada as concentrações normais de dopamina, gerada por uma hiperatividade dos seus receptores (SILVA, 2006). Os agonistas da dopamina levam a uma hiperatividade motora (RANG *et al.*, 2004). No caso da doença de Parkinson, há uma deficiência de dopamina, que leva a sintomas de rigidez muscular e lentidão dos movimentos (SILVA, 2006).

Os inibidores da MAO bloqueiam a degradação de amins como noradrenalina, dopamina e serotonina que são importantes neurotransmissores no sistema nervoso central, fazendo com essas amins se acumulem em certas regiões do cérebro conferindo uma ação antidepressiva (MIZIARA, 2006). Além disso, drogas que inibem a recaptção da dopamina têm ação antidepressiva (OLIVEIRA e SENA, 2006).

1.4 Justificativa

Embora o látex do *Calotropis procera* tenha demonstrado efeitos antiinflamatórios, analgésicos, antinociceptivo, anti-diarréico, antifúngico, entre outras propriedades, pouco se sabe sobre seus efeitos em outros sistemas, como o sistema nervoso central.

Uma ação central significativa pode ser bastante interessante ou pode comprometer a utilização de determinadas substâncias que apresentam potencial farmacológico em outros sistemas, como é o caso da nossa planta de estudo.

Portanto, é necessário fazer uma avaliação das ações centrais das plantas que são utilizadas na medicina popular que apresentem alguma atividade terapêutica a fim de evitar possíveis efeitos colaterais do uso.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar os efeitos da administração aguda das proteínas obtidas do látex da espécie *Calotropis procera* no sistema nervoso central de camundongos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar a atividade anticonvulsivante.

Avaliar a atividade sedativa.

Avaliar a atividade ansiolítica.

Avaliar a atividade depressora.

Estudar os possíveis mecanismos envolvidos nessas ações.

3. METODOLOGIA

3.1 Preparação do látex

As amostras de *C. procera* foram coletadas em Fortaleza, estado do Ceará, Brasil. O comprovante (espécime da amostra No. 32663) foi depositado no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC), Brasil e a planta foi autenticada pelo taxonomista Edson Paula Nunes, do Departamento de Biologia da UFC.

O látex fresco foi coletado de plantas saudáveis por uma pequena incisão próxima as folhas mais jovens e colocado em água destilada na medida para obter uma mistura 1:1 (v/v). A mistura foi manuseada delicadamente para manter a homogeneidade durante o transporte para o laboratório. Deve ser enfatizado que o processo de amostragem do látex não compromete a saúde das plantas. De fato, elas se regeneram muito rápido. As amostras foram centrifugadas (5000 g) a temperatura ambiente (25° C) por 10 minutos. O material precipitado, com aspecto de borracha, foi deixado à parte enquanto o sobrenadante foi submetido a diálises exaustivas (8000 Da) em água destilada a 25°C seguido de nova centrifugação. O novo sobrenadante, isento de borracha foi denominado fração não-dialisada (FND). A fração dialisada (FD) foi obtida depois da primeira hora de diálise feita imediatamente depois da primeira etapa da centrifugação. Todos os experimentos com a fração não-dialisada que contém as proteínas do látex.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos machos Swiss (25 – 35 g), procedentes da Universidade Estadual do Ceará (UECE). Os animais foram mantidos em gaiolas

plásticas, em uma sala com temperatura ambiente de 25°C, obedecendo ao ciclo de claro/escuro (12h/12h). Receberam ração e água *ad libitum* e foram manipulados de acordo com os padrões éticos estabelecidos pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

3.3. Protocolo de tratamento

Os animais foram tratados com água destilada (grupo controle), diazepam (1 ou 2 mg/kg), imipramina (15 ou 30 mg/kg) ou proteínas do látex da *Calotropis procera* (5, 10, 50, 100 mg/kg), todos administrados por via intraperitoneal. Trinta minutos após o tratamento cada animal foi submetido aos testes.

3.4 Teste do campo aberto

O campo aberto é uma área feita de acrílico (paredes transparentes e piso preto, 30 x 30 x 15 cm) dividido em nove quadrados de áreas iguais. O teste do campo aberto é usado para avaliar a atividade exploratória do animal (ACHER, 1973). Os parâmetros observados foram: número de quadrados atravessados (atividade locomotora), número de *grooming* (número de vezes que o animal coça a face com as patas dianteiras) e número de *rearing* (número de vezes em que o animal se mantém completamente ereto sob suas patas traseiras). A tendência natural do animal é explorar os ambientes novos, apesar do estresse e do conflito gerado pelo ambiente novo (MONTGOMERY, 1955).

3.5 Teste do labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado para camundongos (LISTER, 1987) consiste de dois braços abertos (30 x 5 cm) perpendiculares e dois braços fechados (30 x 5 cm) também em posição perpendicular. Os braços abertos e fechados estão conectados por uma plataforma central (5 x 5 cm). A plataforma e as paredes laterais dos braços fechados são feitas de acrílico transparente enquanto o piso é feito de acrílico preto. O labirinto fica a 45 cm do chão. Trinta minutos após a injeção intraperitoneal de água destilada, proteínas do látex ou diazepam, os animais foram colocados no centro do labirinto em cruz elevado, com seu nariz na direção de um dos braços fechados e foram observados por 5 minutos. Os parâmetros observados foram: número de entradas nos braços abertos (NEBA) e nos braços fechados (NEBF) e tempo de permanência em cada um dos braços, braços abertos (TPBA) e fechados (TPBF). O tempo de permanência mede o tempo gasto pelo animal nos braços abertos ou fechados. Compostos ansiolíticos reduzem a aversão natural dos animais aos braços abertos e promove sua maior exploração.

Este teste baseia-se no fato de que ratos e outros roedores evitam locais abertos e fechados, demonstrando sinais de medo (congelamento, defecação e micção), quando expostos a esse tipo de ambiente (GRAEFF e GUIMARÃES, 1999). O animal explora ambos os braços, mas tipicamente permanecerá mais tempo nos braços fechados, quanto menor o tempo gasto nos braços abertos maior a intensidade da ansiedade (MORATO e BRANDÃO, 1997).

3.6. Teste da placa furada

O teste da placa furada para o comportamento exploratório de camundongos foi utilizado como descrito por Clark *et al.* (1971). O aparato utilizado foi uma Ugo Basile de 60x30 cm com 16 buracos igualmente distribuídos com

sensores infra-vermelhos. Trinta minutos após a administração intraperitoneal de água destilada, proteínas do látex ou diazepam, foi contado o número de mergulhos nos buracos que cada animal realizou durante 5 minutos.

Esse teste, geralmente, é utilizado para *screening* de drogas com caráter ansiolítico, já que o número de mergulhos é inversamente proporcional ao estado de ansiedade dos animais (FILE e WARDILL, 1975).

3.7. Teste da barra giratória (*Rota rod*)

No teste da barra giratória, foi utilizado o método de Dunham e Miya (1957). Trinta minutos após o tratamento com água destilada, proteínas do látex ou diazepam, os animais foram colocados, com as quatro patas, sobre uma barra com 2,5 cm de diâmetro e 25 cm acima do piso, com rotação de 12 rpm. Para cada animal, foi registrado o tempo de permanência na barra durante 1 minuto. Esse teste verifica a capacidade do animal de se equilibrar sobre uma barra, medindo o efeito do relaxamento muscular ou incoordenação motora produzida, por exemplo, por ansiolíticos (CARLINI e BURGOS, 1979).

3.8 Teste da suspensão da cauda

O teste da suspensão da cauda foi descrito por Steru *et al.* (1985). Trinta minutos após o tratamento com água destilada, proteínas do látex ou imipramina (30 mg/kg), os animais foram suspensos pela cauda na extremidade de uma prateleira a 58 cm acima de uma mesa, por um adesivo colocado aproximadamente a 1 cm da extremidade da cauda. Foi registrado o tempo de imobilidade por um período de 5

minutos. Esse teste baseia-se na observação de que camundongos quando suspensos pela cauda demonstram um padrão temporal de movimentos de fuga seguido de imobilidade. Um aumento na latência para a imobilidade e/ou uma diminuição no tempo de imobilidade de um grupo sugere uma ação antidepressiva (TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2006).

3.9 Teste do nado forçado

O teste do nado forçado (PORSOLT *et al.*, 1977) inclui duas exposições a um tanque de água, com um dia de diferença entre a primeira e a segunda exposição. Para esse teste o tamanho do tanque foi de 22 cm de diâmetro e 40 cm de altura. O tanque continha 20 cm de água fresca a 25°C. Durante a primeira exposição os camundongos não foram tratados e foram colocados dentro do tanque onde permaneceram por 15 minutos. Na segunda exposição (sessão teste), 30 minutos após o tratamento com água destilada, proteínas do látex ou imipramina (10 mg/kg), os camundongos foram colocados no tanque e permaneceram por 5 minutos. Foi observado o tempo de imobilidade. O animal foi considerado imóvel quando permaneceu flutuando na água, sem esforço, fazendo apenas movimentos suaves, necessários para mantê-los com a cabeça fora da água.

Esse teste é um modelo de “desespero comportamental”, assim como o teste de suspensão da cauda, pois os animais são forçados a nadar em recipiente com água de onde é impossível escapar. No início, há uma tentativa desesperada de sair dessa situação, momento de vigorosa atividade, seguida por momentos em que permanecem imóveis, limitando-se aos movimentos necessários para manter suas cabeças fora da água. A imobilidade reflete um “estado de desespero”, como se os animais tivessem desistido de escapar. Uma diminuição no tempo de imobilidade de um grupo sugere uma ação antidepressiva (TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2006)

3.10 Teste do tempo de sono induzido por pentobarbital de sódio

Trinta minutos após o tratamento com água destilada, proteínas do látex ou diazepam, os animais receberam pentobarbital de sódio (40 mg/kg) intraperitonealmente. O tempo desde a injeção até a perda do reflexo de endireitamento é registrado como latência de sono e o tempo decorrido entre a perda e a recuperação do reflexo de endireitamento é registrado como tempo de sono (WAMBEBE, 1985; ROLLAND *et al.*, 1991). Esse teste permite verificar se determinada substância possui efeito depressor, considerando-se para tanto o fato de que quando duas drogas possuem o mesmo efeito farmacológico elas se somam. Sendo assim, as drogas depressoras do sistema nervoso central prolongam o tempo de sono dos animais (RILEY e SPINKS, 1958).

