

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUCAS DE OLIVEIRA PACCAGNAN

**EFEITOS DE ANTICOLINESTERÁSICOS EM UM MODELO DE
NEURODEGENERAÇÃO INDUZIDO POR CRISES CONVULSIVAS
PROVOCADAS POR ÁCIDO CAÍNICO EM PEIXES-ZEBRA: ENSAIO
PRÉ-CLÍNICO**

CRICIÚMA

2026

LUCAS DE OLIVEIRA PACCAGNAN

**EFEITOS DE ANTICOLINESTERÁSICOS EM UM MODELO DE
NEURODEGENERAÇÃO INDUZIDO POR CRISES CONVULSIVAS
PROVOCADAS POR ÁCIDO CAÍNICO EM PEIXES-ZEBRA: ENSAIO
PRÉ-CLÍNICO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico.

CRICIÚMA

2026

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

P114e Paccagnan, Lucas de Oliveira.

Efeitos de anticolinesterásicos em um modelo de neurodegeneração induzido por crises convulsivas provocadas por ácido caínico em peixes-zebra : ensaio pré-clínico / Lucas de Oliveira Paccagnan. - 2026.

61 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2026.

Orientação: Eduardo Pacheco Rico.

1. Ácido caínico. 2. Galantamina. 3. Amaryllidaceae - Uso terapêutico. 4. Convulsões - Complicações e sequelas. 5. Neurodegeneração. I. Título.

CDD. 22. ed. 616.845

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC




UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E EXTENSÃO
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)
Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 609 de 14.03.2019

ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 498

Com início às 14 (quatorze) horas do dia 12 (doze) de fevereiro de 2026 (dois mil e vinte e seis), realizou-se, na Sala 225/Bloco S, o seminário formal de apresentação dos resultados da Dissertação de Mestrado de **LUCAS DE OLIVEIRA PACCAGNAN**, sob a orientação da Prof. Dr. Eduardo Pacheco Rico, intitulada **“EFEITOS DE ANTICOLINESTERÁSICOS EM UM MODELO DE NEURODEGENERAÇÃO INDUZIDO POR CRISES CONVULSIVAS PROVOCADAS POR ÁCIDO CAÍNICO EM PEIXES-ZEBRA: ENSAIO PRÉ-CLÍNICO”**. A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Tamy Colonetti (Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC) – Conceito final: Aprovado, Profa. Dra. Josiane Budni (Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC) – Conceito final: Aprovado, e Profa. Dra. Adriana Fernanda Kuckartz Vizuete (Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto – UFCSPA) – Conceito final: Aprovado. Com o resultado final: APROVADO, o aluno finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE. Os trabalhos foram concluídos às 16h (dezesseis) horas, dos quais eu, Samiris Albano Pereira, Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, lavrei a presente ata, que assino juntamente com a Profa. Dra. Josiane Budni, Coordenadora do Programa. Criciúma, 12 (doze) de fevereiro de 2026 (dois mil e vinte e seis).


Profa. Dra. Josiane Budni
Coordenadora do PPGCS


Samiris Albano Pereira
Secretária do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo ABNT e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Psiquiatria Translacional do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UNESC.

Dedico esse trabalho à minha família que sempre me apoiou em todos os momentos, à minha irmã que é o meu maior tesouro, à minha namorada ao qual amo profundamente e ao meu falecido primo Samuel que sempre residirá em meu coração.

AGRADECIMENTOS

Nestes dois anos de mestrado passei por muita coisa, o que me fez refletir sobre muitos assuntos. Por isso, dedico este momento para os agradecimentos de pessoas que considero muito importantes para a minha jornada. Inicialmente, tenho que agradecer a Deus pela minha vida e por me permitir conhecer pessoas essenciais para minha felicidade e aprendizado. Entre essas pessoas, está claramente minha família e parentes. Todos os integrantes sempre me forneceram todo o apoio e amor que precisava e até além. Meus tios, tias, primos e a minha prima são pilares fundamentais para tudo o que sou e meu afeto por eles não poderia ser menor. Já meus pais, sou grato por cada minuto em que vivo. Meu pai, Roberto, é um exemplo de homem em que sempre irei me inspirar. Sempre me guiou e me auxiliou em tudo, literalmente tudo, nunca me abandonou ou me deixou. Ele será para sempre meu amigo e espero que ele sinta orgulho do homem que irei me tornar. Já minha mãe, Marilene, sempre cuidou de mim e nunca me negligenciou. Seus cuidados com minha segurança e saúde são as mais perfeitas formas de amor que um filho pode receber de uma mãe. Eu quero que ambos saibam que amo muito eles e que não importa quantas vidas eu tenha, eu sempre vou escolher eles como meus pais. E por fim, minha maninha, um tesouro que veio para minha vida. Eu como irmão mais velho prometo cuidar sempre de você. Apenas sua alegria e sorrisos já era o suficiente para alegrar meu coração. Muito obrigado por ser esse raio de luz na minha vida e nas dos nossos pais. Te amo, Júlia.

Além disso, gostaria de dedicar um parágrafo para duas pessoas de suma importância na minha vida. Meu primo, Samuel, e minha namorada, Taise. Samuel é o mais próximo de um irmão que terei na minha vida. Para sempre, me lembrarei de nossas brincadeiras e tempos juntos. Seu amor por mim era algo que sempre guardarei em meu coração e alma. Sei que andei preocupando muito você nesses últimos anos, mas saiba que minha vida está finalmente nos trilhos. Prometo guardar boas memórias dos meus tempos na terra para rirmos juntos no céu. Te amo Samuel. Sobre a Taise, não tenho palavras para descrever o quanto ela foi importante para mim. Uma amiga e companheira, que tornou este ano de 2025 um dos melhores anos da minha vida. Você é a mulher da minha vida na qual quero construir uma família. Com você quero chorar, sorrir e amar. Quero que saiba que você é um exemplo de profissional, de mulher e de namorada. Construimos juntos

um elo inabalável e que a cada dia fica mais forte. Se Samuel foi aquele que me mostrou como a vida é divertida e alegre, você, Taise, foi aquela que me mostrou que a vida vale a pena ser vivida, que cada dificuldade deve ser encarada com a devida importância e nunca se abalar, mas se cair, você estará lá para me apoiar e me amar. Te amo Taise, para sempre.

Por fim, agradeço ao meus amigos que sempre riem e brincam ao meu lado, ajudando naqueles dias mais tristes. E não poderia esquecer de meu orientador Rico, muito obrigado por me acolher no momento que mais precisava, sou muito grato por sua orientação.

Também agradeço a CAPES pelo fomento para realização da minha dissertação.

'Não há nada melhor para uma alma do que tornar menos triste outra alma.'
Verlaine, Paul.

RESUMO

A neurodegeneração pela neuroinflamação decorrente de um episódio de crise convulsiva é comprometedora. Incluem-se entre os danos: morte neural, mudanças nas funções gliais e níveis de neurotransmissores. Na convulsão, há um desequilíbrio entre a atividade glutamatérgica (excitatória) e GABAérgica (inibitória) na rede neuronal. As crises podem ser mimetizadas em modelos animais por meio da administração de ácido caínico (AC), um agonista dos receptores ionotrópicos de cainato. Diante deste cenário de neuroinflamação, apresentam-se a galantamina sintética e o extrato de *Hippeastrum papilio* (Amaryllidaceae) como potenciais estratégias neuroprotetoras nesse modelo. O extrato obtido é composto de diversos alcaloides de Amaryllidaceae presentes no bulbo de *H. papilio*, incluindo a galantamina. Ambos os compostos possuem efeito anticolinesterásico. Dessa forma, o presente estudo tem como objetivo geral investigar o potencial neuroprotetor da galantamina sintética e do extrato do bulbo de *H. papilio*, frente a parâmetros relacionados à neurotransmissão colinérgica e glutamatérgica, e ao estresse oxidativo, em modelo de AC em peixes-zebra. Foram utilizados 541 peixes distribuídos em 6 grupos: I. Grupo Controle (PBS+PBS); II. Grupo AC+PBS; III. Grupo PBS+Gal; IV. Grupo AC+Gal; V. Grupo PBS+Extrato; VI. Grupo AC+Extrato. Os peixes foram condicionados por administração de 10 µL de AC (4 mg/kg) ou PBS, conforme o grupo, de forma intraperitoneal. Então, após 10 h da administração de AC, foi administrado da mesma forma, o extrato (0,05 ng/g), a galantamina (0,05 ng/g) ou o PBS. Nos primeiros 60 min da administração de AC foi analisado o perfil de crise convulsiva de todos os animais para assegurar a indução do modelo. A seguir, os animais foram eutanasiados em dois momentos. O primeiro momento foi no tempo de 12 h após administração de AC com parte dos animais dos grupos experimentais. No segundo momento, 72 h após a administração, foi analisada a atividade locomotora do restante dos animais e, em seguida, foram eutanasiados. Os conteúdos cerebrais dissecados em 12 h foram usados para análises bioquímicas. Nessas análises foi quantificado a captação total de glutamato, a atividade enzimática da AChE, da colina-acetiltransferase e parâmetros de estresse oxidativo (DCFH-DA, Superóxido dismutase [SOD], Catalase, Sulfidril, glutathione peroxidase [GPx] e glutathione reductase [GR]) em 12 h. Foi averiguado que os grupos PBS+Extrato, e AC+Extrato exibiram aumentos significativos na captação total de glutamato em relação ao grupo Controle e ao grupo AC+PBS. Já na atividade da SOD, os grupos: AC+Gal, PBS+Extrato e AC+Extrato exibiram diminuições significativas em relação ao grupo AC+PBS. As demais análises não apresentaram diferenças significativas. Em conclusão, há evidências de que o período de 12 h após a administração de AC não apresentou uma resposta efetiva frente à estratégia do modelo proposto. No entanto, o extrato com a galantamina apresentou um efeito de modulação dos mecanismos de transporte do glutamato e um mecanismo de defesa antioxidante. Uma vez que não foi observado efeito na AChE ou na ChAT, outros mecanismos podem estar modulando o sistema excitatório. O presente estudo analisou tempos e doses isoladas, sendo necessário para futuros estudos na área, análises em diferentes parâmetros temporais e de administração.

Palavras-chave: Ácido caínico; Convulsões; Neurodegeneração; Galantamina; Amaryllidaceae.

ABSTRACT

Neurodegeneration by neuroinflammation following a convulsive crisis is debilitating. It is included among the damages: neural death, changes in glial function, and altered neurotransmitter levels. During a convulsion, there is an imbalance between glutamatergic (excitatory) and GABAergic (inhibitory) activity in the neuronal network. They can be mimicked in animal models by administering kainic acid (KA), an agonist at ionotropic kainate receptors. Given this scenario of neuroinflammation, synthetic galantamine and *Hippeastrum papilio* extract (Amaryllidaceae) are presented as potential neuroprotective strategies in this model. The extract obtained consists of various alkaloids from the Amaryllidaceae family present in the bulb of *H. papilio*, including galantamine. Both compounds have an anticholinesterase effect. Therefore, the present study aims to investigate the neuroprotective potential of synthetic galantamine and the bulb extract of *H. papilio*, with respect to parameters of cholinergic and glutamatergic neurotransmission and oxidative stress, in a zebrafish model of kainic acid (KA). A total of 541 Zebrafish were used, distributed into 6 groups: I. Control Group (PBS+PBS); II. AK+PBS Group; III. PBS+Gal Group; IV. AK+Gal Group; V. PBS+Extract Group; VI. AK+Extract Group. The fish were conditioned by intraperitoneal administration of 10 μ L of AK (4 mg/kg) or PBS, depending on the group. Then, 10 h after AK administration, the extract (0.05 ng/g), galantamine (0.05 ng/g), or PBS was administered in the same manner. During the first 60 min of AK administration, the convulsion profile was analyzed to confirm model induction. Next, the animals were euthanized at two different times. The first measurement was performed 12 h after AK administration in some animals from the experimental groups. 72 h after administration, the locomotor activity of the remaining animals was analyzed, and they were subsequently euthanized. Brain contents dissected in 12 h were used for biochemical analyses. These analyses quantified total glutamate uptake, AChE and choline acetyltransferase enzyme activity, and oxidative stress parameters (DCFH-DA, superoxide dismutase [SOD], catalase, sulfhydryl, glutathione peroxidase [GPx], and glutathione reductase [GR]) at 12 h. It was found that the PBS+Extract and AK+Extract groups exhibited significant increases in total glutamate uptake compared to the Control and AK+PBS groups. Regarding SOD activity, the groups: AK+Gal, PBS+Extract and AK+Extract exhibited significant decreases compared to the AK+PBS group. The other analyses obtained no significant difference. In conclusion, there is evidence that the 12h period after AC administration did not show an effective response to the proposed model strategy. However, the extract containing galantamine showed modulatory effects on glutamate transport mechanisms and antioxidant defense mechanisms. Since no effect was observed on AChE or ChAT, other mechanisms may be modulating the excitatory system. This study analyzed isolated times and doses, future studies in this area require analyses of different temporal and administration parameters.

