



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ESTUDO DO PROCESSO CONVULSIVO E DAS AÇÕES DA NIMODIPINA NO
MODELO DE CONVULSÃO COM PILOCARPINA EM RATOS JOVENS**

VIVIANE DA SILVA NASCIMENTO

Fortaleza-Ceará

2005

VIVIANE DA SILVA NASCIMENTO

Estudo do processo convulsivo e das ações da nimodipina no modelo de convulsão com pilocarpina em ratos jovens

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará – UFC para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora:

Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles

Fortaleza**2005**

FICHA CATALOGRÁFICA

N199e Nascimento, Viviane da Silva

Estudo do processo convulsivo e das ações da nimodipina
no modelo de convulsão com pilocarpina em ratos jovens/
Viviane da Silva Nascimento. – Fortaleza, 2005.

151 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. Pilocarpina. 2. Nimodipino. 3. Convulsões. I. Título.

CDD 615.78

A Deus, autor da minha vida
e meu refúgio eterno.

Aos meus amados pais, Nilson e Ercilda,
pelo amor e dedicação, e ao meu querido esposo, João Carlos, pelo apoio e
estímulo.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. *Marta Maria de França Fonteles*, minha orientadora, a quem devo a parte mais valiosa da minha formação acadêmica e por quem tenho profunda admiração. Agradeço pela consideração, estímulo, confiança e paciência demonstrados em todos os momentos.

Àos Profs. Drs. *Francisca Cléa Florenço de Sousa e Carlos Maurício de Castro Costa*, o meu profundo agradecimento por prontamente terem aceito o convite para participar da minha banca examinadora.

À Profa. Dra. *Glauce Socorro de Barros Viana*, por ter me acolhido no Laboratório de Neurofarmacologia desde a iniciação científica e por quem tenho profunda admiração pelo seu esforço e dedicação à pesquisa.

Ao meu querido grupo de pesquisa do Laboratório de Neurofarmacologia, *Aline, Rivelilson e Carlos Renato*, por estarem sempre dispostos a me ajudar, aconselhando-me e resolvendo alguns problemas para mim.

Aos estimáveis estagiários *Márcia e João Paulo* pela dedicação e esforço para a execução desta dissertação e, certamente, sem a colaboração deles, tudo seria bem mais difícil. Agradeço também aos bolsistas *Emídio e Noé* pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

Aos meus *colegas e professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia*, pela compreensão e disponibilidade para a realização deste trabalho, em especial a *Silvânia, Kalyne, Lissiana, Daniele, Flávio, Vera, Hélio, João Paulo e Cícero*.

À turma do *Laboratório de Neurofarmacologia* pelo convívio agradável. Em especial agradeço as técnicas *Vilani e Jaqueline*, que me ajudaram em vários momentos.

A meu querido esposo *João Carlos* que sempre esteve ao meu lado, acompanhando-me nos momentos difíceis dessa luta e da vida, o meu profundo agradecimento.

Aos meus amados e inestimáveis pais *Nilson e Ercilda*, pelas orações constantes e o apoio incondicional. E a quem tudo devo. Muito obrigado.

O meu sincero agradecimento à *Coordenação do Curso de Pós-Graduação* e aos meus *colegas de pós-graduação* que me estimularam e me acompanharam durante esse período de realização do curso de Mestrado.

Ao *CNPq* pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE QUADROS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xx
INTRODUÇÃO	
1. Epilepsia	1
2. Neurotransmissores e epilepsia	3
2.1. Neurotransmissores no cérebro em desenvolvimento	3
2.1.1. Sistema Colinérgico	5
2.1.2. Sistema Dopaminérgico	7
2.1.3. Sistema Serotonérgico	9
2.2. Neurotransmissores e o processo convulsivo no cérebro em desenvolvimento	10
3. Estresse oxidativo e epilepsia	12
3.1. Estresse oxidativo no cérebro em desenvolvimento	12
3.2. Estresse oxidativo e o processo convulsivo no cérebro em desenvolvimento	14
4. Modelos colinérgicos de convulsão	15
4.1. Modelo colinérgico de convulsão com pilocarpina	16
5. Nimodipina	18
5.1. Considerações iniciais	18
5.2. Preparações farmacêuticas	19
5.3. Aspectos farmacocinéticos	20
5.4. Aspectos farmacodinâmicos	21
5.5. Usos clínicos	22
5.6. Toxicidade e efeitos adversos	22
5.7. Nimodipina e o processo convulsivo	23
OBJETIVOS	26

MATERIAL E MÉTODOS

1.	Animais	27
2.	Preparação das drogas	27
2.1.	Pilocarpina	27
2.2.	Nimodipina	27
3.	Tratamento dos grupos experimentais	27
4.	Material utilizado nos experimentos	28
5.	Estudo comportamental	29
6.	Dissecção da área cerebral	30
7.	Determinação de monoaminas e metabólitos em HPLC	32
7.1.	Método	32
7.2.	Procedimento experimental	33
7.3.	Soluções reagentes	34
8.	Determinação da densidade de receptores muscarínicos ($RM_1 + RM_2$)	35
8.1.	Método	35
8.2.	Procedimento experimental	36
8.3.	Soluções reagentes	37
9.	Determinação da densidade dos Receptores Dopaminérgicos	38
9.1.	Método	38
9.2.	Procedimento experimental	39
9.3.	Soluções reagentes	40
10.	Dosagem de proteína	42
10.1.	Método	42
10.2.	Soluções reagentes	42
11.	Determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)	43
11.1.	Método	43
11.2.	Procedimento experimental	44
11.3.	Soluções reagentes	44
12.	Determinação da produção de nitrito	45
12.1.	Método da Preparação da Curva-Padrão	45

12.2.	Procedimento experimental	46
12.3.	Solução reagente	46
13.	Determinação da atividade enzimática da Catalase	46
13.1.	Método	46
13.2.	Procedimento experimental	47
13.3.	Soluções reagentes	47
14.	Determinação da concentração de glutationa reduzida	48
14.1.	Método	48
14.2.	Procedimento experimental	48
14.3.	Soluções reagentes	49
15.	Análise estatística	50

RESULTADOS

1.	Estudo comportamental	51
1.1.	Comportamento de ratos jovens pré-tratados ou não com nimodipina observados durante 1h após administração de pilocarpina.	51
2.	Estudos Neuroquímicos	56
2.1.	Efeitos do pré-tratamento com Nimodipina 10 (N10) ou 30mg/Kg (N30) sobre a concentração de monoaminas e seus metabólitos em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade após a administração da pilocarpina 400mg/Kg (P400).	56
2.2.	Efeitos da administração da pilocarpina 400mg/kg sobre a densidade dos receptores muscarínicos (M_1) e sobre a constante de dissociação (Kd) em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade.	60
2.3.	Efeitos da administração da pilocarpina 400mg/kg sobre a densidade dos receptores dopaminérgicos D_1 e D_2 e sobre a constante de dissociação (Kd) em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade.	62
2.4.	Verificação da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) após administração de pilocarpina 400mg/kg (P400) em corpo estriado de ratos com 21 dias pré-tratados ou não com Nimodipina 10 (N10) ou 30mg/Kg (N30).	65
2.5.	Verificação da produção de nitrito após administração de pilocarpina 400mg/kg (P400) em corpo estriado de ratos com 21 dias pré-tratados ou não	67

com Nimodipina 10 (N10) ou 30mg/Kg (N30).	
2.6. Efeitos do pré-tratamento com Nimodipina 10 (N10) ou 30mg/Kg (N30) sobre atividade da catalase em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade após a administração de pilocarpina 400mg/Kg (P400).	69
2.7. Efeitos sobre a concentração da glutationa reduzida (GSH) após a administração de pilocarpina em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade pré-tratados ou não com nimodipina 10 (N10) ou 30 mg/Kg (N30).	71
DISCUSSÃO	73
CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

LISTA DE TABELAS

RESULTADOS

Tabela 1-	Percentagem de alterações comportamentais após a administração de pilocarpina (P400) em animais de 21 dias de idade pré-tratados ou não com Nimodipina (N10 ou N30).	53
Tabela 2-	Efeitos da administração de P400 sobre a densidade dos receptores muscarínicos ($M_1 + M_2$) e sobre a constante de dissociação (Kd) em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade.	61
Tabela 3-	Efeitos da administração de P400 sobre a densidade dos receptores dopaminérgicos (D_1) e sobre a constante de dissociação (Kd) em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade.	63
Tabela 4-	Efeitos da administração de P400 sobre a densidade dos receptores dopaminérgicos (D_2) e sobre a constante de dissociação (Kd) em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade.	64
Tabela 5-	Verificação da concentração da glutationa reduzida (GSH) após a administração de pilocarpina em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade pré-tratados ou não com nimodipina 10 (N10) ou 30 mg/Kg (N30).	72

LISTA DE QUADROS**INTRODUÇÃO**

Quadro 1	Formas farmacêuticas da nimodipina	20
-----------------	------------------------------------	----

MATERIAL E MÉTODOS

Quadro 1-	Drogas utilizadas com suas respectivas doses e vias de administração.	28
------------------	---	----

Quadro 2-	Drogas utilizadas em associação	28
------------------	---------------------------------	----

Quadro 3-	Parâmetros comportamentais observados	30
------------------	---------------------------------------	----

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1-	Estrutura molecular da nimodipina	19
------------------	-----------------------------------	----

Material e métodos

Figura 1-	Dissecção cerebral mostrando a retirada do encéfalo de ratos	31
------------------	--	----

Figura 2-	Dissecção cerebral mostrando a retirada do corpo estriado de ratos.	32
------------------	---	----

Figura 3-	Aparelho de HPLC com detecção de fluorescência e eletroquímica. Laboratório de neurofarmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFC.	35
------------------	--	----

RESULTADOS

Figura 1-	Latência da primeira convulsão após a administração de pilocarpina (P400) em animais de 21 dias de idade pré-tratados ou não com Nimodipina (N10 ou N30).	54
------------------	---	----

Figura 2-	Latência de morte após a administração de pilocarpina (P400) em animais de 21 dias de idade pré-tratados ou não com Nimodipina (N10 ou N30).	55
------------------	--	----

Figura 3-	Verificação da concentração de dopamina e seus metabólitos após a administração de pilocarpina em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade pré-tratados ou não com nimodipina 10 (N10) ou 30 mg/Kg (N30).	58
------------------	---	----

Figura 4-	Verificação da concentração de serotonina e seu metabólito 5-HIAA após a administração de pilocarpina em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade pré-tratados ou não com nimodipina 10 (N10) ou 30 mg/Kg (N30).	59
------------------	--	----

Figura 5-	Verificação da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) após a administração de P400 em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade pré-tratados ou não com nimodipina 10 ou 30mg/Kg.	66
------------------	---	----

Figura 6-	Verificação da produção de nitrito após administração de	68
------------------	--	----

P400 em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade pré-tratados ou não com nimodipina 10 ou 30mg/Kg.

Figura 7-

Efeitos sobre a atividade da catalase após a administração de pilocarpina em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade pré-tratados ou não com nimodipina 10 (N10) ou 30 mg/Kg (N30). 70

LISTAS DE ABREVIATURAS

ACh- Acetylcolina

AMPc- Adenosina monofosfato cíclico

ANOVA- Análise de variância

Bmax- Número máximo de receptores

BSA- Bovine serum albumine

CAT- Catalase

CE – Corpo estriado

D₁ e D₂- Receptores dopaminérgicos do tipo 1 e 2

DA- Dopamina

DOPAC- Ácido 3, 4 dihidroxifenilacético

EEG- Eletroencefalograma

EROs – Espécies reativas derivadas do oxigênio

EUA - Estados Unidos da América

GABA- Ácido gama aminobutírico

GSH-Px - Glutationa peroxidase

GSH-Rd - Glutationa redutase

GSH – Glutationa reduzida

HE – Hematoxilina-Eosina

5-HIAA - 5-hidroxiindolacético

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

HSA – Hemorragia subaracnóidea

HVA - Ácido homovanílico

3H- NMS - 3H- N- Metilescopolamina

5- HT- 5- Hidroxitriptamina (serotonina)

5- HT₁ e 5- HT₂ – receptor serotonérgico dos tipos 1 e 2

i.p. - Intraperitoneal

Kd- Constante de dissociação

M₁ e M₂ - Receptores muscarínicos do tipo 1, 2, 3, 4 e 5

ME- Movimento estereotipado

NE- Noradrenalina

NMDA- N- metil- D- aspartato

NO – Óxido nítrico

3H-QNB - (3H) -quinuclidinilbenzilato

RCM- Receptores colinérgicos muscarínicos

RM₁ – Receptores muscarínicos M₁

RM₂ – Receptores muscarínicos M₂

RD₁- Receptores dopaminérgicos D₁

RD₂- Receptores dopaminérgicos D₂

SCH 23390- 7- Cloro- 2, 3, 4, 5- tetrahidro- - metil- 5- fenil- 1H- 3- benzazepina

SCP- Sinais colinérgicos periféricos

s.c.- Subcutâneo

SE – *status epilepticus*

SNC- Sistema Nervoso Central

SOD – superóxido dismutase

SOS - Ácido octanosulfônico sódico

RESUMO

Estudo do processo convulsivo e das ações da nimodipina no modelo de convulsão com pilocarpina em ratos jovens. VIVIANE DA SILVA NASCIMENTO. Orientadora: Marta Maria de França Fonteles. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2005.

Estudos comportamentais e neuroquímicos foram realizados em ratos com 21 dias de idade, através do pré-tratamento ou não com nimodipina (10 ou 30mg/Kg, i.p.) e administração de pilocarpina (400mg/Kg, s.c., P400), a fim de investigar o mecanismo da fase aguda do processo convulsivo e os efeitos da nimodipina nas convulsões. Os animais foram observados durante 1h e logo depois sacrificados. Os estudos comportamentais mostraram que P400, produziu sinais colinérgicos periféricos (SCP), movimentos estereotipados (ME), convulsões e estado epiléptico em todos os animais, todavia o índice de morte foi em torno de 30%. O pré-tratamento com nimodipina não alterou os SCP e ME, mas diminuiu o índice de convulsões e aumentou as latências da primeira convulsão e morte. Os estudos neuroquímicos em corpo estriado, após 1h da administração de P400, revelaram um aumento nos níveis de peroxidação lipídica, produção de nitrito e atividade da catalase, e esses efeitos foram revertidos pelo pré-tratamento com nimodipina. A densidade dos receptores colinérgicos (M_1+M_2) e dopaminérgicos (D_1 e D_2) apresentou-se diminuída, enquanto a constante de dissociação (K_d) foi diminuída apenas nos receptores D_2 . P400 reduziu a concentração das monoaminas dopamina (DA) e serotonina (5-HT), e de seus respectivos metabólitos, 3,4 ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), enquanto nos níveis do metabólito dopaminérgico, ácido homovanílico (HVA), foi observado um aumento. Por sua vez, o pré-tratamento com nimodipina nas convulsões com P400 resultou em uma redução do metabólito dopaminérgico e aumento do metabólito serotonérgico, HVA e 5-HIAA, respectivamente. Nossos estudos mostram que os animais imaturos são susceptíveis às convulsões, mas apresentam uma certa resistência à morte durante o processo convulsivo, e que a nimodipina exerce uma atividade protetora minimizando as convulsões induzidas por P400. Contudo, o conhecimento da fisiopatologia da convulsão e a identificação dos efeitos da nimodipina nas convulsões devem ser melhor investigados para facilitar o conhecimento dos fatores inerentes à epilepsia e ações da nimodipina no processo convulsivo.

ABSTRACT

Studies of seizures and actions of nimodipine on pilocarpine-induced seizures in young rats. VIVIANE DA SILVA NASCIMENTO. Supervisor: Marta Maria de França Fonteles. Master's dissertation. Graduation course in Pharmacology. Departament of Physiology and Pharmacology, UFC, 2005.

Behavioral and neurochemical studies were carried out with 21 days-old rats pretreated or not with nimodipine (10 or 30mg/Kg, i.p.) on pilocarpine-induced seizures (400mg/Kg, s.c.) to investigate the mechanism involved in the acute phase of seizures and the effects of nimodipine on seizures. The behavioral studies showed peripheral cholinergic signs, stereotyped movements, convulsions, status epilepticus in all animals and death in less degree after administration of P400, and the pretreatment with nimodipine reduced convulsions, the latency of first convulsion and death. Neurochemical studies in striatum showed levels increased of lipid peroxidation, nitrite and catalase activity, and nimodipine reverted this effect. Biochemical studies showed that striatum cholinergic and dopaminergic receptors in young rats were decreased after observation period, while the K_d values decreased only in D_2 dopaminergics receptors. P400 decreased dopamine and serotonin levels and their metabolites DOPAC and 5-HIAA, respectively; otherwise, the dopaminergic HVA metabolite was increased. In this time, the pretreatment with nimodipine decreased dopaminergic metabolite and increased serotonergic, HVA and 5-HIAA, respectively. Our results showed that young animals are sensitive to epileptogenic stimuli, but they are relatively resistant to death, and nimodipine exhibited a protective effect on the pilocarpine-induced seizures. However, the knowledge of seizures physiopathology and effects of nimodipine on seizures should be better investigated.

INTRODUÇÃO

1. Epilepsia

A epilepsia é um distúrbio cerebral crônico de diversas etiologias, caracterizado por manifestações recorrentes clinicamente diversificadas, entre as quais figuram as convulsões (Fuchs et al., 2004).

Aproximadamente 1% da população dos EUA tem epilepsia, o segundo distúrbio neurológico mais comum depois dos acidentes vasculares cerebrais. Embora a terapia padrão possibilite o controle das crises convulsivas em 80% desses pacientes, 500.000 indivíduos apresentam uma epilepsia não controlada, justificando portanto, a necessidade de se estudar os processos convulsivos, como também estudar novas drogas como possíveis agentes farmacológicos para o tratamento da epilepsia.

A prevalência de epilepsia em alguns países é de 0,5 a 0,6%, incluindo todos os tipos de crises em todas as idades (Browne e Holmes, 2001; So, 1995). A incidência de cada tipo de crise depende da faixa etária, é maior nos primeiros cinco anos de vida, abrangendo as convulsões febris simples que ocorrem em 2 a 5% da população. Crises generalizadas tônico-clônicas, crises parciais complexas sem generalização e ausências típicas ocorrem em 56,3%, 25% e 5,4% de todos os epilépticos, respectivamente (Fernandes et al., 1992; Hart et al., 1990). De acordo com fatores etiológicos ou que influenciam a cronificação das crises, estima-se que a incidência de epilepsia seja maior nos países menos desenvolvidos (Fuchs et al., 2004).

A epilepsia é mais comum na infância, idade na qual ocorre um aumento na vulnerabilidade a infecções do sistema nervoso central (meningite), acidentes (traumatismos do crânio) e doenças como sarampo, varicela e caxumba, cujas complicações podem causar crises epilépticas. O problema também poderá se manifestar com o envelhecimento e suas complicações vasculares (Leonard e Llinás, 1994).

Pesquisas mostram que a epilepsia apresenta-se associada ao *status epilepticus* (SE) em 12% dos pacientes (Janz, 1983), este corresponde a crises contínuas ou reentrantes, com duração superior a trinta minutos, sem que haja recuperação da consciência entre as crises (Fuchs et al., 2004). Após SE agudo sintomático, a chance de uma segunda convulsão é de aproximadamente 41% (Hesdorffer et al., 1998). Além disso, estudos retrospectivos indicam uma correlação entre epilepsia lobo temporal em pacientes adultos e a ocorrência de convulsão e SE durante a infância desses pacientes (Falconer, 1971; Sagar e Oxbury, 1987). Se um episódio convulsivo inicial contribui para o desenvolvimento da epilepsia, o tratamento após a primeira convulsão pode ser um fator de extrema importância para redução deste risco (Fuchs et al., 2004; Musicco et al., 1997).

Sabe-se que, em geral, o cérebro imaturo não representa, simplesmente, uma pequena versão do cérebro adulto, mas constitui um órgão com suas características únicas de mecanismos fisiopatológicos. Alguns fatores que exercem um papel importante nas convulsões e lesões cerebrais no adulto podem não estar presentes no cérebro imaturo (Represa et al., 1986). As necessidades metabólicas próprias dos neonatos e a imaturidade da barreira hematoencefálica (Fujikawa et al., 1990) significam vulnerabilidade exclusiva dos neonatos.

Estudos experimentais utilizando modelos animais tanto *in vivo* quanto *in vitro* demonstram que o sistema límbico imaturo, durante um certo período após o nascimento, é um sítio particularmente propenso à epileptogênese (Moshe, 1987; Swann et al., 1993). Outros estudos utilizando modelos de epilepsia focal em ratos mostram um aumento da susceptibilidade às convulsões focais durante a segunda ou terceira semana de vida (Gottlieb et al., 1977). Recentemente, o modelo de epilepsia com pilocarpina têm sido extensivamente analisado, uma vez que, exibe convulsões recorrentes espontâneas e pode esclarecer muitas das alterações vistas na epilepsia do lobo temporal. Pesquisas utilizando este modelo, relatam que somente quando a droga é administrada após o 18º dia de vida, a ocorrência de SE é capaz de induzir mudanças morfológicas e fisiológicas que geram convulsões espontâneas tardias ao longo da vida (dos Santos et al., 2000).

No modelo de epilepsia induzido por alta dose de pilocarpina, ocorre perda neuronal de algumas áreas cerebrais, a saber: hipocampo, corpo estriado, amígdala, córtex piriforme, córtex entorrinal, septum lateral, tálamo, neocôrtex e substância negra, sugerindo o envolvimento de diferentes áreas durante o estabelecimento do processo epiléptico (Borelli et al., 2002; Clifford et al., 1987; Honchar et al., 1983; Marinho et al., 1997; Turski et al., 1983a). Entre as áreas em que ocorre dano neuronal, o estriado, além de ser uma das áreas mais acometidas, pode estar relacionada de forma importante com os mecanismos de propagação e manutenção (epileptogênese) da convulsão (Marinho et al., 1998).

2. Neurotransmissores e epilepsia

2. 1. Neurotransmissores no cérebro em desenvolvimento

Em concordância com as alterações morfológicas intensas observadas durante o desenvolvimento neural, os neurotransmissores e seus receptores ficam dispersos, em alguns casos, marcadamente, durante a ontogenia. Os neurônios monoaminérgicos são os primeiros a aparecerem durante o desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC). A serotonina, noradrenalina e dopamina são detectadas na fase E13 (13º dia da fase embrionária) no cérebro de rato. Tanto os receptores colinérgicos como dopaminérgicos atingem níveis semelhantes aos observados nos animais adultos, na segunda ou terceira semana após o nascimento do rato (Insel, 1995).

A imunoreatividade ao GABA pode ser detectada ainda na fase embrionária E 14 para E 20 (14º e 20º dia) (Jones, 1991). O glutamato, por sua vez, tem sido evidenciado depois da fase embrionária no cérebro de rato, atingindo concentrações semelhantes aos animais adultos no 15º dia do período pós-natal (Kvale et al., 1983). Quanto aos neuropeptídos, parece que, durante o desenvolvimento, até a primeira semana pós-natal, eles não são ainda totalmente processados (Huntley et al., 1988).

Embora os receptores monoaminérgicos e de ácidos amínicos apresentem algumas diferenças quanto à localização, a ligação desses receptores aos seus sistemas de neurotransmissão se desenvolve de uma só vez, excedendo os níveis de ligação observados no adulto, na segunda ou terceira semana pós-natal do rato. A função desses receptores transitórios excedentes não é conhecida (Insel, 1995).

Com relação aos segundos mensageiros, alguns modelos de acoplamento, ausentes ou menos evidentes no cérebro adulto, são vistos no período de desenvolvimento cerebral. Por exemplo, altos níveis de formação de fosfoinositol, nas primeiras três semanas do período pós-natal, em fatias de hipocampo de rato expostas ao glutamato, sugerem o primeiro reconhecimento de um receptor metabotrópico; até então, a única forma conhecida de receptor glutamatérgico no cérebro adulto, era a de um sítio ligado a um canal iônico (Nicoletti et al., 1986).

A estimulação máxima da hidrólise dos fosfolipídios de membrana parece coincidir com o período de crescimento cerebral nos ratos, sugerindo que esse sistema de segundo mensageiro, no córtex cerebral, esteja envolvido no processo de divisão e diferenciação celular (Balduini et al., 1987). A eficiência do acoplamento dos receptores no SNC para o sistema dos fosfoinositídios parece variar em função do estágio de desenvolvimento (Heacock et al., 1987; Nicoletti et al., 1986; Rooney e Nahorski, 1987;) e da região cerebral (Fisher e Agranoff, 1987). As proteínas G, por sua vez, evoluem durante o desenvolvimento cerebral, independentemente dos seus acoplamentos aos receptores. É certo que, a capacidade dos neurotransmissores de exercerem suas funções, dependerá da maturidade dos seus respectivos efetores intracelulares (Insel, 1995).