3.11 Teste de convulsão induzida por estriçnina

A estriçnina é um potente convulsivante que atua, principalmente, como antagonista competitivo seletivo da inibição pós-sináptica mediada pela glicina e sua principal ação é o aumento da excitabilidade reflexa da medula (APRISON *et al.*, 1987).

Trinta minutos após o tratamento com água destilada, proteínas do látex ou diazepam, os animais receberam uma injeção de estriçnina (75 mg/kg) por via intraperitoneal. Após essa injeção os animais foram colocados em gaiolas individuais e observados por 15 minutos. Foram observados o tempo de latência até a primeira convulsão, a porcentagem de animais que apresentaram convulsões, a latência de morte e o percentual de morte (CZUCZWAR e FREY, 1986; YEMITAN e ADEYEMI,

2005). Os animais que não apresentaram convulsões dentro do período de observação foram considerados protegidos.

3.12 Teste de convulsão induzida por pilocarpina

A administração sistêmica de pilocarpina, 400 mg/kg, por via intraperitoneal, produz crises convulsivas motoras límbicas em ratos e camundongos (TURSKI *et al.*,1983). Trinta minutos após o tratamento com água destilada, proteínas do látex ou diazepam, os animais receberam pilocarpina (400 mg/kg). Em seguida, foram colocados em gaiolas individuais e observados por 60 minutos. Foram observados o tempo de latência até a primeira convulsão, a porcentagem de animais que apresentaram convulsões, a latência de morte e o percentual de morte (TEIXEIRA-SILVA *et al.*, 2006). Os animais que não apresentaram convulsões foram considerados protegidos.

3.13 Investigação do mecanismo de ação

Para investigar qual via está envolvida na resposta que as proteínas do látex apresentaram foram realizados os testes de campo aberto, placa furada e suspensão da cauda da seguinte maneira: injetou-se intraperitonealmente uma dose do agonista/antagonista de uma das vias, após trinta minutos, administrou-se as proteínas do látex da *Calotropis procera*, na dose de 100 mg/kg e trinta minutos após a segunda injeção iniciaram-se os testes. Foram investigadas duas vias: glutamatérgica e GABAérgica. Na via glutamatérgica foi utilizado apenas o antagonista cetamina (10 mg/kg). Neste caso, a cetamina foi administrada e após 10 minutos foi administrado ou o veículo ou as proteínas do *Calotropis procera*, pois a

cetamina apresenta metabolização muito rápida. Na via GABAérgica foram utilizados flumazenil (1 mg/kg) e diazepam (1 mg/kg), antagonista e agonista, respectivamente.

3.14 Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como média \pm EPM. ANOVA foi seguida pelo teste de Tukey como teste *post hoc*. Os resultados foram considerados significantes para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Campo aberto

No teste do campo aberto, foram avaliados a movimentação espontânea dos animais (atividade locomotora), o número de *rearings* e o número de *grooming*. A atividade locomotora dos camundongos foi reduzida nos animais tratados com as proteínas do látex nas doses de 50 ($16,33 \pm 3,15$) e 100 mg/kg ($11,29 \pm 2,02$) e no grupo tratado com diazepam 2mg/kg ($20,92 \pm 0,39$) em relação ao grupo controle ($41,33 \pm 3,95$) e 10 mg/kg ($36,33 \pm 3,69$) [$F(5,80) = 13,43$, $p < 0,0001$]. Com relação ao número de *rearing*, todos os animais tratados, nas quatro doses, apresentaram uma redução significativa desse comportamento, quando comparado ao controle ($30,55 \pm 2,43$) [$F(5,85) = 27,07$, $p < 0,0001$]. Quanto ao comportamento de *grooming* apenas os animais tratados com a maior dose, 100 mg/kg ($0,26 \pm 0,11$), apresentaram redução quando comparado ao controle ($1,76 \pm 0,30$) e a dose de 10 mg/kg ($1,86 \pm 0,35$) [$F(5,90) = 3,96$, $p = 0,0028$] (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito da administração aguda das proteínas do látex da *Calotropis procera* no teste do campo aberto.

Grupos	Doses (mg/kg)	Atividade locomotora	<i>Rearing</i>	<i>Grooming</i>
Controle	-	41,77 ± 3,95 (22)	30,50 ± 2,43 (24)	1,76 ± 0,30 (26)
<i>C. procera</i>	5	29,00 ± 4,13 (6)	12,13 ± 4,38 (8) a	1,12 ± 0,39 (8)
	10	36,33 ± 3,69 (15)	17,69 ± 3,48 (16) a	1,86 ± 0,35 (15)
	50	16,33 ± 3,15 (13) a,b	1,91 ± 0,41 (12) a,b	0,84 ± 0,24 (13)
	100	11,29 ± 2,02 (14) a,b	0,26 ± 0,11 (15) a,b	0,26 ± 0,11 (15) a,b
Diazepam	2	20,92 ± 0,39 (12) a,b	4,27 ± 0,57 (11) a,b	1,64 ± 0,38 (14) c

Os animais foram tratados com as proteínas obtidas do látex da planta *Calotropis procera* (5, 10, 50 e 100 mg/kg ip.), com água destilada (controle ip) ou com diazepam (2 mg/kg ip). Os valores são expressos em média ± EPM. Valores dentro dos parênteses representam o número de animais no experimento. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido por Tukey *post hoc*. ($p < 0,05$) **a**, **b** e **c** quando comparados ao controle, *C. procera* 10mg/kg e 100 mg/kg, respectivamente.

4.2 Labirinto em cruz elevado

No teste de labirinto em cruz elevado, foram observados número de entradas nos braços abertos (NEBA), nos braços fechados (NEBF), tempo de permanência nos braços abertos (TPBA) e fechados (TPBF) (Tabela 2). O número de entradas nos braços abertos foi reduzido significativamente nos camundongos tratados com as proteínas do látex nas doses de 50 ($2,00 \pm 0,57$) e 100 mg/kg ($1,87 \pm 0,47$), quando comparado ao controle ($6,28 \pm 0,60$), porém o tempo de permanência só foi significativamente reduzido nos animais tratados com as proteínas na dose mais alta, 100 mg/kg ($10,88 \pm 4,1$) em relação ao grupo controle ($55,86 \pm 9,76$). O número de entradas nos braços fechados, também, foi reduzido nos animais tratados com as maiores doses das proteínas, 50 ($5,0 \pm 0,95$) e 100 mg/kg ($4,62 \pm 0,96$) em relação ao grupo controle ($10,57 \pm 0,99$) e 5 mg/kg ($11,36 \pm 1,19$). No entanto, os animais tratados com as proteínas na dose de 100 mg/kg ($219,8 \pm 34,27$) apresentaram um tempo de permanência nos braços fechados significativamente maior dos que os animais do grupo controle ($108,60 \pm 10,75$). Isso mostra que apesar dos animais tratados com a maior dose (100 mg/kg) terem explorado menos ambos os braços eles permaneceram por mais tempo nos braços fechados.

Tabela 2. Efeito da administração aguda das proteínas do látex da *Calotropis procera* no teste de labirinto em cruz elevado.

Grupos	Doses (mg/kg)	NEBA	TPBA	NEBF	TPBF
Controle	-	6,28 ± 0,60 (7)	55,86 ± 9,76 (7)	10,57 ± 0,99 (7)	108,60 ± 10,75 (7)
<i>C. procera</i>	5	5,00 ± 0,96 (11)	25,64 ± 5,45 (11)	11,36 ± 1,19 (11)	178,7 ± 19,11 (11)
	10	5,75 ± 0,70 (8)	39,5 ± 10,50 (8)	9,50 ± 1,55 (8)	121,6 ± 12,83 (8)
	50	2,00 ± 0,57 (7) a,c	31,0 ± 10,3 (7)	5,0 ± 0,95 (7) a,b	137,6 ± 18,01 (7)
	100	1,87 ± 0,47 (8) a,b,c	10,88 ± 4,1 (8) a	4,62 ± 0,96 (8) a,b	219,8 ± 34,27 (8) a,c
Diazepam	2	11,17 ± 0,98 (6) a	106,2 ± 5,15 (6) a	2,00 ± 0,68 (6) a	68,33 ± 6,7 (6)

Os animais foram tratados com as proteínas obtidas do látex da planta *Calotropis procera* (5, 10, 50 e 100 mg/kg, ip), com água destilada (controle, ip) ou com diazepam (2mg/kg, ip). Os valores são expressos em média ± EPM. Valores dentro dos parênteses representam o número de animais no experimento. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido por Tukey *post hoc*. ($p < 0,05$), **a**, **b** e **c** quando comparados ao controle, *C. procera* 5 mg/kg ou 10mg/kg, respectivamente.

4.3 Placa perfurada

No teste da placa perfurada, foi observado o número de explorações dos orifícios da placa furada realizado por cada animal. Como observado na figura 1, os animais tratados com as proteínas do látex na doses de 50 mg/kg ($13,43 \pm 2,54$) e 100 mg/kg ($10,33 \pm 2,96$) apresentaram uma redução no número de explorações quando comparado aos animais do grupo controle, o mesmo aconteceu com os animais tratados com o diazepam, 1 mg/kg ($18,33 \pm 1,61$) [$F(5,58) = 7,08$, $p < 0,0001$).