Keywords: Kainic acid; Convulsion; Neurodegeneration; Galantamine; Amaryllidaceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho Experimental.....	29
Figura 2 – Comportamento convulsivo do peixe zebra após indução com ácido caínico.....	38
Figura 3 – Gráficos do comportamento da atividade locomotor do peixe zebra após 72 horas da indução com ácido caínico.....	39
Figura 4 – Sistema colinérgico em peixe zebra após 12 horas da indução com ácido caínico	40
Figura 5 – Gráfico da captação total de glutamato em peixe zebra após 12 horas da indução com ácido caínico.....	41
Figura 6 – Gráficos sobre o estresse oxidativo em peixe zebra após 12 horas da indução com ácido caínico.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-PDS	4,4'-ditiopiridina
4-TP	4-tiopiridona
AC	Ácido caínico
AChE	Acetil-colinesterase
AcSCh	Acetilcolina
ADK	Adenosina quinase (do inglês, <i>Adenosine kinase</i>)
Akt	Oncogene viral do timoma murino (do inglês, <i>Murine thymoma viral oncogene</i>)
AMPA	ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (do inglês, <i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>)
ANOVA	Análise de variância (do inglês, <i>Analysis of variance</i>)
AQP4	Aquaporina 4
Asc	Proteína adaptadora apoptótica
BChE	Butirilcolinesterase
Bcl-2	Linfoma de células B 2 (do inglês, <i>B-cell lymphoma 2</i>)
BDNF	Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês, <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>)
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (do inglês, <i>Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate</i>)
Casp1	Proteína efetora pró caspase 1
CAT	Catalase
ChAT	Colina-acetiltransferase
CREB	Proteína de ligação responsiva ao AMP cíclico (cAMP, do inglês, <i>cAMP-responsive binding protein</i>)
Cx	Conexina
DCF	Diclorofluoresceína
DCF-DA	diacetato 2',7'-diclorofluoresceína (do inglês, <i>2',7'-dichlorofluorescein diacetate</i>)
DCFH	2',7'-diclorofluoresceína
DP	Desvio padrão
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (do inglês, <i>5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid</i>)

EAAT Transportador de aminoácido excitatório

EDTA Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês, *Ethylenediaminetetraacetic acid*)

ERK Quinase regulada por sinal extracelular (do inglês, *Kinase regulated by extracellular signal*)

ERO Espécie reativa de oxigênio

EXT Extrato de *Hippeastrum papilio*

GABA Ácido gama-aminobutírico (do inglês, *Gamma-aminobutyric acid*)

GAL Galantamina

GFAP Proteína ácida fibrilar glial (do inglês, *Glial fibrillary acidic protein*)

GLT1 Transportador de glutamato 1 (do inglês, *Glutamate transporter 1*)

GPx Glutaciona peroxidase

GR Glutaciona redutase

GS Glutamina sintetase

GSH Glutaciona reduzida

HBSS Solução salina balanceada de Hank

HMGB1 Proteína da caixa 1 do grupo de alta mobilidade (do inglês, *Protein from box 1 of the high-mobility group*)

IL-1 β Interleucina 1-beta

IP Intraperitoneal

IRAK Proteína quinase associada ao receptor de interleucina 1 (do inglês, *Interleukin-1 receptor-associated protein kinase*)

KAR receptores de kainato

LPA Ligante potenciador alostérico

MyD88 Proteína de resposta primária de diferenciação mielóide 88

NADP⁺ dinucleotídeo de nicotinamida adenina Fosfato (do inglês, *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NADPH dinucleotídeo de nicotinamida adenina Fosfato reduzido (do inglês, *Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

NF-kB Fator nuclear-kB

NLRP3 Proteína 3 contendo o domínio de pirina da família NLR (do inglês, *NLR family pyrin domain-containing protein 3*)

NMDA N-metil-D-aspartato

NOX2 NADPH oxidase 2

p38MAPK Proteína quinase ativada por mitógeno p38 (do inglês, *Mitogen-activated protein kinase p38*)

PBS Tampão de fosfato de sódio (do inglês, *Sodium phosphate buffer*)

PI3K Fosfoinosítido 3-quinase (do inglês, *Phosphoinositide 3-kinase*)

PKA Proteína quinase A (do inglês, *Protein kinase A*)

PTZ Pentilenotetrazol

RAGE Receptor para produtos finais de glicação avançada (do inglês, *Receptor for advanced glycation end products*)

SNC Sistema nervoso central

SOD Superóxido dismutase

TBA-RS Análise quantitativa do ácido 2-tiobarbitúrico

TLR4 Receptor do tipo toll 4 (do inglês, *Toll-type receptor 4*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 CRISE CONVULSIVA	15
1.2 CÉLULAS GLIAIS E SUAS CONSEQUÊNCIAS NEUROQUÍMICAS	16
1.3 MODELOS DE NEURODEGENERAÇÃO POR HIPERESTIMULAÇÃO GLUTAMATÉRGICA.....	18
1.4 CONSEQUÊNCIAS MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DA HIPERESTIMULAÇÃO INDUZIDA POR CAÍNICO	20
1.5 MODELOS DE PEIXES-ZEBRA COMO ESTRATÉGIA PARA ESTUDOS COM ÁCIDO CAÍNICO.....	21
1.6 SISTEMA COLINÉRGICO, ANTICOLINESTERÁSICOS E NEUROPROTEÇÃO.....	22
1.7 JUSTIFICATIVA.....	24
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 METODOLOGIA	27
3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS	27
3.2 ANIMAIS	27
3.3 APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS	28
3.4 EUTANÁSIA.....	29
3.5 PREPARAÇÃO DO ÁCIDO CAÍNICO, GALANTAMINA E DO EXTRATO DE <i>H. PAPILIO</i>	29
3.6 ANÁLISES	30
3.6.1 Pontuação de Crise Convulsiva	30
3.6.2 Comportamento da Atividade Locomotora	30
3.6.3 Determinação da Atividade Enzimática da Acetilcolinesterase	31
3.6.4 Determinação da Atividade Enzimática da Colina-Acetiltransferase	31
3.6.5 Captação Total de Glutamato	32
3.6.6 Preparo do Tecido e Homogeneização para Análises e Medição de Parâmetros de Estresse Oxidativo	32
3.6.7 Parâmetros de Estresse Oxidativo	33
3.6.7.1 Determinação da Oxidação do 2',7'-diclorofluoresceína	33
3.6.7.2 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase	33
3.6.7.3 Determinação da Atividade da Catalase.....	34

3.6.7.4 Determinação da Atividade da Glutaciona Peroxidase	34
3.6.7.5 Determinação da Atividade da Glutaciona Redutase	34
3.6.7.6 Determinação do Conteúdo de Sulfidrilas	35
3.6.7.7 Determinação do Conteúdo Proteico	35
3.7 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE DADOS	36
4 RESULTADOS	37
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 CRISE CONVULSIVA

As crises convulsivas são definidas como episódios de contrações musculares anormais e excessivas, geralmente bilaterais, que podem ser sustentadas ou interrompidas (Trinka *et al.*, 2015). Elas podem ser classificadas em três tipos, sendo tipo tônica (contração do corpo inteiro), clônica (movimentos bruscos) e tônico-clônica (Scheffer *et al.*, 2017).

As crises podem ter diversas etiologias sendo que cada uma possui uma incidência própria. Na doença de Alzheimer, as crises epiléticas afetam aproximadamente 5 a 12 pessoas por 1.000 pacientes por ano na China. Já na doença de Parkinson, a incidência bruta é de aproximadamente 267 casos por 100.000 pacientes por ano no Reino Unido. Além disso, a incidência de epilepsia na população mundial é aproximadamente 50 a 82 indivíduos por 100.000 pessoas por ano. Dessa forma, as crises afligem a população por uma gama de doenças e condições diferentes (Falco-Walter, 2020; Gruntz *et al.*, 2018; Nicastro; Assal; Seeck, 2016).

A fisiopatologia da crise convulsiva se origina de um desequilíbrio entre a atividade glutamatérgica (excitatória) e GABAérgica (inibitória) dentro de uma rede neuronal. Elas não são resultadas apenas de uma despolarização excessiva, mas também de uma atividade neuronal hipsincrônica. Assim, o sistema glutamatérgico é uma peça-chave para o entendimento do início de progressão das crises (Schousboe; White, 2009).

O sistema glutamatérgico é o principal sistema excitatório do corpo humano e seu funcionamento ocorre por meio do glutamato, um dos neurotransmissores presentes no cérebro. O glutamato é um aminoácido não-essencial que provoca excitação dos neurônios pós-sinápticos no sistema nervoso central (SNC). Seu efeito excitatório ocorre por meio de sua interação com receptores ionotrópicos ou metabotrópicos. Entre os ionotrópicos, incluem-se os receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA), ácido α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazol propiônico (AMPA) e cainato. Após a interação com o glutamato, esses receptores abrem seus canais para o influxo de sódio e/ou cálcio na célula. Assim, esse sistema desempenha papéis cruciais na aprendizagem, nos processos de

memória e na plasticidade sináptica. Algumas células, chamadas de células gliais, são essenciais para a manutenção do tônus glutamatérgico na fenda sináptica, tendo papel importante na sustentação das crises convulsivas (Devinsky *et al.*, 2018).

1.2 CÉLULAS GLIAIS E SUAS CONSEQUÊNCIAS NEUROQUÍMICAS

Os astrócitos são células gliais com papel importante nas crises convulsivas, sendo as principais células envolvidas nas sinapses excitatórias, responsáveis pelo gatilho convulsivo. Sua importância reside nos transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs) dependentes de sódio presentes nas suas membranas celulares, cuja função é a captação de glutamato na fenda sináptica, essencial para o cessamento do impulso excitatório. Além disso, eles comportam outras funções no SNC como a modulação da atividade sináptica, visto por exemplo nas sinapses tripartites (Tewari *et al.*, 2024). Essas modulações ocorrem por meio de modificações em canais, junções comunicantes, receptores e transportadores (Binder; Steinhäuser, 2021). Assim, o astrócito possui uma função crítica para a homeostase do tecido e sinalização neural, contribuindo também para a permeabilidade e manutenção da barreira hematoencefálica, fluxo sanguíneo e metabolismo energético (Vezzani *et al.*, 2022). No contexto de sua função homeostática, essas células desempenham um papel central no sequestro e na redistribuição de potássio e água ao longo da atividade neural. Mudanças nesses equilíbrios tornam o organismo mais suscetível a convulsões (Binder; Steinhäuser, 2021).

Os astrócitos, assim como outras células gliais como a micróglia, podem passar por um processo de ativação, bem caracterizado na crise convulsiva, chamado de “gliose”. Os astrócitos ativados/reativos adotam uma morfologia diferente, tornam-se desacoplados e perdem a organização de domínios (Binder; Steinhäuser, 2021). A astrogliose é caracterizada por alterações nas respostas celulares, com mudanças genéticas, epigenéticas, moleculares, metabólicas, morfológicas e funcionais. Na epilepsia, uma condição crônica em que ocorrem as crises, essa reatividade implica no aumento da hiperexcitabilidade neuronal, perda da plasticidade e de neurônios. O aumento da excitabilidade decorre do aumento da ativação de vias inflamatórias, da disfunção de transportadores, da proliferação

astroglial, da desregulação da expressão de moléculas neuroativas e de mudanças na expressão de várias enzimas astrocíticas (Binder; Steinhäuser, 2021).

As principais enzimas afetadas são a glutamina sintetase (GS) e a adenosina quinase (ADK). A GS é responsável por converter o glutamato liberado na fenda sináptica em glutamina, precursor do glutamato e do ácido gama-aminobutírico (GABA). A partir do momento em que sua expressão está afetada, o equilíbrio entre excitação e inibição fica comprometido. Adjunto a isso, temos a enzima ADK que é responsável pela conversão da adenosina em monofosfato de adenosina. A adenosina possui entre muitas funções, a função de ser um anticonvulsivante endógeno (Clasadonte; Haydon, 2012). Dessa forma, é evidente que a baixa expressão dessas enzimas pode acarretar um aumento da propagação do impulso excitatório. Sobre a disfunção dos transportadores, é demonstrado que em modelos em animais de epilepsia há uma redução no número de aquaporinas 4 (AQP4) em astrócitos. As aquaporinas assumem papéis importantes no prolongamento de crises convulsivas. Além disso, outro transportador prejudicado é o transportador de glutamato 1 (GLT1), também conhecido como EAAT2 (Lauriat; McInnes, 2007). Sua regulação depende diretamente do período analisado, em que momentos após uma crise, seus níveis estarão aumentados e nos períodos seguintes, haverá uma redução nos níveis do transportador (Binder; Nagelhus; Ottersen, 2012; Hubbard *et al.*, 2016).

Com base nesse entendimento, é possível traçar marcadores para astrócitos ativados nas crises, sendo eles: a proteína ácida fibrilar glial (GFAP), a proteína S100B, a ADK, a vimentina, a conexina (Cx) e a GS (Vezzani *et al.*, 2022). Vale ressaltar que a astrogliose reativa pode resultar tanto em células resilientes, focadas em manter atividades homeostáticas/compensatórias ou em células disfuncionais com as implicações supracitadas. A hipótese de que o mesmo astrócito teria ambas as funções também são válidas (Aronica *et al.*, 2012; Escartin *et al.*, 2021).

As crises convulsivas por meio de despolarizações robustas provocam uma série de consequências no ambiente neuronal. No mais, existem alguns compostos capazes de alterar a balança excitação-inibição do SNC. Essa alteração na balança é capaz de reproduzir semelhantemente algumas dessas consequências, como a neurodegeneração (Wang *et al.*, 2005a).

1.3 MODELOS DE NEURODEGENERAÇÃO POR HIPERESTIMULAÇÃO GLUTAMATÉRGICA

Um composto que é capaz de causar consequências semelhantes às da crise convulsiva é o Ácido Caínico (AC). O AC é um agonista dos receptores ionotrópicos não-NMDA de glutamato, AMPA e cainato. Ele é um potente análogo do glutamato, capaz de induzir despolarizações robustas nos neurônios, causando crises convulsivas, neuroinflamação e eventos neurodegenerativos por meio da hiperestimulação glutamatérgica. Ele possui alta afinidade aos receptores glutamatérgicos KA1 e KA2 (Lévesque; Avoli, 2013).

Esses receptores apresentam elevada expressão na região CA3 do hipocampo em mamíferos. As crises convulsivas por administração de AC culminam na morte celular (apoptose e necrose), decorrente da excitotoxicidade glutamatérgica e do desequilíbrio redox. A excitotoxicidade é definida como o excesso de glutamato ou outros aminoácidos excitatórios em que leva a hiperexcitação dos neurônios pós-sinápticos. As despolarizações robustas aumentam a concentração de cálcio intracelular. Na sequência, o cálcio ativa caspases, proteases e lipases, além de vias dependentes dele que leva à apoptose neuronal (Toyo-oka *et al.*, 1985). Uma dessas vias é a via intrínseca de apoptose mediada pelas proteínas Bax e Bak (proteínas da família da Bcl-2) em que a sobrecarga de cálcio leva a sua ativação, impactando diretamente na sobrevivência celular (Zong *et al.*, 2024).

Já a necrose, é advinda da neuroinflamação exacerbada vinda do estresse oxidativo, esse surge da disfunção mitocondrial causada pelo influxo de cálcio. O cálcio intracelular em excesso também ativa enzimas mitocondriais críticas para a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Da mesma forma, ele é responsável pela abertura dos poros de transição de permeabilidade mitocondrial, aumentando ainda mais a produção de EROs (Zorov; Juhaszova; Sollott, 2014).