A interação dos neurotransmissores aos seus receptores pode ter diferentes consequências no desenvolvimento. Vários estudos têm demonstrado que durante a ontogenia, quando o número de receptores (isto é, o controle genético), a regulação do receptor (isto é, a homeostase presumida), e o segundo mensageiro ou acoplamento ao canal iônico não estão completamente desenvolvidos, a exposição para agonistas ou antagonistas pode ter efeitos que são paradoxais e de tolerância. Essas ações são descritas

como efeitos organizacionais (Boer e Swaab, 1985; Insel et al., 1988), e podem envolver: a) aumento na sobrevivência das células pós-sinápticas com um dado receptor (Meriney et al., 1985), b) aumento no processo dessas células (Bardo et al., 1985; Hauser et al., 1987), e c) aumento no acoplamento para um segundo mensageiro ou canal iônico (Insel et al., 1988). Qualquer que seja o mecanismo, parece certo que os neurotransmissores clássicos podem funcionar como fatores neurotróficos no período de desenvolvimento cerebral (Insel, 1995).

Dessa forma, o cérebro imaturo fornece a possibilidade de se investigar o mecanismo de ação de uma determinada droga. Pela escolha cuidadosa das idades, o investigador pode estudar a expressão genética, o acoplamento receptor-efetor, e as consequências celulares da ativação no tecido cerebral, onde vários aspectos do desempenho celular são modulados. Assim, o pesquisador interessado na fisiopatologia das doenças mentais pode encontrar anormalidades em um ou mais dos aspectos de desenvolvimento neural que resulta no aparecimento de comportamento patológico, uma observação que ligará aspectos anatômicos e comportamentais durante o desenvolvimento cerebral (Insel, 1995).

2. 1. 1. Sistema colinérgico

O sistema colinérgico tem como neurotransmissor a acetilcolina (ACh). A ACh é um importante neurotransmissor excitatório no cérebro (Nathanson et al., 1999; Olney et al., 1983 e 1986). A estimulação cerebral induzida pela ACh ocorre através da ativação dos receptores colinérgicos cerebrais, onde cerca de 99% destes são muscarínicos, e 1% são nicotínicos (Elgoyen et al., 2000; Pepeu, 1983). Assim, a maioria dos efeitos de ativação colinérgica no cérebro é provavelmente devido à estimulação dos receptores colinérgicos muscarínicos (RCM).

Os receptores muscarínicos são amplamente distribuídos em todo corpo e exercem inúmeras funções vitais no cérebro e no sistema nervoso autônomo (Jope, 1979; Lefkowitz et al., 1996). No cérebro os receptores muscarínicos são importantes na

memória e na fisiopatologia das doenças afetivas e na esquizofrenia (Davis et al., 1975 e 1980).

No fim de 1980, através de técnicas de biologia molecular, foram identificados 5 subtipos de receptores muscarínicos (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , e M_5) (Bonner et al., 1987; Liao et al., 1989; Nathanson et al., 1999). A estimulação dos receptores M_1 , M_3 e M_5 ativa a hidrólise dos fosfoinosítideos, na qual causa a liberação de cálcio intracelular e metabolismo do ácido araquidônico. Já os receptores M_2 e M_4 quando estimulados conduzem a inibição da adenilil ciclase, diminuindo os níveis de AMPc (Hulme et al., 1990; Peralta et al., 1987 e 1988; Wess et al., 1990)

Com relação ao seu desenvolvimento, o sistema colinérgico torna-se funcional no final da segunda semana de vida dos animais. A concentração de ACh aumenta 29% em relação ao nível dos adultos após o nascimento e atinge os níveis do animal adulto na 4^a semana de vida (Coyle e Yamamura, 1976). Do 7º ao 28º dia após o nascimento, a atividade específica da colina acetiltransferase aumenta de 8 para 83 % da atividade encontrada no cérebro adulto (Coyle e Yamamura, 1976).

Rooney e Nahorski (1987) reportaram que os sítios muscarínicos atingem os níveis adultos entre 21 a 40 dias da vida pós-natal. Ben-Barak e Dudai (1979), por sua vez, utilizando o ligante (³H) -quinuclidinilbenzilato (³H-QNB), detectaram no hipocampo, valores de receptores muscarínicos semelhantes aos vistos nos animais adultos já no 12-14º dia de vida. Um aumento significativo nos receptores M_2 e M_4 entre ratos jovens e adultos é registrado no córtex cerebral. No corpo estriado, os níveis de receptores M_4 tendem a aumentar com o decorrer da idade, enquanto os receptores M_1 , M_2 e M_3 atingem seus níveis de maturação no 16º dia de vida. Mudanças menos significativas são vistas ao nível do cerebelo, na qual há uma diminuição dos receptores M_1 , M_3 e M_4 . Em contraste com as demais áreas, o hipocampo exibe níveis consistentes de todos os subtipos de receptores ao longo do desenvolvimento (Tice et al., 1996).

2. 1. 2. Sistema dopaminérgico

A dopamina (DA) exerce seus efeitos biológicos por interagir com os receptores específicos. Esses receptores foram classificados originalmente segundo Kebabian & Calne (1979), como receptores dopaminérgicos D₁ (RD₁) e D₂ (RD₂). Realizam suas ações por se acoparem e ativarem diferentes complexos de proteína G. O receptor D₁ interage com o complexo de proteína G_s, resultando em ativação da adenilil ciclase e um aumento nos níveis de AMPc intracelular. Os receptores D₂ interagem com um complexo de proteína G_i para inibir a produção de AMPc (Civelli et al., 1993; Cooper et al., 1991).

Estudos indicam que os receptores dopaminérgicos podem influenciar a função celular através de outros mecanismos, além de estimular ou inibir a adenilil ciclase. O receptor D₁ parece fazer também um efeito estimulatório no “turnover” do fosfoinositídio. Enquanto o receptor D₂, além de inibir a adenilil ciclase, aumenta a condutância para o K⁺ e modula o metabolismo do fosfoinositídio (Civelli et al., 1993; Cooper et al., 1991).

O avanço da biologia molecular (incluindo clonagem de genes) e o aperfeiçoamento de técnicas de radioligantes possibilitou a identificação de quatro subtipos de receptores D₂ (D_{2c}, D_{2L}, D₃ e D₄) e um subtipo de receptor D₁ (D₅).

A ação da DA foi descoberta desde décadas passadas, interpretada através das suas interações com somente dois receptores (D₁ e D₂). A descoberta de D_{2c}, D_{2L}, D₃, D₄ e D₅ imediatamente revelou a possibilidade de que a atividade desses novos receptores tenha sido disfarçada pelos receptores clássicos D₁ e D₂. A pesquisa para característica comum de ambos, os novos receptores e os clássicos, pode ajudar a resolver essas questões (Civelli et al., 1993).

Tendo em vista essa dúvida, quanto à nova classificação de receptores dopaminérgicos em D₁, D₂, D₃, D₄ e D₅, alguns pesquisadores preferem agrupar esses subtipos em D₁-símile e D₂-símile, já que as propriedades farmacológicas e estruturais

desses subtipos clonados (D_2c , D_2L , D_3 , D_4 e D_5) não são suficientemente divergentes daquelas já existentes (D_1 e D_2).

A DA está presente na maioria das regiões do SNC, sendo originada de longos axônios que partem da substância negra e área tegmentar ventral e inervam os núcleos da base, partes do sistema límbico e o córtex frontal (Kebabian e Calne, 1979).

O sistema dopaminérgico compreende três vias neuronais principais: nigroestriatal, mesocorticolímbica, tuberoinfundibular. A via nigroestriatal está envolvida com disfunções extrapiramidais. Esta via é responsável por 75% da DA cerebral, sendo constituída por neurônios que se projetam da substância negra para o corpo estriado. A via nigroestriatal tem importante papel na locomoção (Civelli et al., 1993).

Estudos anteriores observando o desenvolvimento do sistema dopaminérgico mostram que o conteúdo de DA no corpo estriado aumenta lentamente após o nascimento e que a densidade dos sítios de ligação ao [$3H$] SCH 23390 aumentam durante 14-35º dia de vida. Em contraste, a afinidade dos receptores D_1 para [$3H$] SCH 23390 no corpo estriado permanecem inalterados do nascimento até a senescência (Giorgio et al., 1987). Quanto aos receptores dopaminérgicos D_2 , pesquisas demonstram que níveis significativos desses receptores são expressos em torno do 3º dia de vida, alcançando os níveis adultos no 21º dia após o nascimento (Rao et al., 1991; Sales et al., 1989; Schambra et al., 1994).

Os receptores D_2 são abundantemente expressos em todas as áreas cerebrais dopaminérgicas, todavia os receptores D_3 e D_4 possuem uma distribuição mais restrita em níveis muito menores que os receptores D_2 (Sibley e Monsma, 1992; Sokoloff et al., 1990; Van Tol et al., 1991), na qual Stanwood et al. (1997) mostram que por volta do 14-21º de vida, níveis significativos de ligações ao receptor D_3 ainda não podem ser detectadas.

2. 1. 3. Sistema serotonérgico

O sistema serotonérgico tem como neurotransmissor a serotonina (5-HT). A 5-HT é um importante neurotransmissor inibitório em muitas áreas do Sistema Nervoso Central (SNC) (Julius, 1991). A estimulação inibitória induzida pela 5-HT ocorre através da ativação de muitas vias da 5-hidroxitriptamina (5-HT) em neurônios da rafe ou nas regiões da parte superior do tronco cerebral (Peroutka, 1988). A 5-HT está presente em fibras não-mielinizadas que inervam difusamente muitas regiões do SNC, mas a sua densidade de inervação é diferente para as áreas cerebrais (Peroutka, 1988). Os receptores serotonérgicos, principalmente o 5-HT₁ exercem efeitos predominantemente inibitórios e estão relacionados com o humor e o comportamento (Cooper et al., 1991). Acredita-se que a maioria dos efeitos de ativação serotonérgica no cérebro é provavelmente devido à estimulação dos receptores serotonérgicos do tipo 5-HT_{1A}.

Os receptores serotonérgicos são amplamente distribuídos em todo corpo e exercem inúmeras funções vitais no cérebro e no sistema nervoso periférico (Cooper et al., 1991). No fim de 1980, através de técnicas de biologia molecular, foram identificados 4 subtipos de receptores muscarínicos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄) (Hartig, 1989). Esses receptores encontram-se distribuídos no SNC de forma diferenciada e divergem quanto ao mecanismo de ativação. Os subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D}, agem por inibição da adenilil ciclase (AC), diminuindo os níveis de AMPc. Já os subtipos 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C} transmitem sinais através da mobilização de Ca⁺⁺ no SNC (Hartig, 1989). O subtipo 5-HT₃ é um canal iônico, receptor do tipo 1, enquanto que, o 5-HT₄ age por estimulação da adenilil ciclase (AC), aumentando os níveis de AMPc.

O desenvolvimento dos neurônios que contém serotonina tem sido extensivamente estudado em inúmeras espécies animais, incluindo ratos (Lauder, 1990; Lidov e Molliver, 1982), primatas não humanos (Lambe et al., 2000) e humanos. Em todas as espécies estudadas, os níveis serotonérgicos adultos são muito menores que os

níveis em animais jovens, o que confirma a evidência de um maior estágio funcional do sistema serotonérgico durante o desenvolvimento.

No cérebro humano, os neurônios serotonérgicos são primeiramente evidenciados durante a 5^a semana de gestação (Sudstrom et al., 1993), e rapidamente aumentam em torno da 10^a semana (Kontur et al., 1993; Levallois et al., 1997; Shen et al., 1989). Em ratos, estudos mostram diferenças regionais em relação aos sítios de ligação aos receptores serotonérgicos, no qual Pranzatelli (1993) utilizando o ligante ³H-mesulergine, demonstra que os sítios de ligação ao receptor 5-HT_{1c} diferem regionalmente durante as 5 primeiras semanas após o nascimento. No nascimento, os sítios 5-HT_{1c} corticais são de 24-32% dos níveis adultos e aumentam significamente após 14-21 dias; já no tronco cerebral, a maioria dos sítios de ligação ao receptor 5-HT_{1c} estão presentes logo no nascimento e aumentam durante os 10 primeiros dias.

2. 2. Neurotransmissores e o processo convulsivo no cérebro em desenvolvimento

Os mecanismos envolvidos na indução e manutenção da epilepsia ainda não são bastante conhecidos. A hipótese de que neurotransmissores como: o glutamato e o GABA, participem durante as desordens convulsivas sugerem que alterações na transmissão excitatória e inibitória, respectivamente, possam contribuir para modificar a excitabilidade neuronal (Avoli et al., 1994; Costa-Lotufo et al., 2002; Meldrum e Garthwaite, 1990; Patel et al., 1988). Esta hipótese é sustentada pela eficiência das drogas anticonvulsivantes que aumentam a transmissão GABAérgica ou diminuem a glutamatérgica (Avoli et al., 1994; Ling et al., 2001). A participação primária do sistema GABA, glutamatérgico e de outros neurotransmissores na epilepsia é, entretanto, pouco definida.

Inúmeros estudos sugerem o envolvimento do sistema colinérgico na epilepsia humana (Hirsch et al., 1992; Jope et al., 1986; Michotte et al., 2000; Olney et al., 1983; Persinger et al., 2001; Turski et al., 1983a,b,c,d). A administração periférica e central de agonistas colinérgicos produz convulsões acompanhadas por lesões cerebrais (Marinho et

al., 1997; Turski et al., 1989). Estas convulsões parecem depender da ativação do receptor muscarínico, da alteração da atividade enzimática de alguns sistemas (Liu et al., 2002; Naffah-Mazzacoratti et al., 2001; Simonic et al., 2000), do envolvimento do metabolismo dos fosfoinosítidos (Marinho et al., 1998), como também da participação de outros sistemas de neurotransmissão, a saber: dopaminérgico (Kulkarni et al., 1996), serotonérgico (Cavalheiro et al., 1995), GABAérgico, (Costa-Lotufo et al., 2002; Loup et al., 1999), e glutamatérgico (Chamberlain et al., 2000; Massieu et al., 1994; Nadler et al., 2001). Além desses fatores, a susceptibilidade às convulsões também tem sido apontada como um fenômeno relacionado com a idade.

Na literatura, o cérebro imaturo é considerado mais excitável que o cérebro adulto (Holmes et al., 1997). Este conceito é suportado pela alta incidência de convulsões em humanos observada durante a infância e adolescência quando comparado a idade adulta (Berg e Shinnar, 1994; Berg et al., 1995). Um número de fatores fisiológicos facilita o desenvolvimento de convulsões no cérebro imaturo (Connors et al., 1983; Dudek et al., 1990). A excitabilidade aumentada e a alta sensibilidade a agentes proconvulsivantes tem sido demonstrada em experimentos com animais imaturos, incluindo ratos, gatos e macacos (Kubova e Moshe, 1994).

A tendência ao acúmulo de altos níveis de potássio extracelular durante as convulsões, em parte devido à diminuição da recaptação pela glia, e em parte devido a outros fatores (Hablitz e Heincmann, 1987; Swann et al., 1988) tem sido muito mais apontado como fator epileptogênico no cérebro imaturo do que no cérebro adulto, causando atividade convulsiva na ausência de qualquer outro estímulo (Swann et al., 1991). Além disso, várias características do circuito neuronal do cérebro em desenvolvimento podem contribuir para essa excitabilidade aumentada (Ben Ari et al., 1997; Holmes, 1997). Por exemplo, GABA, o principal neurotransmissor inibitório no sistema nervoso central maduro, em ratos, possui propriedades excitatórias durante a primeira semana de vida (Ben Ari et al., 1989; Ben Ari et al., 1997). Em adição, receptores de aminoácidos excitatórios (NMDA e AMPA) são mais abundantes e possuem subunidades que promovem despolarização neuronal (Monyer et al., 1991).

Estes fatores são propostos contribuir para um balanço excitatório-inibitório alterado (Holmes et al., 1997). Além disso, o número de sinapses excitatórias corticais e hipocampais é maior durante a segunda semana de vida nos ratos e decresce durante a terceira semana (Swann et al., 1992). Dessa forma, todos estes fatores favorecem a excitabilidade aumentada e propiciam a geração e propagação das convulsões no cérebro em desenvolvimento (Holmes et al., 1997).

3. Estresse oxidativo e epilepsia

3. 1. Estresse oxidativo no cérebro em desenvolvimento

Estresse oxidativo é definido como uma condição na qual ocorre um aumento, de forma descontrolada, da produção de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (EROs), desencadeada por fatores endógenos ou exógenos (von Borell, 2001). EROS são intermediários reativos formados durante o processo de redução da molécula de oxigênio, dentre eles, estão os radicais superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2^-), hidroxila (HO^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), este último, apesar de não ser um radical livre, pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito extremamente deletério, porque participa da reação que produz o HO^- (Ferreira e Matsubara, 1997).

Desde a sua descoberta, como um mensageiro intracelular de produção endógena, tem sido demonstrado que o óxido nítrico (NO) desempenha um importante papel em praticamente todos os sistemas do organismo (Eiseich et al., 1998a). Embora exerça diversas funções fisiológicas úteis, seu excesso pode ser nocivo. Em determinadas condições o NO e o O_2^- podem interagir, resultando um produto muito tóxico, o peroxinitrito ($ONOO^-$), esse composto é capaz de reagir prontamente com diversas moléculas: proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucléicos, danificando-as. Além disso, seus prováveis produtos de decomposição, o $OH\cdot$, dióxido de nitrogênio e outros têm semelhante potencial deletério. Conseqüentemente, a toxicidade do óxido nítrico pode ser explicada, pelo menos em parte, por sua reação com o O_2^- . O aumento da

produção de ONOO^- , tem sido associado a diversos processos patológicos (Demiryurek et al., 1998, Eiserich et al., 1998a,b).

As espécies reativas são encontradas em todos os sistemas biológicos e são capazes de reagir com todos os componentes celulares, contudo a membrana plasmática, principalmente em nível cerebral, em especial as áreas cerebrais hipocampo e corpo estriado, devido à alta concentração de lipídeos e metais oxidáveis são umas das mais atingidas, acarretando em alterações na estrutura e permeabilidade da membrana celular (Mello et al., 1983; Zaleska e Floyd, 1985;). Conseqüentemente, ocorre perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos como o malonaldeído (MDA), culminando com a morte celular (Hershko, 1989).

No sistema nervoso, o fenômeno denominado excitotoxicidade tem sido relacionado com uma alta produção de radicais livres pelo tecido. A liberação excessiva de aminoácidos excitatórios, como o glutamato, pode ocasionar em morte neuronal após ativação excessiva desses receptores (Ortiz et al., 2000). Dependendo da maturidade neuronal, o glutamato pode induzir à morte, através de mecanismos apoptóticos ou necróticos prejudicando a homeostase do cálcio e induzindo ao estresse oxidativo (Ferrer et al., 1995).

Na tentativa de se defender contra o ataque de radicais livres, a célula desenvolveu, ao longo de sua evolução, sistemas antioxidantes endógenos, que atuam em duas linhas, a primeira como detoxificadora, antes que o agente cause a lesão, composto pela glutatona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GSH-Px). A segunda linha age reparando a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, glutatona redutase (GSH-Rd) e GSH-Px, entre outros (Ferreira e Matsubara, 1997; Freeman e Crapo, 1982).

O radical O_2^- pode ser gerado no cérebro por vários mecanismos como ineficiência de alguns dos componentes da cadeia transportadora de elétrons na

mitocôndria, degradação de monoaminas, reação xantina oxidase e pelo metabolismo do ácido araquidônico. Todavia, o O_2^- produzido pode ser metabolizado pela SOD, que se encontra presente no citosol (isoforma associada ao cobre-zinco) e na mitocôndria (associada ao manganês) (Hussain et al., 1995). O H_2O_2 , como citado anteriormente, em altas concentrações pode reagir com O_2^- (reação de Haber-Weiss) ou com ferro (reação de Fenton) produzindo radical OH^- . A conversão do H_2O_2 a água (H_2O) é mediada pela CAT e GSH-Px que envolve a glutationa (um tripeptídeo contendo um grupo tiol) que é um co-fator desta enzima (Meister e Anderson, 1983; Meister, 1991).

Em condições fisiológicas, esse mecanismo de defesa regula de forma precisa as concentrações e atividade dos radicais livres mantendo-os em condições estáveis não prejudiciais à integridade celular (Harris, 1992).

Estudos experimentais em ratos demonstram que os níveis de peroxidação lipídica no cérebro, logo após o nascimento, correspondem a 33% dos níveis cerebrais em animais adultos, e a partir do 16º dia estes níveis tornam-se equivalentes. Com relação às concentrações das enzimas antioxidantes e níveis de GSH nos cérebros de animais imaturos, este último apesar de sofrer consideráveis flutuações durante o desenvolvimento, não apresenta diferença significativa dos níveis de GSH em animais adultos, bem como as concentrações das enzimas antioxidantes também apresentam-se geralmente similares aos valores encontrados nos animais adultos, sugerindo assim que não existe diferença ontogênica quanto à capacidade protetora antioxidante em situações não patológicas (Shivakumar et al., 1991).

3. 2. Estresse oxidativo e o processo convulsivo no cérebro em desenvolvimento

Existem evidências de que as EROs possam estar envolvidas na fisiopatologia de diversas doenças, como doença de Parkinson e Alzheimer (Martilla et al., 1988; Martilla e Rinne, 1989). Além das citadas, estudos também têm sugerido que o estresse oxidativo parece ter um importante papel na etiologia da morte neuronal induzida pelo processo convulsivo (Frantseva et al., 2000; Freitas et al., 2004b; Liang et al, 2000), e que a

susceptibilidade ao estresse é altamente dependente da idade (Patel e Li, 2003; Wasterlain et al., 1999).

Convulsões freqüentes podem causar dano cerebral em animais de todas as idades, todavia com relação à susceptibilidade do cérebro imaturo, os resultados ainda são bastante controversos. Alguns estudos mostram que o cérebro imaturo é mais resistente às convulsões (Cavalheiro et al., 1987; Hirsch et al., 1992; Michelson e Lothman, 1991), outros sugerem uma maior susceptibilidade ao estímulo convulsivo, com intensidade e duração similar, porém com menor dano histológico quando comparado ao cérebro de animais adultos (Albala et al., 1984; Nitecka et al., 1984; Sperber et al., 1999). Patel e Li (2003) demonstram que a ausência de ambos, inativação da aconitase mitocondrial (enzima sensível ao radical superóxido) e dos níveis de 8-OhdG (um indicador de dano oxidativo no DNA) em animais jovens, mas não em adultos, sugerem ausência de dano oxidativo nos animais imaturos, e dessa forma pode explicar, em parte, a resistência desses animais ao dano cerebral induzido pela convulsão. Contudo, se as convulsões persistentes continuam ao longo da idade, um dano cumulativo pode surgir, devido à sensibilidade aumentada dos animais adultos ao estresse oxidativo. Esse fato ressalta assim a importância de minimizar as convulsões nos animais jovens, com o objetivo de prevenir esse conseqüente dano oxidativo.

4. Modelos colinérgicos de convulsão

Em condições fisiológicas, a estimulação colinérgica induzida por ACh é importante para os processos cerebrais como memória e aprendizagem (Bartus et al., 1982). Contudo, a ACh em excesso, como depois de uma exposição por organofosforados, que são agentes anticolinesterásicos, apresenta intensos efeitos sobre a energia celular (Pazdernik et al., 1985) e metabolismo dos fosfoinositídios (Flynn e Wecker, 1987; Chamberlain et al., 2000; Marinho et al., 1998). Essas mudanças estão associadas a uma forte excitação elétrica dos neurônios (Konopacki et al., 1987; Morrisett et al., 1987a,b), e frequentemente acompanhadas por convulsões (Jope et al., 1987;

Morrisett et al., 1987a,b; Olney et al., 1986; Piredda e Gale, 1985; Savolainen et al., 1988a,b; Turski et al., 1983a,b,c).

A ACh, os anticolinesterásicos e análogos da ACh são efetivos agentes epileptogênicos quando aplicados intracerebralmente (Cavalheiro et al., 1983; Cohen et al., 1981; Olney et al., 1983) ou sistemicamente (Lundy e Shaw, 1983; Turski et al., 1983d). Injeções diretas na amígdala (Turski et al., 1983b) e no hipocampo (Turski et al., 1983c) de agonistas colinérgicos muscarínicos e colinomiméticos, em ratos, mostram ocorrências eletrográficas e comportamentais de convulsões límbicas acompanhadas por lesões cerebrais semelhantes àquelas produzidas por ácido kaínico (Ben-Ari et al., 1980; Ben-Ari et al., 1981; Siesjo, 1981) e folatos (Olney et al., 1981).