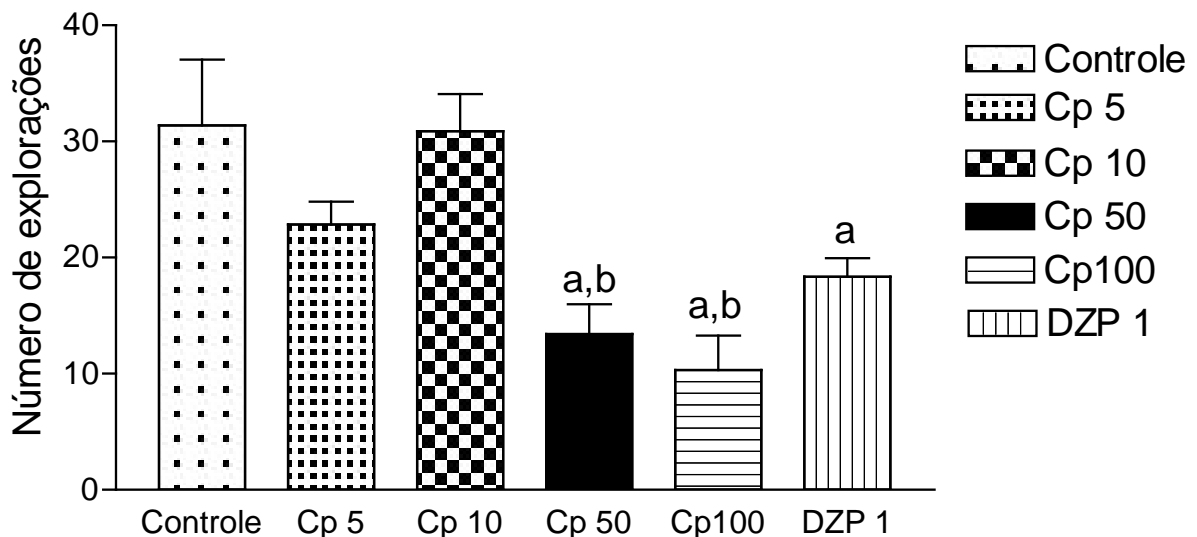


Figura 1. Efeito da administração aguda das proteínas do látex da *Calotropis procera* no teste da placa furada. Número de explorações dos orifícios, durante cinco minutos, em camundongos tratados com as proteínas obtidas do látex da *Calotropis procera* (5, 10, 50 e 100 mg/kg, ip.), água destilada (controle) ou diazepam (1mg/kg). Os valores são expressos em média \pm EPM. Para análise estatística foram utilizados ANOVA seguida de Tukey *post hoc*. ($p < 0,05$), **a** e **b** quando comparados ao controle ou *C. procera* 10 mg/kg, respectivamente.

4.4 Barra giratória (Rota rod)

No teste da barra giratória, foi observado o tempo de permanência dos animais, durante 1 minuto, na barra que girava a 12 rpm. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados com as proteínas do látex, diazepam ou grupo controle. Exceto, uma diminuição do tempo de permanência na barra nos animais tratados com as proteínas do látex na dose de 100 mg/kg ($33,07 \pm 7,06$) comparando-os com os animais tratados com as proteínas na dose de 5 mg/kg ($60,0 \pm 0,0$) [$F(5,70) = 2,56, p = 0,0355$] (Figura 2).

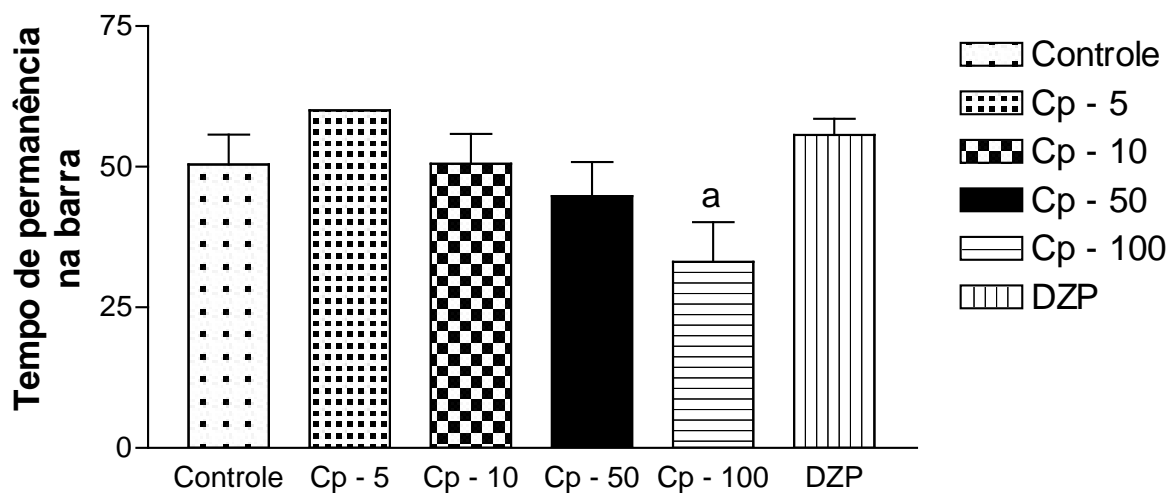


Figura 2. Efeito da administração aguda das proteínas do látex da planta *Calotropis procera* no teste da barra giratória. Tempo de permanência sobre a barra que gira a 12 rpm, durante um minuto, em camundongos tratados com as proteínas obtidas do látex da planta *Calotropis procera* (5, 10, 50 e 100 mg/kg, ip.), água destilada (controle) ou diazepam (1mg/kg). Os valores são expressos em média ± EPM. Para análise estatística foram utilizados ANOVA seguida de Tukey *post hoc*. ($p < 0,05$), **a** quando comparado ao grupo *C. procera* 5 mg/kg.

4.5 Suspensão da cauda

No teste de suspensão da cauda, foi registrado o tempo que o animal permaneceu imóvel suspenso pela cauda. Foi observado um aumento no tempo de imobilidade dos animais tratados com as proteínas do látex na dose de 100 mg/kg ($183,6 \pm 4,76$) quando comparado ao grupo controle ($98,59 \pm 14,35$) e aos outros grupos tratados com as proteínas do látex (C.p 5 = $125,4 \pm 17,03$; C.p 10 = $105,8 \pm 10,34$; C.p 50 = $117,8 \pm 14,91$). No grupo tratado com imipramina, 30 mg/kg ($12,60 \pm 4,71$), foi observada uma redução do tempo de imobilidade quando comparado a todos os outros grupos [$F(5,81) = 16,63$, $p < 0,0001$] (Figura 3).

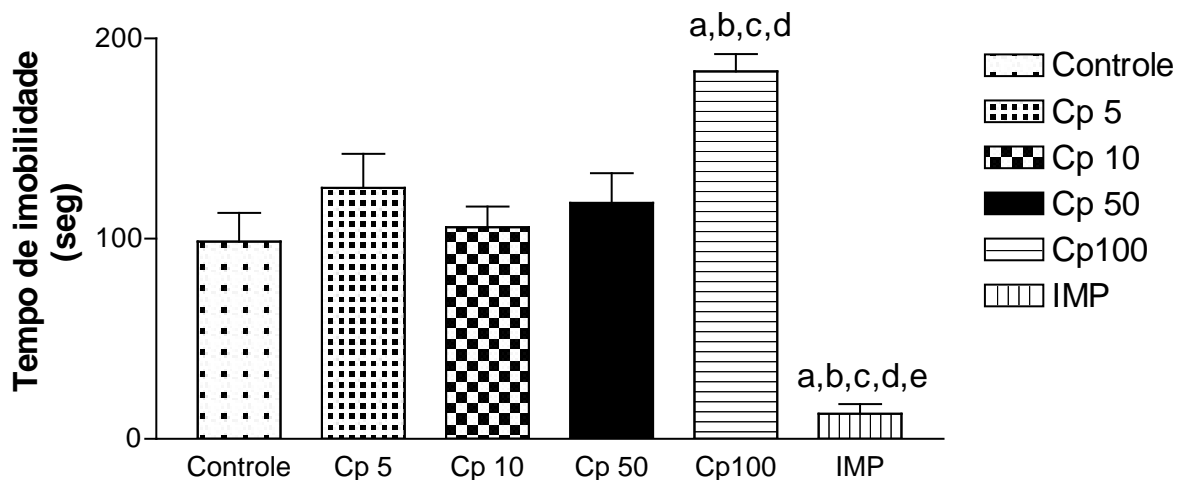


Figura 3. Efeito da administração aguda das proteínas do látex da planta *Calotropis procera* no teste de suspensão da cauda. Tempo de imobilidade durante 5 minutos, em camundongos tratados com as proteínas obtidas do látex da planta *Calotropis procera* (5, 10, 50 e 100 mg/kg, ip.), água destilada (controle) e imipramina (30mg/kg). Os valores são expressos em média \pm EPM. Para análise estatística foram utilizados ANOVA seguida de Tukey *post hoc*. **a, b, c, d** e **e** ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle, *C. procera* 5, 10, 50 e 100 mg/kg, respectivamente.

4.6 Nado forçado

No teste do nado forçado, foi observado o tempo de imobilidade dos animais colocados dentro de um cilindro com água, de maneira que os animais nem pudessem escapar nem tocar o chão do recipiente. Os animais tratados com as proteínas do látex na dose de 100 mg/kg ($222,4 \pm 10,67$) apresentaram um aumento no tempo de imobilidade comparando-os com o grupo controle ($151,8 \pm 9,78$) e proteínas do látex nas duas menores doses, 5 ($150,1 \pm 11,56$) e 10 mg/kg ($151,1 \pm 17,80$). Já o grupo tratado com imipramina, 10 mg/kg ($143,3 \pm 9,79$) apresentou uma redução do tempo de imobilidade quando comparado com os grupos tratados com as proteínas nas maiores doses, 50 ($199,6 \pm 13,56$) e 100 mg/kg [$F(5,48) = 6,82$, $p < 0,0001$] (Figura 4).