Em roedores, observou-se que a inflamação provocada pelo AC tem caráter bifásico, com aumento agudo de expressões de RNAs mensageiros pró-inflamatórios (IL-1 β , NLRP3, Asc, Casp1, TLR4 e NF-kB) em algumas horas e aumento crônico em dias. O aumento agudo das expressões foi atribuído a excitotoxicidade, que causou uma inflamação de grandes proporções logo após a administração de AC (Chen *et al.*, 2015; Pohlentz *et al.*, 2022). Também foi

observado um aumento na translocação da proteína da caixa 1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1) do núcleo para o citoplasma. O aumento dos níveis de HMGB1 intracelular indica a participação do eixo HMGB1/TLR4 na inflamação. Esse eixo é importante para a ativação da micróglia, produção de fator nuclear kappa B (NF- κ B) e propagação da inflamação (Dai *et al.*, 2023; Kaneko *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2017). Nesse eixo, a HMGB1 age como um padrão molecular associado a dano celular (DAMP) e modula a via da TLR4-MyD88-IRAKs. O eixo HMGB1/TLR4 também pode induzir respostas inflamatórias pela via do p38MAPK, além de que o HMGB1 pode interagir com outros receptores, como o RAGE, que também culminaram na ativação do NF- κ B (Chen *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017).

Sendo assim, o ambiente neuronal resultante desse insulto é semelhante a muitas doenças neurodegenerativas, por conta da ativação de células gliais e da neuroinflamação prejudicial (Wang *et al.*, 2005b). Dessa forma, trata-se de uma estratégia particularmente relevante para estudos na área. As crises recorrentes, decorrentes do insulto de AC por exemplo, podem levar a mudanças moleculares, celulares ou alterações de longo prazo nos circuitos neurais. Resumindo, o insulto induz a necrose e a apoptose de neurônios que impacta diretamente nos circuitos, tendo como coadjuvante a ação de EROs (Pitkänen; Sutula, 2002). Modelos em animais de neurodegeneração com AC para estudos de doenças como a doença de Alzheimer, doença de Parkinson, a doença de Huntington e a epilepsia são consolidados, esses tendo participação direta ou indireta da excitotoxicidade (Chapman, 2000; HYND, 2004; Iovino; Tremblay; Civiero, 2020; Sanberg; Johnston, 1981). Isso se deve ao fato de que a excitotoxicidade, o estresse oxidativo e a neurodegeneração se correlacionam um com o outro (Nakao; Brundin, 1998).

Entre os modelos com AC, o mais clássico é o do estudo da epilepsia. Como já mencionado brevemente, a epilepsia é uma condição crônica em que ocorrem uma série de convulsões espontâneas e recorrentes (Beghi; Giussani; Sander, 2015). A epilepsia pode ter diversas etiologias sendo uma delas os eventos degenerativos. O AC é capaz de mimetizar a epilepsia do lobo temporal esquerdo em animais, a qual é a mais comum entre as epilepsias em humanos (Henning *et al.*, 2023; Vrinda *et al.*, 2019). Existem diversas estratégias e compostos para estudo da epilepsia além do AC, como a pilocarpina e o pentilenotetrazol (PTZ). Por sua capacidade de provocar convulsões, esses compostos são chamados de quimioconvulsivantes. Porém, entre todos os quimioconvulsivantes, o AC é o que

provoca a inflamação mais severa e o maior comprometimento de neurônios (Dai *et al.*, 2023). Com tudo isso exposto, vê-se que o AC permite estudar um ambiente neuronal criticamente inflamado, marcado por vastos eventos neurodegenerativos em animais. Esses eventos englobam, além de mortes neuronais, danos em tecidos e alterações bioquímicas.

1.4 CONSEQUÊNCIAS MORFOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DA HIPERESTIMULAÇÃO INDUZIDA POR CAÍNICO

As consequências causadas pelo AC dependem diretamente da forma de administração e os animais usados. Entre as formas de administração há a intraperitoneal (sistêmica), intraventricular, intra-hipocampal, supra-hipocampal, intra-amigdalóide e a intranasal (Rusina; Bernard; Williamson, 2021). Em ratos com administração sistêmica foi relatado lesão bilateral com comprometimento estrutural do hipocampo, subículo e córtex entorrinal (Bertoglio *et al.*, 2017). Já em camundongos, a lesão também foi bilateral, mas com comprometimento das regiões CA3/CA1 do hipocampo, das áreas corticais, da amígdala lateral e do tálamo dorsal (Umpierre *et al.*, 2016). No geral, conforme Wang *et al.*, (2005a) todas as vias de administração convergem para danos nas sub-regiões CA1 e CA3 do hipocampo. A razão para isso, se deve ao fato de que nessas regiões ao predomínio dos receptores KA1 e KA2 de cainato.

Estudos com AC podem ser realizados de forma aguda ou crônica. Em um primeiro momento, as células GFAP positivas tem uma diminuição que persiste até 12 horas após AC. A redução no número de células positivas indica o período de maior neurodegeneração, com diminuição significativa do número de células gliais. Já em 72 horas, tem-se uma normalização no número de células, entre as causas sugeridas está o aumento da expressão intracelular de S100B (Mussulini *et al.*, 2018).

A proteína S100B possui efeito neuroprotetor e induz a proliferação de astrócitos somente em baixas concentrações, devido ao seu caráter dose-dependente (Schulte *et al.*, 2014). Após 10 dias, as células GFAP positivas e as células da micróglia positivas para AIF1 sofrem um aumento em seus números (Pohlentz *et al.*, 2022). Forte indicativo da gliose, principalmente da astrogliose e da

microgliose. As mesmas observações persistem por até 9 meses conforme relatado por Bedner *et al.*, (2015).

Assim exposto, pode-se inferir que o AC é capaz de causar uma neuroinflamação severa com danos teciduais e morte neuronal. O período posterior a crise provocado pelo AC é marcada por uma forte esclerose com redução significativa do número de células neuronais e gliais. Isso demonstra que o AC é um dos modelos clássicos de neurodegeneração por hiperestimulação glutamatérgica. Dessa forma, como descrito acima, o momento de maior neurodegeneração em estudos com animais com AC é o período até 12 horas após o insulto, sendo o tempo ideal para estudos com roedores e outros animais, como o peixe-zebra (Mussulini *et al.*, 2018).

1.5 MODELOS DE PEIXES-ZEBRA COMO ESTRATÉGIA PARA ESTUDOS COM ÁCIDO CAÍNICO

O peixe-zebra possui um SNC similar ao de humanos, embora muitas estruturas do sistema sejam simplificadas, as características celulares dos neurônios e suas principais conexões estão presentes. Assim, as repercussões da administração sistêmica de AC são similares aos de outros animais (Rusina; Bernard; Williamson, 2021). Entre os impactos histológicos do AC no peixe-zebra está a redução da proliferação celular na área telencefálica, diencefálica e zona de proliferação tectal medial, conforme visto em cérebros imaturos de larvas (Kim *et al.*, 2010). Anormalidades no volume cerebral como ruptura da substância branca e redução na densidade neural também foram visualizados (Heylen *et al.*, 2021).

Já em adultos, foi relatado impactos bioquímicos na captação de glutamato no prosencéfalo (Mussulini *et al.*, 2018). A fim de diminuir os danos causados, pesquisas com moléculas protetoras com propriedades antioxidantes tornaram-se relevantes, como a melatonina (de Farias *et al.*, 2022). Portanto, estudar o sistema glutamatérgico em animais como peixes-zebra torna-se uma perspectiva promissora conforme Rico *et al.*, (2010), em que evidenciou a conservação filogenética e expressão dos EAATs e da captação cerebral de glutamato entre a espécie humana e o peixe-zebra.

Dessa forma, o uso de vertebrados como o peixe-zebra é considerado válido para o estudo das convulsões e suas repercussões, visto sua similaridade aos

modelos de roedores (Alfaro; Ripoll-Gómez; Burgos, 2011). O peixe-zebra, além de servir para o entendimento da base biológica da excitotoxicidade glutamatérgica nas crises convulsivas, também é uma estratégia importante para o estudo de diversos compostos. Entender as potenciais propriedades terapêuticas desses compostos, e seus envolvimento com diversos sistemas de neurotransmissores, tais como o glutamatérgicos e colinérgicos é fundamental (Mussulini *et al.*, 2018).

1.6 SISTEMA COLINÉRGICO, ANTICOLINESTERÁSICOS E NEUROPROTEÇÃO

O sistema colinérgico tem como neurotransmissor principal a acetilcolina. Existem três enzimas chaves para o sistema colinérgico: acetilcolinesterase (AChE), butirilcolinesterase (BChE) e colina-acetiltransferase (ChAT). As enzimas AChE e BChE são responsáveis pela degradação da acetilcolina em colina e acetil-coenzima A. Em peixes, a enzima BChE não está presente. Entretanto, como a enzima AChE é responsável pela maior parte da degradação em humanos, essa ausência não é considerada relevante (Bertrand *et al.*, 2001a; Halder; Lal, 2021).

Já a enzima ChAT, é responsável por sintetizar a acetilcolina através da colina e do acetil-coenzima A. Os receptores de acetilcolina são chamados de muscarínicos e nicotínicos. Os receptores muscarínicos são receptores metabotrópicos (compreendendo cinco subtipos) enquanto os nicotínicos são ionotrópicos (compreendendo as subunidades α e β). A abertura dos canais nicotínicos resulta no influxo de sódio, potássio e cálcio. A estimulação dos receptores nicotínicos e de alguns tipos dos muscarínicos de forma pré e pós-sináptica implica no aumento de liberação do glutamato na fenda sináptica. Por isso, o sistema colinérgico é tão importante para a regulação excitatória do SNC. Algumas moléculas possuem a capacidade de modular o sistema colinérgico, como os alcaloides de Amaryllidaceae (Halder; Lal, 2021).

A família das Amaryllidaceae é conhecida por possuir um rico grupo de alcaloides. Eles possuem uma ampla gama de estruturas e atividades biológicas, como atividade: antiprotozoária, antiviral, antitumoral, anti-inflamatória, anticolinesterásica e entre outras atividades (Berkov *et al.*, 2020). Dentre os alcaloides de Amaryllidaceae, a galantamina e a sanguinina são os que possuem o maior efeito anticolinesterásico. Sendo que a galantamina possui a vantagem de

atravessar a barreira hematoencefálica com maior facilidade que a sanguinina (Bores *et al.*, 1996).

A galantamina é um potente inibidor competitivo da AChE que melhora a sinalização colinérgica e potencializa, de forma alostérica, os receptores nicotínicos de acetilcolina. Seu efeito como ligante potenciador alostérico (LPA) permite a galantamina modular a liberação de neurotransmissores e proporcionar neuroproteção por meio de uma ação antiapoptótica. Outra propriedade intrigante da galantamina é seu efeito antioxidante que permite essa diminuir os níveis de EROs (Marco-Contelles *et al.*, 2006).

A modulação colinérgica pela galantamina interfere diretamente nos sistemas de excitação e inibição. Pois, ao se ligar a receptores nicotínicos de acetilcolina em um sítio diferente do local de ligação da acetilcolina, ela causa uma mudança alostérica que permite que a acetilcolina induza uma maior resposta do receptor, potencializando o efeito dela no receptor iônico. Essa característica é descrita pelos receptores $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$. O efeito LPA promove a neurotransmissão colinérgica, regulando a liberação de neurotransmissores como GABA e glutamato. O efeito LPA também possibilita a interação da galantamina com o receptor NMDA e AMPA, sendo o primeiro necessário para a sobrevivência neuronal em moderada ativação e o último responsável por aumentar a secreção do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Este fator é fundamental para a sobrevivência dos neurônios glutamatérgicos (Koola *et al.*, 2014; Marco-Contelles *et al.*, 2006).

Nesse contexto, sugere-se que a galantamina, ao potencializar os efeitos da acetilcolina nos receptores nicotínicos, poderia proporcionar proteção neuronal contra vários estímulos neurotóxicos induzidos pelo glutamato durante a hiperexcitabilidade. Além disso, ela aumenta a expressão dos receptores nicotínicos de acetilcolina $\alpha 7$ e da proteína antiapoptótica Bcl-2, sugerindo que os efeitos antiapoptóticos da galantamina, antes mencionados, são mediados pela ativação do receptor $\alpha 7$ (Marco-Contelles *et al.*, 2006). Outro efeito neuroprotetor foi mediado pela ativação das vias cAMP/PKA e PI3K/AKT, de forma dependente de $\alpha 7$. A ativação aumentou a fosforilação e a expressão do fator de transcrição CREB, um dos principais contribuintes para a plasticidade e desenvolvimento neural com papel crítico na função de aprendizagem e memória. Além disso, a galantamina participou da transição de fenotipagem microglial de M1 (pró-inflamatória) para a M2 (anti-

inflamatória), assim contribuindo para a resolução da inflamação neuronal (Atta *et al.*, 2023; Zuo *et al.*, 2017).

A planta *Ismene amancaes* da família Amaryllidaceae foi uma das espécies a serem estudadas quanto a seu efeito anticolinesterásico. A composição dos alcaloides no extrato da planta foi descrito por Soto-Vásquez *et al.*, (2022). O alcaloide licoramina foi encontrado em maior quantidade no extrato, seguido da galantamina (Soto-Vásquez *et al.*, 2022). Outra planta de interesse, a ser estudada e descrita, foi a *Hippeastrum papilio*. Um dos principais alcaloides de Amaryllidaceae identificados no extrato do bulbo de *H. papilio* foi a galantamina, compondo 67,3 % dos alcaloides presentes no meio (Tallini *et al.*, 2023).

O efeito inibitório do extrato foi comprovado pelo estudo de Tallini *et al.*, (2023) em cérebros macerados de peixes-zebra. Esse achado evidência um importante efeito inibitório do extrato em um sistema biológico completo. Como descrito anteriormente, os peixes-zebra têm a vantagem de possuir apenas a enzima AChE, permitindo estudar os efeitos dela (Bertrand *et al.*, 2001b). Então, embora foi relatado que o extrato de *H. papilio* possui menor atividade inibitória da AChE comparado com o sintético, esse extrato destaca-se devido a significativa presença de galantamina. A família das Amaryllidaceae é reconhecida como a que possui a maior concentração de galantamina e a planta *Hippeastrum papilio* mostrou-se ter a maior concentração dentre as plantas da família. Além disso, o extrato foi caracterizado, tendo como composição: papilina, narvedina, hippapilina, 9-O-desmetillicosinina B, 11 β -hidroxigalantamina e hemantamina. Neste contexto, uma vez que ainda não há um entendimento completo da atividade destes alcaloides, isto permite potenciais perspectivas de estudos para o entendimento da sua atividade biológica (Tallini *et al.*, 2023).