A evidência sustentando a hipótese da participação do sistema colinérgico na propagação das convulsões é dada através de estudos demonstrando que lesões dos neurônios colinérgicos na substância inominata, inibem a produção de convulsões estimuladas, eletricamente, na amígdala (Kimura et al., 1981). A atropina, um antagonista muscarínico, supriu a propagação das convulsões estimuladas na amígdala (Arnold et al., 1973), enquanto que, injeções locais de colinomiméticos intensificaram a atividade convulsiva hipocampal (Burchfield et al., 1979).

A pesquisa sobre epileptogênese colinérgica tem favorecido o conhecimento das propriedades excitatórias da ACh (Olney et al., 1986; Savolainen e Hirvonen, 1992). Vários modelos animais de convulsões induzidas por agentes colinérgicos têm recentemente sido desenvolvidos para explorar esses mecanismos e o papel do sistema colinérgico cerebral na patofisiologia da epilepsia humana (Costa-Lotufo et al., 2002; Hirsch et al., 1992; Jope et al., 1986; Olney et al., 1983; Turski et al., 1983a,b,c,d).

4. 1. Modelo de convulsão com pilocarpina

Em roedores, a administração sistêmica de altas doses de pilocarpina produz convulsões e subsequente desenvolvimento de estado epiléptico (Turski et al., 1983a,b;

1989) acompanhado por lesões cerebrais que são semelhantes, em muitos aspectos, às lesões observadas em cérebro de pacientes epilépticos (Cavalheiro et al., 1991; Leite et al., 1990; Turski et al., 1983a).

Turski et al. (1983a) demonstraram que a injeção sistêmica de pilocarpina (300 - 380 mg/kg), por via intraperitoneal, é capaz de produzir automatismo facial, e convulsões motoras límbicas que se desenvolvem após 30 minutos e progridem para o estado epiléptico.

Efeitos ao longo prazo, da administração de pilocarpina em ratos, são caracterizados por três fases distintas : a) período agudo, de 1 a 2 dias de duração que corresponde ao modelo de convulsões límbicas repetidas e estado epiléptico; b) período sem convulsão (período silencioso), caracterizado por um progressivo retorno ao EEG e comportamento normal, compreendendo a duração de 4 - 44 dias, e c) um período de convulsões espontâneas recorrentes, começando entre 5 - 45 dias depois da pilocarpina e permanecendo por toda a vida do animal (Cavalheiro et al., 1991; Leite et al., 1990). Vários estudos foram feitos utilizando esse modelo para entender a atividade convulsiva e o papel do sistema colinérgico nesse processo (Freitas et al., 2003a; Fujikawa, 1996; Marinho et al., 1997).

Os mecanismos que envolvem as mudanças relacionadas com a idade na susceptibilidade das convulsões induzidas por colinérgicos ainda não foram esclarecidos. O tratamento com alta dose de pilocarpina resulta em intensas convulsões e estado epiléptico acompanhado de extensas lesões cerebrais nos ratos adultos (Marinho et al., 1997; Turski et al., 1983a; 1989). A susceptibilidade dos ratos às convulsões e estado epiléptico induzido por pilocarpina é dependente da idade, na qual nos ratos com 18-24 dias de idade, as características comportamentais e eletroencefalográficas são semelhantes às observadas nos animais adultos, enquanto que os animais mais jovens que essa faixa de idade não exibem convulsões (Priel et al., 1996).

5. Nimodipina

5. 1. Considerações iniciais

Desde o final da década de 1800, constatou-se a necessidade de um influxo de cálcio para a contração do músculo. Entretanto, o mecanismo pelo qual o cálcio penetrava na célula só foi descoberto muito recentemente. A descoberta de um canal de cálcio no músculo cardíaco (Reuter, 1983) foi seguida do achado de vários tipos distintos de canais de cálcio em diferentes tecidos.

Na década de 1960, pesquisas levaram ao conceito de que determinados fármacos podem alterar a contração do músculo cardíaco e do músculo liso ao bloquearem a entrada de cálcio, estas drogas foram denominadas bloqueadores de canais de cálcio ou antagonistas de cálcio, e correspondem, atualmente, às drogas mais prescritas no tratamento de doenças cardiovasculares (Freher et al., 1999).

A origem dos antagonistas de cálcio provém de derivados das fenilalquilaminas, tendo como protótipo deste grupo, o verapamil (Haas e Hartfelder, 1962). Atualmente esses compostos constituem uma classe de drogas estruturalmente heterogênea que causam uma vasodilatação generalizada, apesar de agora haver evidências de que agentes distintos diferem na distribuição regional deste efeito (Opie, 1996; Vetrovec, 1994;).

O aumento do número de antagonistas de cálcio (sejam novas formulações ou novas estruturas químicas) tem contribuído para uma mudança no cenário, possibilitando um emprego mais apropriado quando comparado com outros agentes antihipertensivos. Pelo menos três fatores contribuíram para isso: (a) Desenvolvimento de novas formulações de nifedipina e diltiazem, possibilitando melhor perfil farmacocinético; (b) A introdução de novos compostos, principalmente do grupo das dihidropiridinas; (c) As recentes evidências de efeitos prejudiciais das dihidropiridinas de ação curta em alguns grupos de pacientes. Alguns autores têm proposto uma nova classificação para os antagonistas de cálcio (Mancia e Van Zwieten, 1996; Nayler, 1990; Zanchetti, 1997).

Neste novo sistema de classificação, os antagonistas de cálcio são divididos de acordo com as suas propriedades químicas usuais e diferentes afinidades em relação aos diversos tipos de vasos e tecido cardíaco. Para este novo sistema classificatório, uma subdivisão foi adotada, sendo cada subclasse dividida em primeira (verapamil, diltiazem, nifedipina e nicardipina), segunda (nifedipina, nicardipina, verapamil e diltiazem em formulações de liberação prolongada e novas dihidropiridinas tais como nisoldipina, nitrendipina e manidipina, entre outras) e terceira geração (anlodipina, lacidipina e nimodipina). Esta subdivisão baseia-se tanto nas características farmacocinéticas quanto nos efeitos farmacodinâmicos.

5.2. Preparações farmacêuticas

Com relação às propriedades fisicoquímicas, a nimodipina é uma 1,4-dihidropiridina e possui relação estrutural com a nifedipina. Seu nome químico é isopropil (2-metoxietil)1,4-didro-2,6-dimetil-4-(3-nitrofenil)-3,5-piridina-dicarboxilato. Possui peso molecular de 418,45 e sua fórmula estrutural é C₂₁H₂₆N₂O₇ (Jaya, 2000).

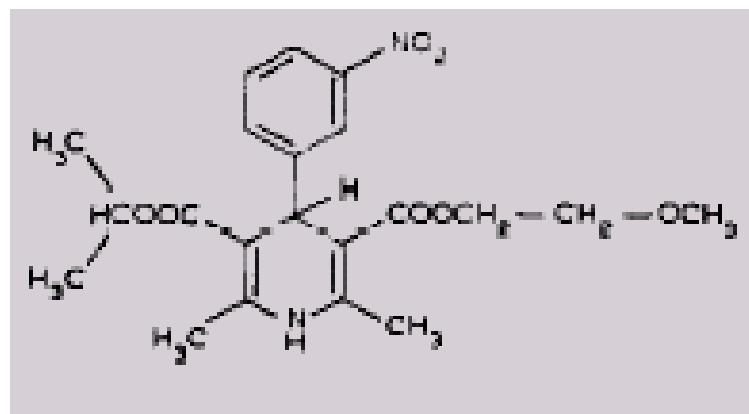


Figura 1 – Estrutura molecular da nimodipina (Fonte: Gonçalves et al., 1991)

A atividade farmacológica da nimodipina parece ser influenciada pela posição dos substituintes no anel 4-aryl e pela planaridade do anel 1,4-dihidropiridinico (Jaya, 2000). O

Quadro 1 apresenta as formas farmacêuticas disponíveis na Inglaterra e no Brasil juntamente com alguns nomes comerciais.

Quadro 1- Formas farmacêuticas da nimodipina

Via de administração	Formas Farmacêuticas		Nomes Comerciais	
	Oral	Endovenosa	INGLATERRA E EUA	BRASIL
Via de administração	Oral	- Comprimido com 30mg - Solução 4% (40mg/mL)	Nimotop®	Oxigen® Norton® Oxigen®
	Endovenosa	- Solução 0,02% (0,2mg/mL)	Nimotop®	Oxigen®

5.3. Aspectos farmacocinéticos

A nimodipina é rapidamente absorvida após administração oral, com pico de concentração plasmática, geralmente atingido em 1 hora. Estudos farmacocinéticos mostram que sua biodisponibilidade é em torno de 4 a 13% em pacientes saudáveis (Ramsch et al., 1985; 1986) e 2 a 28% em pacientes que sofreram hemorragia subaracnóidea (Vinge et al., 1986). Essa biodisponibilidade reduzida é atribuída ao intenso metabolismo de primeira passagem que ocorre no fígado (Ramsch et al., 1985).

A administração intravenosa é uma alternativa que promove uma melhor biodisponibilidade da nimodipina comparada à administração oral. Contudo, a dificuldade da realização de estudos experimentais em animais, principalmente por questões éticas e logísticas, com infusões contínuas ou freqüentes a longo prazo, limita a praticabilidade desta via, bem como sua disponibilidade no uso clínico (Laslo et al., 2004).

Aproximadamente 95% da droga liga-se às proteínas plasmáticas. Estudos em animais indicam que a nimodipina distribui-se amplamente nos tecidos após administração oral ou intravenosa. Devido a sua alta lipossolubilidade, atravessa

facilmente a barreira hematoencefálica e distribuir-se em todo tecido cerebral (Auer et al., 1983; Kazda e Toward, 1982).

Nimodipina é extensivamente metabolizada no fígado (Liu et al., 2000). É eliminada quase que exclusivamente na forma de metabólitos na maioria inativos e menos de 1% é recuperado na urina como droga inalterada. A meia-vida de eliminação terminal é de aproximadamente 8 a 9 horas, mas os índices de eliminação precoce são muito mais rápidos, equivalentes à meia-vida de eliminação de 1 a 2 horas (Langley & Sorkin, 1989).

5. 4. Aspectos farmacodinâmicos

A nimodipina é um análogo da nifedipina (bloqueador de canal de cálcio tipo L – canal controlado por voltagem). O mecanismo de ação dos bloqueadores de canal de cálcio envolve bloqueio do influxo transmembranar de cálcio. Bloqueando a liberação pós-excitatória de íons cálcio no músculo liso cardíaco e vascular inibindo a ativação de ATPase na contração miofibrilar. O efeito global é reduzir os níveis intracelulares de cálcio nas células musculares cardíacas e lisas resultando em dilatação das artérias coronárias, periféricas e cerebrais e arteríolas (Rang et al., 2004). A nimodipina difere dos outros bloqueadores de canais de cálcio (nifedipina, verapamil e diltiazem) por apresentar maior efeito ao nível dos vasos cerebrais em comparação aos vasos coronários e periféricos. Também tem maior eficácia no fluxo sanguíneo cerebral quando a barreira hematoencefálica é rompida. Porém, por ser mais lipofílica que a nifedipina e outros bloqueadores de canal de cálcio, ela é capaz de penetrar a barreira hematoencefálica, até mesmo intacta. Sua ação farmacológica ainda não foi completamente esclarecida, mas provavelmente envolve mecanismos múltiplos. Nimodipina parece prevenir a fase vasoconstritora inicial secundária ao bloqueio dos canais de cálcio. Também interfere com a função plaquetária (inibindo a agregação plaquetária e a liberação de aminas vasoativas).

5.5. Usos Clínicos

Nimodipina tem sido utilizada na prevenção e tratamento de patologias relacionadas com alterações na circulação cerebral, é indicada no tratamento de hemorragia subaracnóidea (HSA) recente, na qual atualmente, é a única terapia comprovada disponível que reduz a morbidez e mortalidade associada com déficits isquêmicos posteriores em pacientes com vasoespasma relacionado com HSA (Biondi et al., 2004; Dorsch, 2002).

Alguns estudos também sugerem o uso de nimodipina no tratamento da isquemia aguda (Hauerberg et al., 1996), em razão da melhoria da recuperação neurológica e redução da mortalidade vista em comparação a terapias de expansão do volume plasmático ou placebo em pacientes com isquemia aguda. A nimodipina parece ser útil na profilaxia e tratamento de certos tipos de cefaléias de origem vascular (Lu et al., 2004), na qual se observa uma redução da freqüência e possivelmente da severidade e duração dos ataques nos pacientes após 1-2 meses de início da terapia.

Nimodipina também tem sido usada com algum sucesso em pacientes com cefaléia severa de origem vascular não migratória associada com isquemia cerebral crônica. Bem como, a administração intravenosa tem sido indicada para alívio de vasoespasma cerebral traumático acompanhado de injúria severa da cabeça. Além disso, nimodipina tem sido também utilizada em alguns pacientes com epilepsia parcial contínua (Brandt et al., 1988) e no tratamento de alterações cerebrais decorrentes de doença vascular crônica ou do envelhecimento, caracterizadas principalmente por alterações de memória, concentração e comportamento, labilidade emocional e redução da capacidade intelectual (Pantoni et al., 2000; Yanpalloewar et al., 2004).

5.6. Toxicidade e efeitos adversos

Nimodipina geralmente é bem tolerada após administração oral. Aproximadamente 11% dos pacientes com HSA tratados com nimodipina apresentam

efeitos adversos, dentre as alterações no sistema cardiovascular, a hipotensão, é o efeito adverso mais freqüente (4,4%) (Devlin et al., 2000). Alterações eletrocardiográficas, como taquicardia, bradicardia, arritmias e extrasístoles também têm sido reportadas em alguns pacientes (Eisenberg et al., 2004). Retenção de líquido (9,3%) e cefaléia (4,1%) são os efeitos mais comuns em pacientes que recebem nimodipina para outros tratamentos além de HSA (Eisenberg et al., 2004).

Dentre os efeitos hematológicos, menos de 1% dos pacientes com HSA apresentam trombocitopenia e anemia. No sistema nervoso central, são reportados casos isolados de fadiga, irritabilidade, desorientação e depressão (Jaya, 2000). Em casos mais raros, o tratamento com nimodipina pode causar complicações gastrintestinais, tais como náuseas, vômitos, diarréia e cólicas ou hemorragias abdominais (Jaya, 2000).

Nimodipina causa aumentos transitórios dos níveis de fosfatase alcalina, bem como a via intravenosa favorece também o aumento dos níveis de gama-glutamil-transferase, e mais raramente dos níveis de transaminases (Jaya, 2000). Dentre as reações dermatológicas relatadas em alguns casos, a acne ocorre em menos de 1% dos pacientes com HSA, bem como podem aparecer também *rash* maculopapular e prurido (Nucera et al., 2002). Além desses, outros efeitos como hiponatremia, perda de peso, faringite e mialgia também têm sido atribuídos, em menos de 1% dos pacientes, em tratamento com nimodipina (Jaya, 2000).

5.7. Nimodipina e o processo convulsivo

Os íons Ca^{++} estão envolvidos em diversas ações no sistema nervoso central, participando de muitos processos celulares, como liberação de neurotransmissores dos terminais pré-sinápticos. O papel do Ca^{++} nas convulsões (Engle, 1990; McDonald et al., 1991; Pumain et al., 1984), sua atividade neurotóxica (Branconnier et al., 1992; Du et al., 1995; Kakariera et al., 1994; Rajdev e Reynolds, 1995) estão sendo investigados intensamente nestes últimos anos.

O processo convulsivo, quando desencadeado por tempo suficiente, induz morte neuronal (Lees, 1991). O mecanismo exato do dano neuronal ainda não foi totalmente elucidado. Estudos têm demonstrado que a atividade epileptiforme está intrinsecamente associada com influxo de cálcio através dos canais de Ca^{++} operados pelo receptor NMDA e canais de Ca^{++} operados por voltagem (Berg et al., 1995; Heinemann e Louvel, 1983; Pumain et al., 1983). Além disso, estudos demonstram que a entrada de cálcio nas células através dos canais de Ca^{++} do tipo L causam uma sobrecarga de cálcio que eventualmente conduz a liberação de mediadores responsáveis por ativação da cascata apoptótica e morte celular (Cano-Abad et al., 2001).

Drogas que bloqueiam esse influxo de cálcio são nomeados antagonistas de Ca^{++} , dentre eles incluem-se os compostos dihidropiridínicos (nicardipina, nifedipina, nimodipina e nitrendipina, etc) que exercem ações modulatórias sobre os canais de Ca^{++} do tipo L, de maneira específica (Rang et al., 2004) e o protótipo do grupo é a nifedipina. Na prática clínica esses compostos são usados como agentes protetores contra injúria induzida por isquemia cerebral, bem como em algumas desordens periféricas (Janis e Triggle, 1991). Os resultados de muitos estudos experimentais mostram que os antagonistas de cálcio são efetivos contra diferentes tipos de convulsões (Van Luijtelaar et al., 2000). Esses compostos apresentam propriedades anticonvulsivantes em modelos experimentais de convulsão induzidos através de isquemia, biculina, petilenotetrazol, eletro-choque, aminofilina, óxido nitroso, pilocarpina, bem como pela retirada de álcool ou exposição a alta pressão (Charkrabarti et al., 1998; Dolin e Little, 1986; Dolin et al., 1988; Kaminski et al., 2001; Little et al., 1986; Marinho et al., 1997; Meyer et al., 1987; Popoli et al., 1988; Zapatar et al., 1998). A ação anticonvulsivante contra as convulsões induzidas por NMDA sugere que as diidropiridinas podem interagir com receptores de aminoácidos excitatórios como uma possível prevenção da liberação regulada pelo Ca^{++} pré-sinapticamente de aminoácidos excitatórios através da despolarização direta de receptores diidropiridínicos ou regulação pelo acoplamento indireto de canais iônicos sensíveis às diidropiridinas após ativação do receptor NMDA (Palmer et al., 1993).

A nimodipina é uma diidropiridina que age seletivamente no sistema nervoso central, e tem demonstrado ação protetora (Harkany et al., 2000; Kawaguchi et al., 1999) e eficácia anticonvulsivante (Kriz et al., 2003; Marinho et al., 1997) em alguns modelos experimentais em animais adultos, todavia pouco se sabe sobre sua ação em animais jovens. Além disso, o mecanismo exato da ação protetora da nimodipina ainda não foi totalmente esclarecido. Há uma crescente linha que sugere que seus efeitos anticonvulsivantes sejam, em parte, independentes do antagonismo dos canais de Ca^{++} ; que suas ações possam decorrer também do bloqueio de canais de Na^+ e receptores de glutamato, bem como de canais de K^+ dependente de Ca^{++} e canais de Cl^- (Van Luijtelaar et al., 1995). Pesquisas também sugerem que a nimodipina pode bloquear o efluxo de Ca^{++} , antes do influxo, dos sinaptossomas e consequentemente interferir com o mecanismo de liberação e/ou recaptação de neurotransmissores dos terminais neuronais (Azmitia et al., 1993; Woodward et al., 1988).

Assim, um enfoque especial tem sido dado ao estudo com bloqueadores de canais de Ca^{++} , dentre eles a nimodipina, em vários modelos de convulsão em animais (Kaminski et al., 2001; Kriz et al., 2003; Zapatar et al., 1998), inclusive em animais jovens (Mikati et al., 2004).

OBJETIVOS

GERAL

Estudar a fisiopatologia das convulsões induzidas por pilocarpina em alta dose (400mg/Kg; P400) e os efeitos da nimodipina nesse modelo de convulsão em ratos jovens machos com 21 dias de idade.

ESPECÍFICOS

- Investigar as alterações comportamentais produzidas nos animais tratados com nimodipina e/ou pilocarpina;
- Estudar a participação do sistema colinérgico, dopaminérgico e serotonérgico, avaliando os seguintes parâmetros: Densidade máxima (Bmax) e a constante de dissociação (Kd) dos receptores colinérgicos muscarínicos (M_1 - e M_2 -símile) e dopaminérgicos (RD_1 - e RD_2 -símile) em corpo estriado dos animais; Níveis das monoaminas: dopamina (DA), 5-hidroxitriptamina (5-HT) e seus metabólitos: ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA) e ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5-HIAA) para a área estudada;
- Avaliar a interferência no estresse oxidativo, através da determinação dos níveis de peroxidação lipídica, produção de nitrito, atividade da enzima antioxidante catalase e níveis de GSH em corpo estriado.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, jovens com 21 dias de idade, com peso variando de 40 - 60 g, provenientes do Biotério Central do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com no máximo 10 animais, em condições ambientais semelhantes, com ciclo claro / escuro alternado de 12 horas, recebendo ração padrão tipo Purina e água *ad libitum*.

2. Preparação das drogas

2.1. Pilocarpina

Cloridrato de pilocarpina (Sigma Chemical Co., USA) foi dissolvido em água bidestilada, obtendo-se uma concentração final de 200mg/mL.

2.2. Nimodipina

O volume desejado de Nimodipina (Oxygen® 4%; solução líquida; Biosintética, Brasil) foi retirado diretamente da forma farmacêutica. Sendo utilizada uma concentração final de 40mg/mL.

3. Tratamento dos grupos experimentais

Os animais foram tratados com nimodipina ou com pilocarpina, em seguida observados por um período de 1h. O **Quadro 1** sumariza as drogas e suas respectivas doses e vias de administração.

Quadro 1: Droga utilizada com sua respectiva dose e via de administração.

Droga	Dose	Via de Administração	Abreviatura
Nimodipina	10mg/Kg	Intraperitoneal	N10
	30mg/Kg	Intraperitoneal	N30
Pilocarpina	400 mg/kg	Subcutânea	P400

Foram feitas administrações combinadas onde a pilocarpina foi administrada 30 minutos depois da Nimodipina. Todas as associações utilizadas estão sumarizadas no **Quadro 2**. Os animais controles foram tratados com solução salina (NaCl, 0,9%).

Quadro 2: Drogas utilizadas em associação.

Droga	Abreviatura
Nimodipina10 + Pilocarpina	N10+P400
Nimodipina 30+Pilocarpina	N30+P400

Após 1 hora da administração de pilocarpina, os animais que apresentaram convulsões, estado epiléptico e sobreviveram ao tratamento foram sacrificados, e seus cérebros removidos. O corpo estriado foi isolado e retirado sobre gelo, em seguida armazenado em condições apropriadas para a realização dos estudos neuroquímicos.

4. Material utilizado nos experimentos

- Agitador de tubos (modelo 251, FANEN, São Paulo, Brasil);
- Balança analítica (modelo H5, Mettler, Suíça);
- Banho maria (FANEN, modelo 102/1, SP, Brasil);
- Centrífuga (modelo J-21C, Beckman, CA, USA);
- Cubetas de plástico para leitura em espectrofômetro (Sarstedt, Alemanha Oriental);

- Espectrofômetro (Modelo Beckman DU, Fullerton, CA, USA) com medidor de absorbância digital e outros acessórios (acoplado ao sistema de modernização Gilford, Oberlin, Ohio, USA);
- Equipamento de Millipore para filtração à vácuo (Millipore apparatus, Bedford, MA, USA);
- Estufa de secagem e esterilização (modelo 315 SE FANEN, SP, Brasil);
- Filtros de fibra de vidro (GF/B Whatman, Maidstone, England);
- Homogeneizadores (Bellico, USA);
- Guilhotina (Harvard, USA);
- Micropipetas (H.E. Pedersen, Dinamarca)
- Medidor de pH, modelo B374 (Micronal, SP, Brasil);
- Carbogênio (tubo contendo 5 % CO₂ + 95 % O₂);
- Equipamento de HPLC-Cromatografia Líquida de Alta Performance-Detector eletroquímico (Shimadzu, Japão), constando de: Detector eletroquímico (Modelo L-ECD-6A; Shimadzu , Japão) e Eletrodo de carbono (Shimadzu); Degaseificador (DGU-2A Shimadzu , Japão); Integrador (C-R6A Chromatopac, Shimadzu, Japão);
- Injetor (Shimadzu Corp., Japan).

5. Estudo comportamental

Os animais tratados e controles foram divididos em gaiolas contendo 4 a 6 animais e colocados em ambiente reservado, sendo feita a observação direta. Todos os grupos experimentais foram observados durante 1 hora após a última injeção da droga, de acordo com o tratamento previsto. Os seguintes parâmetros foram observados: presença de sinais colinérgicos periféricos, movimentos esteriotipados, convulsões motoras, instalação de estado epiléptico, número de mortes, latência de convulsão e latência de morte em cada grupo. O **Quadro 3** apresenta estes parâmetros juntamente com suas características. Depois desse período de observação, os animais foram utilizados para os estudos neuroquímicos.