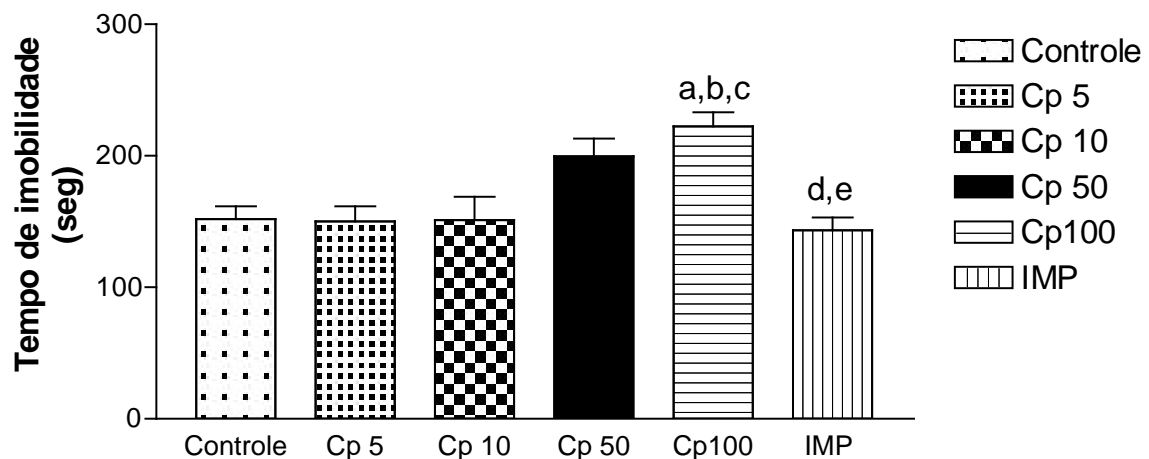


Figura 4. Efeito da administração aguda das proteínas do látex da planta *Calotropis procera* no teste de nado forçado. Tempo de imobilidade durante 5 minutos, em camundongos tratados com as proteínas obtidas do látex da planta *Calotropis procera* (5, 10, 50 e 100 mg/kg, ip.), água destilada (controle) ou imipramina (10mg/kg). Os valores são expressos em média \pm EPM. Para análise estatística foram utilizados ANOVA seguida de Tukey *post hoc*. ($p < 0,05$) **a, b, c, d** e **e** quando comparado ao grupo controle, *C. procera* 5, 10, 50 e 100 mg/kg, respectivamente.

4.7 Tempo de sono induzido por pentobarbital de sódio

No teste de tempo de sono, foram observados a latência de sono e o tempo decorrido entre a perda e a recuperação do reflexo de endireitamento que foi registrado como tempo de sono. Na latência de sono foi observada uma redução do tempo de latência nos animais tratados com as doses de 50 (243,4±16,14), 100 mg/kg (190,8 ± 15,12) e nos animais tratados com diazepam 2 mg/kg (177,7 ±4,04) em relação ao controle (314,5 ± 35,44) [F (5,59) = 4,412, p = 0,0021]. Com relação ao tempo de sono, os animais tratados com as proteínas do látex nas doses de 50 (5509 ±597, 2) e 100 mg/kg (7656 ± 1152) apresentaram um aumento do tempo de sono se comparado ao grupo controle (1460 ± 200) e aos grupos tratados com as proteínas nas doses de 5 mg/kg (2339 ± 486,4) e 10 mg/kg (2869 ± 354,3). Os animais tratados com o diazepam apresentaram um aumento no tempo de sono (4334 ± 155,6) quando comparados aos animais do grupo controle, porém um tempo de sono reduzido quando comprado com os animais tratados com as proteínas do látex na dose de 100 mg/kg [F(5,47) = 16,98, p < 0,0001] (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito da administração aguda das proteínas do látex da *Calotropis procera* no teste de tempo de sono induzido por pentobarbital de sódio.

Grupos	Doses (mg/kg)	Latência de sono	Tempo de sono
Controle	-	314, 5 ± 35,44 (15)	1460 ± 200 (9)
<i>C. procera</i>	5	306,8 ± 46,77 (6)	2339 ± 486,4 (8)
	10	275,6 ± 14,47 (8)	2869 ± 354,3 (8)
	50	243,4 ± 16,14 (8)	5509 ± 597, 2 (8) a, b, c
	100	190,8 ± 15,12 (8) a	7656 ± 1152 (7) a, b, c
Diazepam	2	177,7 ± 4,04 (10) a	4334 ± 155,6 (8) a,d

Os animais foram tratados com as proteínas obtidas do látex da planta *Calotropis procera* (5, 10, 50 e 100 mg/kg ip), com água destilada (controle ip.) ou com diazepam (2mg/kg ip). Os valores são expressos em média ± EPM. Valores dentro dos parênteses representam o número de animais no experimento. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido por Tukey *post hoc* ($p < 0,05$). **a, b, c e d** quando comparados ao controle, *C.procera* 5 mg/kg, 10mg/kg e 100 mg/kg, respectivamente.

4.8 Convulsão induzida por estriçnina

Neste teste, foram observados o tempo de latência até a primeira convulsão, a porcentagem de animais que apresentaram convulsões, a latência de morte e o percentual de morte. Não houve diferença entre os grupos tratados com as proteínas do látex da planta *Calotropis procera* nas quatro doses estudadas em relação ao tempo de latência da primeira convulsão [$F(5,55) = 2,05$, $p = 0,0865$] e ao tempo de latência de morte em relação ao grupo controle (latência de convulsão = $19,90 \pm 2,62$; latência de morte = $32,50 \pm 3,14$) [$F(5,55) = 6,43$, $p = 0,0001$]. Apenas o grupo tratado com diazepam, 4 mg/kg, apresentou aumento no tempo de morte quando comparado ao grupo controle e aos outros grupos. Em todos os grupos, todos os animais apresentaram convulsões e todos morreram (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito da administração aguda das proteínas do látex da *Calotropis procera* no teste de convulsão induzida por estricnina.

Grupos	Doses (mg/kg)	Latência de convulsão (seg.)	Latência de morte (seg.)
Controle	-	19,90 ± 2,62 (10)	32,50 ± 3,14 (10)
<i>C. procera</i>	5	19,13 ± 1,14 (8)	35,50 ± 2,55 (8)
	10	20,38 ± 1,13 (8)	35,63 ± 1,87 (8)
	50	25,42 ± 5,46 (12)	42,25 ± 6,41 (12)
	100	21,75 ± 1,57 (8)	49,63 ± 5,90 (8)
Diazepam	4	31,50 ± 1,96(10)	72,40 ± 9,35 (10) a,b,c,d

Latência da primeira convulsão e tempo de morte, em camundongos tratados com as proteínas obtidas do látex da planta *Calotropis procera* (5, 10, 50 e 100 mg/kg, ip.), água destilada (controle) ou estricnina (75mg/kg). Os valores são expressos em média ± EPM. Valores dentro dos parênteses representam o número de animais no experimento. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguida de Tukey *post hoc*. ($p < 0,05$), **a, b, c, d e e** quando comparado ao grupo controle, *C. procera* 5, 10, 50 e 100 mg/kg, respectivamente.

4.9 Convulsão induzida por pilocarpina

Neste teste, foram observados o tempo de latência até a primeira convulsão, a porcentagem de animais que apresentaram convulsões, a latência de morte e o percentual de morte. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados com as proteínas do látex em todas as doses e o grupo controle com relação ao tempo de latência da primeira convulsão [$F(5,55) = 23,54$, $p < 0,0001$] e ao tempo de latência de morte [$F(5,59) = 28,44$, $p < 0,0001$]. Os animais tratados com diazepam, 4 mg/kg, apresentaram um aumento no tempo de latência da primeira convulsão ($1725,0 \pm 348,2$) e no tempo de latência de morte ($2740,0 \pm 365,5$), quando comparados ao controle (latência de convulsão = $472,20 \pm 18,44$; latência de morte = $803,20 \pm 160,30$). Além disso, no grupo controle nos grupos tratados com as proteínas do látex, em todas as doses, todos os animais apresentaram convulsões e todos os animais morreram. Entretanto, no grupo tratado com diazepam 40% dos animais não apresentaram convulsões e 60% dos animais não morreram (Tabela 5).

Tabela 5. Efeito da administração aguda das proteínas do látex da *Calotropis procera* no teste de convulsão induzida por pilocarpina.

Grupos	Doses (mg/kg)	Latência de convulsão (seg.)	Latência de morte (seg.)
Controle	-	472,2 ± 18,44 (10)	803,2 ± 160,3 (10)
<i>C. procera</i>	5	420,2 ± 21,21 (10)	557,7 ± 31,42 (10)
	10	380,1 ± 22,17 (10)	490,7 ± 42,71 (10)
	50	458,1 ± 22,29 (10)	603,5 ± 58,99 (10)
	100	425,0 ± 19,39 (10)	478,7 ± 20,31 (10)
Diazepam	4	1725,0 ± 348,2 (6) a,b,c,d,e	2740,0 ± 365,5 (10) a,b,c,d,e

Latência da primeira convulsão e tempo de morte, em camundongos tratados com as proteínas obtidas do látex da planta *Calotropis procera* (5, 10, 50 e 100 mg/kg, ip.), água destilada (controle) ou pilocarpina (400 mg/kg). Os valores são expressos em média ± EPM. Valores dentro dos parênteses representam o número de animais utilizados no experimento. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguida de Tukey *post hoc*. ($p < 0,05$) **a, b, c, d e e** quando comparado ao grupo controle, *C. procera* 5, 10, 50 e 100 mg/kg, respectivamente.

4.10 Mecanismo de ação

Para avaliar o mecanismo de ação das proteínas do látex obtido da planta *Calotropis procera*, foram feitos os testes de campo aberto, placa furada e suspensão da cauda com agonistas e antagonista do glutamato e do GABA isoladamente ou em combinação com as proteínas na dose de 100 mg/kg.

4.10.1 Sistema glutamatérgico

No teste campo aberto o grupo tratado com a cetamina, um antagonista da via do glutamato, apresentou atividade locomotora semelhante a do grupo controle. Quando administrada juntamente com as proteínas do látex, na dose de 100 mg/kg, a cetamina conseguiu reverter a diminuição da atividade locomotora causada pela proteínas como está mostrado na tabela 6 [F(3,56) = 12,35, $p < 0,0001$].

No teste da placa furada, as proteínas do látex da planta *Calotropis procera* diminuíram o número de explorações realizadas pelos animais. Neste teste, a cetamina não foi capaz de reverter esse efeito das proteínas, sendo que a cetamina administrada sozinha apresentou também uma diminuição no número de explorações quando comparada ao grupo controle (Tabela 6) [F(3,42) = 10,26, $p < 0,0001$].