1.7 JUSTIFICATIVA

As crises convulsivas possuem diversas etiologias ao quais afetam grande parte da população. Assim, entendendo que o AC é capaz de desencadear convulsões em peixes-zebra, por meio da excitotoxicidade glutamatérgica e que o período após elas é marcado por vasta neurodegeneração, surge a lacuna de utilizar tanto a galantamina sintética quanto o extrato de *H. papilio*, como tratamentos neste modelo de neurodegeneração. Modelos de degeneração por excesso de glutamato

extracelular são bem consolidados para estudos de eventos neurodegenerativos. Dessa forma, visto que os prejuízos neurológicos decorrentes da neuroinflamação exagerada e da ativação de células gliais são relevantes em crises convulsivas. Surge a proposta de estudar os efeitos de anticolinesterásicos sintéticos e naturais em um organismo vivo e complexo como o peixe-zebra. Assim, visa-se elucidar as propriedades colinérgicas, glutamatérgicas e antioxidantes desconhecidas desses compostos frente a esse modelo. A observação de tais efeitos contribuirão para a área de farmacognosia da família das Amaryllidaceae, ampliando o entendimento e uso dessas plantas em condições de morte neuronal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o potencial neuroprotetor da galantamina sintética e do extrato do bulbo de *H. papilio*, frente a parâmetros relacionados à neurotransmissão colinérgica, glutamatérgica e estresse oxidativo em modelo de AC em peixes-zebra.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil de crise convulsiva induzido pelo AC com a pontuação e latência das crises durante 60 min;
- Analisar o comportamento da atividade locomotora dos peixes (distância, eventos de mobilidade e imobilidade) 72 horas após AC;
- Quantificar a atividade da AChE em todo o cérebro em 12 horas após AC;
- Quantificar a atividade da ChAT em todo o cérebro em 12 horas após AC;
- Quantificar a captação total de glutamato em todo o cérebro em 12 horas após AC;
- Quantificar parâmetros de estresse oxidativo como a oxidação da 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), a atividade cinética das enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GR), além de quantificar os conteúdos de grupos sulfidríla em todo o cérebro em 12 horas após AC.

3 METODOLOGIA

3.1 PROCEDIMENTOS ÉTICOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC sob o número de protocolo 07/2025, conforme o Anexo A. Os procedimentos foram feitos em conformidade com as diretrizes brasileiras para o uso de animais com propósitos científicos e didáticos (Lei 11.794, DOU 27/5/13, MCTI, p.7). Esta pesquisa também seguiu as Diretrizes ARRIVE 2.0.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados 722 peixes-zebra selvagens de nadadeira curta (*Danio rerio*) de ambos os sexos com a proporção aproximada de 50% machos e 50% fêmeas (~50:50). Os animais foram obtidos do departamento de bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e alojados no Biotério da UNESC. Eles apresentavam as seguintes características: 6 meses de vida e peso de cerca de 0,5 g cada. Os animais foram alojados em grupos de 25 peixes em tanques de 5 L com termostato (a 28 ± 2 °C, pH de 7,4, amônia < 0,02 mg/L, nitrito < 0,01 mg/L e condutividade de 500 μ S) contendo água de osmose reversa reconstituída com 0,4 ppt de sal marinho (Cristalsea™, Marinemix). A água foi mantida sob constante filtragem química, biológica e mecânica, e aeração (7,20 mg O₂/L). Os peixes foram mantidos sob um ciclo de fotoperíodo dia/noite de 14-10 horas e alimentados duas vezes ao dia com artêmia viva e ração comercial em flocos para peixes.

Os animais foram distribuídos randomicamente em 6 grupos experimentais (totalizando 90 animais por grupo):

- I. Grupo Controle (PBS + PBS);
- II. Grupo Ácido Caínico + PBS (AC, 4 mg/kg + PBS);
- III. Grupo Galantamina (PBS+ Gal, 0,05 ng/g);
- IV. Grupo AC+ Galantamina (AC+ Gal 0,05 ng/g) ;
- V. Grupo Extrato de *H. papilio* (PBS+ Extrato 0,05 ng/g);

VI. Grupo AC+ Extrato de *H. papilio* (AC+ Extrato 0,05 ng/g).

3.3 APLICAÇÃO DOS TRATAMENTOS

Ao chegarem aos 6 meses, os peixes foram imersos em 160 µg/mL de tricafina para posterior administração intraperitoneal (IP) única de 10 µL de AC (4 mg/kg) ou PBS, conforme o grupo. Após 10 h da administração, foram administrados os tratamentos conforme cada grupo (extrato, galantamina ou PBS) da mesma forma que anteriormente, porém no lado oposto. Não foi adotada nenhuma estratégia para minimizar os fatores de confusão na aplicação dos tratamentos. No mais, os critérios de exclusão dos animais foram: infecção por fungos, pesos abaixo de 0,1 g e comprometimento locomotor prévio. A dose utilizada para o extrato e para a galantamina foi de 0,05 ng/g. A dose foi descrita por Capiotti *et al.*, (2014) como segura para administração intraperitoneal em peixes-zebra. Já o tempo para aplicação do tratamento foi escolhido com base no estudo de Boiangiu *et al.*, (2021) e no estudo anterior. Nos quais, foram relatados mudanças comportamentais após 2 horas de tratamento. Para ilustração das etapas do presente estudo, segue Figura 1 com o desenho experimental:

Figura 1 – Desenho Experimental



Legenda: Ácido caínico (AC); Tampão fosfato de sódio (PBS); Extrato de *H. papilio* (EXT); Galantamina (GAL).

Fonte: Figura elaborada pelo autor.

3.4 EUTANÁSIA

Os 722 peixes foram eutanasiados (imersão em solução de 160 mg/mL de triclaína [4 °C]) em dois momentos. O primeiro momento foi no tempo de 12 horas após administração de AC com 541 peixes dos grupos experimentais (90 peixes por grupo). No segundo momento, 72 horas após a administração, foi analisada a atividade locomotora do restante dos animais dos grupos e, em seguida, foram eutanasiados. Os conteúdos cerebrais foram utilizados para fazer as análises bioquímicas.

3.5 PREPARAÇÃO DO ÁCIDO CAÍNICO, GALANTAMINA E DO EXTRATO DE *H. PAPILIO*

O AC foi dissolvido em tampão PBS ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 16 mM; KCl 140 mM; Na_2HPO_4 3 mM [pH 7,4], em 1 L de água Milli-Q) para obter a concentração desejada e necessária para a dose de 4 mg/kg de animal. Já o bromidrato de galantamina (Reminyl®) e o extrato de *H. papilio*, foram dissolvidos em tampão PBS para a dose de 0,05 ng/g por peso do animal. O extrato foi obtido de bulbos frescos

de *Hippeastrum papilio* por meio de uma sequência de extrações com éter dietílico em solução de caráter ácido (pH 3,0), e após esta primeira etapa de extrações, foi realizado uma nova sequência de extrações com acetato de etila em caráter básico (pH 10,0). A caracterização do extrato foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM).

3.6 ANÁLISES

3.6.1 Pontuação de Crise Convulsiva

Após a administração, os peixes-zebra foram colocados individualmente em tanques de 1,5 L contendo água de osmose reversa previamente reconstituída com sal marinho. Para determinar a pontuação de convulsão, a natação foi monitorada usando uma webcam de alta resolução (Microsoft¹ LifeCam 1.1 com Auto-Focus). Após a administração com AC, os peixes foram monitorados por um período de 60 min, e seu comportamento de convulsão epilética foi avaliado de acordo com as seguintes pontuações: Estágio I: O animal mostra sinais de imobilidade e hiperventilação; Estágio II: Comportamento de natação semelhante a um redemoinho; Estágio III: Movimentos rápidos da direita para a esquerda; Estágio IV: Contrações musculares anormais e espasmódicas; Estágio V: Convulsões rápidas, de corpo inteiro, semelhantes a clônus; Estágio VI: Afundando no fundo do tanque e tendo espasmos por vários minutos; Estágio VII: Morte (Alfaro; Ripoll-Gómez; Burgos, 2011). A pontuação qualitativa das convulsões foi realizada por dois observadores diferentes sem nenhum tipo de cegamento (Sierra *et al.*, 2012).

3.6.2 Comportamento da Atividade Locomotora

A atividade locomotora do peixe-zebra foi medida usando os seguintes *endpoints* comportamentais: 1) A distância total percorrida em metros; 2) velocidade média dos eventos móveis em metros por segundo; e 3) tempo de imobilidade em segundos. Esses parâmetros foram avaliados no período de 72 h após a indução com AC. As coordenadas do tanque experimental foram calibradas adequadamente usando o software ANY-maze1. Uma webcam (Microsoft LifeCam 1.1 com Auto-Focus) foi colocada na frente do tanque experimental para

monitorar a localização e a atividade de natação do peixe-zebra durante um período de 6 minutos (Rosemberg *et al.*, 2011). Os peixes foram manuseados cautelosamente para não haver estresse na transferência do tanque doméstico ao tanque experimental (Ibrahim *et al.*, 2014).

3.6.3 Determinação da Atividade Enzimática da Acetilcolinesterase

Para cada amostra independente, três cérebros foram reunidos para garantir proteína adequada para análise ($n = 6$), formando um *pool* de amostras. Os cérebros foram homogeneizados em gelo, em 300 μL de tampão Tris-HCl. Posteriormente, foi centrifugado em 3.000 rpm por 10 minutos a 4 °C para retirada do sobrenadante, e por fim, o conteúdo proteico do *pool* de amostras foi dosado. A taxa de hidrólise de acetiltiocolina (AcSCh, 0,8 mM) em soluções de ensaio de 2 mL com tampão fosfato de potássio 150 mM (pH 7,5) e ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB [Sigma-Aldrich D8130]) 1,0 mM foi determinada conforme descrito anteriormente por Ellman *et al.*, (1961). Antes da adição do substrato, amostras contendo 10 μg de proteína e o meio de reação mencionado acima foram pré-incubadas por 10 min a 25 °C. A hidrólise do substrato foi monitorada pela formação do dianion tiolato de DTNB a 412 nm por 2–3 minutos (intervalos de 30 segundos). Os resultados foram expressos como $\mu\text{mol ACSCh. h}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

3.6.4 Determinação da Atividade Enzimática da Colina-Acetiltransferase

A atividade enzimática da ChAT foi ensaiada, de acordo com Chao; Wolfgram, (1972). Em que para cada amostra independente, dois cérebros foram reunidos para garantir proteína adequada para análise ($n = 6$), formando um *pool* de amostras. Então, este foi homogeneizado com a proporção de 100 μL por cérebro de tampão fosfato de sódio 0,5 M ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,43 M; Na_2HPO_4 0,5 M [pH 7,2], com água Milli-Q, acertando o pH do dibásico com o monobásico). Depois, as amostras foram centrifugadas à 3.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. Posteriormente foi retirado o sobrenadante e realizado a dosagem do conteúdo proteico no *pool* das amostras. A fração homogeneizada foi pré-incubada por 10 minutos a 37 °C na solução de reação contendo tampão de fosfato de sódio 0,5 M (pH 7,2), acetil-CoA 6,2 mM (Sigma-Aldrich A2181), cloreto de colina 1 M (Exodo científica CC07538RA), sulfato

de neostigmina 0,76 mM, cloreto de sódio 3 M e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA [Sigma-Aldrich E5134]) 1,1 mM em placa UV. Em seguida, 4,4'-ditiodipiridina (4-PDS [Sigma-Aldrich 143049]) 1 mM foi adicionado, e a absorvância foi medida a 324 nm por 20 minutos, com leitura de 30 em 30 segundos. A atividade foi medida pela formação do conjugado 4-tiopiridona (4-TP), um produto resultante da ligação da coenzima A a 4-PDS. Os resultados foram calculados usando o coeficiente de extinção molar de 4-TP, $1,98 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, e foram expressos como milimoles por minuto por miligrama de proteína ($\text{mmol 4-TP} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$).

3.6.5 Captação Total de Glutamato

Para cada amostra independente, um cérebro de peixe-zebra foi usado para a análise ($n = 6$). Os cérebros foram umidificados com solução salina balanceada de Hank (HBSS) (NaCl 137 mM; Na_2HPO_4 0,63 mM; NaHCO_3 4,17 mM; KCl 5,36 mM; KH_2PO_4 0,44 mM; CaCl_2 1,26 mM; MgSO_4 0,41 mM; MgCl_2 0,49 mM e D-glicose 1,11 mM [pH 7,2; Sigma-Aldrich G8270]). Cada cérebro foi separado com a ajuda de uma lupa e transferido como um todo para uma placa de cultura de 24 poços contendo 0,5 mL de HBSS. A placa foi mantida a 37 °C. Os cérebros foram lavados uma vez com 1 mL de HBSS a 37 °C. O ensaio de captação de glutamato foi realizado conforme descrito anteriormente por Rico *et al.*, (2010). A captação total de glutamato foi medida pela adição de $0,33 \text{ Ci mL}^{-1}$ I-[^3H] glutamato ao meio de incubação a 37 °C. A incubação foi interrompida após 7 min lavando o glutamato restante duas vezes com 1 mL de HBSS gelado. Os cérebros foram imediatamente transferidos para NaOH 0,5 N durante a noite. O conteúdo intracelular de L-[2,3- ^3H] glutamato foi determinado por contagem de cintilação. Já o conteúdo proteico dos cérebros utilizados, foi determinado pelo método de Lowry para posteriores cálculos. Os resultados foram expressos como nmol de Glu [^3H]. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg de proteína}^{-1}$.

3.6.6 Preparo do Tecido e Homogeneização para Análises e Medição de Parâmetros de Estresse Oxidativo

Para cada amostra independente, cinco cérebros foram reunidos ($n = 6$) para formar um *pool* de amostras (Vizueté *et al.*, 2022). Foram homogeneizadas as amostras na proporção 1:10 com tampão PBS, e após foi colocado as amostras para

a centrifugação à 3.500 rpm por 10 minutos a 4 °C. Ao fim, foi retirado o sobrenadante e realizado a dosagem do conteúdo proteico.

3.6.7 Parâmetros de Estresse Oxidativo

3.6.7.1 Determinação da Oxidação do 2',7'-diclorofluoresceína

A produção de EROs foi medida a partir da oxidação do DCF-H formando diclorofluoresceína (DCF), onde a intensidade da fluorescência está de acordo com a formação de EROs (LeBel; Ischiropoulos; Bondy, 1992). O ensaio foi realizado de acordo com LeBel; Ischiropoulos; Bondy, (1992) modificado por Duailibe *et al.*, (2024). Em placa de fluorescência, no escuro, foi pipetado 40 µL de amostra e 160 µL de DCFH-DA (Sigma-Aldrich 35845), em duplicata. Depois, foi incubado a placa a 37 °C por 30 minutos no escuro e realizado a leitura em espectrofotometro de fluorescencia a 488 nm de excitação e 525 nm de emissão. Uma curva de calibração em duplicata foi realizada com DCF padrão (0,25–10 µM [Sigma-Aldrich 35848]) e os níveis de espécies reativas foram expressos como nmol DCF formado.mg de proteína⁻¹.

