

**ESTUDO DA ATIVIDADE MOTORA EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A TRATAMENTO COM
DICLORIDRATO DE FLUNARIZINA E GINKGO BILOBA**

*STUDY OF MOTOR ACTIVITY IN MICE SUBMITTED TO TREATMENT WITH DICHLORIDRATE OF
FLUNARIZIN AND GINKGO BILOBA*

Wagner de Jesus Pinto¹, Rafael Ramón Rodriguez Treto¹

1- Universidade Federal do Acre .

RESUMO - A busca por novas ações farmacológicas em medicamentos já conhecidos vem ganhando espaço na farmacologia experimental, e por essa razão, que o Dicloridrato de flunarizina e Ginkgo biloba na forma de comprimidos foram selecionados para estudar a possível ação do dicloridrato de flunarizina e Ginkgo biloba sobre o sistema motor em camundongos Swiss. Os animais foram divididos em três grupos de seis indivíduos, submetidos aos seguintes tratamentos: Grupos I e II tratados com doses únicas de Dicloridrato de flunarizina e Ginkgo biloba respectivamente enquanto que o grupo III foi tratado com solução fisiológica. Os animais de todos os grupos foram submetidos à prova de atividade motora espontânea numa caixa de conduta (Prova de campo aberto) aos 30 e 150 minutos após os tratamentos. Os dados obtidos foram analisados de acordo com a prova U de Mann Whitney e o teste t de Student, considerando $p < 0.05$. O resultado mostrou que não houve diferença estatística significativa na atividade motora (exploração espontânea) entre os grupos tratados com os medicamentos quando comparados com o grupo controle. Finalmente, se conclui que de acordo as condições do experimento, o Dicloridrato de flunarizina e o fitofármaco Ginkgo biloba não apresentaram efeitos sobre o sistema motor em camundongos Swiss.

PALAVRAS CHAVE: Flunarizina, Ginkgo biloba, Campo aberto.

ABSTRACT - *New pharmacological properties in known's drugs had been an important objective for the experimental pharmacology. The aim of this paper is to study of the possible action of Flunarizine dicloridrate pills and Ginkgo biloba pills on the motor system in Swiss mice. The animals were shared in three groups of six animals each, the first and second group were treated with the Flunarizine dicloridrate pills and Ginkgo biloba pills respectively, (only one oral administration), the group number three was a control and received a saline physiological solution. After 30 and 150 minutes of the drugs treatment and the saline physiological solution, the mouse motor system was studied in each animals, through the Open Field test (spontaneous motor activity). The results were analyzed by the Mann Whitney U test and the Student t test, considered $p < 0.05$. In conclusion, there is no statistical difference between the group's results, showing no action of the drugs studied on the motor activity level in Swiss mice.*

KEY WORDS: Flunarizine, Ginkgo biloba, Open field.

Autor para correspondência: Prof. Dr. Wagner de Jesus Pinto Wagner.wp@gmail.com

Campus Universitário Reitor Aulio Gelio Alves de Souza - Rodovia BR 364, nº 6637 (Km 04) – Distrito Industrial Caixa Postal 500 ☐ Cep: 69915-900 - Rio Branco - Acre ☐ PABX: (0xx68) 3901-2500 Centro de Ciências da Saúde (CCSD)-sala107