Já no teste da suspensão da cauda o grupo tratado com a cetamina e o grupo que associa a cetamina com as proteínas do látex apresentaram tempo de imobilidade semelhante ao do grupo controle, ou seja, bem menor do que o tempo de imobilidade do grupo tratado apenas com as proteínas do látex. Portanto, mais uma vez a cetamina foi capaz de reverter os efeitos das proteínas do látex [F(3,52) = 20,05, $p < 0,0001$].

Tabela 6. Efeito da administração aguda das proteínas do látex da *Calotropis procera* e do antagonista da via do glutamato (cetamina) isolados ou em associação nos testes do campo aberto, placa furada e suspensão da cauda.

Grupos	Doses (mg/kg)	Atividade locomotora	Nº explorações	Tempo de imobilidade
Controle	-	41,77 ± 3,95 (22)	31,40 ± 5,66 (10)	90,36 ± 13,97 (14)
<i>C. procera</i>	100	11,29 ± 2,02 (10) a	8,50 ± 1,48 (10) a	183,6 ± 8,70 (15) a
Cetamina	10	36,50 ± 5,06 (11) b	15,30 ± 2,33 (10) a	74,10 ± 11,82 (10) b
<i>C. procera</i> + cetamina	100 e 10	27,73 ± 3,98 (14) b	11,23 ± 1,83 (13) a	88,79 ± 10,93 (14) b

Os animais foram tratados com as proteínas (100 mg/kg), com água destilada (controle), com cetamina (10mg/kg) ou associações, todas as substâncias foram administradas ip. Os valores são expressos em média ± EPM. Valores dentro dos parênteses representam o número de animais no experimento. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido por Tukey *post hoc*. **a, b** ($p < 0,05$) quando comparados ao controle, *C.procera* 100 mg/kg, respectivamente.

4.10.2 Sistema GABAérgico

Os resultados referentes aos testes estão apresentados na tabela 7. No teste da atividade locomotora todos os animais tratados com as proteínas, isoladamente ou em associação com o flumazenil ou com o diazepam, apresentaram uma diminuição da atividade locomotora [$F(6,91) = 16,263$, $p < 0,0001$].

No teste da placa furada, o flumazenil conseguiu aumentar a atividade exploratória dos animais que receberam as proteínas em associação com o flumazenil, porém esse aumento não o suficiente para tornar este resultado semelhante ao do controle [$F(6,72) = 9.84$, $p < 0,0001$].

No teste da suspensão da cauda o flumazenil conseguiu reverter o aumento do tempo de imobilidade proporcionado pelas proteínas do látex fazendo com o que o tempo ficasse semelhante ao do grupo controle [$F(6, 94) = 10,39$, $p < 0,0001$].

Tabela 7. Efeito da administração aguda das proteínas do látex da *Calotropis procera*, do agonista (diazepam) e do antagonista (flumazenil) da via do GABA isolados ou em associação nos testes do campo aberto, placa furada e suspensão da cauda.

Grupos	Doses (mg/kg)	Atividade locomotora	Nº explorações	Tempo de imobilidade
Controle	-	41,77 ± 3,95 (22)	31,40 ± 5,66 (10)	90,36 ± 13,97 (14)
<i>C. procera</i>	100	11,29 ± 2,02 (10) a	8,50 ± 1,48 (10) a	183,6 ± 8,70 (15) a
Diazepam	1	17,8 ± 0,25 (10) a	19,07 ± 1,72 (14) a	126,8 ± 9,83 (14) b
Diazepam + <i>C. procera</i>	1 e 100	10,50 ± 0,56 (8)	7,10 ± 1,60 (10) c	155,7 ± 17,95 (9)
Flumazenil	1	39,4 ± 3,0 (10)	21,13 ± 1,96 (8)	74,69 ± 11,25 (16)
Flumazenil + <i>C. procera</i>	1 e 100	15,89 ± 2,17 (9) d	19,7 ± 1,52 (10) b	119,9 ± 12,69 (9) b
Diazepam + flumazenil	1 e 1	42,3 ± 4,2 (10) c	20,00 ± 2,4 (10)	108,9 ± 11,8 (16)

Os animais foram tratados com as proteínas (100 mg/kg), água destilada (controle), diazepam (1mg/kg), flumazenil (1 mg/kg), ou associações, todas as substâncias foram administradas ip. Os valores são expressos em média ± EPM. Valore dentro dos parênteses representam o número de animais no experimento. Análise estatística foi realizada utilizando ANOVA seguido por Tukey *post hoc* ($p < 0,05$). **a, b, c, d** quando comparados ao controle, *C. procera* 100 mg/kg, diazepam (1mg/kg) e flumazenil (1 mg/kg), respectivamente.

5. DISCUSSÃO

Existem estudos na literatura avaliando as atividades do látex da planta *Calotropis procera* e já foram evidenciadas várias propriedades benéficas como atividade antiinflamatória (ALENCAR *et al.*, 2006; ARYA e KUMAR, 2005), antinociceptiva (SOARES *et al.*, 2005), anticâncer (CHOEDON, 2006), antidiarréica (KUMAR *et al.*, 2001), antioxidante (ROY *et al.*, 2005) entre outras. Porém, não se tem relatos na literatura das ações dessas proteínas a nível de sistema nervoso central. Portanto, neste estudo, foram avaliados os efeitos da administração aguda das proteínas obtidas do látex da planta *Calotropis procera* em modelos animais de ansiedade, depressão e convulsão. Esses testes são modelos clássicos para a avaliação da ação de substâncias no sistema nervoso central fornecendo informações sobre desempenho psicomotor, ansiedade, atividade miorreaxante e depressão (SOUSA *et al.*, 2004).

A avaliação do comportamento ligado à ansiedade em modelos animais é baseada na convicção de que a ansiedade em animais é comparável à ansiedade em humanos. Entretanto, o maior problema é que não se pode provar que um animal experimente a ansiedade da mesma maneira que um ser humano, apesar de ser incontestável que os roedores exibem padrões comportamentais que indicam ansiedade. Então pode-se assumir uma analogia entre a ansiedade em humanos e roedores (MELO *et al.*, 2006).

Os modelos animais, embora apresentem a limitação de não se poder reproduzir fidedignamente as características dos transtornos humanos, são responsáveis, em grande parte, pelo que sabe atualmente sobre as ações dos psicofármacos em diversas etapas dos processos de transmissão sináptica (GONRENSTEIN e SCAVONE, 1999).

Os resultados mostraram que as proteínas do látex, em doses elevadas, diminuíram a atividade locomotora horizontal do animal, já a atividade locomotora vertical (*rearing*) foi diminuída em todas as doses, enquanto o número de *grooming*,

diminuiu apenas na maior dose. Isso indica uma possível ação sedativa e/ou depressora dessas proteínas, principalmente nas maiores doses (ARAGÃO *et al.*, 2006).

O teste do campo aberto é um modelo animal clássico usado para avaliar o efeito autonômico das drogas e a atividade geral do animal (NOVAS *et al.*, 1988), além de também dá uma boa indicação do estado emocional do animal (ARAGÃO *et al.*, 2006). Alterações nesse teste podem levar a um resultado falso positivo ou falso negativo em outros testes, como no teste do labirinto em cruz elevado (MELO *et al.*, 2006), placa furada (SILVA *et al.*, 2007), nado forçado (SOUSA *et al.*, 2004) e suspensão da cauda.

É esperado que substâncias depressoras do sistema nervoso central levem a uma diminuição da atividade locomotora dos animais (CARNEIRO *et al.*, 2005) e isso é resultado de uma diminuição da excitabilidade do sistema nervoso central e sedação (GOMES *et al.*, 2008).

As proteínas do látex da *Calotropis procera*, nas doses mais altas, levaram a uma diminuição no número de entradas em ambos os braços, uma diminuição no tempo de permanência nos braços abertos e um aumento na permanência nos braços fechados. Isso poderia sugerir que a substância em estudo apresenta uma ação ansiogênica. Porém é importante lembrar que o prejuízo da atividade locomotora, observada nessas mesmas doses, pode ter interferido no resultado deste teste (MELO *et al.*, 2006).

O teste do labirinto em cruz elevado é o teste mais usado para pesquisar agentes ansiolíticos (RODGERS *et al.*, 1997, CARNEIRO *et al.*, 2005). Esse modelo usa o medo natural dos roedores que evitam lugares abertos e fechados. Quando os animais são colocados nessas situações demonstram sinais de medo – congelamento, defecação e micção (GRAEFF e GUIMARÃES, 1999; BORSINI *et al.*, 2002). O comportamento dos roedores é determinado pelo conflito entre ímpeto de explorar um local ou objeto desconhecido e a motivação a evitar perigo potencial (SOUSA *et al.*, 2007). O animal explora ambos os braços, mas tipicamente permanecerá mais tempo nos braços fechados, quanto menor o tempo gasto nos

braços abertos maior a intensidade da ansiedade (MORATO e BRANDÃO, 1997). O animal encontra-se em conflito entre o impulso para explorar o ambiente novo e a tentativa de se proteger devido ao medo (MORATO, 2006).

Compostos que causam ansiedade reduzem significativamente o número de entradas e o tempo de permanência nos braços abertos, enquanto os compostos ansiolíticos diminuem a aversão do animal pelos braços abertos (PELLOW *et al.*, 1985, DE-SOUZA *et al.*, 2006).

O efeito ansiogênico apresentado no teste do labirinto em cruz elevado foi confirmado no teste da placa furada, que avalia o comportamento exploratório do animal (CRAWLEY, 1985). Neste teste, foi observada uma redução no número de explorações nos animais que receberam as proteínas nas maiores doses. O número de explorações é um comportamento sensível que muda de acordo com o estado emocional do animal.

A exploração é gradualmente inibida pela ansiedade e uma inibição do comportamento exploratório pode ser revertido por um composto ansiolítico, indicado por um aumento no número de explorações (TAKEDA *et al.*, 1998). Portanto, uma diminuição no número de explorações indica uma ação ansiogênica da substância em teste, bem como, um aumento nesse parâmetro indica uma ação ansiolítica (TAKEDA *et al.*, 1998). Lembrando também que os resultados desse teste pode ter sofrido interferência da alteração da atividade locomotora observada no teste do campo aberto (SILVA *et al.*, 2007).