3.6.7.2 Determinação da Atividade da Superóxido Dismutase

A atividade enzimática da SOD foi analisada através do método de inibição da oxidação da adrenalina (Bannister; Calabrese, 1987). Em que consiste em duas leituras, uma considerada o “Branco” e uma a “Amostra” (em duplicata). No Branco foi adicionado 190 µL de tampão glicina (50 mM; Sigma-Aldrich 410225) em um poço, e em outro poço, 180 µL de tampão glicina, 10 µL de amostra e 5 µL de catalase (Sigma-Aldrich C9332). Então, foi feito a primeira leitura no espectrofotometro (480 nm a 32 °C), após isso, foi adicionado 5 µL de adrenalina (Sigma-Aldrich E4250) nos dois poços e feito imediatamente a segunda leitura no espectrofotômetro (leitura cinética de 10 min com intervalos entre leituras de 40 segundos a 412 nm a 32 °C, 16 leituras no total). Os valores de SOD foram medidos e expressos como nmol.min⁻¹.mg of proteína⁻¹.

3.6.7.3 Determinação da Atividade da Catalase

A determinação da atividade enzimática da CAT foi mensurada conforme descrito por (Aebi, 1984). A técnica consiste em expor as amostras (em duplicata) ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2 [Neon 01984]) visando analisar a degradação dele ao longo do tempo. A leitura em espectrofotômetro foi feita em dois momentos, a primeira sendo em *endpoint* a 240 nm (37 °C) e a segunda em cinética de 5 minutos com intervalos entre leituras de 15 segundos a 240 nm (21 leituras no total; 25 °C). Os valores de CAT foram medidos e expressos como $nmol \cdot min^{-1} \cdot mg \text{ of proteína}^{-1}$.

3.6.7.4 Determinação da Atividade da Glutathione Peroxidase

A técnica descrita por Paglia; Valentine, (1967) e adaptada por Wendel, (1981) é baseada na medida indireta da atividade de GPx. A glutathione oxidada (GSSG) é produzida por meio da redução do peróxido de hidrogênio pela GPx e é reciclada para seu estado reduzido pela glutathione redutase (GR) produzindo a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidado ($NADP^+$). A oxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) para $NADP^+$ é acompanhada por um decaimento da absorvância de luz do NADPH (Millipore 481973) a 340 nm em presença de peróxido de hidrogênio. A determinação da atividade enzimática é possível pois o consumo do NADPH é proporcional ao decaimento. Para a realização da mesma, precisamos fornecer substratos (NADPH [Sigma-Aldrich 10107824001], GR [Sigma-Aldrich 63664], GSH [Sigma-Aldrich G4251]) e inibidores da catalase (azida sódica e ácido metafosfórico) para impedir a redução do peróxido de hidrogênio, que foi substituído pelo *tert*-butil hidroperóxido, pela enzima. Uma unidade de GPx é definida como a quantidade de enzima que causará a oxidação de 1,0 nmol de NADPH para $NADP^+$ por minuto a 25 °C. A atividade de GPx foi expressa como $\mu mol \text{ NADPH oxidado} \cdot min^{-1} \cdot mg \text{ de proteína}^{-1}$.

3.6.7.5 Determinação da Atividade da Glutathione Redutase

A técnica da GR descrita por Carlberg; Mannervik, (1985) é baseada na taxa de oxidação de NADPH para NADP⁺ em 340 nm. Uma unidade de GR é definida como a quantidade de enzima que causará a oxidação de 1,0 nmol de NADPH a NADP⁺ por minuto a 25 °C. A atividade de GR foi expressa como nmol NADPH oxidado.min⁻¹.mg de proteína⁻¹.

3.6.7.6 Determinação do Conteúdo de Sulfidrina

O teor total de tiol foi determinado usando 5,5'-Ditiobis (ácido 2-nitrobênico) (DTNB). A reação foi iniciada adicionando DTNB e solução salina tamponada à amostra (em duplicata). As amostras de controle não incluíram DTNB. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, a absorção a 412 nm foi medida, e as quantidades de 5,5'-Ditiobis (ácido nitrobênico) formadas foram calculadas ao comparar a amostra controle com a amostra reagida (Aksenov; Markesbery, 2001). O conteúdo de sulfidrina é inversamente correlacionado ao dano oxidativo às proteínas. Os resultados foram expressos como nmol TNB. mg de proteína⁻¹.

3.6.7.7 Determinação do Conteúdo Proteico

O teor de proteína a partir do tecido homogeneizado foi analisado utilizando albumina de soro bovino como padrão, de acordo com Lowry *et al.*, (1951) modificado por Peterson, (1977). Foi preparado o Reagente A (NaCO₃ 3% em NaOH 0,2 M), o Reagente B (Tartarato de sódio e potássio 4%) e o Reagente C (Sulfato de cobre 2%). Após finalizar o preparo dos reagentes, foi misturado 24 mL do Reagente A com 500 µL de Reagente B e C, para formar 25 mL de Reagente D. Em uma placa de 96 poços, foi adicionado 2 µL de amostra e 98 µL de água Milli-Q, posteriormente adicionado 100 µL de Reagente D e foi deixado agir por 10 min incubado em temperatura ambiente no escuro. Foi adicionado 50 µL de reagente Folin fenol (0,4 N; [Sigma-Aldrich F9252]) e incubado por uma hora no escuro. Durante este tempo de incubação, o Folin fenol ligou-se à proteína e foi lentamente reduzido passando de amarelo para azul. A absorbância foi lida a 740 nm em espectrofotômetro. A escolha do método de Lowry para o teor de proteína se deve ao fato de estar-se utilizando o cérebro inteiro do peixe-zebra para as análises e

como descrito por Zaia; Zaia; Lichtig, (1998), a determinação por Lowry é sugerido quando se utiliza tecido animal por possuir alta sensibilidade, baixo consumo de amostra e poucos interferentes.

3.7 PROCEDIMENTO PARA ANÁLISE DE DADOS

Os dados foram analisados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados paramétricos foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) unidirecional, seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni e os dados não-paramétricos foram analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post hoc* de Dunn. Os dados paramétricos foram expressos como média e desvio padrão (DP), já os não-paramétricos foram expressos como mediana e intervalo interquartil com pontos mínimos e máximos. O nível de significância estabelecido para os testes estatísticos foi de $p < 0,05$. Foi utilizado o *GraphPad Prism 8* como pacote estatístico.

4 RESULTADOS

O perfil alcaloide do extrato de *H. papilio* utilizado no presente estudo está exposto na Tabela 1 com suas devidas quantidades expressas em valores de μg de galantamina por 100 mg^{-1} de peso seco da planta.

Tabela 1 - Perfil alcaloide do extrato do bulbo de *Hippeastrum papilio* por CG-EM

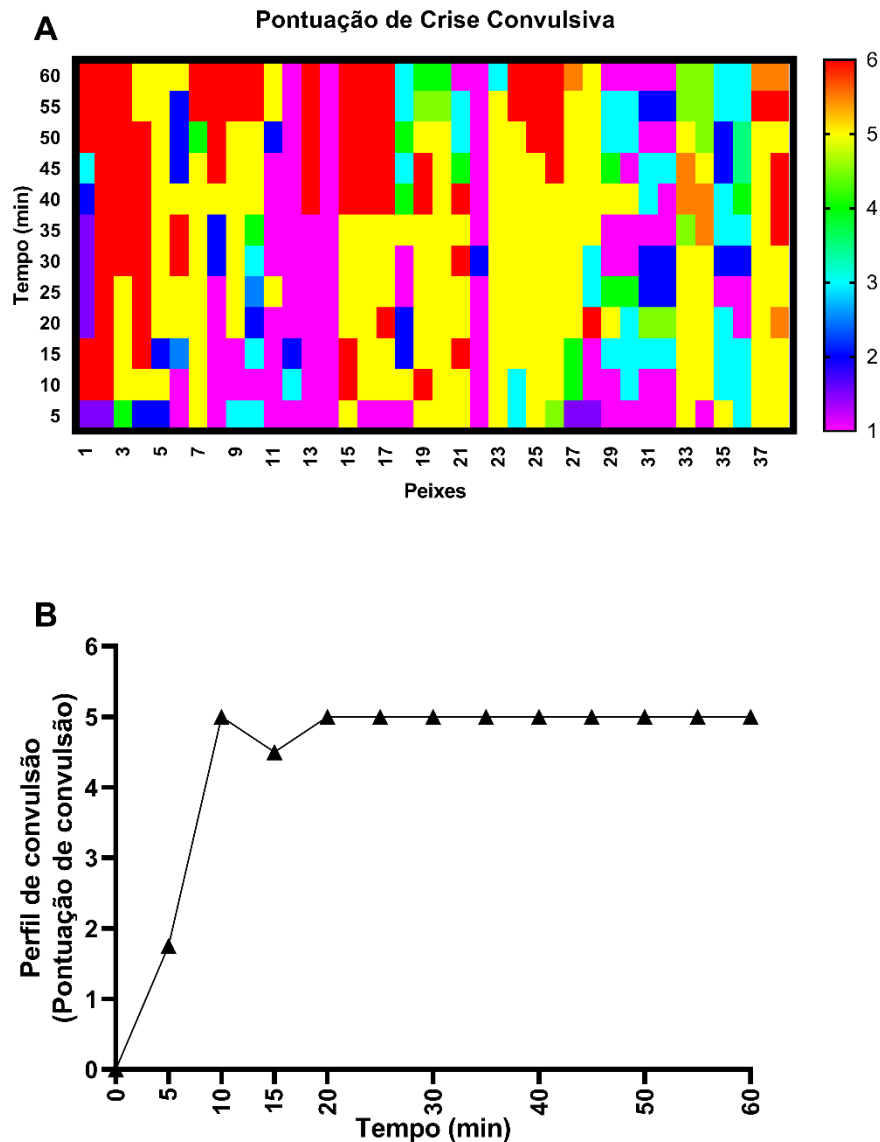
Alcalóide	M	PB	IR	Quantidade
Galantamina	287	286	2392,2	258,1
Narvedina	285	284	2461,1	15,1
Não identificado	315	254	2476,3	41,8
Não identificado	273	272	2519,9	13,8
Não identificado	283	283	2558,7	4,3
Habrantina	303	230	2569,3	11,8
Não identificado	345	109	2607,3	8,8
Hemantamina	301	272	2623,3	75,0

Legenda: M: íon molecular; PB: pico base; IR: índice de retenção. Valores expressos como μg Gal $\cdot 100 \text{ mg}^{-1}$ PS.

Fonte: Tabela elaborada pelo autor.

A caracterização das crises convulsivas está evidenciado na Figura 2. A figura ilustra como os peixes reagiram ao insulto de AC na dose de 4 mg/kg . No mais, os dados do mapa de calor (A) estão plotados no gráfico B da Figura 2. Os animais apresentaram convulsões clônicas variáveis, flutuando entre os escores ao longo do tempo. O período de latência ficou na média de 08:20 minutos ($\pm 10:44$ minutos). Nenhum animal do grupo controle apresentou convulsões.

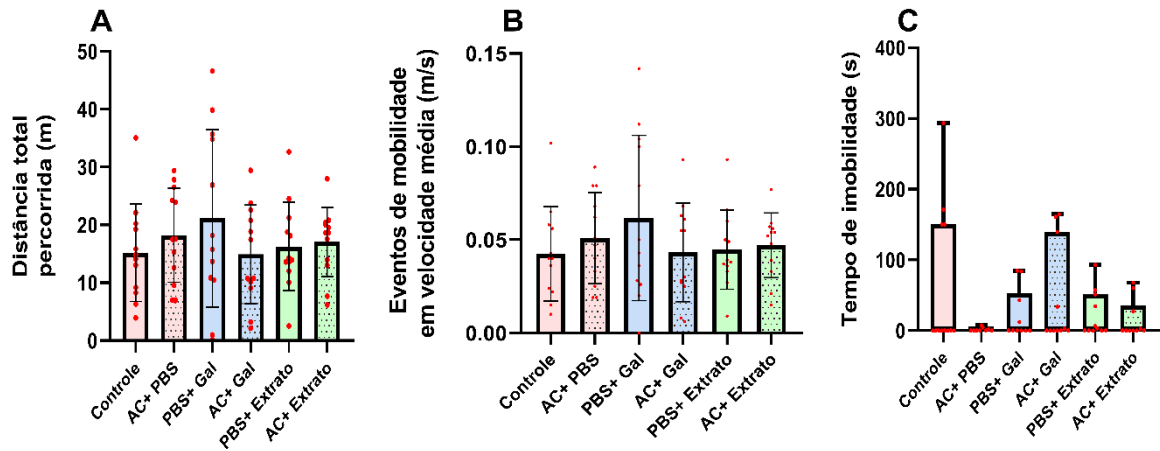
Figura 2 – Comportamento convulsivo do peixe zebra após indução com ácido caínico



Fonte: Figura elaborada pelo autor.

A análise do comportamento locomotor no teste do novel tank não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais nos parâmetros avaliados. Conforme apresentado na Figura 3, a distância total percorrida (A), os eventos de mobilidade expressos como velocidade média (B) e o tempo de imobilidade (C) foram semelhantes entre os grupos Controle, AC+ PBS, PBS+ Gal, AC+ Gal, PBS+ Extrato e AC+ Extrato.