INTRODUÇÃO

O estudo de novas ações farmacológicas em medicamentos já conhecidos, têm se desenvolvido bastante nos últimos anos, especialmente as ações voltadas para o sistema nervoso central e o sistema motor¹. Nesse sentido, foram escolhidas como possíveis candidatos a outras ações de importância no Sistema Nervoso e particularmente no Sistema Motor², o dicloridrato de flunarizina e Ginkgo biloba. O dicloridrato de flunarizina (derivado difluorado da piperazina), comercializado como Vertigium com ação comprovada em nível das células musculares lisas, provoca vasodilatação central e periférica³, além de outras ações como induzir manifestações parkinsonianas (rigidez muscular e tremor unilateral em pacientes⁴, reduzir episódios de vertigem em pacientes com enxaqueca⁵ e induzir in vitro atividade apoptótica em células de mieloma múltipla e linfoma⁶. Insônia e ansiedade são também consequências da ação deste medicamento levando a inferir, possível aumento na excitabilidade do sistema nervoso central³. O fitoterápico Ginkgo biloba, comercializado como Gincomed é rico em flavonóides, bi-flavonas, terpenóides e outros compostos orgânicos⁷, produz efeitos similares ao dicloridrato de flunarizina como vaso-regulador⁸, além de outras ações como neuroprotetora, evitando a aparição da substância amilóide nos neurônios e portanto evitando a morte dos mesmos no hipocampo⁷ em pacientes portadores da doença de Alzheimer, não esta totalmente comprovada a redução do risco de agravamento da doença (Alzheimer) em pacientes submetidos a tratamento com Ginkgo biloba⁹, além do anterior as ações antioxidante¹⁰ e semelhante aos benzodiazepínicos também foram reportadas¹⁰, aumento na sínteses de dopamina e aumento do número de receptores B

adrenérgicos também se descrevem com relação a dito medicamento¹¹, potencializa os processos cognitivos¹², parece aumentar a liberação de GABA e noradrenalina no cérebro, diminuindo o desgaste de receptores para a serotonina (5-hidroxi-triptamina), ajuda na absorção de colina por parte dos neurônios cerebrais, facilitando assim a síntese de acetilcolina¹³, apresenta ação comprovada nos leitos vasculares, aumentando o fluxo sanguíneo local, e portanto o suprimento de oxigênio¹⁴. Ginkgo biloba também é capaz de inibir a recaptção da serotonina nos neurônios pré-sinápticos¹⁴, finalmente facilita a transmissão sináptica colinérgica e alfa adrenérgica¹⁴ além de aumentar a recaptção pré-sináptica de colina no hipocampo¹⁴. A prova de “Campo aberto” é uma das provas utilizadas para estudar a ação medicamentosa no sistema motor, pode-se determinar a atividade motora per se (exploratória espontânea) e também na sua variante atividade motora induzida^{15,16}. Assim pode-se caracterizar o nível de excitabilidade do sistema motor como um todo condutual devido a que a atividade motora nesse modelo animal depende da necessidade de conhecer o novo ambiente e o medo de encarar ou enfrentar o ambiente desconhecido. Considera-se o medo, associado ou como consequência de diferentes fatores ambientais, frequentes geradores de respostas de alarme.

Baseado nessas informações esse estudo objetiva analisar as ações do dicloridrato de flunarizina e do Ginkgo biloba no sistema motor em modelo animal mediante a prova de “campo aberto”(exploração espontânea), aferida através do indicador: número de quadrados percorridos/minuto.

METODOLOGIA

Materiais de laboratório: Utilizou-se cronômetro digital e caixa de conduta com piso quadriculado, solução fisiológica, dicloridrato de flunarizina, comercializado com o nome de *Vertigium* pela Neo química/Hipermercado S/A. Indústria Brasileira e *Ginkgo biloba*, comercializada com o nome de Ginkgomed pela Cimed indústria de medicamentos Ltda. Indústria Brasileira.

Animais: Utilizou-se 18 camundongos albinos Swiss machos pesando entre 30 e 45 gramas, com idade de 8 a 10 semanas, oriundos do biotério do laboratório de Fisiologia-farmacologia da Universidade Federal do Acre (UFAC). Os animais foram mantidos em regime de claro/escuro de 12/12 horas, com água e comida *ad libitum* bem como temperatura ambiental constante (25°C). Os grupos experimentais foram formados com 6 animais cada, escolhidos de forma aleatória, partindo do pré-requisito da homogeneidade da população e estratificação das massas corporais. Cada grupo de animais foi tratado somente com um tipo de solução.

Preparação da solução de Dicloridrato de flunarizina: em 20 mL de solução salina fisiológica dissolve-se 2,5mg de dicloridrato de flunarizina obtendo assim uma concentração de 0.125 mg/mL. O excipiente não foi extraído.