Quadro 3 - Parâmetros comportamentais observados

Parâmetros	Características
1. Sinais colinérgicos periféricos (SCP)	Miose, cromodacriorréia, piloereção, diarréia
2. Movimentos estereotipados	Aumento das atividades de roer, coçar-se, mastigar e <i>wet-dog shakes</i> (ato de sacudir – semelhante a um cachorro molhado).
3. Convulsões	Tônico / clônica com ou sem rearing (ato de empinar-se)
4. Estado epiléptico	Convulsões intermitentes
5. N ^º de mortes	Determinado durante o período de 1 hora depois da última administração realizada
6. Latência de convulsão	Intervalo de tempo em segundos entre a última injeção e o aparecimento da primeira convulsão
7. Latência de morte	Intervalo de tempo em segundos entre a última injeção e a morte do animal

6. Dissecção da área cerebral (corpo estriado)

Os animais foram decapitados com uma guilhotina (Harvard, USA) e, em seguida, os encéfalos foram rapidamente retirados e colocados sobre papel alumínio numa placa de petri com gelo (**Figura 1**).

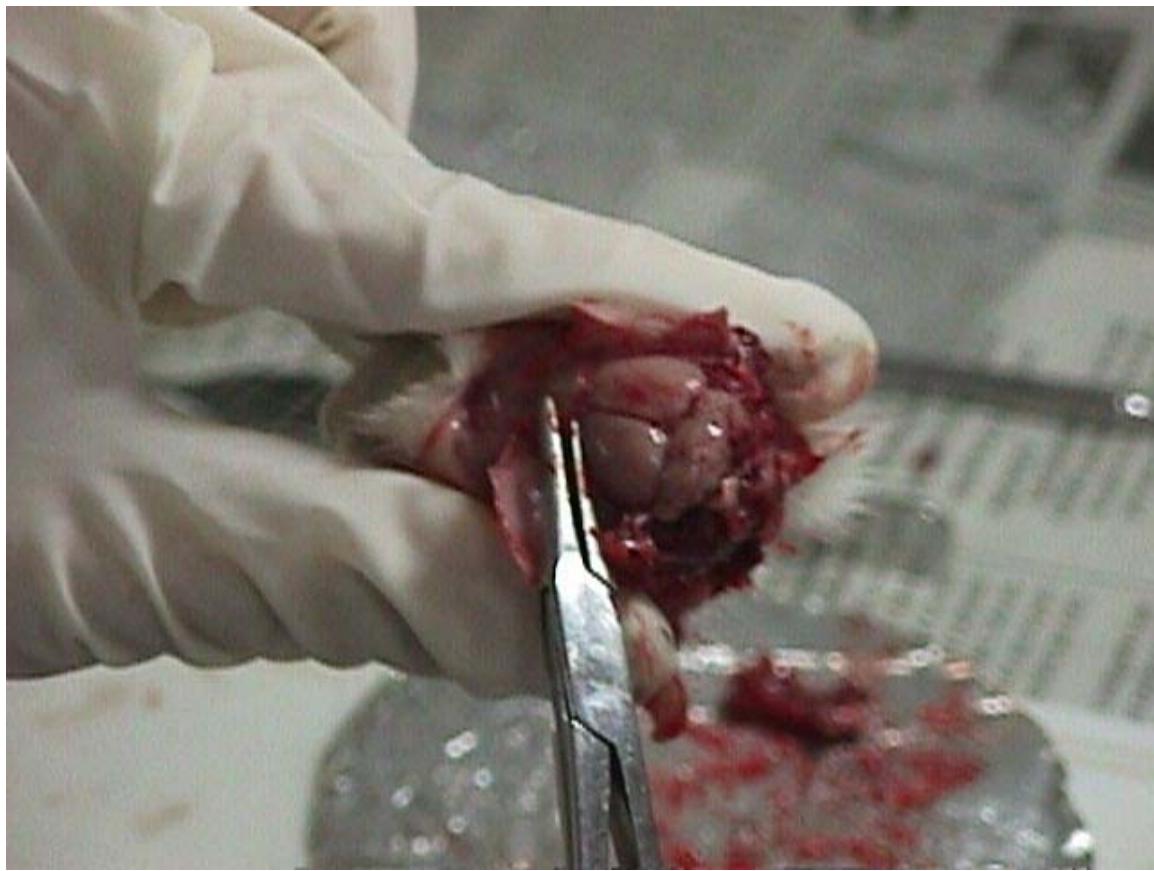


Figura 1 - Dissecção cerebral mostrando a retirada do encéfalo de ratos

O corpo estriado (caudado, putâmen e globo pálido) foi isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecção, sendo a sua retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex (Figura 2).

Terminada a dissecção, a área isolada foi colocada em papel de alumínio, devidamente identificado, pesada e conservada a -70°C para uso posterior. Quando foi necessária a estocagem por um certo período de tempo (no máximo dois meses) os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação que os ensaiados imediatamente ou 24 h após a dissecção (Burke e Greenbaun, 1987; Fielder et al., 1987).

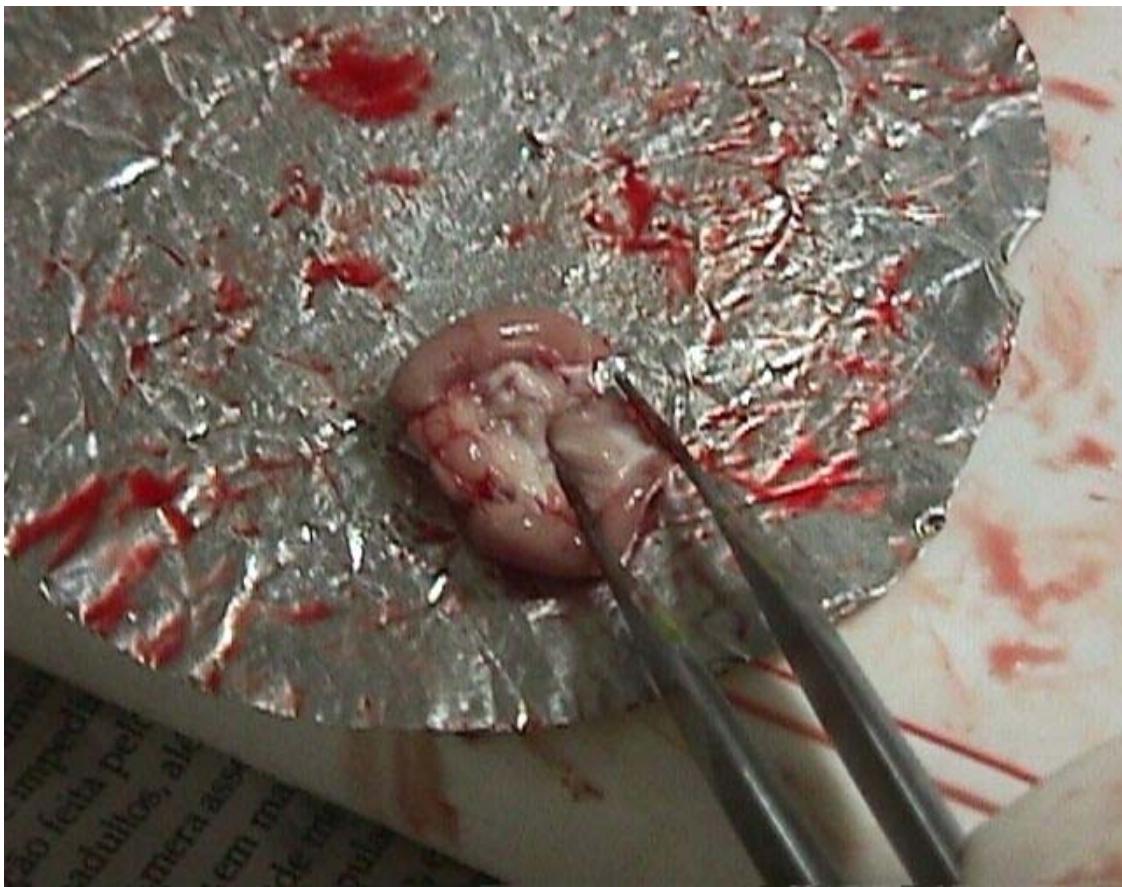


Figura 2 - Dissecção cerebral mostrando a retirada do corpo estriado de ratos.

7. Determinação de monoaminas e metabólitos com HPLC

7. 1. Método

Para a determinação dos níveis de catecolaminas, foi utilizado o equipamento de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) (**Figura 3**). Na cromatografia líquida clássica, um adsorvente (alumina ou sílica) é empacotado em uma coluna e é eluído por um líquido ideal (fase móvel). Uma mistura para ser separada é introduzida na coluna, e é carregada através da mesma por um líquido eluente. Se um composto da mistura (sóluto) é adsorvido fracamente pela superfície da fase sólida estacionária, ele atravessará a coluna mais rapidamente que um outro soluto que seja mais rapidamente

adsorvido. Então, a separação dos solutos é possível se existem diferenças na adsorção pelo sólido.

Os detectores eletroquímicos medem a condutância do eluente, ou a corrente associada com a oxidação ou redução dos solutos. Para ser capaz de detectar, no primeiro caso os solutos devem ser iônicos, e no segundo caso os solutos devem ter a característica de serem relativamente fáceis de se oxidarem ou reduzirem.

Detectores eletroquímicos que medem corrente associada com a redução ou oxidação de solutos são chamados detectores amperométricos ou coulométricos. Neste estudo, foi utilizado o tipo amperométrico que reage com uma quantidade muito menor de soluto, em torno de 1%. Todas as técnicas eletroquímicas envolvem a aplicação de um potencial para um eletrodo (geralmente de carbono vítreo), oxidação da substância que está sendo estudada próximo à superfície do eletrodo, seguindo a amplificação e medida da corrente produzida. As catecolaminas são oxidadas nos grupos de anel hidroxil para produzir um derivado ortoquinona com a liberação de dois elétrons.

7. 2. Procedimento Experimental

Os animais foram decapitados 1 h após a administração de pilocarpina 400 mg/kg e, imediatamente, tiveram seus cérebros dissecados sob gelo. O corpo estriado foi utilizado para preparar homogenatos a 10%. Os tecidos cerebrais foram sonicados em ácido perclórico (HClO_4) por 30 s e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 15.000 rpm. Uma alíquota de 20 μl do sobrenadante foi, então, injetada no equipamento de HPLC (Figura 2), para a análise química.

Para a análise das monoaminas, uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 25 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro da partícula de 3 μm , da Shimadzu-Japão, foi utilizada. A fase móvel utilizada foi composta por tampão ácido cítrico 0,163 M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico, 0,69 M (SOS), como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4 % v/v e tetrahidrofurano 1,7 % v/v.

Dopamina (DA), Ácido diidroxifenilacético (DOPAC), Ácido homovanílico (HVA), Serotonina (5-HT) e Ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) foram eletronicamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85 V relativo a um eletrodo de referência de Ag-AgCl.

7. 3. Soluções Reagentes

➤ **Fase Móvel**

Foram pesados 15,75 g de ácido cítrico (grupo química, RJ, Brasil) e completado para um volume de 400 mL com água puríssima (Milli-Q). Esta solução foi ajustada para pH 3,0 com hidróxido de sódio 12,5 M (Reagen, RJ, Brasil). A esta solução foi adicionado o Ácido octanosulfônico sódico (SOS) 75 mg (Sigma, MO, EUA) e completado o volume para 471,5 mL com água Milli-Q.

Em seguida, foi procedida a filtração e degaseificação, e posteriormente adição de 20 mL de acetonitrila (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) e 10 mL de tetrahidrofuran (Sigma, MO, EUA) para um volume final de 500 mL.

➤ **Ácido Perclórico 0,1 M**

Foram adicionados 1,8 mL de ácido perclórico (Sigma, MO, EUA) em um balão volumétrico e completado o volume para 300 mL.

➤ **Padrões**

Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4 ng de NE, DA, 5-HT, DOPAC, HVA e 5-HIAA (Sigma, MO, EUA). A partir da altura ou área dos picos

desses padrões, as amostras foram calculadas no programa *Microsolf Excel* em um computar PC e os resultados expressos em ng/g de tecido.



Figura 3 - Aparelho de HPLC com detecção de fluorescência e eletroquímica. Laboratório de neurofarmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFC.

8. Determinação da densidade de receptores muscarínicos ($RM_1 + RM_2$)

8. 1. Método

A densidade de receptores muscarínicos ($RM_1 + RM_2$) foi determinada através de ensaios de *binding*, executados em homogenatos cerebrais, utilizando-se o ligante específico ^3H -N-metilescopolamina (^3H -NMS, 85 Ci/mmol - New England), de acordo com método previamente descrito (Dombrowski et al., 1983).

A ^3H -NMS liga-se a sítios específicos dentre os quatro primeiros segmentos transmembrana dos receptores muscarínicos que existem nos fragmentos de membranas dos tecidos homogeneizados. Desse modo, o ligante tritiado marca especificamente os receptores colinérgicos presentes no tecido estudado.

A atropina é um outro antagonista clássico utilizado nos “brancos” dos ensaios para determinar a radioatividade de *background* ou ligações não específicas. A atropina, acrescentada em concentração muito maior do que a da ^3H -NMS, interage, seletivamente, com os mesmos sítios de ligação do receptor, deslocando e deixando livre toda a droga radioativamente marcada, que é logo depois filtrada. A radioatividade contida no filtro é, então, contada por cintilação líquida.

8. 2. Procedimento experimental

Terminada a dissecção da área cerebral em gelo, como mencionado anteriormente, foram feitos homogenatos a 10 % de corpo estriado (CE) em tampão fosfato de sódio, 150 mM, pH 7,4.

Rapidamente, os homogenatos contendo 130 - 160 μg de proteína foram incubados em tampão fosfato de sódio contendo 2,35 nM de ^3H -NMS, na presença ou na ausência de sulfato de atropina 12,5 μM em um volume final de 0,2 mL, para experimentos de pontos únicos. Para experimentos de saturação o ligante foi utilizado em concentrações que variavam entre 0,0031 e 5,95 nM.

Após incubação a 37°C por 30 minutos, a reação foi terminada por filtração à vácuo através de filtros Whatman GF / B. Os filtros foram lavados três vezes com 4 mL de solução salina 0,9 % gelada, secos a 60°C por no mínimo 2 h e colocados em frascos de vidro (*vials*) com 3 mL de um coquetel de cintilação líquida contendo tolueno.

A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-100 com uma eficiência de 67 %. A ligação específica foi calculada como a ligação total

menos a ligação não-específica feita na presença de atropina 12,5 uM. Os resultados para a densidade máxima de receptores ($B_{máx}$) e para a constante de dissociação (K_d) foram expressos em fentomoles por miligrama de proteína e nM, respectivamente. A concentração de proteína foi determinada segundo o método de Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

8. 3. Soluções reagentes

As seguintes soluções reagentes foram empregadas nessa técnica:

➤ **Solução estoque de $^3\text{H-N-metil-escopolamina}$ ($^3\text{H-NMS}$)**

Cloridrato de $^3\text{H-NMS}$ (85 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA, USA), em tampão fosfato de sódio 150 mM, pH 7,4 para obter uma solução de concentração de 23,52 nM.

➤ **Solução estoque de atropina**

Sulfato de atropina (Sigma, St. Louis, MO, USA) em água bidestilada, para obter uma concentração de 0,5 mM.

➤ **Tampão fosfato de sódio**

NaH_2PO_4 (Reagen, RJ, Brasil) foi dissolvido em água bidestilada, para obter uma solução 150 mM e o pH foi ajustado para 7,4 com solução de HCl 1N (Merck, RJ, Brasil).

➤ **Coquetel de cintilação**

p-bis-2-(5-feniloxazolil) benzeno, POPOP (0,5 g; Sigma, St. Louis, MO, USA) e 4,0 g de 2,5-difeniloxazol, PPO (Sigma, St. Louis, MO, USA) foram dissolvidos em 1000 mL de tolueno (Beckman, Fullerton, CA, USA).

9. Determinação da densidade dos Receptores Dopaminérgicos

A determinação dos receptores dopaminérgicos foi feita através de ensaios de *binding* executados em homogenatos cerebrais, variando os seguintes parâmetros:

➤ **Receptores D₁-símile**

Foi utilizado o ligante específico [³H]-SCH 23390 (87,0 Ci/mmol - New England Nuclear, EUA), de acordo com método previamente descrito (Meltzer et al., 1989).

➤ **Receptores D₂-símile**

Foi utilizado o ligante específico [³H]-espiroperidol (114,0 Ci/mmol - New England Nuclear, EUA), segundo uma adaptação do método previamente descrito (Kessler et al., 1991; Meltzer et al., 1989).

9. 1. Método

O [³H]-SCH 23390 é um antagonista dopaminérgico que possui alta afinidade pelos receptores D₁-símile. O ligante [³H]-espiroperidol é um antagonista dopaminérgico que possui alta afinidade pelos receptores D₂-símile, possuindo também afinidade pelos receptores serotonérgicos do tipo 5-HT₂ (Kessler et al., 1991). Para bloquear os receptores serotonérgicos no *binding* de D₂-símile, foi utilizado um antagonista específico, a mianserina.

A dopamina, um agonista dopaminérgico, foi adicionada, na forma não marcada, nos *brancos* dos ensaios para receptor D₁ para determinar a radioatividade de *background* ou ligações não-específicas, em uma concentração elevada para interagir com os mesmos sítios de ligação do receptor, impedindo assim a ligação do [³H]-SCH23390, que fica livre. O mesmo foi feito com relação ao receptor D₂, mas neste caso foi utilizado o butaclamol, um antagonista de receptores dopaminérgicos, também com o intuito de determinar as ligações não-específicas. Esses ligantes livres são retirados do filtro através de lavagens sucessivas, e a radioatividade é, então, contada por cintilação líquida.

9. 2. Procedimento experimental

Logo após a dissecação da área cerebral em gelo, como mencionado anteriormente, foram feitos homogenatos a 10 % de CE em tampão tris-HCl 50 mM, pH 7,4.

Os homogenatos, contendo 50-100 µg de proteína, foram incubados em tampão tris-HCl modificado (50 mM, pH 7,4). No caso dos receptores D₁-símile, o tampão continha 0,115 a 9,2 nM de [³H]-SCH 23390 para experimentos de saturação. No caso dos receptores D₂-símile, o tampão continha 10 µM de mianserina (incubada por 30 minutos à temperatura ambiente) para bloquear os receptores serotonérgicos, e 0,09 a 4,76 nM de [³H]-espiroperidol para experimentos de saturação.

Em ambos os ensaios, os respectivos ligantes eram incubados na presença e na ausência de dopamina 100 µM (durante 10 minutos), no caso dos receptores D₁, ou butaclamol 10 µM, no caso dos receptores D₂ sendo o volume final do ensaio de 0,2 mL.

Após incubação a 37 °C durante 60 minutos, a reação foi terminada por filtração a vácuo através de filtros Whatman GF/B. Os discos de papel de filtro foram lavados três vezes com 4 mL de solução salina 0,9 % gelada, secos a 60 °C por no mínimo 2 h e colocados em frascos de vidro (*vials*) contendo 3 mL de um coquetel de cintilação líquida contendo tolueno.

A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-6500 com a eficiência de 61 %. O *binding* específico foi calculado como *binding* total menos o *binding* não-específico feito na presença de dopamina 100 μ M ou butaclamol 10 μ M, respectivamente para os receptores D₁ e D₂.

Os resultados para a densidade máxima de receptores (Bmax) e para a constante de dissociação (Kd) foram expressos em fentomoles por miligrama de proteína e nM, respectivamente.

A concentração de proteína foi determinada segundo o método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

9. 3. Soluções reagentes

As seguintes soluções reagentes foram empregadas nessa técnica:

- **[³H]-espiroperidol** (114 Ci/mmol, Amersham Life Science, EUA)

5 μ L de [³H]-espiroperidol foram diluídos em tampão tris-HCl, pH 7,4, de forma a obter uma concentração final de 43,28 nM.

- **[³H]- SCH 23390** (87 Ci/mmol, Amersham Life Science, EUA)

5 μ L de [³H]-SCH 23390 foram diluídos em tampão tris HCl, pH 7,4 de forma a obter uma concentração final de 11,5 nM

- **Tampão Tris-HCl**

Seis gramas de Tris-HCl (Trizma base, Sigma, Brasil) foram diluídos em 1000 mL de água bidestilada, obtendo-se uma concentração de 50 mM. O pH foi ajustado com solução HCl 0,1 N (MERCK, RJ, Brasil) para pH 7,4.

➤ **Tris HCl modificado**

NaCl 120 mM; KCl 1mM; CaCl₂ 2 mM; MgCl₂ 1 mM, NaEDTA 1 mM e ascorbato sódico 1 mM foram dissolvidos em tampão tris-HCl 50 mM pH 7,4.

➤ **Mianserina**

Comprimidos de mianserina (Tolvon 30 mg, Organon, SP, Brasil) foram macerados e diluídos em tampão tris-HCl, obtendo-se uma concentração final de 10 µM.

➤ **Dopamina**

10mg de cloridrato de dopamina (Sigma) foram diluídas em 2 ml de tampão tris-HCl, tendo uma concentração final de 5 mg/ml. A esta solução, foi acrescentado ácido ascórbico 0,1 %.

➤ **Butaclamol (Cloridrato de butaclamol)**

Butaclamol (RBI, MA, EUA) foi dissolvido em ácido ascórbico a 0,1%, de forma a se obter uma concentração final de 10 µM.

➤ **Coquetel de cintilação**

0,5 g de p-bis-2-(5-feniloxazolil) benzeno, POPOP (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 4,0 g de 2,5-difeniloxasol, PPO (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foram dissolvidos em 1000 mL de tolueno (Beckman, Fullerton, CA, EUA).

10. Dosagem de proteína

10. 1. Método

A quantidade de proteína em homogenatos de cérebro foi determinada a 25°C utilizando albumina sérica bovina com padrão, de acordo com o método previamente descrito (Lowry et al., 1951), que emprega duas reações de formação de cor para analisar a concentração proteíca fotometricamente. Inicialmente é feita uma reação de biureto de baixa eficiência na qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor azulada na presença de ligações peptídicas. Esta cor biureto é característica de todas as proteínas e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa de ensaio.

Depois o método emprega uma mistura complexa de sais inorgânicos, o reagente Folin-Ciocalteau, que produz uma cor verde azulada intensa na presença de tirosina ou triptofano livres ou ligados às proteínas. Como as quantidades desses dois aminoácidos são geralmente constantes nas proteínas solúveis, com poucas exceções, a cor das reações (verde-azulada) é indicativa da presença de proteína e a intensidade da cor proporcional à concentração. Esta coloração é medida em 750 nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA.

10. 2. Soluções reagentes

As seguintes soluções reagentes foram empregadas nessa técnica:

➤ **Reagente A**

Na_2CO_3 (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 2% em NaOH (Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) 0,1 N.

➤ **Reagente B**

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,5% em $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Grupo Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) a 1%.

➤ **Reagente C**

Solução de cobre alcalino (24 mL do reagente A com 1mL do reagente B, misturados no momento de usar).

➤ **Reagente de Folin** - Ciocalteau - Fenol (Labordin, Piraquara, PR, Brasil

1:1 em água bidestilada.

➤ **Solução de albumina sérica bovina** (Sigma, St Louis, MO, USA)

1 mg/mL em água bidestilada.

11. Determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

11. 1. Método

Ratos Wistar, machos (40-50g) foram utilizados para a obtenção do homogeneizado de cérebro, conforme descrito a seguir. Os animais foram observados durante 1h após administração da pilocarpina (400mg/kg). Aqueles que sobreviveram ao período de observação foram sacrificados e o cérebro dissecado para a retirada do corpo estriado. No grupo tratado somente com pilocarpina 400mg/kg, foram utilizados somente os animais que apresentaram convulsão e estado epiléptico.

11. 2. Procedimento Experimental

O grau de lipoperoxidação na área cerebral foi medido através da determinação dos níveis de TBARS, conforme o método de Huong et al. (1998), seguindo o protocolo a seguir.

Foi preparado o homogenato a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 0,15 M. Do homogeneizado 0,25 mL foram colocados em tubos de ensaio, adicionados 0,5 mL de tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,4 e 0,25 mL do sistema catalisador da formação de radicais livres. Após incubação dessa mistura a 37° C, por 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de solução de ácido tricloroacético a 10%. Em seguida, a mistura foi submetida à centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi separado e acrescido de 0,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,8%. Após a agitação, essa mistura foi mantida em um banho de água fervente (95-100°C) por 15 min., a seguir resfriada em banho de gelo por alguns minutos e posteriormente tomada para leitura em espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos em micromol de MDA por grama de tecido.