Figura 3 – Gráficos do comportamento da atividade locomotor do peixe zebra após 72 horas da indução com ácido caínico

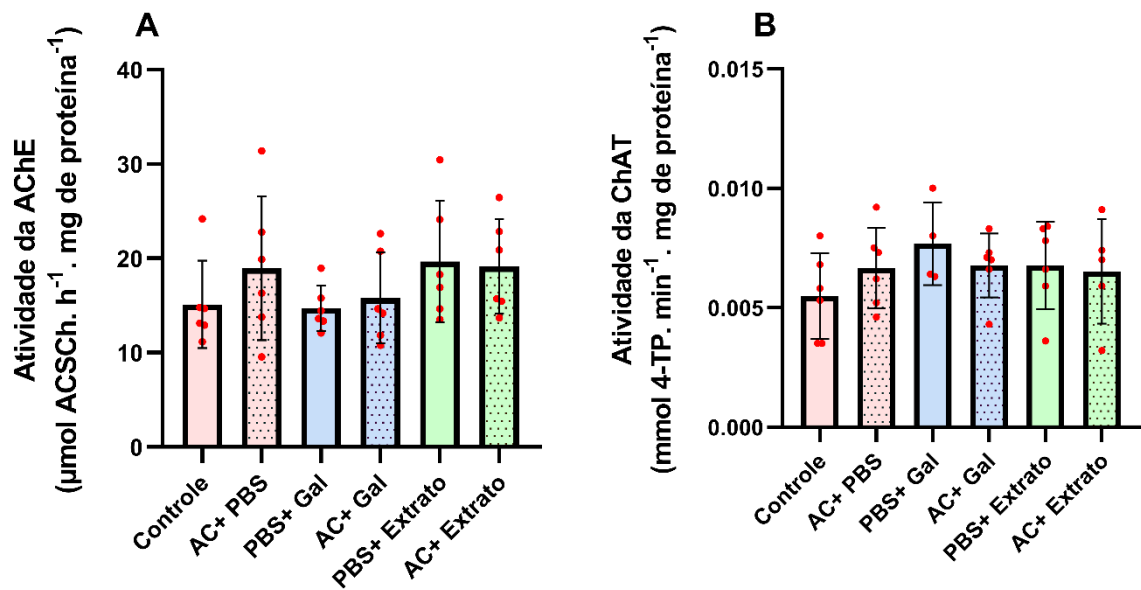


Legenda: Dados apresentados em média \pm desvio padrão (A e B) e em mediana + intervalo interquartil com máximo e mínimo (C) de acordo com a análise de variância (ANOVA) unidirecional com *post hoc* de Bonferroni para dados com distribuição normal (A e B) e Teste de Kruskal-Wallis seguida por teste de Dunn para dados com distribuição não-normal (C).

Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Os dados apresentados na Figura 4 referem-se à atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e colina-acetiltransferase (ChAT). Conforme observado, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais para a atividade da AChE (Figura 4A) nem para a ChAT (Figura 4B) após 12 h da indução com AC.

Figura 4 – Sistema colinérgico em peixe zebra após 12 horas da indução com ácido caínico

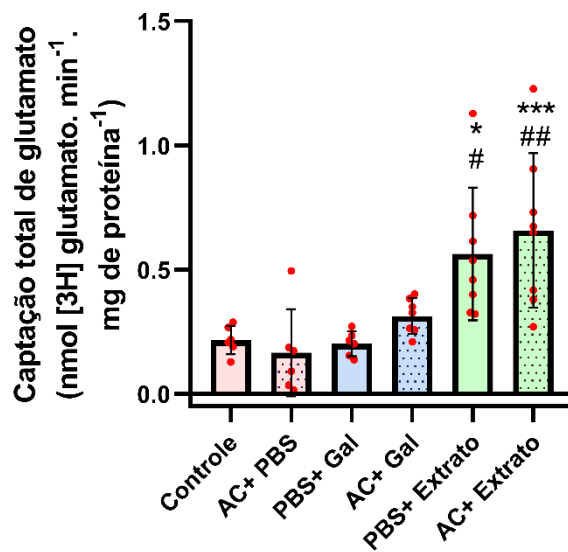


Legenda: Dados apresentados em média \pm desvio padr\u00e3o de acordo com a an\u00e1lise de vari\u00e2ncia (ANOVA) unidirecional com *post hoc* de Bonferroni.

Fonte: Figura elaborada pelo autor.

A capta\u00e7\u00e3o total de glutamato diferiu significativamente entre os grupos experimentais (Figura 5), conforme indicado pela ANOVA unidirecional ($F_{[5,35]} = 7,758$; $p < 0,0001$; $\eta^2 = 0,53$). Assim, foi observado um aumento significativo da capta\u00e7\u00e3o total de glutamato no grupo PBS+ Extrato em rela\u00e7\u00e3o aos grupos Controle ($\#p < 0,05$) e AC+ PBS ($*p < 0,05$). No mais, foi observado tamb\u00e9m no grupo AC+ Extrato, um aumento significativo na capta\u00e7\u00e3o total de glutamato em compara\u00e7\u00e3o aos grupos Controle ($\#p < 0,01$) e AC+ PBS ($***p < 0,001$).

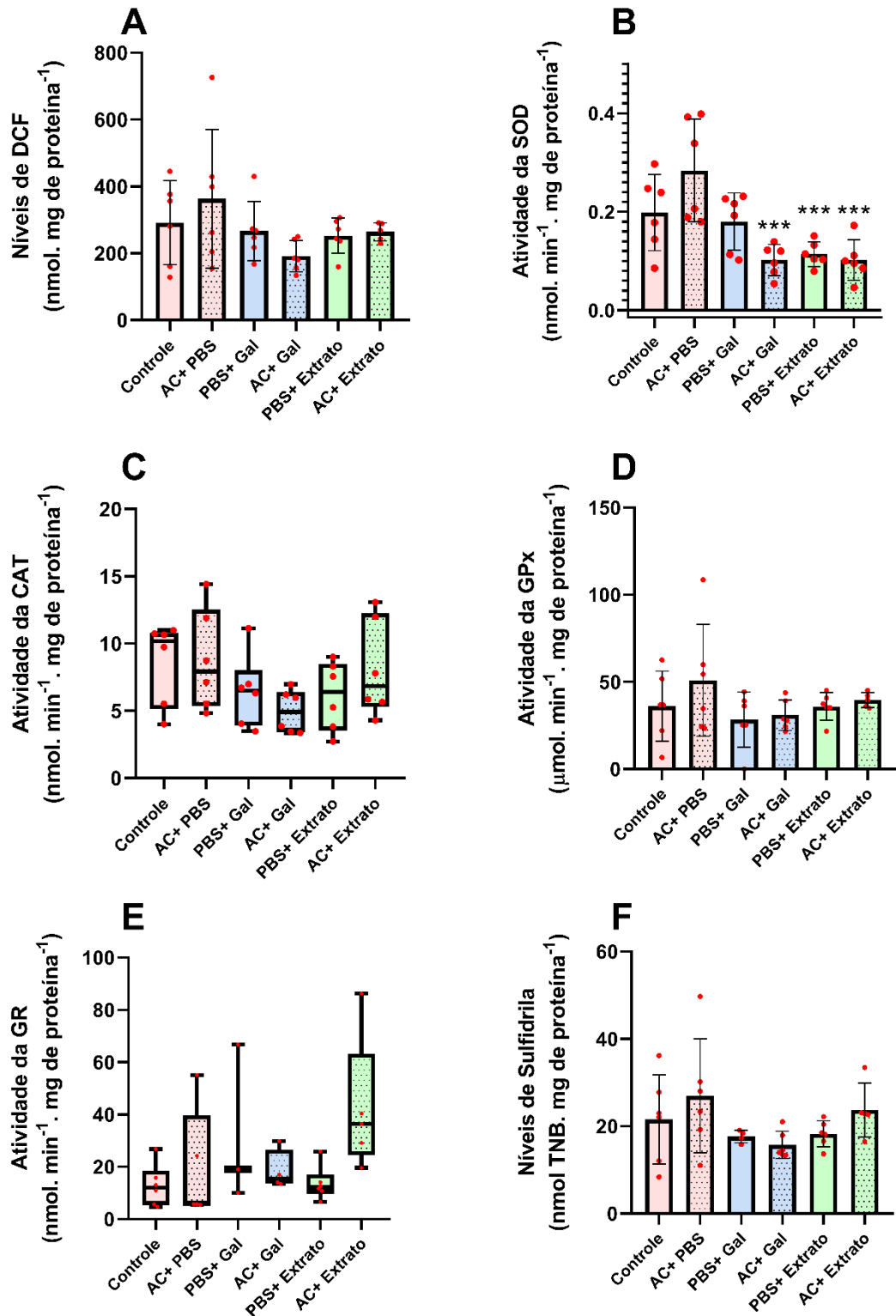
Figura 5 – Gráfico da captação total de glutamato em peixe zebra após 12 horas da indução com ácido cáínico



Legenda: Dados apresentados em média \pm desvio padrão de acordo com a análise de variância (ANOVA) unidirecional com *post hoc* de Bonferroni. # $p < 0,05$ e ## $p < 0,01$ comparado ao grupo Controle; * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ comparado ao grupo AC+ PBS.
Fonte: Figura elaborada pelo autor.

Por fim, os dados sobre os parâmetros do estresse oxidativo estão expostos na Figura 6. A ANOVA indicou variância significativa entre os grupos do gráfico B ($F [5,30] = 8,003$; $p < 0,0001$, $n^2 = 0,57$). Dessa forma, não houve diferença significativa entre os grupos na determinação da oxidação do DCFH (A), na atividade da catalase (C), na atividade da GPx (D), na atividade da GR (E) e no conteúdo de grupos sulfidrilas (F). Porém, obteve-se redução significativa da atividade da superóxido dismutase (B) nos grupos: AC+ Gal (** $p < 0,001$), PBS+ Extrato (** $p < 0,001$) e AC+ Extrato (** $p < 0,001$) em comparação ao grupo AC+ PBS.

Figura 6 – Gráficos sobre o estresse oxidativo em peixe zebra após 12 horas da indução com ácido caínico



Legenda: Dados apresentados em média \pm desvio padrão (A, B, D e F) e em mediana + intervalo interquartil com máximo e mínimo (C e E) de acordo com a análise de variância (ANOVA) unidirecional com post hoc de Bonferroni para dados com distribuição normal (A, B, D e F) e Teste de Kruskal-Wallis seguida por teste de Dunn para dados com distribuição não-normal (C e E). *** $p < 0,001$ comparado ao grupo AC+ PBS.

Fonte: Figura elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

A neurodegeneração advinda de uma crise convulsiva é caracterizada por danos aos circuitos neurais e mudanças no mecanismo metabólico do SNC (Łukawski; Czuczwar, 2023; Pourkhodad *et al.*, 2025; Thompson, 2023). Um dos sistemas neurais alterados é o glutamatérgico. Em doses elevadas de AC, como de 5 mg/kg, há evidências de que a captação específica do sistema é modulada negativamente (Mussulini *et al.*, 2018). Por outro lado, conforme demonstrado nessa pesquisa, doses de 4 mg/kg não possuem a capacidade de influenciar a dinâmica dos EAATs dependentes de sódio, sendo estes os principais mecanismos de captação de glutamato na fenda sináptica.

Uma possível explicação seria que, as crises convulsivas não mostraram pontuações suficientes para causar repercussões excitatórias. Em estudos da área, é apontado que a redução no transporte de glutamato está diretamente relacionada com as células gliais (Schousboe, 1981). A principal célula glial do SNC responsável por modular o sistema excitatório é o astrócito, este sendo sugerido como peça-chave para o entendimento do sistema glutamatérgico (Binder; Steinhäuser, 2021; Martins *et al.*, 2023; Tilleux; Hermans, 2007). A modulação do astrócito no tônus glutamatérgico deve-se principalmente pelos EAAT₁ e EAAT₂ dependentes de sódio (Lauriat; McInnes, 2007).

Assim, durante as convulsões induzidas por AC, essas células gliais passam por um processo de ativação/reactividade. Este processo é uma resposta fisiológica ao ambiente patológico (Escartin *et al.*, 2021). A presença de células gliais positivas para GFAP é evidenciado em modelos de AC em peixes-zebra, sendo sugerido que o ambiente neural resultante de um insulto por AC é capaz de promover processos de reatividade astrocitária (Mussulini *et al.*, 2018). A ativação dos astrócitos é um dos muitos mecanismos sugeridos para a redução da captação de glutamato. Além da proteína GFAP, outra proteína de importância para estudos de reatividade do astrócito é a S100B. É levantado que sua presença em baixas concentrações na célula glial exerce efeitos protetores. Já em altas concentrações, os efeitos tendem a ser deletérios às células (Langeh; Singh, 2020).

Ao caracterizar o perfil das crises através da pontuação de crise convulsiva pode-se ver que ela apresenta níveis heterogêneos ao longo do tempo. Neste contexto, os dados desse estudo revelaram uma média de latência para as

crises convulsivas relativamente divergente em relação a outros estudos da área como os desenvolvidos por (Alfaro; Ripoll-Gómez; Burgos, 2011). Assim, é sugerido que a dose de 4 mg/kg não modula de forma similar o sistema de transporte de glutamato em 12 horas após a indução da crise em comparação estudos prévios que utilizaram doses superiores (Chitolina *et al.*, 2023; de Farias *et al.*, 2022; de Pieri Pickler *et al.*, 2025; Mussulini *et al.*, 2018). A dose de escolha para estes estudos foi a de 5 mg/kg. No mais, outros possíveis fatores determinantes elegíveis para essas divergências seria o veículo utilizado para dissolver o AC sendo a diferença no tipo de tampão e seu pH, uma plausível explicação. Dessa forma, é evidente que o perfil das crises desses estudos é mais homogêneo.

Por outro lado, 3 mg/kg de AC foi capaz de prejudicar a memória associada de peixes-zebras (Kundap *et al.*, 2019). Há uma relação intrínseca entre o sistema colinérgico e a aprendizagem espacial, a locomoção e a memória de trabalho espacial. (Solari; Hangya, 2018). Por isso, essas condições experimentais podem evidenciar alterações no sistema colinérgico. Já no presente estudo, não foi observadas alterações na atividade das enzimas AChE e ChAT. Essas observações sugerem que frente a estratégia proposta no modelo do atual estudado o insulto de AC não alterou o sistema colinérgico.

Outros mecanismos ainda não estudados devem ter afetado o sistema glutamatérgico, como por exemplo alterações nas enzimas e proteínas de astrócitos (GFAP, S100B, ADK, vimentina, Cx e GS) ou alterações em vias de sinalização relacionadas a inflamação (Aronica *et al.*, 2012; Escartin *et al.*, 2021). A participação do sistema colinérgico nas alterações observadas não pode ser totalmente excluída, já que outros parâmetros do sistema não foram quantificados. Ou seja, outra provável explicação seria que os níveis de acetilcolina ou as rotas de sinalização ERK1/2-CREB-BDNF possam estar alteradas (Chen *et al.*, 2022). Já sobre os dados obtidos da atividade locomotora (Figura 3), pode-se observar que há uma divergência em relação a estudos com 5 mg/kg (Mussulini *et al.*, 2018). Esta dose afetou a atividade locomotora dos peixes-zebra até longas horas após a indução com AC. Porém, nenhuma alteração no comportamento locomotor foi observada após 72 horas da indução das crises convulsivas. O intervalo de tempo para a realização do comportamento locomotor pode ser considerado um dos fatores cruciais para essa divergência.