Preparação da solução de *Ginkgo biloba*: em 20 mL de solução salina fisiológica dissolve-se 20mg de Ginkgomed obtendo assim uma concentração de 1.0 mg/mL. O excipiente não foi extraído.

Determinação da atividade motora: A atividade motora (exploração espontânea) foi determinada através da prova de Campo aberto^{15,16}, realizada numa caixa de conduta de 73cm de lado, 50cm de altura e piso quadriculado (49 quadrados) com a finalidade de quantificar os movimentos espontâneos do animal. A atividade motora do animal de experimentação foi realizada através da contagem do número de quadrados percorridos pelo animal durante cinco minutos. Para essa mensuração utilizou-se o método visual e um cronômetro digital. Considera-se quadrado percorrido aquele onde o animal coloca qualquer uma das patas. O indicador da variável utilizada foi o número de quadrados percorridos pelo animal de experimentação por minuto. O início da prova deu-se no momento em que o animal se posicionou no centro do piso quadriculado da caixa de conduta. As soluções de dicloridrato de flunarizina e *Ginkgo biloba* foram administradas 30 minutos antes do início da prova¹⁵. Utilizou-se uma variável de razão ou proporcional, a qual se aferiu, através do número de quadrados percorridos pelo animal durante um minuto. Os animais foram tratados em concordância com as normas e princípios éticos vigentes quanto à experimentação animal ditadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal em consonância com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONSEA) e Comissão de Ética no Uso de Animais na UFAC (CEUA), processo N-23107. 014614/2014-90 e protocolo número 36/2014.

ESQUEMA DE TRATAMENTO

Experimento I - Ação do Dicloridrato de flunarizina (DF) sobre a atividade motora (exploração espontânea) em camundongos Swiss.

Grupo	Tratamento	Det. Pós Trat.		n
I	0.33 mg de DF/kg de massa corporal	CA	CA	6
IIIc	Solução salina fisiológica (0,3 mL)	CA	CA	6
Tempo (Minutos)	0	30	150	

A administração do medicamento Dicloridrato de flunarizina (0.3ml) se realizou por via oral (dose única). A administração da solução (sln) salina fisiológica (0.3 ml) se realizou por via oral (dose única). **Det. Pós Trat.:** Determinação pós- tratamento da atividade motora; CA: Campo aberto; n: Número de animais por grupo.

Experimento II - Ação do *Ginkgo biloba* (GB) sobre a atividade motora (exploração espontânea) em camundongos Swiss. As doses de Cloridrato de flunarizina e *Ginkgo biloba* utilizadas neste trabalho foram tomadas a partir das doses reportadas nas bulas desses medicamentos.

Para o tratamento estatístico utilizou-se a prova não paramétrica de *U* de *Mann Whitney* juntamente com o teste *t* de *Student*, ambos com intervalo de confiança de 95%, $p < 0.05^{17}$. Para comprovar a distribuição normal dos valores se utilizou a aprova de *Shapiro-Wilk*. Os resultados se expressam através da “média e o erro padrão da média” dos quadrados recorridos por minuto por grupo.

Grupo	Tratamento	Det. Pós Trat.		n
II	4.0 mg de GB/kg de massa corporal	CA	CA	6
IIIc	Solução fisiológica (0,3mL)	CA	CA	6
Tempo (Minutos)	0	30	150	

A administração do medicamento *Ginkgo biloba* (0.3ml) se realizou por via oral (dose única). A administração da solução (sln) salina fisiológica (0.3 ml) se realizou por via oral (dose única). **Det. Pós Trat.:** Determinação pós- tratamento da atividade motora; CA: Campo aberto; n: Número de animais por grupo.

RESULTADOS

Experimento I

O dicloridrato de flunarizina na dose e tempos utilizados na prova de campo aberto não modifica a atividade motora, aferida através do número de quadrados percorridos pelo animal de experimentação num minuto, de modo que não existem diferenças estatisticamente relevantes entre o grupo experimental e controle aos 30 e 150 minutos após a administração do medicamento (Figura 1). Entretanto, pode-se verificar certa tendência à queda da atividade motora no grupo tratado quando comparado com o grupo controle aos 150 minutos de prova.