➤ Curva-padrão de malonilaldeído(MDA)

A partir da solução padrão de MDA (6mols), foram preparadas as soluções a 0,627; 1,247; 2,463; 4,8; 9,16 e 16,77 μ mol. O branco foi feito com água destilada. A leitura da absorbância foi feita a 532nm para determinação da equação da curva padrão de MDA.

11. 3. Soluções reagentes

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

➤ **Solução de Cloreto de potássio**

EDTA (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 521,1mg em 70 mL de água bidestilada, para preparar EDTA 0,2M. Em seguida foi retirado 30 mL desta solução inicial e acrescido mais 270 mL de água bidestilada.

➤ **Tampão Fosfato**

NaH₂PO₄H₂O (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) 50mM em água bidestilada, pH 7,4.

➤ **Solução de ácido tricloroacético**

ATC (Sigma, MO, EUA) 10 mL mais 90mL de água bidestilada.

➤ **Solução de ácido tiobarbitúrico (TBA)**

TBA (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 50mg em 50mL de água bidestilada.

12. Determinação da produção de nitrito

12. 1. Método da Preparação da Curva-Padrão

Foi pesado 7mg de NaNO₂ e dissolvido em 10 mL de água bidestilada (estoque-10mM) foi feita as diluições em série (10 e 20x), ficando 1mM, 100µM, 10µM, 5µM, 2,5µM, 1,25µM, 0,625µM, 0,312µM. Foi feita uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (Green et al. 1981).

12. 2. Procedimento Experimental

Em um tubo branco foi adicionado 500 μ L do reagente mais 500 μ L de água destilada, em um outro tubo teste foi adicionado 500 μ L do reagente mais 500 μ L do homogenato de tecido a 10% em água destilada. Foi feita a leitura em espectrofotômetro a 560nm e os resultados expressos em nM.

12. 3. Solução reagente

A seguinte solução reagente foi empregada nessa técnica:

➤ **Solução de NaNO₂ (10mM)**

NaNO₂ (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 7mg em 10mL de água bidestilada.

Em seguida, foi procedida a filtração e degaseificação, e posteriormente adição de 20 mL de acetonitrila (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) e 10 mL de tetrahidrofuran (Sigma, MO, EUA) para um volume final de 500 mL.

13. Determinação da atividade enzimática da Catalase (CAT)

13. 1. Método

A atividade da catalase tem como princípio à medida da velocidade de produção de O₂ e H₂O à proporção que a H₂O₂, utilizado como substrato é hidrolisado, de acordo com Chance e Maehly (1955) e Maehly e Chance (1954).

A atividade da enzima é medida em 230nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA, o que permitiu leitura automáticas em sistema digital e forneceu maior sensibilidade.

A atividade enzimática é medida através da leitura da variação da absorbância por minuto, durante 6 minutos e os resultados expressos em mM/min/µg de proteína.

13. 2. Procedimento Experimental

Foi preparado o meio da reação com H₂O₂ (18 mL) mais Tampão Tris HCl 1M, EDTA 5 mM pH 8,0 (1,0 mL) e H₂O Milli Q (0,8 mL). Em seguida foi colocado na cubeta de quartzo 980 µL do meio de reação mais 20 µL do homogenato a 10%.

E feita à leitura durante 6 min a temperatura de 37°C em espectrofotômetro a 230nm. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951).

13. 3. Soluções reagentes

As seguintes soluções reagentes foram empregadas nessa técnica:

➤ **Tampão Tris HCl 1M, EDTA 5 mM, pH 8,0**

Pesou-se 12,11g de Trisma Base (1M) e 0,19g de EDTA (5mM) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e diluiu-se em 100 mL de água Mill-Q. O pH foi acertado com HCl 1M.

➤ **H₂O₂ para meio de reação**

Retirou-se 10 µL de peridol 30% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e em um balão volumétrico de 10 mL, diluiu-se com 10mL de água Mill-Q (qsp).

14. Determinação da concentração da glutationa reduzida (GSH)

14. 1. Método

A determinação da concentração da GSH basea-se na reação do reagente de Ellman, o 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de reação formado é feita por leitura da absorbância a 412 nm, conforme descrito anteriormente por Sedlak e Lindsay (1988).

14. 2. Procedimento Experimental

Preparou-se o homogenato a 10% da área cerebral a ser estudada, em EDTA 0,02 M, em seguida foi retirado 400 μ L desse homogenato e adicionado 320 μ L de água destilada e mais 80 μ L de ácido tricloroacético a 50%.

O material foi agitado e centrifugado a 3000rpm por 15 min. Em seguida foi recolhido 400 μ L do sobrenadante e acrescido 800 μ L de tampão Tris-HCl 0,4M, pH 8,9 e mais 20 μ L de DTNB 0,01M e após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração em 412 nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA, o que permitiu leitura automáticas em sistema digital e forneceu maior sensibilidade.

A concentração da glutationa reduzida foi expressa em nanograma de GSH por grama de tecido.

➤ Curva padrão de Glutation (GSH)

A partir da solução padrão de GSH (1mg/mL), foi preparado 4m (em triplicata) de soluções a 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 μ g/mL. O branco foi feito com água destilada (4 mL)

e a cada tudo das soluções de GSH foi acrescentado 4 mL de tampão Tris HCl 0,4M (pH 8,9).

Adicionou-se ainda a cada tubo 0,1 mL de DTNB (0,01M) e feita a leitura da absorbância a 412 nm após 1 min da adição do DTNB, e determinada a equação da curva padrão de GSH.

14. 3. Soluções reagentes

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

➤ **Solução de ácido etilenodiaminotetracético**

EDTA (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 521,1mg em 70 mL de água bidestilada, para preparar EDTA 0,2M.

Em seguida foi retirado 30 mL desta solução inicial e acrescido mais 270 mL de água bidestilada.

➤ **Tampão Tris-HCl**

14,352 gramas de Tris-HCl (Trizma base, Sigma, Brasil) foram diluídos em 30 mL de EDTA 0,2 mM, mais 300 mL de água bidestilada, obtendo-se uma concentração de 0,4 M.

O pH foi ajustado com solução HCl 0,1 N (MERCK, RJ, Brasil) para pH 8,9.

➤ **Solução de ácido 5:5-ditiobis–2-nitrobenzoato**

DTNB (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 39,6mg em 10 mL de metanol absoluto.

➤ **Solução de ácido tricloroacético**

ATC (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 50 mL mais 50mL de água bidestilada.

➤ **Solução de Glutation**

GSH (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 50mg em 50mL de água bidestilada.

15. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi acompanhada por um computador PC, utilizando o programa *Prisma*. Para os dados não paramétricos, a Análise de Variância foi utilizada para comparação das médias de dois grupos e o teste “t” de Student ou Student Newman Keuls como teste *post hoc* para comparações múltiplas. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

1. Estudo comportamental

1.1. Comportamento de ratos jovens pré-tratados ou não com nimodipina observados durante 1h após administração de pilocarpina.

Os estudos comportamentais foram realizados como descrito anteriormente. Os resultados são apresentados como o número de animais que apresentaram alterações dos parâmetros comportamentais em relação ao número total de animais observados durante os experimentos.

Os animais tratados com pilocarpina (400 mg/kg, s.c.) apresentaram sinais colinérgicos periféricos (miose, piloereção, cromodacriorréia, salivação, diarréia, diurese) e movimentos esteriotipados (aumento da atividade de roer, coçar, mastigar e o ato de sacudir), sucedidos pelo desenvolvimento de convulsões e estado epiléptico em 100% (40/40), que conduziram à morte de 27,5% (11/40) dos animais (**Tabela 1**). Todos os animais jovens pré-tratados com nimodipina (10 ou 30mg/Kg, i.p.; n=28 e 38, respectivamente) 30 minutos antes da administração de pilocarpina (400 mg/kg, s.c.) apresentaram sinais colinérgicos periféricos e movimentos esteriotipados. As convulsões ocorreram em 71,4% (20/28) e 55,2% (21/38), sendo instalado o estado epiléptico logo em seguida, em 57,1% (16/28) e 65,2% (17/38) dos animais tratados com nimodipina 10 e 30mg/Kg, respectivamente. Com relação ao número de mortes, somente 21,4% (6/28) e 21,0% (8/38), respectivamente, morreram durante o período de observação (**Tabela 1**).

Na observação dos animais que convulsionaram, o tratamento com nimodipina aumentou significativamente, em ambas as doses 10 e 30mg/kg, a latência do aparecimento de convulsões induzidas por pilocarpina (**P400=429,9±21,18, n=41; N10+P400=779,2±61,68, n=20; N30+P400=1516±126,4, n=21; p<0,001**) (**Figura 1**),

bem como a latência de morte (**P400**=1016±67,38, n=11; **N10+P400**=1881±183,2, n=6; **N30+P400**=2090±152,4, n=8; **p<0,001**) (**Figura 2**).

Tabela 1 – Percentagem de alterações comportamentais após a administração de pilocarpina (P400) em animais de 21 dias de idade pré-tratados ou não com Nimodipina (N10 ou N30).

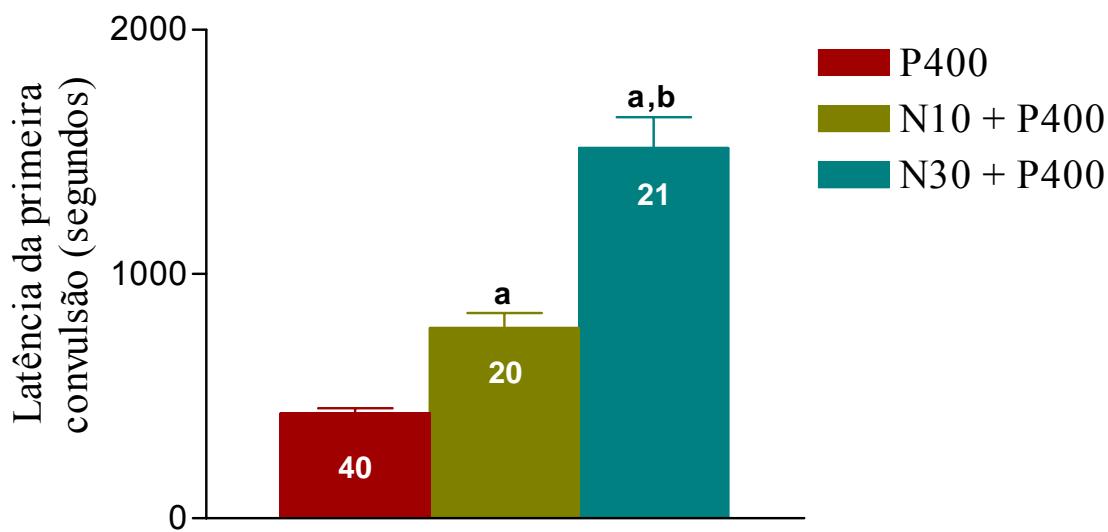
Alterações Comportamentais (%)	P400	N10 + P400	N30 + P400
Número de animais (n)	40	28	38
SCP*	100 (40)	100 (28)	100 (38)
ME**	100 (40)	100 (28)	100 (38)
Convulsões	100 (40)	71,4 (20)	55,2 (21)
Estado Epiléptico	100 (40)	57,1 (16)	65,2 (17)
Morte	27,5 (11)	21,4 (6)	21,0 (8)

Ratos Wistar machos (40 – 60 g, 21 dias) foram tratados ou não com Nimodipina (10 ou 30mg/kg, i.p.) e após 30 minutos com pilocarpina (400mg/kg, s.c.). Os controles receberam salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período de 1h de observação. Número de animais expresso em parênteses.

*SCP: Sinais colinérgicos periféricos: miose, piloereção, cromodacriorréia, diarréia.

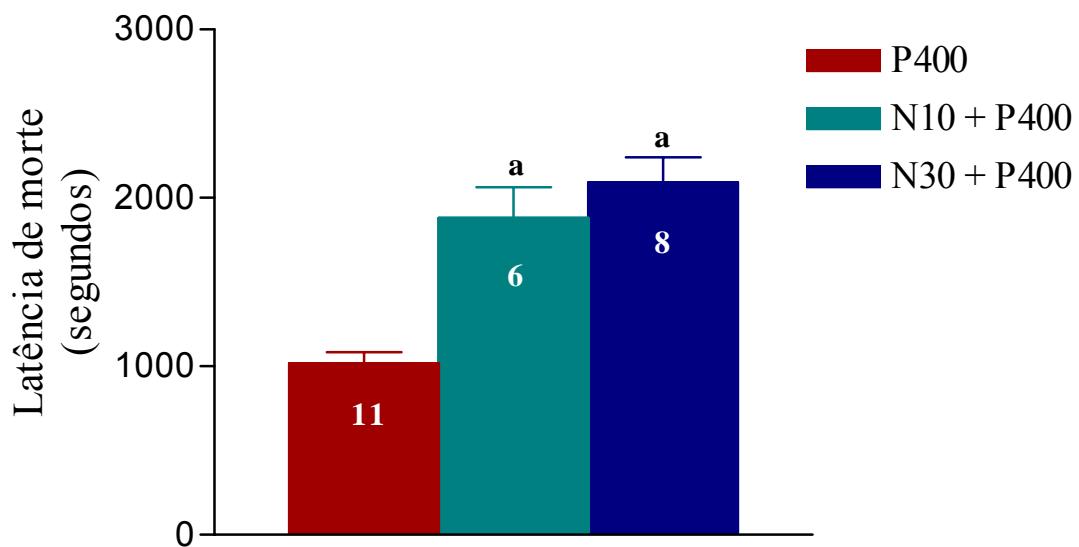
**ME: Movimentos esteriotipados: aumento da atividade de roer, coçar, mastigar e o ato de sacudir.

Figura 1 – Latência da primeira convulsão após a administração de pilocarpina (P400) em animais de 21 dias de idade pré-tratados ou não com Nimodipina (N10 ou N30).



Ratos Wistar machos (40 – 60 g, 21 dias) foram tratados ou não com Nimodipina (10 ou 30mg/kg, i.p.) e após 30 minutos com pilocarpina (400mg/kg, s.c.). Os controles receberam salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período de 1h de observação. Número de animais expresso em parênteses. a e b, quando comparado a P400 e N10+P400, respectivamente ($p<0,001$).

Figura 2 – Latência de morte após a administração de pilocarpina (P400) em animais de 21 dias de idade pré-tratados ou não com Nimodipina (N10 ou N30).



Ratos Wistar machos (40 – 60 g, 21 dias) foram tratados ou não com Nimodipina (10 ou 30mg/kg, i.p.) e após 30 minutos com pilocarpina (400mg/kg, s.c.). Os controles receberam salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período de 1h de observação. Número de animais expresso em parênteses. a, quando comparado a P400 ($p<0,001$).

2. Estudos neuroquímicos

2. 1. Efeitos do pré-tratamento com Nimodipina 10 (N10) ou 30mg/Kg (N30) sobre a concentração de monoaminas e seus metabólitos em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade após a administração da pilocarpina 400mg/Kg (P400).

Os resultados das determinações dos níveis de monoaminas em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade tratados ou não com nimodipina (10 ou 30mg/Kg, i.p.) 30 minutos antes da administração de pilocarpina 400mg/Kg, s.c., e sacrificados 1h após a última administração, foram expressos em ng/grama de tecido.

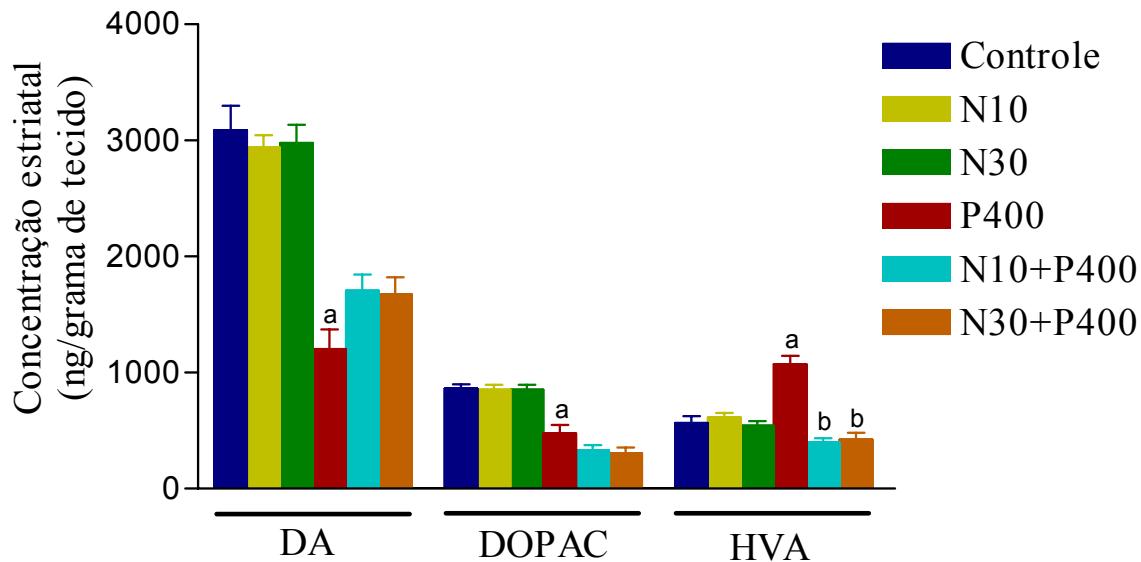
A **Figura 3** apresenta uma redução nos níveis da DA no grupo tratado com P400 em relação ao controle (**Controle** = $3089 \pm 210,7$; **P400** = $1201 \pm 170,4$; $p<0,05$). Os grupos tratados somente com nimodipina não apresentaram nenhuma alteração significativa (**Controle** = $3089 \pm 210,7$; **N10**= $2938\pm108,7$; **N30** = $2978\pm155,9$; $p>0,05$). Já os animais pré-tratados com nimodipina antes da administração de P400 mostraram uma tendência a um aumento dos níveis de DA em relação ao grupo tratado somente com P400, porém não foi estatisticamente significativo (**P400** = $1201 \pm 170,4$; **N10** +**P400**= $1705\pm139,7$; **N30+P400**= $1674\pm146,6$; $p>0,05$).

Com relação aos metabólitos da DA, houve uma diminuição nos níveis de DOPAC do grupo P400 em relação ao controle (**Controle** = $861,2 \pm 37,81$; **P400** = $475\pm74,81$; $p<0,05$). Os grupos tratados somente com nimodipina não apresentaram nenhuma alteração significativa (**Controle** = $861,2 \pm 37,81$; **N10**= $860,7\pm67,16$; **N30** = $851,6\pm45,02$; $p>0,05$). Por sua vez, os animais pré-tratados com nimodipina antes da administração de P400 mostraram uma tendência a uma diminuição dos níveis de DOPAC em relação ao grupo tratado somente com P400, porém não foi estatisticamente significativo (**P400**= $475\pm74,81$; **N10** +**P400**= $327,7\pm48,91$; **N30+P400**= $305,6\pm50,83$; $p>0,05$) (**Figura 3**). Na concentração de HVA houve um aumento significativo no grupo P400 em relação ao controle (**Controle**= $566,1\pm57,30$; **P400**= $1072\pm72,74$; $p<0,05$), já nos animais que receberam somente nimodipina não foi observada nenhuma alteração

(**Controle**= $566,1 \pm 57,30$; **N10**= $610,8 \pm 39,91$; **N30** = $542,2 \pm 40,99$; $p>0,05$) (**Figura 3**). Os níveis de HVA quando determinados nos ratos pré-tratados com nimodipina antes de P400 apresentaram uma redução significativa quando comparados aos animais que receberam somente P400 (**P400** = $1072 \pm 72,74$; **N10 + P400** = $397,2 \pm 37,94$; **N30+P400**= $421 \pm 59,16$; $p<0,05$) (**Figura 3**).

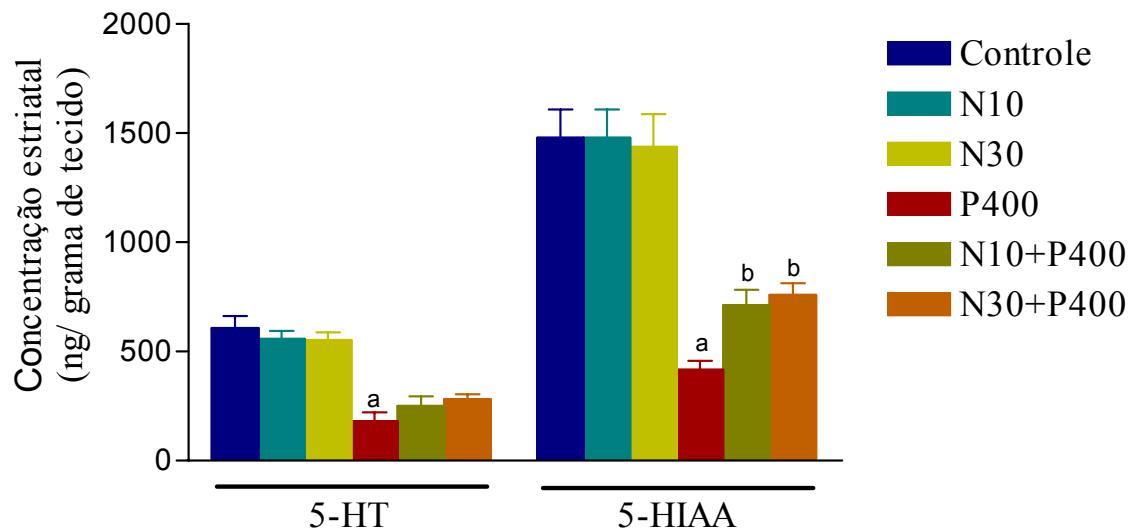
Em relação aos níveis de serotonina houve uma redução nos animais tratados com P400 em relação ao grupo controle (**Controle**= $608,3 \pm 54,73$; **P400**= $179,0 \pm 42,54$; $p<0,01$), enquanto nos grupos tratados somente com nimodipina não foi observada nenhuma alteração significativa (**Controle**= $608,3 \pm 54,73$; **N10**= $564 \pm 45,54$; **N30** = $567,2 \pm 48,32$; $p>0,05$) (**Figura 4**). Por sua vez, nos grupos pré-tratados com nimodipina antes de P400, foi observado um aumento nos níveis de 5-HT na dose de 30mg/kg de nimodipina em relação ao grupo tratado somente com P400 (**P400** = $179,0 \pm 42,54$; **N30+P400**= $437,5 \pm 46,30$; $p<0,01$), todavia nenhuma alteração significativa foi vista na dose de 10mg/Kg de nimodipina (**P400** = $179,0 \pm 42,54$; **N10 + P400** = $250,8 \pm 43,42$; $p>0,05$) (**Figura 4**). Quanto aos níveis do metabólito 5-HIAA, foi observada alteração significativa no grupo P400, onde ocorreu uma redução dos níveis de 5-HIAA em relação ao grupos controle (**Controle**= $1480 \pm 129,5$; **P400**= $450,3 \pm 58,09$; $p<0,01$), nos demais grupos não houve nenhuma alteração (**Figura 4**).

Figura 3 – Verificação da concentração de dopamina e seus metabólitos após a administração de pilocarpina em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade pré-tratados ou não com nimodipina 10 (N10) ou 30 mg/Kg (N30).



Ratos Wistar machos (40-60g, 21 dias de idade) foram tratados ou não com Nimodipina (30mg/kg, i.p.) e após 30 minutos com pilocarpina (400mg/kg, s.c.). Os controles receberam salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período de 1h de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6-8). As concentrações de DA e seus metabólitos foram determinadas em 20 μ L de homogenato. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. **a** e **b**, quando comparado ao controle e ao grupo P400, respectivamente, ($p<0,05$).

Figura 4 – Verificação da concentração de serotonina e seu metabólito 5-HIAA após a administração de pilocarpina em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade pré-tratados ou não com nimodipina 10 (N10) ou 30 mg/Kg (N30).



Ratos Wistar machos (40-60g, 21 dias de idade) foram tratados ou não com Nimodipina (30mg/kg, i.p.) e após 30 minutos com pilocarpina (400mg/kg, s.c.). Os controles receberam salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período de 1h de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6-8). As concentrações de serotonina e seu metabólito foram determinadas em 20 μ L de homogenato. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. **a** e **b**, quando comparado ao controle e ao grupo P400, respectivamente, ($p<0,01$).

2. 2. Efeitos da administração da pilocarpina 400mg/kg sobre a densidade dos receptores muscarínicos (M_1) e sobre a constante de dissociação (Kd) em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade.