Em relação às consequências observadas no sistema redox, não foi observado nenhum achado significativo nos parâmetros avaliados. Entretanto, alterações nos níveis de parâmetros de estresse oxidativo, como o DCF e o TBA-RS foram evidenciados em outro estudo (de Farias *et al.*, 2022). Alterações em níveis de oxidação de DCF-H e em níveis de TBA-RS são indicativos de danos oxidativos. Já sobre os parâmetro antioxidantes, os achados sobre a atividade da SOD e CAT foram de encontro aos achados de de Farias *et al.*, (2022). Em contraste, diferenças na atividade da CAT foram observadas no estudo de de Pieri Pickler *et al.*, (2025). Essas alterações mostram como o modelo de AC em peixes-zebra interfere nos níveis intracelulares de EROs e desencadeia danos às membranas lipídicas das células.

Ademais, o estudo de Stachowicz *et al.*, (2021) encontrou uma correlação direta entre o estresse oxidativo com a diminuição do transporte de glutamato nas fendas sinápticas após a administração de AC. Na crise convulsiva, uma das possíveis causas desse fenômeno seria a ativação exacerbada de canais iônicos de AMPA e de cainato. A ativação em excesso leva a uma cadeia de despolarizações e a um influxo elevado de cálcio para dentro dos neurônios pós-sinápticos, por meio de canais iônicos, como o NMDA. Em consequência disso, processos como a disfunção mitocondrial e a neuroinflamação são induzidos. Adjunto a disfunção, temos o aumento da atividade da NADPH oxidase 2 (NOX2). Assim, a produção de EROs vem tanto da NOX2 quanto da mitocôndria disfuncional (Ambrogini *et al.*, 2019; Sciaccaluga *et al.*, 2023; Zhang *et al.*, 2021).

Sobre os efeitos dos tratamentos nos animais, foi evidenciado uma redução na atividade enzimática da SOD e na captação total de glutamato após 12 horas da administração de AC. Tanto na galantamina quanto no extrato, não houve influência na atividade locomotora dos animais. Esse achado implica que a dose avaliada para os tratamentos não foi capaz de causar prejuízos nos parâmetros comportamentais dos animais. A galantamina sintética é comumente usada para o tratamento de Alzheimer, visto seu efeito anticolinesterásico que provoca a melhora da transmissão colinérgica (Hansen *et al.*, 2008). No entanto, a dose escolhida não foi capaz de modular o sistema colinérgico, sendo esse um dos principais efeitos biológicos da galantamina. Assim, as alterações observadas nos níveis de captação total de glutamato podem ser atribuídas a outros mecanismos celulares além do sistema colinérgico.

O extrato do bulbo de *H. papilio*, como evidenciado por Tallini *et al.* (2023), mostrou seu efeito inibitório na atividade da AChE diretamente através de ensaios *in vitro*. O valor de IC₅₀ de inibição da AChE deste similar extrato é de $1,20 \pm 0,10$ µg/mL. O IC₅₀ da galantamina sintética é de $0,79 \pm 0,15$ µg/mL. Esta diferença sugere que a ausência de alterações no extrato do bulbo de *H. papilio* é um achado divergente. Como evidenciado por Berkov S, (2013) em sua patente, o extrato do bulbo de *H. papilio* possui um alto conteúdo de galantamina. Adjunto a isto, dentre os extratos de espécies de *Hippeastrum* relatados na literatura, o extrato possui o maior conteúdo dentre eles (Tallini *et al.*, 2021). Posto isto, os efeitos de inibição do extrato de *H. papilio* são maiores em comparação a outros extratos (Soto-Vásquez *et al.*, 2022). Sugestivo de que o padrão de inibição dos extratos deve-se a galantamina. Seu efeito inibitório em peixes-zebra deve-se a uma ligação de hidrogênio entre a hidroxila da galantamina com a hidroxila da enzima AChE e também as duas interações hidrofóbicas com os resíduos da AChE conforme descrito (Tallini *et al.*, 2023). Em suma, a inibição da galantamina é do tipo competitiva e reversível ao sítio ativo da AChE, permitindo a ela diminuir a afinidade da enzima pela acetilcolina sem alterar a taxa máxima de reação (Samochocki *et al.*, 2003).

Considerando o sistema glutamatérgico, o aumento da captação de glutamato observado, revela que outros componentes além da galantamina podem ter modulado a atividade de transporte de glutamato dependente de sódio. Os extratos de Amaryllidaceae possuem outras moléculas orgânicas além dos alcaloides, como compostos fenólicos e flavonoides (Llalla-Cordova *et al.*, 2025). Estas moléculas podem ter propriedades desconhecidas frente a sistemas biológicos complexos. Já a galantamina isolada, segundo Kihara *et al.*, (2004), foi capaz de prevenir a neurotoxicidade do glutamato em um modelo de expressão de placas beta-amiloides. A via de sinalização descrita foi a via de fosforilação de PI3K-Akt. Um achado interessante desse artigo foi o relato de que possivelmente a AChE não esteja diretamente ligada a proteção fornecida pela galantamina. Assim sendo, entendendo que a galantamina não é a única molécula orgânica presente no meio e de que foi descrito vias alternativas de proteção para ela além da colinérgica. É sugerido que as outras moléculas (alcaloides ou não-alcaloides) possam ter participação por outros mecanismos biológicos no aumento do transporte do glutamato.

A redução na atividade enzimática da SOD para os grupos tratamentos mais AC após 12 horas é sugestivo de uma atividade antioxidante frente ao modelo. Por outro lado, alterações na SOD em tratamentos com galantamina não são relatados (Celik Topkara *et al.*, 2022). Já sobre a redução observada nos grupos extrato, pode ser explicada pela participação das moléculas não-galantamina. Pois, sua ação não pode ser excluída. Os extratos de Amaryllidaceae são muito estudados em relação ao seu efeito antioxidante. Os mecanismos de estabilização de radicais livres dos alcaloides envolvem transferência de átomo de hidrogênio, transferência de elétron único e a capacidade de quelar metais de transição. Além disso, outras vias de sinalização ou reações são responsáveis pela diminuição do estresse oxidativo (Llalla-Cordova *et al.*, 2025). Entretanto, uma explicação plausível para o efeito antioxidante da molécula de galantamina seria a presença de um grupo enol (Traykova *et al.*, 2003). Este grupo demonstra ser responsável por estabilizar o radical livre a partir da quebra homolítica do grupo hidroxila presente nele (Cortes *et al.*, 2018).

Dentre as limitações do estudo, pode-se ressaltar um entendimento mais detalhado dos sistemas de sinalização, como por exemplo, a dosagem dos neurotransmissores acetilcolina e glutamato, ou outros mecanismos pertencentes aos sistemas glutamatérgicos e colinérgicos que podem ter limitado a compreensão mais completa dos efeitos da galantamina e do extrato e a falta de inibidores de receptores glutamatérgicos específicos para a compreensão dos mecanismos subjacentes ao aumento da captação de glutamato. É de interesse para futuros estudos na área, explorar os potenciais mecanismos envolvidos na modulação do aumento da atividade de transporte de glutamato além de outros efeitos biológicos promovidos por essas moléculas de interesse.

6 CONCLUSÃO

Esse estudo demonstrou que o extrato de *H. papilio* com galantamina apresenta um efeito modulador frente aos mecanismos de transporte do glutamato e ao mecanismo de defesa antioxidante. Diante disso, o sistema excitatório pode estar sendo modulado pelo extrato por outros mecanismos que possam estar além da modulação e da sinalização colinérgica, uma vez que não foi observado efeito na AChE e na ChAT. Portanto, não se exclui a possibilidade de que a galantamina esteja relacionada a outros parâmetros bioquímicos de astrogliose ou de neurodegeneração. Já considerando os efeitos neuroprotetores advindos do sistema colinérgico, é sugerido que o período de 12 horas após a administração de AC não apresentou uma resposta efetiva frente a estratégia do modelo proposto. Além disso, o presente estudo analisou tempos e doses isoladas, sendo necessário para futuros estudos na área, análises em diferentes parâmetros temporais e de administração.

REFERÊNCIAS

AEBI, H. [13] Catalase in vitro. *In: [S. l.]: [s. d.]*, 1984. p. 121–126.

AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, [s. l.], vol. 302, no 2–3, p. 141–145, 2001.

ALFARO, J. M.; RIPOLL-GÓMEZ, J.; BURGOS, J. S. Kainate administered to adult zebrafish causes seizures similar to those in rodent models. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], vol. 33, no 7, p. 1252–1255, 2011.

AMBROGINI, P. *et al.* Excitotoxicity, neuroinflammation and oxidant stress as molecular bases of epileptogenesis and epilepsy-derived neurodegeneration: The role of vitamin E. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, [s. l.], vol. 1865, no 6, p. 1098–1112, 2019.

ARONICA, E. *et al.* Astrocyte immune responses in epilepsy. **Glia**, [s. l.], vol. 60, no 8, p. 1258–1268, 2012.

ATTA, A. A. *et al.* Targeting $\alpha 7$ -nAChR by galantamine mitigates reserpine-induced fibromyalgia-like symptoms in rats: Involvement of cAMP/PKA, PI3K/AKT, and M1/M2 microglia polarization. **European Journal of Pharmacology**, [s. l.], vol. 952, p. 175810, 2023.

BANNISTER, J. V.; CALABRESE, L. Assays for Superoxide Dismutase. *In: [S. l.]: [s. d.]*, 1987. p. 279–312.

BEDNER, P. *et al.* Astrocyte uncoupling as a cause of human temporal lobe epilepsy. **Brain**, [s. l.], vol. 138, no 5, p. 1208–1222, 2015.

BEGHI, E.; GIUSSANI, G.; SANDER, J. W. The natural history and prognosis of epilepsy. **Epileptic Disorders**, [s. l.], vol. 17, no 3, p. 243–253, 2015.

BERKOV S, B. J. C. C. de A. J. B. R. Extract of *Hippeastrum papilio* rich in galanthamine. EP2999480B1. Concessão: 2013.

BERTOGLIO, D. *et al.* Kainic Acid-Induced Post-Status Epilepticus Models of Temporal Lobe Epilepsy with Diverging Seizure Phenotype and Neuropathology. **Frontiers in Neurology**, [s. l.], vol. 8, 2017.

BERTRAND, C. *et al.* Zebrafish Acetylcholinesterase Is Encoded by a Single Gene Localized on Linkage Group 7. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], vol. 276, no 1, p. 464–474, 2001a.

BERTRAND, C. *et al.* Zebrafish Acetylcholinesterase Is Encoded by a Single Gene Localized on Linkage Group 7. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], vol. 276, no 1, p. 464–474, 2001b.

BINDER, D. K.; NAGELHUS, E. A.; OTTERSEN, O. P. Aquaporin-4 and epilepsy. **Glia**, [s. l.], vol. 60, no 8, p. 1203–1214, 2012.

BINDER, D. K.; STEINHÄUSER, C. Astrocytes and Epilepsy. **Neurochemical Research**, [s. l.], vol. 46, no 10, p. 2687–2695, 2021.

BOIANGIU, R. S. *et al.* Anxiolytic, Promnesic, Anti-Acetylcholinesterase and Antioxidant Effects of Cotinine and 6-Hydroxy-L-Nicotine in Scopolamine-Induced Zebrafish (*Danio rerio*) Model of Alzheimer's Disease. **Antioxidants**, [s. l.], vol. 10, no 2, p. 212, 2021.

CAPIOTTI, K. M. *et al.* Hyperglycemia induces memory impairment linked to increased acetylcholinesterase activity in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural Brain Research**, [s. l.], vol. 274, p. 319–325, 2014.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. [59] Glutathione reductase. *In*: [S. l.]: [s. d.], 1985. p. 484–490.

CELIK TOPKARA, K. *et al.* Therapeutic effects of carvacrol on beta-amyloid-induced impairments in in vitro and in vivo models of Alzheimer's disease. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], vol. 56, no 9, p. 5714–5726, 2022.

CHAO, L.-P.; WOLFGRAM, F. Spectrophotometric assay for choline acetyltransferase. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], vol. 46, no 1, p. 114–118, 1972.

CHAPMAN, A. G. Glutamate and Epilepsy. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], vol. 130, no 4, p. 1043S-1045S, 2000.

CHEN, C. *et al.* Learning and memory impairment induced by 1,4-butanediol is regulated by ERK1/2-CREB-BDNF signaling pathways in PC12 cells. **Metabolic Brain Disease**, [s. l.], vol. 37, no 5, p. 1451–1463, 2022.

CHITOLINA, R. *et al.* Chemically-induced epileptic seizures in zebrafish: A systematic review. **Epilepsy Research**, [s. l.], vol. 197, p. 107236, 2023.

CLASADONTE, J.; HAYDON, P. G. Astrocytes and Epilepsy. [S. l.]: [s. d.], 2012.

DAI, S. *et al.* Inflammation attenuates seizure severity in mouse epilepsy models via inhibiting HMGB1 translocation. **Acta Pharmacologica Sinica**, [s. l.], vol. 44, no 9, p. 1737–1747, 2023.

DE FARIAS, A. C. S. *et al.* Melatonin Pretreatment Protects Against Status epilepticus, Glutamate Transport, and Oxidative Stress Induced by Kainic Acid in Zebrafish. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], vol. 59, no 1, p. 266–275, 2022.

DE PIERI PICKLER, K. *et al.* Cannabidiol Pretreatment Reduces Status Epilepticus and Glutamate Uptake Induced by Kainic Acid in Adult Zebrafish. **Cannabis and Cannabinoid Research**, [s. l.], 2025.

DEVINSKY, O. *et al.* Epilepsy. **Nature Reviews Disease Primers**, [s. l.], vol. 4, no 1, p. 18024, 2018.

DUALIBE, J. B. B. *et al.* Protective effect of long-chain polyunsaturated fatty acids on hepatorenal syndrome in rats. **World Journal of Nephrology**, [s. l.], vol. 13, no 3, 2024.

ELLMAN, G. L. *et al.* A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, [s. l.], vol. 7, no 2, p. 88–95, 1961.

ESCARTIN, C. *et al.* Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. **Nature Neuroscience**, [s. l.], vol. 24, no 3, p. 312–325, 2021.

FALCO-WALTER, J. Epilepsy—Definition, Classification, Pathophysiology, and Epidemiology. **Seminars in Neurology**, [s. l.], vol. 40, no 06, p. 617–623, 2020.

GRUNTZ, K. *et al.* Parkinson disease and the risk of epileptic seizures. **Annals of Neurology**, [s. l.], vol. 83, no 2, p. 363–374, 2018.

HALDER, N.; LAL, G. Cholinergic System and Its Therapeutic Importance in Inflammation and Autoimmunity. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], vol. 12, 2021.

HENNING, O. *et al.* Temporal lobe epilepsy. **Tidsskrift for Den norske legeförening**, [s. l.], 2023.