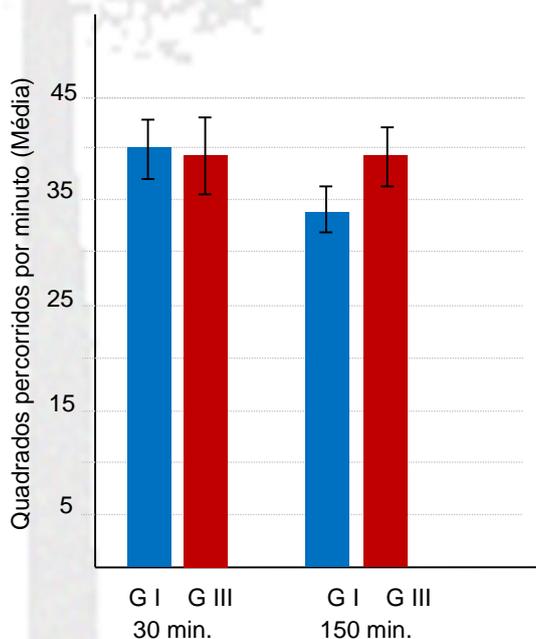


Figura 1 – Ação do dicloridrato de flunarizina sobre a atividade motora em camundongos *Swiss* aos 30 e 150 minutos de prova. G I: grupo I: 0,33mg de DF/Kg de massa; G III: grupo III: 0,3mLde solução fisiológica. Para o tratamento estatístico utilizou-se a prova não paramétrica de *U* de *Mann Whitney* juntamente com o teste *t* de *Student*, ambos com intervalo de confiança de 95%, $p < 0.05$

É possível que a tendência observada poderia ser confirmada estatisticamente através do aumento no número de animais experimentais por grupo.

Experimento II

A solução de *Ginkgo biloba*, na dose e tempos de prova utilizados no experimento proposto, não modifica a atividade motora, uma vez que não há diferenças estatisticamente significativas entre o grupo tratado e o grupo controle (Figura 2 a,b,c). Contudo, se observa certa tendência à queda na atividade motora nos animais tratados e provavelmente essa tendência manifeste-se de forma efetiva em uma prova experimental com numero maior de animais por grupo.

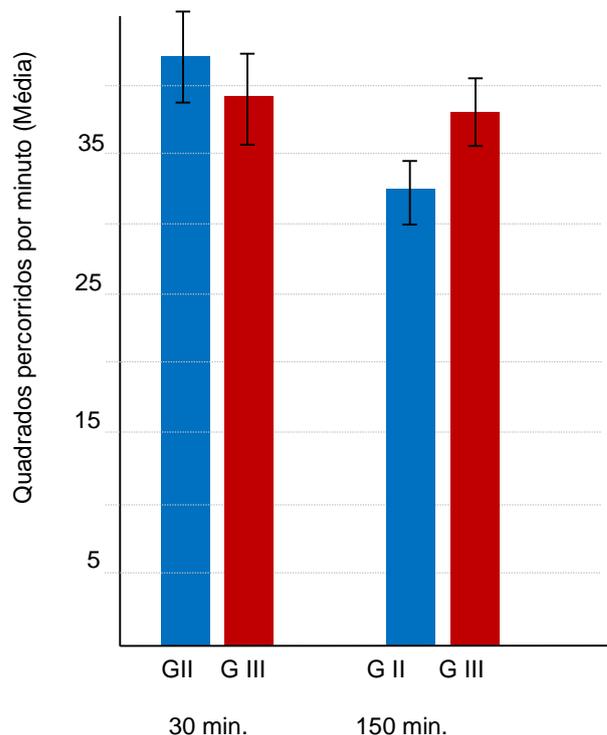


Figura 2a – Ação do *Ginkgo biloba* sobre a atividade motora em camundongos *Swiss* aos 30 e 150 minutos de prova. G II: grupo II: 4mg de GB/Kg de massa. G III: grupo III: 0,3ml de solução salina. Para o tratamento estatístico utilizou-se a prova não paramétrica de *U* de *Mann Whitney* juntamente com o teste *t* de *Student*, ambos com intervalo de confiança de 95%, $p < 0.05$

DISCUSSÃO

A ação farmacológica básica do dicloridrato de flunarizina é bloquear seletivamente os canais de cálcio em determinados tipos celulares tais como músculo liso, eritrócitos e células receptoras do ouvido interno¹⁸. Esse efeito ocorre através da interação do medicamento com a calmodulina, o bloqueio dos receptores histaminérgicos (H1) parece ser também parte do mecanismo de ação proposto¹⁸.