Os resultados da densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos (M_1+M_2) (Bmax) e da constante de dissociação do ligante específico aos receptores muscarínicos (Kd) em corpo estriado de ratos tratados com uma única dose de pilocarpina foram expressos em fentomoles/mg de proteína e nM, respectivamente, e os valores apresentados abaixo representam a média \pm EPM e são mostrados na **tabela 2**.

Ocorreu uma *downregulation* no Bmax no corpo estriado nos animais tratados com P400 em relação ao grupo controle (**Controle** = $271,7 \pm 15,6$; **P400** = $93,75 \pm 11,01$; $p<0,05$). Com relação ao Kd dos receptores muscarínicos (M_1+M_2) não houve alteração significativa entre os grupos (**Controle** = $1,33 \pm 0,08$; **P400** = $1,26 \pm 0,09$; $p>0,05$ (**Tabela 2**)).

Tabela 2 - Efeitos da administração de P400 sobre a densidade dos receptores muscarínicos ($M_1 + M_2$) e sobre a constante de dissociação (Kd) em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade.

Grupo	Bmax (fmol/ mg de proteína)	Kd (nM)
Controle	$271,7 \pm 15,68$ (7)	$1,33 \pm 0,08$ (6)
P400	$93,75 \pm 11,01$ (4) ^a	$1,26 \pm 0,09$ (4)

Ratos Wistar machos (40-60g, 21 dias de idade) foram tratados com uma única dose de pilocarpina (400 mg/Kg, sc.) e os controles com salina 0,9%. Os animais foram submetidos a 1 h de observação e após esse período foram sacrificados. Os valores representam a média \pm SEM e o número de animais entre parênteses. Para análise estatística, foram usados, ANOVA e o Student's t test como *post-hoc*. ^a quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

2. 3. Efeitos da administração da pilocarpina 400mg/kg sobre a densidade dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ e sobre a constante de dissociação (Kd) em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade.

Os resultados da densidade dos receptores dopaminérgicos D₁-like (Bmax) e D₂-like e das constantes de dissociação dos ligantes específicos aos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂(Kd) em corpo estriado de ratos tratados com uma única dose de pilocarpina foram expressos em fentomoles/mg de proteína e nM, respectivamente, os valores apresentados abaixo representam a média \pm EPM e são mostrados na **tabela 3 e 4**, respectivamente.

Quando estudados os RD₁ no corpo estriado foi evidenciada uma diminuição na densidade dos receptores no grupo P400 após 1h de observação em relação ao controle (**Controle** = 311,90 \pm 23,51; **P400**= 134,12 \pm 14,36; p<0,05). Com relação ao Kd não houve alteração significativa (**Controle** = 1,35 \pm 0,08; **P400**= 1,57 \pm 0,21; p>0,05) (**Tabela 3**).

Durante o estudo dos RD₂ também foi evidenciada uma *downregulation* nos animais tratados com P400 quando comparado aos animais controles (**Controle** = 373,43 \pm 19,92; **P400** = 253,0 \pm 18,3; p<0,05). Da mesma forma foi vista alteração no Kd para está área cerebral nos grupos tratados com P400(**Controle** = 1,67 \pm 0,08; **P400**= 2,35 \pm 0,07 ; p<0,05) (**Tabela 4**).

Tabela 3 - Efeitos da administração de P400 sobre a densidade dos receptores dopaminérgicos (D₁) e sobre a constante de dissociação (Kd) em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade.

Grupo	Bmax (fmol/ mg de proteína)	Kd (nM)
Controle	$311,90 \pm 23,51$ (8)	$1,35 \pm 0,08$ (8)
P400	$134,12 \pm 14,36$ (4) ^a	$1,57 \pm 0,21$ (4)

Ratos Wistar machos (40-60g, 21 dias de idade) foram tratados com uma única dose de pilocarpina (400 mg/Kg, sc.) e os controles com salina 0,9%. Os animais foram submetidos a 1 h de observação e após esse período foram sacrificados. Os valores representam a média \pm SEM e o número de animais entre parênteses. Para análise estatística, foram usados, ANOVA e o Student's t test como *post-hoc*. ^a quando comparado ao controle ($p<0,05$).

Tabela 4 - Efeitos da administração de P400 sobre a densidade dos receptores dopaminérgicos (D₂) e sobre a constante de dissociação (Kd) em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade.

Grupo	Bmax (fmol/ mg de proteína)	Kd (nM)
Controle	$373,43 \pm 19,92$ (8)	$1,67 \pm 0,08$ (6)
P400	$253,0 \pm 18,3$ (4) ^a	$2,35 \pm 0,07$ (4) ^a

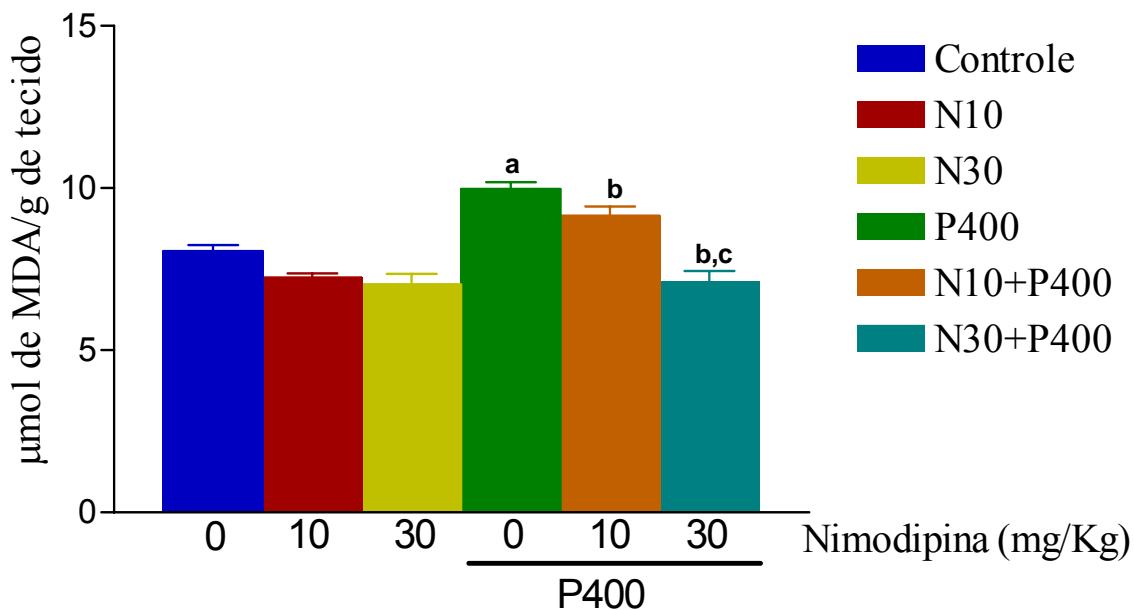
Ratos Wistar machos (40-60g, 21 dias de idade) foram tratados com uma única dose de pilocarpina (400 mg/Kg, sc.) e os controles com salina 0,9%. Os animais foram submetidos a 1 h de observação e após esse período foram sacrificados. Os valores representam a média \pm SEM e o número de animais entre parênteses. Para análise estatística, foram usados, ANOVA e o Student's t test como *post-hoc*. ^a quando comparado ao controle ($p<0,05$).

2. 4. Análise da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) após administração de pilocarpina 400mg/kg (P400) em corpo estriado de ratos com 21 dias pré-tratados ou não com Nimodipina 10 (N10) ou 30mg/Kg (N30).

Os resultados da análise da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade pré-tratados ou não com nimodipina (10 e 30mg/Kg, i.p.) 30 minutos antes da administração de pilocarpina na dose de 400mg/Kg, s.c., e sacrificados 1h após a última administração, foram expressos em μ mol de MDA/ grama de tecido.

Um aumento significativo na concentração de MDA em relação ao grupo controle foi evidenciado no corpo estriado dos animais tratados com pilocarpina após 1h de observação (**Controle** = $8,06 \pm 0,19$; **P400** = $9,96 \pm 0,22$; $p < 0,05$) (**Figura 5**), já nos grupos tratados somente com nimodipina nenhuma alteração foi observada (**Controle** = $8,06 \pm 0,19$; **N10** = $7,23 \pm 0,14$; **N30** = $7,01 \pm 0,34$; $p > 0,05$) (**Figura 5**). Quando comparados aos grupos tratados com nimodipina e pilocarpina associados ocorreu também uma diminuição em ambas as associações comparadas ao grupo tratado somente com P400 (**P400** = $9,96 \pm 0,22$; **N10 + P400** = $9,15 \pm 0,28$; **N30 + P400** = $7,10 \pm 0,35$; $p < 0,05$) (**Figura 5**).

Figura 5 - Verificação da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) após a administração de P400 em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade pré-tratados ou não com nimodipina 10 ou 30mg/Kg.



Ratos Wistar machos (40-60g, 21 dias de idade) foram tratados ou não com Nimodipina (10 ou 30mg/kg, i.p.) e após 30 minutos com pilocarpina (400mg/kg, s.c.). Os controles receberam salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período de 1h de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6-7). Em homogenatos de corpo estriado desses animais que foram submetidos a condições (temperatura e oxigenação) controladas foi determinada a ocorrência de lipoperoxidação com base na concentração de MDA. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. **a**, **b** e **c** quando comparado ao controle, P400 e ao grupo N10 + P400, respectivamente, ($p<0,05$).

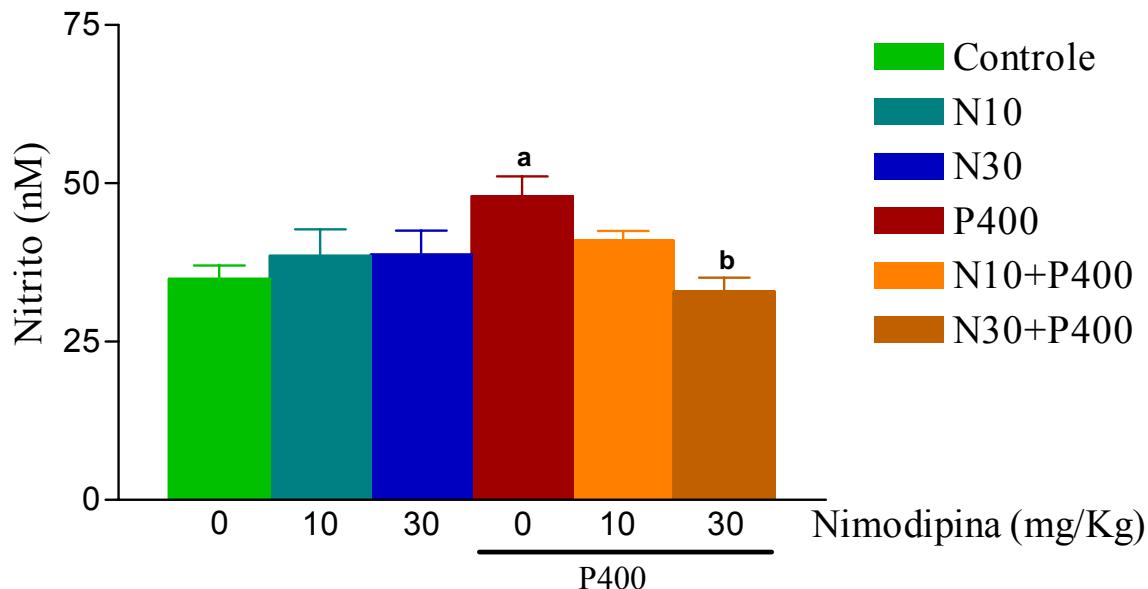
2. 5. Verificação da produção de nitrito após administração de pilocarpina 400mg/kg (P400) em corpo estriado de ratos com 21 dias pré-tratados ou não com Nimodipina 10 (N10) ou 30mg/Kg (N30).

Os resultados da verificação da produção de nitrito em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade tratados ou não com nimodipina (10 e 30mg/Kg, i.p.) 30 minutos antes da administração de pilocarpina na dose de 400mg/Kg, s.c., e sacrificados 1h após a última administração, foram expressos em nM.

A concentração do nitrito apresentou um aumento significativo no corpo estriado dos animais tratados com P400 após 1h de observação (**controle** = $34,89 \pm 2,16$; **P400** = $47,97 \pm 3,09$; $p < 0,05$) (**Figura 6**), nos grupos tratados somente com nimodipina 10 ou 30mg/Kg não foi observada nenhuma alteração quando ao comparado ao grupo controle (**controle** = $90,54 \pm 1,70$; **N10** = $38,53 \pm 4,16$; **N30** = $38,74 \pm 3,78$; $p > 0,05$) (**Figura 6**).

Nos grupos pré-tratados com nimodipina antes da administração de P400, não houve alteração significativa no grupo pré-tratado com N10 em comparação ao grupo tratado somente com P400 (**P400** = $47,97 \pm 3,09$; **N10 + P400** = $40,95 \pm 1,49$; $p > 0,05$) (**Figura 6**), já nos animais que receberam N30 foi observada uma diminuição significativa na concentração de nitrito (**P400** = $47,97 \pm 3,09$; **N30 + P400** = $32,94 \pm 2,16$; $p < 0,05$) (**Figura 6**).

Figura 6 – Verificação da produção de nitrito após administração de P400 em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade pré-tratados ou não com nimodipina 10 ou 30mg/Kg.



Ratos Wistar machos (40-60g, 21 dias de idade) foram tratados ou não com Nimodipina (10 ou 30mg/kg, i.p.) e após 30 minutos com pilocarpina (400mg/kg, s.c.). Os controles receberam salina 0,9% . Os animais foram submetidos a um período de 1h de observação . Os valores representam a média \pm EPM (n=8). A produção de nitrito foi determinada em 100 μ L de homogenato. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. **a** e **b**, quando comparado ao controle e ao grupo P400, respectivamente, ($p<0,05$).

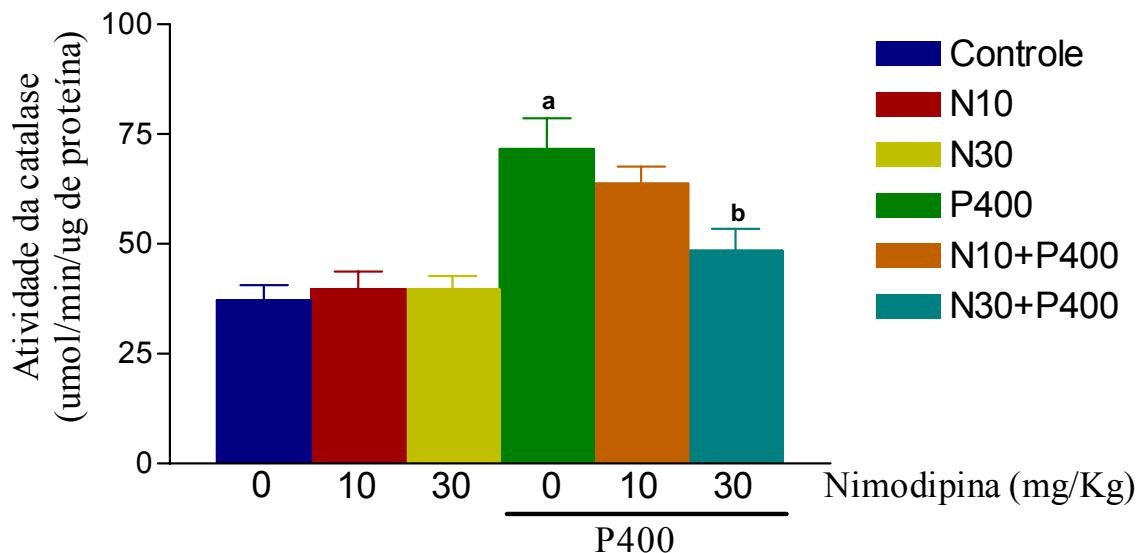
2. 6. Efeitos do pré-tratamento com Nimodipina 10 (N10) ou 30mg/Kg (N30) sobre atividade da catalase em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade após a administração de pilocarpina 400mg/Kg (P400).

Os resultados da determinação da atividade enzimática da catalase em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade tratados ou não com nimodipina (10 ou 30mg/Kg, i.p.) 30 minutos antes da administração de pilocarpina 400mg/Kg, s.c., e sacrificados 1h após a última administração, foram expressos em μ mol/minuto/ μ g de proteína.

Um aumento na atividade da enzima catalase, em relação ao grupo controle, foi observado no corpo estriado dos animais tratados com P400 (**Controle** = $37,24 \pm 3,40$; **P400** = $71,66 \pm 6,96$; $p < 0,05$) (**Figura 7**), já nos grupos tratados somente com nimodipina 10 e 30mg/Kg não houve nenhuma alteração (**Controle** = $37,24 \pm 3,40$; **N10** = $39,74 \pm 3,94$; **N30** = $39,64 \pm 3,04$; $p > 0,05$) (**Figura 7**).

A atividade enzimática da catalase também foi verificada nos grupos tratados com nimodipina e pilocarpina associados, e foi evidenciado uma diminuição no grupo pré-tratado com nimodipina 30mg/Kg em relação ao tratado com pilocarpina isoladamente (**P400** = $71,66 \pm 6,96$; **N30+P400** = $48,43 \pm 5,04$; $p < 0,05$) (**Figura 7**), todavia no grupo pré-tratado com nimodipina 10mg/Kg não houve alteração significativa (**P400** = $71,66 \pm 6,96$; **N10+P400** = $63,71 \pm 3,87$; $p > 0,05$) (**Figura 7**).

Figura 7 - Efeitos sobre a atividade da catalase após a administração de pilocarpina em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade pré-tratados ou não com nimodipina 10 (N10) ou 30 mg/Kg (N30).



Ratos Wistar machos (40-60g, 21 dias de idade) foram tratados ou não com Nimodipina (30mg/kg, i.p.) e após 30 minutos com pilocarpina (400mg/kg, s.c.). Os controles receberam salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período de 1h de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6-7). A atividade da catalase foi determinada em 20 μ L de homogenato. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. **a** e **b**, quando comparado ao controle e ao grupo P400, respectivamente, ($p<0,05$).

2. 7. Efeitos sobre a concentração da glutationa reduzida (GSH) após a administração de pilocarpina em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade pré-tratados ou não com nimodipina 10 (N10) ou 30 mg/Kg (N30).

Os resultados das determinações da concentração da glutationa reduzida (GSH) em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade tratados ou não com nimodipina (10 ou 30mg/Kg, i.p.) 30 minutos antes da administração de pilocarpina 400mg/Kg, s.c., e sacrificados 1h após a última administração, foram expressos em ng/grama de tecido.

Nenhuma alteração significativa foi evidenciada entre os grupos submetidos a diferentes tratamentos analisados no estudo (**Controle** = $146,9 \pm 0,08$; **N10**= $148,6 \pm 0,05$; **N30** = $148,3 \pm 0,54$; **P400** = $148,7 \pm 0,48$; **N10 +P400**= $148,6 \pm 0,22$; **N30+P400**= $148,6 \pm 0,05$; $p>0,05$) (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Verificação da concentração da glutatona reduzida (GSH) após a administração de pilocarpina em corpo estriado de ratos com 21 dias de idade pré-tratados ou não com nimodipina 10 (N10) ou 30 mg/Kg (N30).

Tratamento (mg/Kg)	Níveis de GSH (ng/g de tecido)
Controle	146,9 \pm 0,08
N10	148,6 \pm 0,06
N30	147,1 \pm 1,46
P400	147,6 \pm 1,04
N10 + P400	148,0 \pm 0,82
N30 + P400	147,7 \pm 0,88

Ratos Wistar machos (40-60g, 21 dias de idade) foram tratados ou não com Nimodipina (30mg/kg, i.p.) e após 30 minutos com pilocarpina (400mg/kg, s.c.). Os controles receberam salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período de 1h de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6-7). A concentração de GSH foi determinada em 400 μ L de homogenato. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc* ($p<0,05$).

DISCUSSÃO

Algumas pesquisas têm focalizado seus estudos na epileptogênese nos animais em desenvolvimento, na intenção de investigar a origem e a propagação das convulsões no cérebro imaturo (dos Santos et al., 2000; Priel et al., 1996). Estes estudos além de investigar a fisiopatologia das convulsões, buscam fornecer subsídios para identificação de novos agentes terapêuticos para a epilepsia.

Neste mesmo sentido, este trabalho objetivou estudar o processo convulsivo desencadeado através de uma única dose de pilocarpina (400mg/Kg, s.c; P400), bem como as ações da nimodipina neste processo convulsivo em ratos com 21 dias de idade, através da análise das alterações comportamentais e neuroquímicas em corpo estriado, a saber: atividade da enzima catalase (CAT), os níveis da glutationa reduzida (GSH), o conteúdo de nitrito, o índice de lipídio peroxidação, as concentrações da monoaminas (DA, DOPAC, HVA, 5-HT e 5-HIAA), bem como a densidade máxima (Bmax) e constante de dissociação (Kd) dos receptores muscarínicos (RM₁ + RM₂) e dopaminérgicos (RD₁ e RD₂).

ESTUDO COMPORTAMENTAL

A epilepsia pode ser caracterizada por episódios de alteração no comportamento. Essas convulsões apresentam, ainda, uma temporária redução da consciência e contrações involuntárias do músculo esquelético (Jobe, 2003). Assim, a atividade epiléptica pode ser detectada pelas alterações eletroencefalográficas (EEG) e comportamentais.

O fenômeno epileptogênico experimental, mediado por mecanismos colinérgicos, parece ser demonstrado no final da segunda semana de vida. Hirsch e colaboradores (1992) sugerem que o mecanismo pelo qual o lítio potencializa a pilocarpina acontece na segunda semana de vida dos animais e Priel e colaboradores (1996), também demonstraram o aparecimento de convulsões nesse período, com a pilocarpina sozinha, bem como descrevem que as alterações comportamentais são similares às observadas nos animais adultos.

Nosso estudo comportamental feito em animais tratados com uma única dose de pilocarpina (400mg/Kg, s.c.; P400) apresentaram as características descritas na literatura. Todos os animais observados por 1h apresentaram sinais colinérgicos periféricos, movimentos esteriotipados e convulsões, desencadeando-se também o estado epiléptico, porém com baixa mortalidade.

Em relação ao pré-tratamento com nimodipina, nossos estudos demonstraram uma proteção contra as convulsões induzidas por pilocarpina em ambas as doses utilizadas (10 e 30mg/Kg). Alguns estudos experimentais mostram que bloqueadores de canais de cálcio são efetivos contra vários tipos de convulsões (Van Luijtelaar et al., 2000), na qual os pertencentes ao grupo das diidropiridinas apresentam atividade anticonvulsivante em vários modelos animais (Charkrabarti et al., 1998; Kaminski et al., 2001; Meyer et al., 1987; Zapatar et al., 1998). A nimodipina, em particular, comparada a algumas diidropiridinas, parece exercer um efeito anticonvulsivante mais potente (Kriz et al., 2003). Nossos resultados confirmaram essa ação anticonvulsivante da nimodipina, através do aumento evidenciado na latência de início das convulsões e latência de morte, bem

como na redução do aparecimento das convulsões e estado epiléptico nos animais após a administração de P400.

ESTUDOS NEUROQUÍMICOS

Estudo da determinação dos níveis das monoaminas (DA E 5-HT) e seus metabólitos (DOPAC, HVA E 5-HIAA)

No modelo de convulsão com pilocarpina, estudos demonstram que as convulsões são ativadas pelo sistema colinérgico (Cardone et al., 1994; Freitas et al., 2003a; Marinho et al., 1998), todavia outros sistemas de neurotransmissores também estão envolvidos na instalação e/ou propagação e manutenção das convulsões estabelecidas nesse modelo.

O neurotransmissor DA tem sido sugerido participar do controle da excitabilidade neuronal durante episódios convulsivos em modelos animais (Weinshenker e Szot, 2002), na qual pesquisas com antagonistas D₁/D₂ misturados, como haloperidol, clorpromazina e tioridazina, mostraram que esses agentes produzem um efeito proconvulsivante profundo em muitas espécies e com uma enorme variedade de agentes convulsivantes (Ogren e Pakh, 1993; Turski et al., 1988).

Diferenças significativas no conteúdo de monoaminas foram evidenciadas no corpo estriado de ratos jovens após convulsões induzidas por pilocarpina. Houve uma diminuição na concentração do neurotransmissor DA, durante o SE em ratos jovens sacrificados após 1h de observação. Com relação ao metabólito da DA (DOPAC) foi visto uma redução da concentração no corpo estriado após 1h das convulsões induzidas por pilocarpina. Por sua vez, em relação ao HVA, metabólito também da DA, foi verificado um incremento no mesmo período de observação.