No teste da barra giratória não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos, mostrando que essas proteínas não apresentam nenhum prejuízo na coordenação motora desses animais (SOUSA *et al.*, 2007), indicando que não há bloqueio neuromuscular periférico (SILVA *et al.*, 2007).

Os dois modelos animais mais utilizados para avaliar a atividade antidepressiva de uma substância são os testes de nado forçado e suspensão da cauda. Ambos são conhecidos como testes de desespero comportamental. Os

antidepressivos em geral reduzem o tempo de imobilidade durante esses testes (McARTHUR e BORSINI, 2006, PORSOLT *et al.*, 1977, STERU *et al.*, 1985).

Os resultados observados mostraram que os animais tratados na maior dose apresentaram um aumento significativo no tempo de imobilidade quando comparado com todos os outros grupos, mostrando que essas proteínas apresentam uma ação depressora ou sedativa do sistema nervoso central em grandes doses (ROMANINI *et al.*, 2006). A imipramina, um antidepressivo tricíclico que bloqueia a recaptação de serotonina e noradrenalina (ARAGÃO *et al.*, 2006), diminuiu o tempo de imobilidade dos animais em ambos os testes.

Nos testes de nado forçado e suspensão da cauda foi avaliado o tempo de imobilidade do animal, uma postura que reflete um estado de desespero comportamental no qual o animal não tem esperança de escapar. Porém, a relação entre tempo de imobilidade e depressão ainda é controversa (GARDIER e BOURIN, 2001). Nesses modelos, os animais adotam uma postura de imobilidade após um período inicial de agitação. A imobilidade observada nesse modelo se assemelha ao estado de anedonia apresentado por pacientes depressivos durante o curso da doença. Portanto, os animais “deprimidos” tendem a apresentar tempo de imobilidade elevado, como o que foi registrado em alguns grupos deste estudo (DESOUZA *et al.*, 2006).

Embora esses dois testes sejam utilizados com a mesma finalidade, o teste da suspensão da cauda é mais sensível e seu resultado não pode ser confundido com o estresse causado por uma possível hipotermia que pode ocorrer no caso do teste de nado forçado (CRYAN *et al.*, 2005). Machado *et al.* (2008), mostraram que uma mesma substância pode reduzir o tempo de imobilidade no teste da suspensão da cauda e esse mesmo efeito não ser observado no teste do nado forçado. O teste do nado forçado pode ainda sofrer interferência de um déficit na coordenação motora (SILVA *et al.*, 2007), que foi avaliada no teste da barra giratória. Porém, neste estudo, os animais não apresentaram alteração de coordenação motora e, portanto, não houve esse tipo de interferência no teste do nado forçado e o resultado não está relacionado com bloqueio neuromuscular

periférico, mas pode envolver neurônios que controlam a atividade depressora central (ADZU *et al.*, 2002).

A ação sedativa das proteínas, observada no teste de campo aberto, foi confirmada no teste de tempo de sono induzido por pentobarbital de sódio, no qual foi observada uma diminuição do tempo de latência de sono na maior dose e um aumento no tempo de sono dos animais tratados com as doses mais altas das proteínas. Drogas que apresentam um efeito depressor no sistema nervoso central levam a uma diminuição na latência para o sono e um aumento no tempo de sono no teste de tempo de sono induzido por pentobarbital de sódio (SOUSA *et al.*, 2004). Porém, esse teste não é específico, pois droga que alteram a metabolização do pentobarbital pelo complexo citocromo P-450 podem apresentar o mesmo efeito que as drogas depressoras do sistema nervoso central (GOLOUBKOVA *et al.*, 1998).

A diminuição da atividade locomotora espontânea e potenciação do tempo de sono sugerem atividade depressora central (PEREZ *et al.*, 1998). Uma substância que diminui a latência para o sono e aumenta o tempo de sono total pode ser classificada como hipnótica (DE-SOUZA *et al.*, 2006). Portanto, pode-se dizer que as proteínas apresentam efeito sedativo, depressor, hipnótico e ansiogênico nas doses mais elevadas utilizadas nesse estudo. Semelhante ao que foi encontrado neste trabalho, Argal e Pathak (2006), mostraram que o extrato alcoólico da casca da raiz da *C. gigantea* possui ação no sistema nervoso central como atividades sedativa, ansiolítica, anticonvulsivante e analgésica.

As proteínas do látex não apresentaram nenhum efeito na prevenção do aparecimento de convulsões nem no tempo de latência para o desenvolvimento de convulsões induzidas por pilocarpina nem por estriquina.

O látex da planta *Calotropis procera* tem sido avaliado com relação as suas atividades farmacológicas por diversos grupos de pesquisa e já foram evidenciadas várias propriedades benéficas como atividade antiinflamatória (ALENCAR *et al.*, 2006; ARYA e KUMAR, 2005), antinociceptiva (SOARES *et al.*, 2005), anticâncer (CHOEDON, 2006), antidiarréica (KUMAR *et al.*, 2001), antioxidante (ROY *et al.*, 2005), entre outras.

Na maioria dos estudos, foi utilizado o látex de uma maneira integral. Neste, foram avaliadas apenas as atividades das proteínas obtidas do látex dessa planta no sistema nervoso central de camundongos. Observamos que essas proteínas quando administradas nas maiores doses apresentaram algumas alterações no sistema nervoso central. Apesar de nos testes de labirinto em cruz elevado e placa furada os resultados apontarem para um aumento na ansiedade causado pela administração aguda das proteínas do látex da planta *Calotropis procera*, esse resultado sofreu alteração devido ao prejuízo na atividade locomotora dos animais tratados com essas proteínas. O efeito sedativo dessa substância e um possível efeito depressor do sistema nervoso central ficou melhor evidenciado nos testes de campo aberto, suspensão da cauda, nado forçado e tempo de sono induzido por pentobarbital de sódio, que também podem ter sido afetado pelo prejuízo da atividade locomotora.

Comparando os nossos resultados com outros encontrados na literatura, que também avaliaram a ação especificamente das proteínas, podemos observar que essas alterações encontradas no nível de sistema nervoso central não iriam interferir nas outras ações. Em geral, as doses utilizadas para a avaliação das outras propriedades dessas proteínas são bem menores, por exemplo, a atividade antinociceptiva foi observada em animais tratados com as doses de 5 mg/kg, 12,5mg/kg, 25 mg/kg e 50 mg/kg (SOARES *et al.*, 2005). As atividades antiinflamatória e analgésica foram evidenciadas na dose de 5 mg/kg (ALENCAR *et al.*, 2006), enquanto que alterações centrais só foram encontradas em doses altas, 50 ou 100 mg/kg.

Avaliando o mecanismo de ação envolvido na atividade dessas proteínas, verificamos que esse mecanismo acontece via glutamato. Embora o glutamato seja um antagonista dos receptores NMDA e, portanto, deveria diminuir a excitação agravando o quadro depressor iniciado pelas proteínas, Arruda *et al.* (2008), mostraram que a cetamina administrada em doses agudas subanestésicas afeta a coordenação motora e gera uma hiperatividade em camundongos através de uma modulação do sistema dopaminérgico. Nesses mesmos estudos podemos observar que os animais tratados com a cetamina da dose de 10 mg/kg apresentaram um

aumento da atividade locomotora e uma diminuição do tempo de imobilidade do teste da suspensão da cauda.

Mecanismos dopaminérgicos têm papel importante na mediação da atividade locomotora e a cetamina pode influenciar a transmissão de dopamina e ativação do receptor através de múltiplos mecanismos (MANDRYK *et al.*, 2005). Dados bioquímicos demonstraram que a cetamina aumenta a liberação (SMITH *et al.*, 1998) e inibe a recaptação de dopamina (JOHNSON e SNELL, 1985) no estriato e córtex, respectivamente. Tem sido sugerido que a cetamina pode apresentar uma atividade agonista indireta da dopamina, e a estimulação comportamental induzida pela cetamina pode ser conectada com o sistema de dopamina (IRIFUNE, 1991).

A cetamina mostra afinidade muito similar pelos receptores NMDA e D₂, com menor afinidade por sítios 5HT atuando como agonista parcial nos receptores D₂ (KAPUR e SEEMAN, 2002). Essa interrelação anatômica e funcional dos sistemas dopaminérgicos e glutamatérgicos no sistema nervoso central sugere que uma inibição dos receptores NMDA pode influenciar a neurotransmissão dopaminérgica (VASILIADIS *et al.*, 1999, ZHENG *et al.*, 1999).

Liu *et al.* (2006) relataram que a ocupação direta de receptores D₂ de dopamina e receptores de serotonina pela cetamina permanece obscura, sendo necessária investigação adicional.

6. CONCLUSÃO

As proteínas do látex obtido da planta *Calotropis procera* apresentam efeito um efeito sedativo que foi evidenciado nos testes de campo aberto e tempo de sono induzido por pentobarbital de sódio.

Nos testes de labirinto em cruz elevado e placa furada as proteínas mostraram uma atividade ansiogênica, embora esse resultado tenha sofrido interferência pela diminuição da atividade locomotora.

Nos testes de suspensão da cauda e de nado forçado foi evidenciado um efeito depressor dessas proteínas, porém a diminuição da atividade locomotora também comprometeu estes resultados.

Portanto, o que se pode afirmar com esses testes é que as proteínas do látex obtido da planta *Calotropis procera* apresentam efeito sedativo, provavelmente através da via glutamatérgica modulando a via dopaminérgica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADZU, B.; AMOS, S.; MUAZZAM, I.; INYANG, U.S.; GAMANIEL, K.S. Neuropharmacological screening of *Diospyros mespiliformis* in mice. **Journal of Ethnopharmacol**, 83: 139 -143, 2002.

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 17(1): 114-140, 2007.

ALENCAR, N.M.N., OLIVEIRA, J.S., MESQUITA, R.O., LIMA, M.W., VALE, M.R., ETCHELLS, J.P., FREITAS, C.D.T., RAMOS, M.V. Pro- and anti-inflammatory activities of the latex from *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. are triggered by compounds fractionated by dialysis. **Inflamm. res.** 55, 559-564, 2006.

ALVES, T.M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C.L. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 95(3): 367-373, 2000.

APRISON, M.H.; LIPPKWITZ, K.B.; SIMON, J.R. Identification of a glycine-like fragment on the strychnine molecule. **J Neurosci Res**, 17: 209-213, 1987.