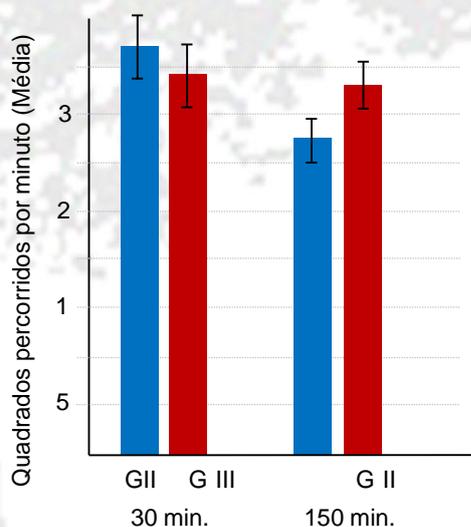


Figura 2b – Ação do *Ginkgo biloba* sobre a atividade motora em camundongos *Swiss* aos 30 e 150 minutos de prova. G II: grupo II: 4mg de GB/Kg de massa. G III: grupo III: 0,3ml de solução salina. Para o tratamento estatístico utilizou-se a prova não paramétrica de *U* de *Mann Whitney* juntamente com o teste *t* de *Student*, ambos com intervalo de confiança de 95%, $p < 0.05$

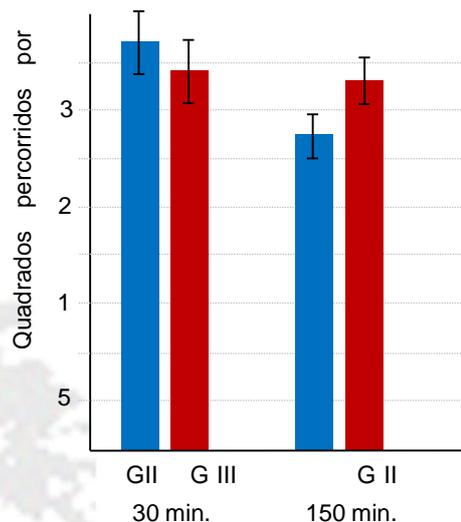


Figura 2c – Ação do *Ginkgo biloba* sobre a atividade motora em camundongos *Swiss* aos 30 e 150 minutos de prova. G II: grupo II: 4mg de GB/Kg de massa. G III: grupo III: 0,3ml de solução salina. Para o tratamento estatístico utilizou-se a prova

Contudo, não está plenamente esclarecido se essa ação se manifesta em neurônios do sistema motor ainda que tratamentos prolongados com esse medicamento possam induzir sono, fadiga e depressão¹⁸, levando a inferir que esses efeitos são decorrentes de uma suposta ação antagonista com relação à dopamina e noradrenalina. Conseqüentemente, ocorre queda da atividade dos neurônios do sistema nervoso central, seja por antagonismo ou devido à plasticidade neuronal. Entretanto, essa tendência de queda não mostrou diferenças estatísticas significativas, provavelmente em função da utilização de uma dose única de medicamento neste modelo experimental ou em função dos neurônios do sistema motor de camundongos não serem o alvo específico do medicamento.

Sabe-se que o cloridrato de flunarizina induz manifestações parkisonianas⁴ e reduz os episódios de vertigem em pacientes com enxaqueca⁵, fatos esses pelo menos aparentemente antagônicos e que refletem aumento e diminuição da excitabilidade.