Freitas et al. (2003b), mostram resultados semelhantes no conteúdo de DA e de seus metabólitos no corpo estriado durante o período agudo do processo convulsivo induzido por pilocarpina em animais jovens. Portanto, nossos resultados confirmam esses dados para a área cerebral estudada, bem como sugerem o envolvimento dessa monoamina nas convulsões.

O mecanismo neuroquímico básico das ações dos antagonistas de cálcio no sistema nervoso central ainda não é claramente entendido, todavia vários trabalhos sugerem a relação entre o bloqueio de canais de cálcio tipo L e a participação do sistema monoaminérgico (Gaggi e Gianni, 1990; Gaggi et al., 1993; Pucilowski, 1992).

Nossos resultados mostram que a administração do antagonista de cálcio nimodipina em ratos normais não ocasionou efeitos nas concentrações de DA e de seus metabólitos (DOPAC e HVA). Estes dados confirmam evidências anteriores de outros experimentos sobre o efeito da nimodipina nos níveis basais de DA em ratos normais (Pani et al., 1990a, b; Reiriz et al., 1994; Rossetti et al., 1999). Contudo nos animais submetidos à convulsão induzida por pilocarpina, o pré-tratamento com nimodipina também não acarretou em alterações nos níveis de DA e de seu metabólito DOPAC, porém diminuiu significativamente os níveis do outro metabólito HVA.

Gaggi e Gianni (1990) mostram que os compostos diidropiridínicos são mais efetivos do que o verapamil e diltiazem no metabolismo das monoaminas no cérebro de ratos. Em particular, a nimodipina parece inibir o sistema dopaminérgico, visto que ela reduz os níveis de DOPAC e HVA, enquanto o conteúdo de DA de várias cerebrais permanece inalterado (Fadda et al., 1989; Gaggi et al., 1992; Pileblad e Carlsson, 1986).

As ações dos antagonistas de cálcio no sistema dopaminérgico podem consistir predominantemente numa inibição da liberação de DA, desde que a nimodipina é capaz de inibir a estimulação motora e a liberação de DA cálcio-dependente induzida pela cocaína (Pani et al., 1990a). A inibição da síntese de DA também pode estar envolvida (Pileblad e Carlsson, 1987), já que os níveis de DA encontram-se acumulados nestas condições.

Alguns estudos na fase aguda das convulsões, também têm sugerido relação, quase que imediata, da ACh com outros sistemas de neurotransmissão, dentre eles o sistema noradrenérgico e serotonérgico (El-Etri et al., 1993). Já se determinou que a noradrenalina e seu metabólito aumentam de concentração em todas as fases da epilepsia.

A concentração de NE durante o período silencioso decresce e a sua taxa de metabolização foi semelhante ao dos controles (Cavalheiro et al., 1994). Infelizmente, não foi possível, nos nossos experimentos de determinação de neurotransmissores na situação de ratos convulsivos, detectar os níveis de NE.

É sabido que no modelo de kindling de epilepsia, a concentração de NE e 5-HT em hipocampo, diminui facilitando o desenvolvimento das convulsões em ratos (Cavalheiro et al., 1991; El-Etri et al., 1999). Nossos dados em corpo estriado de ratos jovens mostraram uma diminuição da concentração de 5-HT e de seu metabólito 5-HIAA durante as convulsões observadas por 1h. Portanto, nossos resultados corroboram novamente os de Freitas et al. (2003b), bem como são semelhantes, em parte, aos evidenciados em corpo estriado de ratos adultos, no qual observa-se uma diminuição dos níveis de 5-HT e nenhuma alteração na concentração de 5-HIAA após convulsão induzida por pilocarpina (Freitas et al., 2003a).

Com relação a influência dos antagonistas de cálcio nessas condições, alguns autores têm sugerido que as diidropiridinas afetam o metabolismo serotoninérgico cerebral, ativando-o em várias regiões, visto que provocam um aumento da proporção (5-HIAA/5-HT) pelo aumento dos níveis de 5-HIAA (Gaggi et al., 1993; 1997).

O estudo dos efeitos da nimodipina na função e neurotransmissão serotoninérgica pode ser bastante relevante, em virtude desta diidropiridina ser apontada como eficaz em muitas desordens neurológicas (Dubowski, 1986; Scriabine et al., 1989).

Nenhuma diferença significativa foi evidenciada em corpo estriado de ratos jovens pré-tratados com nimodipina, observados durante 1h após administração de pilocarpina. Por sua vez, uma diminuição nos níveis do metabólito 5-HIAA foi verificada nos mesmos grupos experimentais analisados, sugerindo assim, uma possível ativação do sistema serotoninérgico.

Os efeitos das convulsões induzidas por pilocarpina no sistema dopaminérgico evidenciados em nossos estudos, não foram obtidos após alteração específica do sistema serotoninérgico. Contudo, a possível ativação do sistema dopaminérgico nas convulsões pode ter afetado o estado funcional do sistema serotoninérgico, visto que as interações anatômicas e funcionais entre esses sistemas têm sido claramente estabelecidas (Dray et al., 1976). Presumidamente, a ativação do sistema serotoninérgico pode inibir a síntese e/ou liberação de DA dos neurônios dopaminérgicos, via um mecanismo que envolve a participação dos receptores 5-HT₂ (Meltzer e Nash, 1991). Por sua vez, a inibição do sistema dopaminérgico, mostrada anteriormente, por ação da nimodipina, pode ser devido, em parte, de forma indireta, a habilidade da nimodipina em ativar o sistema serotoninérgico. Gaggi et al. (1997) sugerem que a facilitação da neurotransmissão serotoninérgica induzida pela nimodipina pode ser devido, em parte, a inibição da resposta a estimulação dos receptores 5-HT_{1A} pré-sinápticos, essa ação é também sugerida para outras diidropiridinas e antagonistas de cálcio não diidropiridínicos.

Inúmeros estudos indicam claramente a importância das monoaminas no fenômeno epiléptico, os mecanismos de como esses neurotransmissores influenciam as convulsões, bem como a maneira que os antagonistas de cálcio afetam esses sistemas nessas condições, não foram determinados e, portanto, são necessários mais estudos para o esclarecimento das hipóteses propostas na literatura.

Estudo da determinação da densidade máxima (Bmax) dos receptores muscarínicos (RM₁ + RM₂) e dopaminérgicos (RD₁ e RD₂) e da constante de dissociação (Kd) aos ligantes

Os pacientes com epilepsia do lobo temporal apresentam o foco epileptogênico no hipocampo. Neurônios piramidais, no hipocampo, estão envolvidos com o início da atividade convulsiva epiléptica e são lesionados por convulsões recorrentes (Wyss e Van Groen, 1995). Além do hipocampo, outras áreas cerebrais, a saber, corpo estriado, é também lesionado pelas convulsões e apontada como envolvida no processo convulsivo (Costa-Lotufo et al., 2002; De Bruin et al., 2000; Freitas et al., 2003a).

A ativação colinérgica é sugerida como essencial para o início do processo convulsivo, visto que convulsões induzidas por pilocarpina em alta dose e pela associação de lítio e pilocarpina podem ser bloqueadas pelo pré-tratamento com o antagonista muscarínico atropina (De Bruin et al., 2000; Marinho et al., 1998).

A neurotransmissão mediada pela ACh tem um envolvimento crucial em algumas funções exercidas pelo corpo estriado. Essa área contém alguns dos níveis mais acentuados de ACh, receptores muscarínicos e outros marcadores relacionados com ACh no sistema nervoso central (Hersch et al., 1994; Graybiel et al., 1994; Weiner et al., 1990).

Nossos resultados evidenciaram no corpo estriado de ratos jovens convulsivos uma *downregulation* nos receptores muscarínicos, não havendo alteração em nível da constante de dissociação (K_d) após 1h do tratamento agudo com pilocarpina. Através de nossos estudos confirmamos a *downregulation* nos receptores muscarínicos produzida por agonistas colinérgicos (Turski et al., 1989), bem como nossos dados também corroboram, em parte, os de Freitas e colaboradores (2003a), que encontraram, em ratos adultos convulsivos, uma *downregulation* nos receptores muscarínicos (M1+M2) e um decréscimo no K_d no corpo estriado de ratos adultos após tratamento com pilocarpina.

As diferenças vistas em nossos resultados e os de Freitas et al. (2003a), com relação a constante de dissociação, sugerem possíveis diferenças referentes à ativação do sistema colinérgico durante o processo convulsivo, que podem decorrer de características ontogênicas e/ou relacionadas ao período do processo convulsivo analisado.

O tratamento com pilocarpina resulta numa exacerbação da atividade colinérgica. A hipótese proposta para essa interação é que a pilocarpina pode influenciar diretamente a transmissão colinérgica por aumentar a ação da ACh circulante, modificando o *binding* dos receptores muscarínicos (Hruska et al., 1984) e diminuindo, possivelmente, a

atividade acetilcolinesterásica. Este fenômeno também pode ser demonstrado em ratos imaturos e denota o estado atuante do sistema colinérgico nessa faixa de idade.

Alternativamente, os efeitos da pilocarpina podem afetar a transmissão dopaminérgica. A pilocarpina aumenta a afinidade dos receptores D₁ (Al-Tajir et al., 1990), aumentando a susceptibilidade para os efeitos pró-convulsivantes da estimulação dos receptores dopaminérgicos D₁.

A administração aguda de pilocarpina em alta dose promoveu significativa *downregulation* dos receptores dopaminérgicos no corpo estriado de rato imaturo, mostrando assim uma sensibilidade desses receptores às ações colinérgicas nessa faixa de idade. No *binding* referente ao ligante ³H-SCH, os valores de Kd não sofreram nenhuma alteração, entretanto, no *binding* referente ao ligante ³H-espiroperidol, os valores do Kd foram diminuídos no grupo tratado com pilocarpina, indicando uma maior afinidade do ligante pelos sítios dopaminérgicos D₂.

O cérebro imaturo apresenta a surpreendente capacidade de se adaptar diante de mudanças ocorridas no seu meio e de ajustar suas conexões durante o desenvolvimento (Morilak et al., 1995). Os fenômenos de *up* ou *downregulation* constituem exemplos de adaptações quantitativas cerebrais que ocorrem numa determinada via em resposta a um certo estímulo (Hyman e Nestler, 1996).

Algumas estudos sugerem que o sistema dopaminérgico tem uma importante participação no mecanismo de propagação das convulsões, observada através da potencialização dos efeitos convulsivantes decorrentes da estimulação dos receptores D₁, bem como pela prevenção das convulsões induzidas por pilocarpina através do bloqueio desses receptores (Barone et al., 1990a,b). Além disso, Barone et al. (1991), também demonstram que antagonistas dos receptores D₂ facilitam as convulsões induzidas por lítio e pilocarpina. Estas observações indicam que estes dois receptores dopaminérgicos parecem possuir efeitos opostos na regulação da atividade epiléptica.

É interessante notar que no cérebro em desenvolvimento, as alterações pós-sinápticas, provocadas pelo tratamento agudo com a droga colinérgica pilocarpina no corpo estriado, aconteceram principalmente sobre os receptores D₂. Uma provável explicação para essas manifestações pode ser sugerida através do estudo ontogênico, mostrando a evolução dos receptores D₂ cerebrais. Estes receptores apareceram intensamente no corpo estriado ainda na fase embrionária (no 15° - 17° dia da fase embrionária). Por sua vez, no hipocampo, estes sítios foram evidenciados mais tarde, ou seja, no período pós-natal (Sales et al., 1989). As mudanças quantitativas e / ou qualitativas dos receptores envolvem certo grau de maturação (Hyman e Nestler, 1996).

A interação do neurotransmissor com seus receptores pode ter diferentes consequências durante o desenvolvimento cerebral. No adulto, a administração de um agonista e de um antagonista para o receptor geralmente leva a uma *downregulation* e uma *upregulation* compensatória, respectivamente. Vários estudos têm demonstrado que durante a ontogenia, quando o número de receptores, sua regulação, e o segundo mensageiro ou a ligação aos canais iônicos estão incompletamente desenvolvidos, a exposição para agonistas ou antagonistas pode ter efeitos que são paradoxais e duradouros (Insel, 1995).

Determinação do índice de peroxidação lipídica

A excitação prolongada dos neurônios durante as convulsões pode conduzir a injúria e morte celular, resultantes de processos bioquímicos que ainda não foram bem esclarecidos. Um dos mecanismos básicos de injúria celular envolve a formação excessiva de radicais livres (Floyd, 1990; Reiter et al., 1997), que conduzem a alterações estruturais anormais das proteínas celulares, lipídios de membrana, DNA e RNA, pelo processo de estresse oxidativo. A injúria oxidativa no cérebro é apontada como mecanismo comum de injúria celular em muitas doenças crônicas como Parkinson e Alzheimer, bem como em insultos neurológicos agudos, incluindo isquemia e atividade

epiléptica (Beni e Moretti, 1995; Dexter et al., 1994; Oliver et al., 1990; Sperk, 1994), todavia pouco se sabe sobre a relação entre injúria oxidativa cerebral e a epilepsia humana.

Modelos experimentais em roedores têm mostrado que o estresse oxidativo parece contribuir para a morte de células neuronais e gliais. Kim et al. (1997) demonstraram uma elevação de oxidação protéica e lipídica no hipocampo de animais após 4 e 24h da administração de ácido caínico. Freitas et al. (2004a) também mostram níveis aumentados de peroxidação lipídica durante o período agudo das convulsões induzidas por pilocarpina em várias áreas cerebrais de animais adultos. Nossos resultados, por sua vez, também revelam que a administração de P400 produziu um aumento dos níveis de peroxidação lipídica (expressos em concentração de MDA) no corpo estriado dos animais com 21 dias de idade, confirmando, assim, o possível envolvimento de radicais livres na injúria cerebral induzida pelas convulsões.

Estudos prévios mostram que bloqueadores de canais de cálcio tipo L exibem propriedade variável de atividade antioxidante nas membranas celulares (Mak et al., 1995). Dos três grupos de bloqueadores de canais de cálcio tipo L (diidropiridinas, fenilalquilaminas e benzotiapepinas), as diidropiridinas são os que apresentam um efeito antioxidante mais potente (Mak et al., 1992; Mak et al., 1995).

Os resultados do presente estudo indicam uma ação antioxidante da ND evidenciada pela diminuição dos níveis estriatais de MDA. O mecanismo molecular pelo qual as diidropiridinas medeiam seus efeitos antioxidantes ainda não foram totalmente esclarecidos, pesquisas sugerem que estes compostos podem mediar uma ação de “quebra de corrente” através de uma reação de transferência de elétrons ou hidrogênio, semelhante ao mecanismo de ação da Vitamina E (Mak et al., 2002; Simic et al., 1987).

Estudos experimentais demonstraram que altas doses de diidropiridinas podem inibir a formação de plaquetas ateroescleróticas em coelhos (Henry, 1985; Willis et al., 1985). Estudos clínicos também sugerem que os bloqueadores de cálcio certamente

podem inibir a progressão da ateroesclerose coronária (Keogh e Schroeder, 1990). O mecanismo responsável por esse efeito anti-ateroesclerotico não está claro, mas pode não estar relacionado ao bloqueio de canais de cálcio (Henry, 1985; Keogh e Schroeder, 1990).

Verificação da produção de nitrito

A excitotoxicidade, um processo no qual há uma excessiva produção de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs), induz morte neuronal e é responsável por muitas alterações neurológicas em diversas doenças, incluindo a epilepsia (Lipton e Rosenberg, 1994). As EROS produzidas durante as convulsões e estado epiléptico podem ser consideradas com uma parte dos mecanismos envolvidos na excitotoxicidade glutamatérgica *in vitro* (Bonfoco et al., 1995) e *in vivo* (Bondy e Lee, 1993; Bruce e Baudry, 1995; Shulz et al., 1995; Ueda et al., 1997). Por sua vez, o envolvimento das EROS durante o período agudo das convulsões induzidas por pilocarpina em animais imaturos precisam ser melhor esclarecido.

A estimulação de receptores de glutamato induz a liberação de óxido nitrito (NO) neuronal (Alabadi et al., 1999; Nakaki et al., 2000). Desde a sua descoberta, como um mensageiro intracelular de produção endógena, tem sido demonstrado que o NO desempenha um importante papel em praticamente todos os sistemas do organismo (Eiseich et al., 1998). Embora exerça diversas funções fisiológicas úteis, seu excesso pode ser nocivo. Em determinadas condições o NO e o O_2^- podem interagir, resultando um produto muito tóxico, o peroxinitrito (ONOO $^-$). Esse composto é capaz de reagir prontamente com diversas moléculas: proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucléicos, danificando-as. Além disso, seus prováveis produtos de decomposição, o OH $^-$, dióxido de nitrogênio e outros têm semelhante potencial deletério. Conseqüentemente, a toxicidade do NO pode ser explicada, pelo menos em parte, por sua reação com o O_2^- .

Pesquisas recentes mostram um aumento na produção de nitrito (metabólito estável do NO) em diversas áreas cerebrais, incluindo corpo estriado, em alguns modelos de convulsão (Freitas et al., 2004b; Radenovic et al., 2003). Da mesma forma, nossos resultados também mostraram um aumento no nível de nitrito no corpo estriado de ratos jovens após administração aguda de pilocarpina.

O nitrito pode ser associado com a fisiopatologia de inúmeras doenças (Vanhatalo e Riikonen, 2001). Durante a convulsão o nitrito tem sido implicado com muitos dos mecanismos moleculares do processo, podendo modular uma cascata de efeitos excitotóxicos no SNC, e finalmente participar do subseqüente dano neuronal (Dalkara et al., 1994).

Bloqueadores de canais de cálcio são utilizados na clínica, principalmente por sua ação inibitória no influxo de cálcio intracelular, contudo estudos têm mostrado que esses agentes, também exercem ações antioxidantes que podem contribuir para sua atividade farmacológica (Mak et al., 1992; Mak et al., 1995). No entanto, o mecanismo bioquímico desse efeito protetor ainda não foi estabelecido.

Nossos dados revelam que a nimodipina exerce efeitos protetores no corpo estriado de ratos jovens, evidenciados pela diminuição dos níveis de nitrito nos animais que foram tratados com esta droga antes das convulsões induzidas por pilocarpina. Como relatado anteriormente, apesar do mecanismo antioxidante das diidropiridinas não ter sido elucidado com exatidão, existem evidências que sugerem que elas pertencem ao grupo de antioxidantes que agem pelo mecanismo de “quebra de corrente”, ou seja, elas doam elétrons para os radicais livres formados, reduzindo-os a forma não reativa (Gaviraghi et al., 1995). Contudo, mais estudos usando esses compostos durante o estado epiléptico devem ser realizados para o pronto esclarecimento do efeito citoprotetor das diidropiridinas contra as Eros, na patogênese da epilepsia do lobo temporal induzida por pilocarpina.

Estudos da atividade da catalase

Um aumento nos níveis de radicais livres pode ser responsável pela neuropatologia induzida pelo SE (Rong et al., 1999). Existe, contudo, um sistema de enzimas antioxidantes endógenas (SOD, CAT e GSH-Px) que agem contra o dano neuronal induzido por esses radicais. SOD metaboliza O_2^- a H_2O_2 , no qual é então detoxificado pelas enzimas CAT e GSH-Px (Ferreira e Matsubara, 1997). O SE também pode alterar esses sistemas antioxidantes, indicando, assim, uma resposta celular ao aumento dos radicais livres (Erakovic et al., 2000; Freitas et al., 2004a; Naffah-Mazzacoratti et al., 2001). Os resultados do nosso presente estudo mostraram um aumento na atividade da CAT no corpo estriado de ratos jovens, 1h após as convulsões induzidas por P400, contribuindo para a hipótese de um possível mecanismo compensatório contra a produção excessiva de radicais livres durante SE.

Ao investigar as ações da ND, observamos que o pré-tratamento dos animais antes da indução do processo convulsivo, resultou em um efeito estabilizante da atividade da CAT, mantendo-a nos seus níveis normais, confirmando, novamente, uma ação protetora dessa droga nas alterações bioquímicas induzidas pelo processo convulsivo.

Os mecanismos envolvidos na ação protetora da ND precisam ser determinados totalmente, Zupan et al. (1999) mostraram que a ND previne a acumulação de ácidos graxos livres após convulsões induzidas por penicilina. Marinho et al. (1997), no modelo de convulsão com pilocarpina, demonstraram que ND não somente protege os animais contra SE, mas também é capaz de diminuir significativamente o dano cerebral. Nessa idéia, uma crescente linha de evidências sugere que os efeitos da ND podem não decorrer exclusivamente da modulação de canais de cálcio do tipo L, mas também de sua ação bloqueadora, tanto do efluxo quanto do influxo de cálcio dos sinaptossomas, bem como da interferência nos mecanismos de liberação e/ou recaptação de neurotransmissores dos terminais neuronais (Azmitia et al., 1993; Woodward et al., 1988). Contudo, mais estudos são necessários para se avaliar de forma mais detalhada as alterações

neuroquímicas decorrentes da ação protetora da ND, a fim de contribuir para o esclarecimento do seu mecanismo de ação.

Determinação da concentração da glutationa reduzida (GSH)

A glutationa reduzida (GSH, L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina) está presente em muitos tecidos de mamíferos em concentrações milimolares. A GSH tem um importante envolvimento no estoque e transporte de cisteína e na defesa celular contra radicais livres, peróxidos e xenobióticos eletrofílicos, como um cofator de glutationa peroxidase (GSH-Px) e glutationa-S-transferase. A GSH-Px converte a GSH em glutationa oxidada (GSSG) na presença de peróxido de hidrogênio, que por sua vez é utilizada para a regeneração de GSH, via um processo catalisado pela glutationa redutase. No cérebro, a GSH está localizada quase que exclusivamente nas células astrogliais, mas também pode ser encontrada em terminais nervosos e em alguns neurônios (Philbert et al., 1991; Raps et al., 1989; Slivka et al., 1987a). A concentração total de GSH no cérebro é de aproximadamente 2mM, na qual a maior parte encontra-se no compartimento intracelular na forma reduzida, e somente 1,2% ou menos na forma oxidada (Rehncrona et al., 1980; Slivka et al., 1987b).

O poder antioxidant da GSH foi demonstrado pelo aumento da sobrevida de 90% de ratos submetidos a hiperoxia. Pode também ser benéfica na proteção contra o estresse oxidativo (Deneke e Fanburg, 1989).

Nossos resultados não apresentaram qualquer alteração no conteúdo da glutationa reduzida (GSH) no corpo estriado de ratos jovens, evidenciado pela manutenção dos níveis normais de GSH em todos os grupos experimentais. Segundo Scott e colaboradores (1991), a suplementação de catalase exógena previne a oxidação da GSH mediada pelo H_2O_2 em eritrócitos humanos normais. Dessa forma, podemos sugerir que a não alteração da concentração de GSH, no grupo tratado com pilocarpina, pode decorrer do aumento da atividade da catalase mostrado anteriormente em nossos resultados e,

possivelmente, esse mecanismo compensatório parece contribuir de forma importante para a redução dos efeitos deletérios na fase aguda inicial do processo convulsivo.

CONCLUSÕES

1. Os animais em desenvolvimento, tratados com alta dose de pilocarpina, apresentaram intensas convulsões, estado epiléptico e uma mortalidade de aproximadamente 30%, ao passo que os animais pré-tratados com nimodipina (10 e 30mg/Kg) antes das convulsões induzidas por pilocarpina 400mg/Kg (P400) apresentaram características comportamentais semelhantes àquelas vistas com pilocarpina 400 mg/kg (P400), no que se refere à presença de sinais colinérgicos e movimentos estereotipados, mas divergiram quanto ao número de convulsões, estado epiléptico e a letalidade.
2. Com relação aos sistemas de neurotransmissores, foi visto uma redução na concentração da serotonina no corpo estriado dos animais tratados com P400, sugerindo uma participação direta entre os sistemas colinérgico e serotonérgico, possivelmente com o intuito de reduzir ou cessar as ações anticonvulsivantes mediadas pela 5-HT através dos receptores 5-HT₁, facilitando a manutenção das convulsões.
3. O estudo com o bloqueador de cálcio sugere que os efeitos protetores da nimodipina podem-se dever à ativação do sistema serotonérgico e inibição do sistema dopaminérgico, o que ressalta a interligação desses dois sistemas e a hipótese de que as ações da nimodipina não decorra exclusivamente da modulação de canais de cálcio tipo L.
4. A *downregulation* dos receptores muscarínicos (M₁+M₂) no corpo estriado dos animais jovens mostra que a ativação muscarínica parece ser preponderante para o processo convulsivo. Além disso, o tratamento com pilocarpina mostrou alteração na densidade dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂, aumentando apenas a afinidade para os receptores D₂ pelo ligante no corpo estriado dos animais jovens, sugerindo também uma participação dopaminérgica no processo convulsivo e uma relação direta e/ou indireta dos sistemas colinérgicos e dopaminérgicos.