ARAGÃO, G.F.; CARNEIRO, L.M.V.; JUNIOR, A.P.F.; VIEIRA, L.C.; BANDEIRA, P.N.; LEMOS T.L.G.; VIANA, G.S.B. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) **March. Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 85, p.827-834, 2006.

ARAÚJO E.C., OLIVEIRA, R.A. G; COROLIANO, A.T., ARAÚJO, E.C. Uso de plantas medicinais pelos pacientes com câncer de hospitais da rede pública de saúde em João Pessoa (Pb). **Revista Espaço para a Saúde**, 8 (2): 44-52, 2007.

ARGAL A.; PATHAK, A.K. CNS activity of *Calotropis gigantea* roots. **Journal of Ethnopharmacology** 106, 142–145, 2006.

ARNOUS, A.H.; SANTOS, A.S.; BEINNER, R.P.C. Plantas medicinais de uso caseiro - conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, 6 (2): 1-6, 2005.

ARRUDA, M.O.V.; SOARES, P.M.; HONÓRIO JR, J.E.R.; LIMA, R.C.S.; CHAVES, E.M.C.; LOBATO, R.F.G.; MARTIN, A.L.A.R.; SALES, G.T.M.; CARVALHO, K.M.; ASSREUY, A.M.S.; BRITO, E.M.; VASCONCELOS, S.M.M. Activities of the Antipsychotic Drugs Haloperidol and Risperidone on Behavioural Effects Induced by Ketamine in Mice **Sci Pharm.** 76; 673–687, 2008.

ARYA, S.; KUMAR, V.L. Antiinflammatory efficacy of extracts do latex de *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. **Mediators of Inflammation**, 4, 228-232, 2005.

ARCHER J. Tests for emotionality in rats and mice. A review. **Anim Behav**; 21: 205–235, 1973.

BORSINI, F.; PODHORNA, J.; MARAZZITTI, D. Do animal models of anxiety predict anxiolytic-like effects of antidepressant? **Psychopharmacology**, 163: 121 – 141, 2002.

BRESSAN, R.A.; BIGLIANI, V.; PILOWSKY, L.S. Neuroimagem de receptores D2 de dopamina na esquizofrenia. **Rev Bras Psiquiatr**, 23 (supl I): 46-49, 2001.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agentes). **Braslian Journal of Medical and Biological Research**, 33: 179 – 189, 2000.

CARLINI, E.A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: metodologia laboratorial e comparação entre o diazepam e o clorobenzapam. **Revista da Associação Brasileira de Psiquiatria** 1: 25-31, 1979.

CARNEIRO, LMV; DIÓGENES, JPL; VASCONCELOS, SMM; ARAGÃO, GF; NORONHA, EC; GOMES, PB; VIANA, GSB. Behavioral and neurochemical effects on rat offspring after prenatal exposure to ethanol. **Neurotoxicology and Teratology**, 27: 585 – 592, 2005.

CHOEDON, T.; MATHAN, G.; ARYA, S.; KUMAR, V.L.; KUMAR, V. Anticancer and cytotoxic properties of the latex of *Calotropis procera* in a transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma. **World J Gastroenterol** , 12 (16): 2517-2522, 2006.

CLARK, G.; KOSTER, A.G.; PERSON, D.W. Exploratory behavior in chronic disulfoton poisoning in mice. **Psychopharmacology**; 20:169– 71, 1971

CRAWLEY, J.N. Exploratory behaviour models of anxiety in mice. **Neurosci Behav Rev**, 9: 37-44, 1985.

CRYAN, JF; MOMBÉREAU, C; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assensing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neurosci. Biobehav. Rev.** 29; 571 – 625, 2005.

CZUCZWAR, S.J.; FREY, H.H. Effect of morphine and morphine-like analgesics on susceptibility to seizures in mice. **Neuropharmacology**, 25: 465–469, 1986.

DE LA CRUZ, MG. O acesso aos fitoterápicos e plantas medicinais e a inclusão social – diagnóstico situacional da cadeia produtiva farmacêutica no estado de mato grosso. Secretaria de Saúde do Estado do Mato Grosso, mar/2005. Disponível em: http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/diagnostico_situacional.pdf. Acesso em: 05 de agosto de 2008.

DE-SOUZA, M.M.; GARBELOTO, M.; DENEZ, K.; EGER-MANGRICH, I. Avaliação dos efeitos centrais dos florais de Bach em camundongos através de modelos farmacológicos específicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16 (3), p. 365-371, jul/set. 2006.

DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P., CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H.; REIS, M.S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, 73: 69-91, 2002.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficits in rats and mice. **J Am Pharm Assoc**, 46: 208, 1957.

FILE, S.E.; WARDILL, A.G. Validity of head-dipping as a measure of exploration in a modified hole-board. **Psychopharmacology**, 44: 53-59, 1975.

FOGLIO, M.A.; QUEIROGA, C.L.; SOUSA, I.M.O.; RODRIGUES, R.A.F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multi ciência: construindo a história dos produtos naturais**, out/2006.

GARDIER, A.M.; BOURIN, M. Appropriate use of 'knockout' mice as models of depression or models of testing the efficacy of antidepressants. **Psychopharmacology**, 153: 393–439, 2001.

GARCIA, E.S. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, 11 (3): 491-494, 1995.

GOLOUBKOVA, TD; HECKLER, E; RATES, SMK; HENRIQUES, JAP; HENRIQUES, AT. Inhibition of cytochrome P-450-dependent monooxygenases by an alkaloid fraction from *Helietta apiculata* markedly potentiate the hypnotic action of pentobarbital. **Journal of Ethnopharmacology**, 60; 141 – 148, 1998.

GOMES, PB; NORONHA, EC; MELO, CTV; BEZERRA, JNS; NETO, MA; LINO, CS; VASCONCELOS, SMM; VIANA, GSB, SOUSA, FCF. Central effects of isolated fractions from the root of *Petiveria alliacea* L. (tipi) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, xxx, 2008.

GORENSTEIN, C; SCAVONE, C. Avanços em psicofarmacologia – mecanismos de ação dos psicofármacos de hoje. **Rev. Bras. Psiquiatr**, 21: 1, 1999.

GRABOWSKI, T. Tecido nervoso. In: GRABOWSKI, T. **Princípios de anatomia e fisiologia**. 9ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 347 – 376, 2002.

GRAEFF, F.G; GUIMARÃES, F.S. **Fundamentos da psicofarmacologia**. São Paulo: Atheneu, 1999, 246 p.

HOWES, O.D.; MONTGOMERY, A.J.; ASSELIN, M.C.; MURRAY, R.M.; VALLI, I.; TABRAHAM, P.; BRAMON-BOSH, E.; VALMAGGIA, L.; JONHS, L.; BROOME, M.; McGUIRE, P.K.; GRASBY, P.M. Elevated striatal dopamine function linked to prodromal signs of schizophrenia. **Arch Gen Psychiatry**, 66:(1), 2009.

IRIFUNE, M.; SHIMIZU, T.; NOMOTO, M. Ketamine-induced hyperlocomotion associated with alteration of presynaptic component of dopamine neurons in the nucleus accumbens of mice. **Pharmacol Biochem Behav.**, 40: 399–407, 1991.

JOHNSON, K.M.; SNELL, L.D. Effects of phencyclidine (PCP)-like drugs on turning behaviour, H-dopamine uptake, and H-PCP binding. **Pharmacol Biochem Behav.**; 22: 731–735, 1985.

KAPUR, S.; SEEMAN, P. NMDA receptor antagonists ketamine and PCP have direct effects on the dopamine D-2 and serotonin 5-HT₂ receptors - implications for models of schizophrenia. **Mol Psychiatr.**, 7: 837–844, 2002.

KUMAR, S.; DEWAN, S.; SANGRAULA, H.; KUMAR, V.L. Anti-diarrhoeal activity of the latex of *Calotropis procera*. **Journal of Ethnopharmacology**, 76 (1): 115-118, 2001.

KUMAR, V.L.; ROY, S. *Calotropis procera* Latex Extract Affords Protection Against Inflammation and Oxidative Stress in Freund's Complete Adjuvant-Induced Monoarthritis in Rats. **Mediators of Inflammation**, 2007: 2007.

KUMAR, V. L.; SHIVKAR, Y. M. Involvement of prostaglandins in inflammation induced by latex of *Calotropis procera*. **Mediators of Inflammation**, 13 (3), 151-155, 2004.

LHINHATRAKOOL, T.; SUTTHIVAIYAKIT, S. 19-Nor- and 18,20-Epoxy-cardenolides from the Leaves of *Calotropis gigantea*. **J. Nat. Prod.**, 69: 1249-1251, 2006.

LIAISON, N.U. Como as drogas e os hormônios influenciam o comportamento? IN: KOLB, B.; WHISHAW, I.Q. **Neurociência do comportamento**. 1ª ed, São Paulo: Manole, p. 190-233, 2002.

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

LIU J.; JI, X.Q.; ZHU, X.Z. Comparison of psychic emergence reactions after (-)-ketamine and (+)-ketamine in mice. **Life Sci.**; 78: 1839–1844, 2006.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JÚNIOR, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, 25 (3): 429-438, 2002.

MANDRYK, M.; FIDECKA, S., POLESZAK, E.; MALEC, D.. Participation of adenosine system in the ketamine-induced motor activity in mice. **Pharmacol Rep**; 57: 55–60, 2005.

McARTHUR, R.; BORSINI, F. Animal models of depression in drug Discovery: a historical perspective. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 84: 436-452, 2006.

MELO, C.T.V.; MONTEIRO, A.P.; LEITE, C.P.; ARAÚJO, F.L.O.; LIMA, V.T.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; FRANÇA FONTELES, M.M.; VASCONCELOS; S.M.M; VIANA, G.S.B; SOUSA, F.C.F. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyl-tyrnamine (Riparin III) from *Aniba riparia* (NESS) MEZ(Lauraceae) in mice. **Biol. Pharm. Bull**, 29(3): 451-454, 2006.