HEYLEN, L. *et al.* Pericardial Injection of Kainic Acid Induces a Chronic Epileptic State in Larval Zebrafish. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], vol. 14, 2021.

HUBBARD, J. A. *et al.* Regulation of astrocyte glutamate transporter-1 (GLT1) and aquaporin-4 (AQP4) expression in a model of epilepsy. **Experimental Neurology**, [s. l.], vol. 283, p. 85–96, 2016.

HYND, M. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, [s. l.], vol. 45, no 5, p. 583–595, 2004.

IBRAHIM, M. *et al.* Anxiolytic effects of diphenyl diselenide on adult zebrafish in a novelty paradigm. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, [s. l.], vol. 54, p. 187–194, 2014.

IOVINO, L.; TREMBLAY, M. E.; CIVIERO, L. Glutamate-induced excitotoxicity in Parkinson's disease: The role of glial cells. **Journal of Pharmacological Sciences**, [s. l.], vol. 144, no 3, p. 151–164, 2020.

KANEKO, Y. *et al.* Extracellular HMGB1 Modulates Glutamate Metabolism Associated with Kainic Acid-Induced Epilepsy-Like Hyperactivity in Primary Rat Neural Cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**, [s. l.], vol. 41, no 3, p. 947–959, 2017. Disponível em: <https://karger.com/article/doi/10.1159/000460513>.

KIHARA, T. *et al.* Galantamine modulates nicotinic receptor and blocks A β -enhanced glutamate toxicity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], vol. 325, no 3, p. 976–982, 2004.

KIM, Y.-H. *et al.* Reduced neuronal proliferation by proconvulsant drugs in the developing zebrafish brain. **Neurotoxicology and Teratology**, [s. l.], vol. 32, no 5, p. 551–557, 2010.

KOOLA, M. M. *et al.* Potential role of the combination of galantamine and memantine to improve cognition in schizophrenia. **Schizophrenia Research**, [s. l.], vol. 157, no 1–3, p. 84–89, 2014.

KUNDAP, U. P. *et al.* Embelin Prevents Seizure and Associated Cognitive Impairments in a Pentylenetetrazole-Induced Kindling Zebrafish Model. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], vol. 10, 2019.

LANGHEH, U.; SINGH, S. Targeting S100B Protein as a Surrogate Biomarker and its Role in Various Neurological Disorders. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], vol. 19, no 2, p. 265–277, 2020.

LAURIAT, T. L.; MCINNES, L. A. EAAT2 regulation and splicing: relevance to psychiatric and neurological disorders. **Molecular Psychiatry**, [s. l.], vol. 12, no 12, p. 1065–1078, 2007.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chemical Research in Toxicology**, [s. l.], vol. 5, no 2, p. 227–231, 1992.

LÉVESQUE, M.; AVOLI, M. The kainic acid model of temporal lobe epilepsy. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, [s. l.], vol. 37, no 10, p. 2887–2899, 2013.

LLALLA-CORDOVA, O. *et al.* Alkaloid Profile, Anticholinesterase and Antioxidant Activities, and Sexual Propagation in *Hieronymiella peruviana* (Amaryllidaceae). **Plants**, [s. l.], vol. 14, no 2, p. 281, 2025.

LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of biological chemistry**, [s. l.], vol. 193, no 1, p. 265–75, 1951.

ŁUKAWSKI, K.; CZUCZWAR, S. J. Oxidative Stress and Neurodegeneration in Animal Models of Seizures and Epilepsy. **Antioxidants**, [s. l.], vol. 12, no 5, p. 1049, 2023.

MARCO-CONTELLES, J. *et al.* Synthesis and Pharmacology of Galantamine. **Chemical Reviews**, [s. l.], vol. 106, no 1, p. 116–133, 2006.

MARTINS, L. C. *et al.* Cochlear glial cells mediate glutamate uptake through a sodium-independent transporter. **Hearing Research**, [s. l.], vol. 432, p. 108753, 2023.

MUSSULINI, B. H. M. *et al.* Forebrain glutamate uptake and behavioral parameters are altered in adult zebrafish after the induction of Status Epilepticus by kainic acid. **NeuroToxicology**, [s. l.], vol. 67, p. 305–312, 2018.

NAKAO, N.; BRUNDIN, P. Chapter 16 Neurodegeneration and glutamate induced oxidative stress. *In*: [S. l.]: [s. d.], 1998. p. 245–263.

NICASTRO, N.; ASSAL, F.; SEECK, M. From here to epilepsy: the risk of seizure in patients with Alzheimer's disease. **Epileptic Disorders**, [s. l.], vol. 18, no 1, p. 1–12, 2016.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, [s. l.], vol. 70, no 1, p. 158–69, 1967.

PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], vol. 83, no 2, p. 346–356, 1977.

PITCHAI, A. *et al.* Zebrafish bio-assay guided isolation of human acetylcholinesterase inhibitory trans-tephrostachin from *Tephrosia purpurea* (L.) Pers. **Neuroscience Letters**, [s. l.], vol. 687, p. 268–275, 2018.

PITKÄNEN, A.; SUTULA, T. P. Is epilepsy a progressive disorder? Prospects for new therapeutic approaches in temporal-lobe epilepsy. **The Lancet Neurology**, [s. l.], vol. 1, no 3, p. 173–181, 2002.

POHLENTZ, M. S. *et al.* Characterisation of NLRP3 pathway-related neuroinflammation in temporal lobe epilepsy. **PLOS ONE**, [s. l.], vol. 17, no 8, p. e0271995, 2022. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0271995>.

POURKHODADAD, S. *et al.* Brain-invading monocytes promote seizure-associated cognitive deficits and neurodegeneration. **Neuropharmacology**, [s. l.], vol. 279, p. 110625, 2025.

RICO, E. P. *et al.* Expression and functional analysis of Na⁺-dependent glutamate transporters from zebrafish brain. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], vol. 81, no 4–5, p. 517–523, 2010.

ROSEMBERG, D. B. *et al.* Differences in Spatio-Temporal Behavior of Zebrafish in the Open Tank Paradigm after a Short-Period Confinement into Dark and Bright Environments. **PLoS ONE**, [s. l.], vol. 6, no 5, p. e19397, 2011.

RUSINA, E.; BERNARD, C.; WILLIAMSON, A. The Kainic Acid Models of Temporal Lobe Epilepsy. **eneuro**, [s. l.], vol. 8, no 2, p. ENEURO.0337-20.2021, 2021.

SAMOCHOCKI, M. *et al.* Galantamine Is an Allosterically Potentiating Ligand of Neuronal Nicotinic but Not of Muscarinic Acetylcholine Receptors. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], vol. 305, no 3, p. 1024–1036, 2003.

SANBERG, P. R.; JOHNSTON, G. A. Glutamate and Huntington's Disease. **Medical Journal of Australia**, [s. l.], vol. 2, no 9, p. 460–465, 1981.

SCHEFFER, I. E. *et al.* ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology. **Epilepsia**, [s. l.], vol. 58, no 4, p. 512–521, 2017.

SCHOUSBOE, A. Transport and Metabolism of Glutamate and Gaba in Neurons and Glial Cells. *In*: [S. l.]: [s. d.], 1981. p. 1–45.

SCHULTE, S. *et al.* A Systematic Review of the Biomarker S100B: Implications for Sport-Related Concussion Management. **Journal of Athletic Training**, [s. l.], vol. 49, no 6, p. 830–850, 2014.

SCIACCALUGA, M. *et al.* Traditional and Innovative Anti-seizure Medications Targeting Key Physiopathological Mechanisms: Focus on Neurodevelopment and Neurodegeneration. **Current Neuropharmacology**, [s. l.], vol. 21, no 8, p. 1736–1754, 2023.

SIERRA, S. *et al.* Administration of docosahexaenoic acid before birth and until aging decreases kainate-induced seizures in adult zebrafish. **Brain Research Bulletin**, [s. l.], vol. 88, no 5, p. 467–470, 2012.

SOLARI, N.; HANGYA, B. Cholinergic modulation of spatial learning, memory and navigation. **European Journal of Neuroscience**, [s. l.], vol. 48, no 5, p. 2199–2230, 2018.

SOTO-VÁSQUEZ, M. R. *et al.* Alkaloid Composition and Biological Activities of the Amaryllidaceae Species *Ismene amancaes* (Ker Gawl.) Herb. **Plants (Basel, Switzerland)**, [s. l.], vol. 11, no 15, 2022.

STACHOWICZ, K. *et al.* Evidence for the interaction of COX-2 with mGluR5 in the regulation of EAAT1 and EAAT3 protein levels in the mouse hippocampus. The influence of oxidative stress mechanisms. **Brain Research**, [s. l.], vol. 1771, p. 147660, 2021.

TALLINI, L. R. *et al.* Acetylcholinesterase Inhibition Activity of *Hippeastrum papilio* (Ravenna) Van Scheepen (Amaryllidaceae) Using Zebrafish Brain Homogenates. **Life**, [s. l.], vol. 13, no 8, p. 1721, 2023.

TALLINI, L. R. *et al.* Structural Diversity and Biological Potential of Alkaloids from the Genus *Hippeastrum*, Amaryllidaceae: an Update. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s. l.], vol. 31, no 5, p. 648–657, 2021.

TEWARI, B. P. *et al.* Astrocytes require perineuronal nets to maintain synaptic homeostasis in mice. **Nature Neuroscience**, [s. l.], vol. 27, no 8, p. 1475–1488, 2024.

THOMPSON, K. Status epilepticus and early development: Neuronal injury, neurodegeneration, and their consequences. **Epilepsia Open**, [s. l.], vol. 8, no S1, 2023.

TILLEUX, S.; HERMANS, E. Neuroinflammation and regulation of glial glutamate uptake in neurological disorders. **Journal of Neuroscience Research**, [s. l.], vol. 85, no 10, p. 2059–2070, 2007.

TOYO-OKA, T. *et al.* Ca overload and the action of calcium sensitive proteases, phospholipases and prostaglandin E2 in myocardial cell degradation. **Basic Research in Cardiology**, [s. l.], vol. 80, no 3, p. 303–315, 1985.

TRAYKOVA, M. *et al.* Antioxidant Properties of Galantamine Hydrobromide. **Zeitschrift für Naturforschung C**, [s. l.], vol. 58, no 5–6, p. 361–365, 2003.

TRINKA, E. *et al.* A definition and classification of status epilepticus – Report of the <sc>ILAE</sc> Task Force on Classification of Status Epilepticus. **Epilepsia**, [s. l.], vol. 56, no 10, p. 1515–1523, 2015.

UMPIERRE, A. D. *et al.* Repeated low-dose kainate administration in C57BL/6J mice produces temporal lobe epilepsy pathology but infrequent spontaneous seizures. **Experimental Neurology**, [s. l.], vol. 279, p. 116–126, 2016.

VEZZANI, A. *et al.* Astrocytes in the initiation and progression of epilepsy. **Nature Reviews Neurology**, [s. l.], vol. 18, no 12, p. 707–722, 2022.

VIZUETE, A. F. K. *et al.* Prolonged ethanol exposure alters glutamate uptake leading to astrogliosis and neuroinflammation in adult zebrafish brain. **NeuroToxicology**, [s. l.], vol. 88, p. 57–64, 2022.

VRINDA, M. *et al.* Temporal lobe epilepsy-induced neurodegeneration and cognitive deficits: Implications for aging. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, [s. l.], vol. 95, p. 146–153, 2019.

WANG, Q. *et al.* Kainic Acid-Mediated Excitotoxicity as a Model for Neurodegeneration. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], vol. 31, no 1–3, p. 003–016, 2005a.

WANG, Q. *et al.* Kainic Acid-Mediated Excitotoxicity as a Model for Neurodegeneration. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], vol. 31, no 1–3, p. 003–016, 2005b.

WENDEL, A. [44] Glutathione peroxidase. *In*: [S. l.]: [s. d.], 1981. p. 325–333.

YANG, W. *et al.* HMGB1-TLR4 Axis Plays a Regulatory Role in the Pathogenesis of Mesial Temporal Lobe Epilepsy in Immature Rat Model and Children via the p38MAPK Signaling Pathway. **Neurochemical Research**, [s. l.], vol. 42, no 4, p. 1179–1190, 2017.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, [s. l.], vol. 21, no 6, p. 787–793, 1998.

ZHANG, Y. *et al.* Succinate accumulation contributes to oxidative stress and iron accumulation in pentylentetrazol-induced epileptogenesis and kainic acid-induced seizure. **Neurochemistry International**, [s. l.], vol. 149, p. 105123, 2021.

ZONG, Y. *et al.* Mitochondrial dysfunction: mechanisms and advances in therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], vol. 9, no 1, p. 124, 2024.

ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLOTT, S. J. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. **Physiological Reviews**, [s. l.], vol. 94, no 3, p. 909–950, 2014.

ZUO, D. *et al.* Alcohol amplifies ketamine-induced apoptosis in primary cultured cortical neurons and PC12 cells through down-regulating CREB-related signaling pathways. **Scientific Reports**, [s. l.], vol. 7, no 1, p. 10523, 2017.

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade do Extremo Sul Catarinense
Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto abaixo especificado, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC, em reunião de **11/03/2025**.

Título do projeto	Efeito neuroprotetor de anticolinérgicos num modelo de neurodegeneração induzido por ácido caínico em peixes-zebra: ensaio pré-clínico
Project title	NEUROPROTECTIVE EFFECT OF ANTICHOLINERGICS IN A KAINIC ACID-INDUCED NEURODEGENERATION MODEL IN ZEBRAFISH: PRECLINICAL TRIAL
Número do protocolo Protocol number	07/2025
Pesquisador principal Principal Investigator	EDUARDO PACHECO RICO
Pesquisadores Researchers	Lucas de Oliveira Pacagnan, Guilherme Lodetti da Silva, Natanael Junior Lopes Specht, Henrique Redivo Wençon, Anna Thereza Endler, Eduardo Ronconi Dondossola, Manolo Guilherme Roso Melissa Talita Wiprich, Amanda Gomes Teixeira, Wuesllen Dondossola Pereira
Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	19/03/2025 a 19/11/2025
Espécie/linhagem/raça	Peixe / Danio rerio
Idade/Peso	6 meses / 0,5 g
Número de animais	Masculino 361 / Feminino 361
Procedência	Biotério Unesc

The Ethics Committee on Animal Use on Research, sanctioned by the resolution number 03/2017/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794/08, has analyzed the Project that was Approved in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us by e-mail ceua@unesc.net.

Criciúma-SC, 11 de março de 2025

Josiane Budni
Coordenadora da CEUA