Outra possibilidade para explicar os resultados obtidos é que o fechamento seletivo dos canais de cálcio acontece somente quando o influxo de cálcio ao interior das células musculares é expressivo¹⁸ e não em condições fisiológicas, como no modelo experimental estudado. Outra manifestação associada à ação deste medicamento, é a exacerbação de sintomas extrapiramidais¹⁹ decorrentes da ação agonista dopaminérgica do medicamento¹⁹ e que não foi observada no experimento.

A ação do medicamento *Ginkgo biloba* no sistema nervoso central depende principalmente dos flavonóides e terpenolactonas, já que, ao que parece essas substancias participam de alguma forma na inibição da recaptção de serotonina²⁰. A serotonina é um importante neurotransmissor do sistema motor e sua maior disponibilidade na fenda sináptica está relacionada à queda na atividade motora. Contudo, esse efeito não foi observado no experimento II. Assim, é possível que o medicamento não tenha promovido de fato, aumento nos níveis de serotonina na fenda sináptica ou de alguma forma ocorreu um mecanismo de compensação fisiológica dos sistemas colinérgicos e adrenérgicos motores¹. Outra possibilidade, é que a relação dopamina/serotonina nos neurônios motores centrais, tenha se mantido constante, e, portanto, em nível normal a atividade motora. Sabe-se que os componentes do fitoterápico *Ginkgo biloba* facilitam a transmissão colinérgica²⁰ devido à diminuição na recaptção de acetilcolina no neurônio pré-sináptico e conseqüentemente,

aumento da atividade muscular esquelética. Este aumento de atividade motora também pode ser consequência do aumento na síntese de dopamina¹¹ induzida pelo medicamento, deprimindo a atividade motora de maneira semelhante aos benzodiazepínicos¹⁰, provavelmente envolvendo o neurotransmissor GABA.

Finalmente, estudos mostram que quando um animal de experimentação é colocado pela segunda vez numa caixa de conduta a atividade motora do mesmo é menor devido ao fenômeno de habituação ao ambiente²¹. Portanto, analisando as velocidades de queda da atividade motora para os grupos tratados com os medicamentos e tratados com solução fisiológica, nos tempos 30 minutos e 150 minutos após a administração das soluções, observa-se maior velocidade de queda no grupo tratado com o produto Dicloridrato de flunarizina muito embora essa queda não seja estatisticamente significativa quando comparada com a velocidade de queda no grupo controle (Figura 1). No caso dos animais tratados com *Ginkgo biloba* (Figura 2 a,b,c) o efeito foi similar daquele descrito para o dicloridrato de flunarizina. Dessa forma, o dicloridrato de flunarizina e o *Ginkgo biloba* nas doses estudadas e nos tempos de provas utilizados parecem não ter ação expressiva estatisticamente significativa sobre a atividade motora (exploração espontânea) em camundongos Swiss. Entretanto, novos testes são necessários ampliando-se o "n" das amostras e também as doses administradas de modo que a tendência mostrada nos experimentos possa-se evidenciar de forma clara e concludente.

CONCLUSÕES

Tendo em conta as doses administradas aos animais experimentais, o modelo experimental escolhido para realizar as determinações assim como os tempos de provas utilizados em ditas determinações, pode-se concluir que: 1) O medicamento Dicloridrato de flunarizina na dose única de 0.33mg/kg de massa corporal, nos tempos de prova utilizados, não modifica a atividade motora exploratória espontânea em camundongos; 2) O medicamento *Ginkgo biloba* na dose única de 4.0mg/kg de massa corporal, nos tempos de prova utilizados, não modifica a atividade motora exploratória espontânea em camundongos.