MELO, M.M.; VAZ, F.A.; GONÇALVES, L.C., SATURNINO, H.M. Estudo fitoquímico da *Calotropis procera* Ait., sua utilização na alimentação de caprinos: efeitos clínicos e bioquímicos séricos. **Rev. Bras. Saúde Prod. An.** 2 (1): 15-20, 2001.

MIZIARA, L.J. Adrenérgicos e antiadrenérgicos. In: SILVA, P. **Farmacologia**, 7^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.253-275, 2006.

MONTGOMERY, K.C. The relationship between fear induced by novel stimulation and exploration behavior. **J Comp Physiol Psychol**, 48: 254-260, 1955.

MORATO, S; BRANDÃO, M.L. Paradoxical increase of exploratory behavior in the elevated plus-maze by rats exposed to two kinds of aversive stimuli. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 30: 1113-20, 1997.

MORATO, S. O papel da visão na aversão aos espaços abertos no labirinto em cruz elevado. **Psicologia USP**, 17 (4): 159 – 174, 2006.

MOSSA, J.S.; TARIG, M.; MOHSIN, A.; AGEEL, A.M., AL-YAHYA, M.A.; AL-SAID, M.S., RAFATULLAH, S. Pharmacological studies on aerial parts of *Calotropis procera*. **Am J Chin Med**, 19(3-4): 223-231, 1991.

NOVAS, M.L.; WOLFMAN, C.; MEDINA, J.H.; DE ROBERTIS, E. Proconvulsant and anxiogenic effects of n-butyl- β -carboline-3-carboxylate, on endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. **Pharmacol Biochem Behav**, 30: 331-336, 1988.

OLALYEA, M.T.; ROCHA, J.B.T. Commonly used tropical medicinal plants exhibit distinct in vitro antioxidant activities against hepatotoxins in rat liver. **Experimental and Toxicologic Pathology**, 58: 433 – 438, 2007.

OLIVEIRA, J.S.; BEZERRA, D.P.; FREITAS, C.D.T.; MARINHO FILHO, J.D.B.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; RAMOS, M.V. *In vitro* cytotoxicity against different human cancer cell lines of laticifer proteins of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Toxicology in Vitro**, 21: 1563–1573, 2007.

OLIVEIRA, I.R.; SENA, E.P. **Manual de psicofarmacologia clínica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

PADHY, B.M., KUMAR, V.L. Inhibition of *Calotropis procera* latex-induced inflammatory hyperalgesia by oxytocin and melatonin. **Mediators of Inflammation**; 6: 360-365, 2005.

PARI, K.; RAO, P.J, RASTROGI, J.N. A Novel Insect Antifeedant Nonprotein Amino Acid from *Calotropis gigantea*. **J. Nat. Prod.**, 61: 102-104, 1998.

PELLOW, S; CHOPIN, P; FILE, SE; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, 14: 149-67, 1985.

PEREZ, R.M.; PEREZ, J.A.; GARCIA, L.M.; SOSSA, H. Neuropharmacological activity of *Solanum nigrum* fruit. **Journal of Ethnopharmacology**, 62, 43 -48, 1998.

PORSOLT, R.D.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, 229: 327– 336, 1977.

RAMOS, M.V.; BANDEIRA, G.P., de FREITAS, C.D.T., NOGUEIRA, N.A.P., ALENCAR, N.M.N., DE SOUSA, P.A.S., CARVALHO, A.F.U. Latex constituents from *Calotropis procera* (R. Br.) display toxicity upon egg hatching and larvae of *Aedes aegypti* (Linn.). **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**, 101 (5): 503-510, 2006.

RAMOS, M.V., AGUIAR, V.C., MELO, V.M.M., MESQUITA, R.O., SILVESTRE, P.P., OLIVEIRA, J.S., OLIVEIRA, R.S.B., MACEDO, N.M.R., ALENCAR, N.M.N.

Immunological and allergenic responses induced by latex fractions of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. **Journal of Ethnopharmacology**, 11(1): 115-122, 2007.

RANG, HP; DALE, MM; RITTER, JM; MOORE, PK. Fármacos ansiolíticos e hipnóticos. In: Farmacologia. Rio de Janeiro: Elsevier, 5ª ed., 2004

RILEY, H.; SPINKS, A. Biological assessment of tranquilizers. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 10: 657-671, 1958.

RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A.; HOLMES, A. Animal models of anxiety an ethological perspective. **Braz J Med Biol Res**, 30: 289-304, 1997.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande –Minas Gerais. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, 25 (1):102-123, 2001.

ROLLAND, A.; FLEURENTIN, J.; LANHERS, M.C.; YOUNOS, C.; MISLIN, R.; MORTIER, F., et al. Behavioural effects of the American traditional plant *Eschscholzia californica*: sedative and anxiolytic properties. **Planta Med**; 57: 212-216, 1991.

ROMANINI, C.V.; MACHADO, M.W.; BIAVATTI, M.W.; OLIVEIRA, M.W. Avaliação da atividade ansiolítica e antidepressiva do extrato fluido e fração aquosa de folhas de *Passiflora alata* Curtis em camundongos. **Acta Sci Health Sci**, 28 (2): 159-164, 2006.

ROY, S.; SEHGAL, R.; PADHY, B.M.; KUMAR, V.L. Antioxidant and protective effect of latex of *Calotropis procera* against alloxan-induced diabetes in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, 102: 470–473, 2005.

SCHENKE, E.P.; SIMÕES, C.M.O.; MENGUE, S.S.; MENTZ, L.A.; IRGANG, B.E.; STEHMANN, J.R. O espaço das plantas medicinais e suas formas derivadas na medicina científica. **Caderno de Farmácia**, 1 (2): 65-72, 1985.

SHIVKAR, Y.M., KUMAR, V.L. Histamine mediates the pro-inflammatory effect of latex of *Calotropis procera* in rats. **Mediators of Inflammation**, 12(5): 299-302, 2003.

SILVA, EC. Neurotransmissão aminérgica central. In: SILVA, P. **Farmacologia**, 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 297-312, 2006.

SILVA, M.I.G.; NETO, M.R.A.; NETO, P.F.T.; MOURA, B.A.; AMARAL, J.F.; SOUSA, D.P.; VASCONCELOS, S.M.M.; SOUSA, F.C.F. Central nervous system activity of açude administration of isopulegol in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 88: 141 – 147, 2007

SINGH, R.K., MITTAL, P.K., DHIMAN, R.C., Laboratory study on larvicidal properties of leaf extract of *Calotropis procera* (Family –Asclepiadaceae) against mosquito larvae. **J Commun Dis.**, 37 (2): 109-113, 2005.

SMITH, G.S.; SCHLOESSER, R.; BRODIE, J.D. et al. – Glutamate modulation of dopamine measured in vivo with positron emission tomography (PET) and C-11 raclopride in normal human subjects. **Neuropsychopharmacol** 18: 18-25, 1998.

SOARES, P.M.; LIMA, S.R.; MATOS, S.G.; AANDRADE, M.M., PATROCÍNIO, M.C.A., DE FREITAS, C.D.T., RAMOS, M.V., CRIDLLE, D.N., CARDI, B.A., CARVALHO, K.M., ASSREUY, A.M.S., VASCONCELOS, S.M.M. Antinociceptive activity of *Calotropis procera* latex in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, 99: 125-129, 2005.

SOUSA, F.C.F.; LEITE, C.P.; MELO, C.T.V.; ARAÚJO, F.L.O.; GUTIERREZ, S.J.C.; BARBOSA-FILHO, J.M.; FONTELES, M.M.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B. Evaluation of effects of N-(2-Hydroxybenzoyl) Tyramine (Riparin II) from *Aniba riparia* (NESS) MEZ (Lauraceae) in Anxiety Models in Mice. **Biol. Pharm. Bull**, 30 (7): 1212 – 1216, 2007.

SOUSA, F.C.F.; MELO, C.T.V.; MONTEIRO, A.P.; LIMA, V.T.M.; GUTIERREZ, S.J.C.; PEREIRA, B.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS, S.M.M.;

FONTELES, M.F.; VIANA, G.S.B.. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparina* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 78: 27-33, 2004.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. Tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**; 85: 367– 70, 1985.

TAKEDA, H.; TSUJI, M.; MATSUMIYA, T. Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. **European Journal of Pharmacology** 350: 21–29, 1998.

TEIXEIRA-SILVA, F.; QUEIROGA, M.N.G.; VARELA, R.W.B.; FECHINE, M.F. Métodos para avaliar drogas antidepressivas. In: Almeida RN. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. Guanabara Koogan. 1ª ed., p. 262 – 274, 2006.

TOLEDO, A.C.O.; HIRATA, L.L; BUFFON, M.C.M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta, Bragança Paulista**, 21 (1/2): 7-13, 2003.

TOMAR, V.; AGARWAL, P.K. AGARWAL, B.L. Toxic iridocyclitis caused by *Calotropis*. **Indian J Ophthalmol**, 18: 15 – 6, 1970.

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; SCHWARZ, M.; CZUCZWAR, S.; KLEIROK, K.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavioural Brain Research**, 9: 315-36, 1983.

VASILADIS, H.; ELIE, R.; DEWAR, K.M. Interaction between dopamine and glutamate receptors following treatment with NMDA receptor antagonists. **Eur J Pharmacol**, 386: 155-163, 1999.

VENDRUSCOLO, G.S.; RATES, S.M.K.; MENTZ, L.A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do

bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15(4): 361-372, 2005.

WAMBEBE, C. Influence of some agents that affect 5-hydroxy-tryptamine metabolism and receptors on nitrazepam-induced sleep in mice. **Braz J Pharmacol**; 84:185-191, 1985.

WILLIS JR, WD. O sistema nervoso. In; BERNE, RM; LEVY, MN; KOEPPEN, BM; STANTON, BA. **Fisiologia**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 85 – 104, 2004

YEMITAN, O.K.; ADEYEMI, O.O. CNS depressant activity of *Lecaniodiscus cupanioides*. **Fitoterapia**, 76: 412–418, 2005.

ZHENG, P.; ZHANG, X.X.; BUNNEY, B.S. et al. - Opposite modulation of cortical N-methyl-D-aspartate receptor-mediated responses by low and high concentrations of dopamine. **Neuroscience** 91: 527-535, 1999

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)