AGRADECIMENTOS

Ao laboratório de Fisiologia-farmacologia da Universidade Federal do Acre (UFAC) pelo fornecimento dos animais experimentais bem como dos materiais de laboratório utilizados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. GUYTON A, Hall J. Tratado de Fisiologia Médica. 10ª Ed. Editora Guanabara-Koogan R.J, 2002.p.580
2. MACHADO A. Neuroanatomia Funcional. 2ª Ed. Editora Saraiva. Rio de Janeiro, 2010.p.35-47
3. Bulario de medicamentos. Disponível em :<<http://www.bulas.med.br> > Acesso em: 20 dez. 2013
4. MIGUEL R, CORREIA AS, BUGALHO P. Iatrogenic parkinsonism: The role of Flunarizine e Cinnarizine . J Parkinson Dis. 2014; 4(4):645-9.
5. CHEN YZ, LI N, ZHOU KY. Preventive effects of behavioral therapy plus Flunarizine in children with migraine. Zhongguo Dang Dai ErKe Za Zhi. 2014; 16(11):1105-8 nov.
6. SCHMEEL LC, et al. Flunarizine exhibit in vitro efficacy against lymphoma and multiple myeloma cells. Anticancer Res. 2015;35(3):1369-76 Mar.
7. LON S, SCHNEIDER. Ginkgo and AD (Alzheimer Disease): key negatives and lessons from Goid Age. DOI:[http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(12\)70212-0](http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(12)70212-0)
8. KLEIJNEN J, KNIPCHILD P. *Ginkgo biloba* for cerebral insufficiency. Br.J.Clin.Pharmacol. 1992; 34:352-358.
9. BRUNO VELLAS MD, et al. Long-term use of standardised *Ginkgo biloba* extract for the prevention of Alzheimer disease (Guiage): A randomised placebo-controlled trial. DOI:[http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422\(12\)70206-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1474-4422(12)70206-5).
10. De FREUDIS FV. *Ginkgo biloba* extracts (EGb761): Pharmacological Activities and Clinical Application. Paris: Elsevier 1991;6:187.
11. HADLEY SK, PETRY JJ. Medicinal Herbs. A primer for primary care. Hospital Practice. 1999;4:23-25.
12. HASSE J, et al. Wirksamkeit Kurzverminderungsbehandlungen MIT *Ginkgo biloba*-speziell extrakt EGb 761. beidemenz vom vaskulären und Alzheimer-typ. Z. Gerontol. geriat. 1996;29:302-309.
13. PAUL EGOLD, LANNY CAHILL e GARY L WENT As controvérsias do *Ginkgo biloba*. Disponível em <www2.uol.com.br/sciam/reportagens/as_controversias_do_ginkgo_biloba.html> Acesso em: 31 jan. 2016.
14. Bulario de medicamentos. Disponível em:<<http://www.grupocimed.com.br/produto-gingkomed-32.php>> Acesso em: 20 de dez. 2013
15. BUZNEGO M, CUBA A, GARRIGA E, CUELLAR A, PEREZ H. Efecto de los extractos acuoso y etanólico de *Cestrum nocturnum* L. sobre La conducta exploratoria y pruebas de analgesia. Revista cubana de Plantas Medicinales. 2005; 10 (2): 15-19.
16. FERNANDEZ F, RODRÍGUEZ R, TORRES M, OLIVA M, Pérez C, BACALLAO M. Características químico-farmacéuticas y propiedades farmacológicas de extractos de *Musa sp* ABB (plátano burro). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 1997; 2 (2): 40-44.
17. Da FONSECA JS, De ANDRADE G. Curso de Estatística. 6ª Ed. São Paulo; 1996.
18. HOLMES B, BROGDEN R, HEEL R, SPEIGHT T, AVERY G. Flunarizine: a review of this pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic use. Drugs. 1984; 27 (1): 6-44.
19. BISOL L W, BRUNSTEIN MG, OTONIC GL, RAMOS F, BORBA DL, DALTIO C S, OLIVEIRA RB, De SOUZA SE, BRESSAN RA, LARA DR. Is flunarizine a long acting oral atypical antipsychotic ? A randomized clinical Trial versus haloperidol for the treatment of schizophrenia. Journal of clinical Psychiatry. 2008; 69: 1572-79.
20. AHLEMEYER B, KRIEGELSTEIN J. Neuroprotective effects of *Ginkgo biloba* extract. Cell. Mol. Live Sci. 2003; 60 (9): 1779-92.
21. SATO T. Habituação e sensibilização comportamental. Psicologia USP. 1995; 6 (1): 231-276.