5. P400 promove uma produção excessiva de espécies deletérias para as células no corpo estriado dos animais jovens. Em adição, como possível mecanismo compensatório, P400 aumenta a atividade da enzima catalase no corpo estriado de ratos jovens. E esses efeitos são revertidos pela ação protetora da nimodipina.
6. O conhecimento da fisiopatologia das convulsões em animais imaturos, como a identificação dos mecanismos de instalação, propagação e manutenção do processo convulsivo, poderão favorecer a determinação das áreas cerebrais e as alterações neuroquímicas que estão envolvidas na epilepsia.
7. A identificação dos alvos intracelulares para as ações da nimodipina poderá fornecer subsídios para sua possível aplicação terapêutica, além das já utilizadas na clínica, em outras desordens neurológicas, dentre elas a epilepsia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALABADI, J.; THIBAULT, J. L.; PINARD, E.; SEYLAZ, J. LASBENNES, F. 7-Nitroindazole a selective inhibitor of *n*NOS increases hippocampal extracellular glutamate concentration in status epilepticus induced by kainic acid in rats. **Brain Res.**, v. 839, p. 305-312, 1999.

ALBALA, B. J.; MOSHE, S. L.; OKADA, R. Kainic-acid-induced seizures: a developmental study. **Brain Res.**, v. 315, p. 139-148, 1984.

AL-TAJIR, G.; STARR, M.S.; STARR, B. S. Proconvulsant effect of SKF 38393 mediated by nigral D₁ receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 162, p. 245-251, 1990.

ARNOLD, J. H.; RACINE, R. J.; WISE, R. A. Effects of atropine, reserpine, 6-hydroxydopamine, and handling on seizure development in the rat. **Expl. Neurol.**, v. 40, p. 457-470, 1973.

AUER, L. M.; OBERBAUER, R. W.; SCHALK, H. V. Human pial vascular reactions to intravenous nimodipine-infusion during EC-IC bypass surgery. **Stroke**, v. 14, p. 210-213, 1983.

AVOLI, M.; LIU, Z.; NAGAO, T.; DESJARDINS, C.; GLOOR, P. Quantitative evaluation of neuronal loss in the dorsal hippocampus in rats with long-term pilocarpine seizures. **Epilepsy Research**, v. 17, p. 237-247, 1994.

AZMITIA, E. C.; KRAMER, H. K.; KIM-PARK, W. K. Nimodipine blocks the efflux of Ca²⁺ and enhances the depolarization-induced release of [³H]5-HT from CNS synaptosomes. **Drugs Develop.**, v. 2, p. 437-445, 1993.

BALDUINI, W.; MURPHY, S. D.; COSTA, L. G. Developmental changes in muscarinic receptor- stimulated phosphoinositide metabolism in rat brain. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 241, p. 421-427, 1987.

BARDO, M. T.; SCHMIDT, R. H.; BHATNAGAR, R. K. Effects of morphine on sprouting of locus coeruleus fibers in the neonatal rat. **Dev. Brain Res.**, v. 22, p. 161-168, 1985.

BARONE, P.; PALMA, V.; PARASHOS, S. A.; CHASE, T. N.; CAMPANELLA, C. L. Role of D1 and D2 dopamine receptors in pilocarpine-induced seizures, in: **Basal Ganglia III**. eds. M.B. Carpenter, G. Bernardi, G. Di Chiara and P. Stanzione. New York: Plenum Press, p. 568, 1990a.

BARONE, P.; PARASHOS, S. A.; PALMA, V.; MARIN, C.; CAMPANELIA, G.; CHASE, T. N. Dopamine D1 receptor modulation of pilocarpine-induced convulsions. **Neuroscience**, v. 34, p. 209, 1990b.

BARONE, P.; PALMA, V.; DEBARTOLOMEIS, A.; TEDESCHI, E.; MUSCETTOLA, G.; CAMPANELLA, G. Dopamine D1 e D2 receptors mediate opposite functions in seizures induced by lithium-pilocarpine. **European Journal of Pharmacology**, v. 195, p. 157-162, 1991.

BARTUS, R. T.; DEAN III, R. L.; BEER, B.; LIPPA, A. S. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. **Science**, v. 217, p. 408-414, 1982.

BEN-ARI, Y.; TREMBLAY, E.; OTTERSEN, O. P. Injections of kainic acid into the amygdaloid complex of the rat: an electrographic, clinical and histological study in relation to the pathology of epilepsy. **Neuroscience**, v. 5, p. 515-528, 1980.

BEN-ARI, Y.; TREMBLAY, E.; RICHE, D.; GHILINI, G.; NAQUET, R. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of

kainic acid, bicuculdeoxyglucose or pentylenetetrazole: metabolite mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. **Neuroscience**, v. 6, p. 1361-1391, 1981.

BEN-BARAK, J.; DUDAI, Y. Cholinergic *binding* sites in rat hippocampal formation: properties and ontogenesis. **Brain Res.**, v. 166, p. 245- 257, 1979.

BEN-ARI, Y.; CHERUBINI, E.; CORRADETTI, R.; GAIARSA, J. L. Giant synaptic potentials in immature rat CA3 hippocampal neurons. **J. Physiol.**, v. 416, p. 303-325, 1989.

BEN-ARI, Y.; KHAZIPOV, R.; LEINEKUGEL, X.; CAILLARD, O.; GAIARSA, J. L. GABA_A, NMDA and AMPA receptors: a developmentally regulated “ménage a trios”. **Trends Neurosci.**, v. 20, p. 523-529, 1997.

BENI, G.; MORETTI, A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer’s disease ? **Neurobiol. Aging**, v. 16, p. 661-674, 1995.

BERG, A. T.; SHINNAR, S. The contributions of epidemiology to the understanding of childhood seizures and epilepsy. **J. Child. Neurol.**, v. 9, p. 19-26, 1994.

BERG, A.T.; SHINNAR, S.; SHAPIRO, E. D.; SALOMON, M. E.; CRAIN, E. F.; HAUSER, A. Risck factors for a first febrile seizure: a matched case-control study. **Epilepsia.**, v. 36, p. 334-341, 1995a.

BERG, M.; BRUHN, T.; FRANDSEN, A.; SCHOUSBOE, A.; DIEMER, N. H. Kainic acid-induced seizures and brain damage in the rat: role of calcium homeostasis. **J. Neurosci. Res.**, v. 40, p. 641-646, 1995b.

BIONDI, A.; RICCIARDI, G. K.; PUYBASSET, L.; ABDENOUR, L.; LONGO, M.; CHIRAS, J.; VAN EFFENTERRE, R. Intra-arterial nimodipine for the treatment of

symptomatic cerebral vasospasm after aneurismal subarachnoid hemorrhage: preliminary results. **AJNR Am. J. Neuroradiol.**, v. 25, p. 1067-1076, 2004.

BOER, G. J.; SWAAB, D. F. Neuropeptide effects on brain development to be expected from behavioral teratology. **Peptides**, v. 6, p. 21-28, 1985.

BONDY, S. C.; LEE, D. K. Oxidative stress induced by glutamate receptors agonists. **Brain Res.**, v. 610, p. 229-233, 1993.

BONFOCO, E.; KRAINIC, D.; ANKARCRONA, M.; NOCOTERA, P.; LIPTON, A. S. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 7162-7166, 1995.

BONNER, T. I.; BUCKLEY, N. J.; YOUNG, A. C.; BRANN, M. R. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. **Science**, v. 237, p. 527-532, 1987.

BORELLI, E.; BOZZI, Y. Dopamine D₂ receptor signaling controls neuronal cell death induced by muscarinic and glutamtergic drugs. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 19, p. 263-271, 2002.

BRANCONNIER, R. J.; BRANCONNIER, M. E.; WALSHE, T. M.; McCARTHY, L. P. N.; MORSE, P. A. Blocking the Ca²⁺-activated cytotoxic mechanisms of cholinergic neuronal death: A novel treatment strategy for Alzheimer's disease. **Psychopharmacol. Bull.**, v. 28, p. 175-181, 1992.

BRANDT, L.; SAVELAND, H.; LJUNGGREN, B.; ANDERSSON, K.-E. Control of epilepsy partialis continua with intravenous nimodipine. **J. Neurosurg.**, v. 69, p. 949-950, 1988.

BROWNE, T. R.; HOLMES, G. L. Epilepsy. **NEJM**, v. 344, p. 1145-1451, 2001.

BRUCE, A.J.; BAUDRY, M. Oxygen free radicals in rat limbic structures after kainate-induces seizures. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 18, p. 993-1002, 1995.

BURCHFIEL, J. L.; DUCHOWNY, M. S.; DUFFY, F. N. Neuronal supersensitivity to acetylcholine induced by kindling in the rat hippocampus. **Science**, v. 204, p. 1096-1098, 1979.

BUREAU, Y.R.J.; PEREDERY, O.; PERSINGER, M.A. Concordance of quantitative damage within the diencephalon and telencephalon following systemic pilocarpine (380mg/kg) or lithium (3mEq/kg)/pilocarpine (30mg/kg) induced seizures. **Brain Research**, v. 648, p. 265-269, 1994.

BURKE, R. E.; GREEBAUN, D. Effect of post-morten factors on muscarinic receptor subtypes in rat brain. **Journal Neurochemical**, v. 49, p. 592-596, 1987.

CANO-ABAD, M. F.; VILLAROYA, M.; GARCIA, A. G.; GABILAU, N. H.; LOPEZ, M. G. Calcium entry through L-type calcium channels causes mitochondrial disruption and chromaffin cell death. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 39695-39704, 2001.

CARDONE, C.; SZENOHRADSKY, J.; YOST, S.; BICKLER, P.E. Activation of brain acetylcholine receptors by neuromuscular blocking drugs. **Anesthesiology**, v. 80, p. 1155-1161, 1994.

CAVALHEIRO, E. A.; CZUEZWAR, S. J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L.; TURSKI, W. A. Intracerebral cholinomimetics produce seizure- related brain damage in rats. **Brit. Pharmacol.**, v. 79, p. 284, 1983.

CAVALHEIRO, E. A.; SILVA, D. F.; TURSKI, W. A.; CALDERAZZO-FILHO, L. S.; BORTOLOTTO, Z. A.; TURSKI, L. The susceptibility of rats to pilocarpine-induced seizures is age dependent. **Dev. Brain Res.**, v. 37, p. 43-58, 1987.

CAVALHEIRO, E. A.; LEITE, J. P.; BORTOLOTTO, Z. A.; TURSKI, W. A.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia**, v. 32, p. 778-782, 1991.

CAVALHEIRO, E. A.; FERNANDES, M. J.; TURSKI, L.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G. Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. **Epilepsia**, v. 35, p. 1-11, 1994.

CAVALHEIRO, E. A.; BELLÍSSIMO, M. I.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G. Profile of prostaglandin levels in the rat hippocampus in pilocarpine model of epilepsy. **Neurochemical**, v. 27, p. 461-466, 1995.

CHAMBERLAIN, M.; JOHNSON, M. P.; KELLY G. M. Blockade of pilocarpine-induced cerebellar phosphoinositide hydrolysis with metabotropic glutamate antagonists: evidence for an indirect control of granule cell glutamate release by muscarinic agonists. **Neuroscience Letters**, v. 285, p. 71-75, 2000.

CHANCE, B.; MAEHLY, A. C. Assay catalases and peroxidases. **Methods Enzymol.**, v. 2, p. 764-768, 1955.

CHARKRAHARTI, A.; SAINI, H. K.; GARG, S. K. Dose-finding study of nimodipine: a selective central nervous system calcium blocker on amynophylline induced seizures in rats. **Brain Res. Bull.**, v. 45, p. 495-499, 1998.

CIVELLI, O.; BUNZOW, J. R.; GRANDY, D. K. Molecular diversity of the dopamine receptors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 32, p. 281-307, 1993.

CLIFFORD, D. B.; OLNEY, J. W.; MANIOTIS, A.; COLLINS, R. C.; ZORUMSKI, C. F. The functional anatomy and pathology of lithium-pilocarpine and high-dose pilocarpine seizures. **Neuroscience**, v. 23, p. 953-968, 1987.

COHEN, S. L.; MORLEY, B. J.; SNEAD, O. C. An EEG analysis of convulsive activity produced by cholinergic agents. **Prog. Neuropsychopharmacol.** v. 5, p. 383-388, 1981.

CONNORS, B. W.; BERNARDO, K. S.; PRINCE, D. A. Coupling between neurons of developing rat neocortex. **J. Neurosci.**, v. 3, p. 773-82, 1983.

COOPER, J. R.; BLOOM, F. E.; ROTH, R. H. The biochemical basis of neuropharmacology consequences. 6ht ed. Oxford Univ Press, 1991.

COSTA-LOTUFO, L.V.; FONTELES, M. M. F.; LIMA, I. S. P.; OLIVEIRA, A. A.; NASCIMENTO, V. S.; BRUIN, V. M. S.; VIANA, G. S. B. Attenuating effects of melatonin on pilocarpine-induced seizures in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 131, p. 521-529, 2002.

COYLE, J. T.; YAMAMURA, H. I. Neurochemical aspects of the ontogenesis of cholinergic neurons in the rat brain. **Brain Res.**, v. 118, p. 429-440, 1976.

DAVIS, K. L.; HOLLISTER, L. E.; BERGER, P. A.; BARCHAS, J. D. Cholinergic imbalance hypotheses of psychoses and movement disorders: strategies for evaluation. **Psychopharmacologia Commun.**, v. 1, p. 533-543, 1975.

DAVIS, W. M.; HATOUN, N. S. Synergism of the toxicity of physostigmine and neostigmine by lithium or by a reserpine-like agent (R04-1284). **Toxicology**, v. 17, p. 1-7, 1980.

DALKARA, T.; YOSHIDA, T.; IRIKURA, K.; MOSKOWITZ, M. A. Dual role of nitric oxide in focal cerebral ischemia. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 1447-1452, 1994.

DE BRUIN, V. M. S.; MARINHO, M. M. F.; DE SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Behavioural and neurochemical alterations after lithium-pilocarpine administration in

Young and adult rats: a comparative study. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 65, p. 547-551, 2000.

DEMIRYUREK, A. T.; CAKICI, I.; KANZIK, I. Peroxynitrite: a putative cytotoxin. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 82, p. 113-117, 1998.

DENEKE, S. M.; FANBURG, B. L. Regulation of cellular glutathione. **Am. J. Physiol.**, v. 257, p. 163-173, 1989.

DEVLIN, J. W.; COPLIN, W. M.; MURRY, K. R.; RENGACHARY, S. S.; WILSON, R. F. Nimodipine-induced acute hypoxemia: case report. **Neurosurgery**, v. 47, p. 1243-1246, 2000.

DEXTER, D. T.; HOLLEY, A. E.; FLITTER, W. D.; SLATER, T. F.; WELLS, F. R.; LEES, D. S. E.; JENNER, P.; MARDEN, D. C. Increased levels of hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra – an HPLC and EPR study. **Mov. Disord.**, v. 9, p. 92-97, 1994.

DOLIN, S. J.; LITTLE, H. J. The dihydropyridine nitrendipine prevents nitrous oxide withdrawal seizures in mice. **Br. J. Addict.**, v. 81, p. 708, 1986.

DOLIN, S. J.; HUNTER, A. B.; HALSEY, M. J.; LITTLE, H. J. Anticonvulsant profile of the dihydropyridine calcium channel antagonists, nirendipine and nimodipine. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 152, p. 19-27, 1988.

DOMBROWSKI, H. G.; JERKINS, A. A.; KAUFFMANN, F. C. Muscarinic receptor binding and oxidative activities in the adult rat superior cervical ganglion: effects of 6-hydroxydopamine and nerve growth factor. **Journal Neuroscience**, v. 3, p. 1963-1970, 1983.

DORSCH, N. W. Therapeutic approaches to vasospasm in subarachnoid hemorrhage. **Curr Opin Crit Care**, v. 8, p. 128–133, 2002.

DOS SANTOS, N. F.; ARIDA, R. M.; TRINDADE-FILHO, E. M.; PRIEL, M. R.; CAVALHEIRO, E. A. Epileptogenesis in immature rats following recurrent status epilepticus. Short review, **Brain Research Reviews**, v. 32, p. 269-276, 2000.

DRAY, A.; GONYE, T. T.; OAKLEY, N. R.; TANNER, T. Evidence for existence of a raphe projection to the substantia nigra in rat. **Brain Res.**, v. 113, p. 45-57, 1976.

DU, F.; EID, T.; LOTHMAN, E. W.; KOLHER, C.; SCHEVAREZ, R. Preferential neuronal loss in layer III of the medial entorhinal cortex in rats models of temporal lobe epilepsy. **J. Neurosci.**, v. 15, p. 6301-6313, 1995.

DUBOWSKY, S. L. Calcium antagonists: a new class of psychiatric drugs? **Psychiatr. Anm.**, v. 16, p. 724-728, 1986.

DUDEK, F. E.; OBENHAUS, A.; TASKER, J. G. Osmolarity-induced changes in extracellular volume after epileptiform bursts independent of chemical synapses in the rat: importance of non-synaptic mechanisms in hippocampal epileptogenesis. **Neurosci. Lett.**, v. 120, p. 267-70, 1990.

EISENBERG, M. J.; BROX, A.; BESTAWROS, A. N. Calcium Channel Blockers: An Update. Review. **Am. J. Med.**, v. 116, p. 35– 43, 2004.

EISERICH, J. P.; PATEL, R. P.; O'DONNELL, V. B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. **Mol. Aspects Med.**, v. 19, p. 221-357, 1998a.

EISERICH, J. P.; HRISTOYA, M.; CROSS, C. E.; JONES, A. D.; FREEMAN, B. A.; HALLIWELL, B.; VAN DER VLIET, A. Formation of nitric oxide-derived

inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. **Nature**, v. 391, p. 393-397, 1998b.

EL-ETRI, M. M.; ENNIS, M.; JIANG, M.; SHIPLEY, M. T. Pilocarpine-induced convulsions in rats: evidence for muscarinic receptor-mediated activation of locus coeruleus and norepinephrine release in cholinolytic seizure development. **Experimental Neurology**, v. 121, p. 24-39, 1993.

EL-ETRI, M. M.; ENNIS, M.; GRIFFS, E. R.; SHIPLEY, M. T. Evidence for cholinergic regulation of basal norepinephrine release in the rat olfactory bulb. **Neuroscience**, v. 93, p. 611-617, 1999.

ELGOYHEN, A. B.; KATZ, E.; ROTHLIN, C. V.; VERBITSKY, M. Mixed nicotinic-muscarinic properties of the $\alpha 9$ nicotinic cholinergic receptor. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 2515-2524, 2000.

ENGLE, J. Jr. functional explorations of the human epileptic brain and their therapeutic implications. **Eletroencephalogr. Clin. Neurophysiol.**, 76: 296-316, 1990.

ERAKOVIC, V.; ZUPAN, G.; VARLJEN, J.; LAGINJA, J.; SIMONIC, A. Lithium plus pilocarpine induced status epilepticus—biochemical changes. **Neurosci. Res.**, v. 36, p. 157-166, 2000.

FADDA, F.; GEZZA, G. L.; MOSCA, E.; STEFANINI, E. Different effects of the calcium antagonists nimodipine and flunarizine on dopamine metabolism in the rat brain. **J. Neural. Transm.**, v. 75, p. 195-200, 1989.

FALCONER, M. A. Genetic and related etiologic factors in temporal lobe epilepsy. A review, **Epilepsia**, v. 12, p. 13-21, 1971.

FERRER, I.; MARTIN, F.; REIRIZ, J.; PE'REZ-NAVARRO, E.; ALBERCH, J.; MACAYA, A.; PLANAS, A. M. Both apoptosis and necrosis occur following intrastriatal administration of excitotoxins. **Acta Neuropathol.**, v. 90, p. 504-510, 1995.

FISHER, S. K.; AGRANOFF, B. W. Receptor activation and inositol lipid hydrolyses in neural tissues. **J. Neurochem.**, v. 48, p. 999-1017, 1987.

FLYNN, C. J.; WECKER, L. Concomitant increases in the levels of choline and free fatty acids in rat brain: Evidence supporting the seizure-induced hydrolysis of phosphatidylcholine. **J. Neurochem.**, v. 48, p. 1178-1184, 1987.

FRANTSEVA, M. V.; PEREZ VELAZQUEZ, J. L.; HWANG, P. A.; CARLEN, P. L. Free radical production correlates with cell death in an in vitro model of epilepsy. **Eur. J. Neurosci.** v. 12, p. 1431-1439, 2000.

FREEMAN, B. A.; CRAPO, J. D. Biology of disease. Free radicals and tissue injury. **Lab. Invest.**, v. 47, p. 412-426, 1982.

FREHER, M.; CHALLAPALLI, S.; PINTO, J.V.; SCHWARTZ, J.; BONOW, R. O.; GHEORGIADE, M. Current status of calcium channel blockers in patients with cardiovascular disease. **Curr. Probl. Cardiol.**, v. 24, p. 236-40, 1999.

FERNANDES, J. G.; SCHMIDT, M. I.; MONTE, T. L.; TOZZI, S.; SANDER, J. W. Prevalence of epilepsy. The Porto Alegre study. **Epilepsia**, v. 33, p. 132, 1992.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Brasil**, v. 4, p. 61-68, 1997.

FIELDER, E. P.; MARKS, M. J.; COLLINS, A. C. Postnatal development of cholinergic enzymes and receptors in mouse brain. **Journal Neurochemical**, v. 49, p. 983-990, 1987.

FLOYD, R. A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. **FASEB J.**, v. 4, p. 2587-2597, 1990.

FREITAS, R. M.; FELIPE, C. F. B.; NASCIMENTO, V. S.; OLIVEIRA, A. A.; VIANA, G. S. B.; FONTELES, M. M. F. Pilocarpine-induced seizures in adults rats: monoamine and muscarinic and dopaminergic receptor changes in the striatum. **Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 136, p. 103-108, 2003a.

FREITAS, R. M.; SOUZA, F. C. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; FONTELES, M. M. F. Acute alterations of neurotransmitters levels in striatum of young rat after pilocarpine-induced status epilepticus. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 61, p. 430-433, 2003b.

FREITAS, R. M.; NASCIMENTO, V. S.; VASCONCELOS, S. M. M.; SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B.; FONTELES, M. M. F. Catalase activity in cerebellum, hippocampus, frontal córtex and striatum after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. **Neur. Letters**, v. 365, p. 102-105, 2004a.

FREITAS, R. M.; SOUSA, F. C. F.; VASCONCELOS, S. M. M.; VIANA, G. S. B.; FONTELES, M. M. F. Pilocarpine-induced status epilepticus in rats: lipid peroxidation level, nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the hippocampus, striatum and frontal córtex. **Pharmacol. Biochem. and Behaviour**, v. 78, p. 327-332, 2004b.

FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Farmacologia clínica, cap 43, p. 536-553, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

FUJIKAWA, D. G.; DWYER, B. E.; LAKE, R. R.; WASTERLAIN, C. G. Cerebral blood flow and metabolism during neonatal seizures. In : WASTERLAIN, C. G. & VERT, P. **Neonatal seizures**. New York : Raven Press, p. 143-158, 1990.

FUJIKAWA, D. G. The temporal evolution of neuronal damage from pilocarpine-induced status epilepticus. **Brain Research**, v. 725, p. 11-22, 1996.

GAGGI, R.; GIANNI, A. M. Effects of calcium antagonists on biogenic amines in discrete brain areas. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 181, p. 187-197, 1990.

GAGGI, R.; CHIRIVI, L.; RONCADA, P.; GIANNI, A. M. Effects of nitrendipine and nisoldipine on biogenic amines in discrete áreas of rat brain. **Gen. Pharmacol.**, v. 23, p. 881-888.

GAGGI, R.; CONT, R.; GIANNI, A. M. Comparison among the effects of nifedipine, nimodipine and nisoldipine on the brain biogenic amines of normal or haloperidol treated rats. **Gen. Pharmac.**, v. 24, p. 1091-1096, 1993.

GAGGI, R.; DALL'OLIO, R.; SANTANGELO, M.; RONCADA, P. Actions of nimodipine on the serotonergic systems of rat brain. **Gen. Pharmac.**, v. 29, p. 415-419, 1997.

GAVIRAGHI, G.; PASTORINO, A. M.; RATTI, E.; TRIST, D. G. Calcium channel blockers with antioxidant activity, in: Bellomo, G., Finardi, G., Maggi, E., Rice-Evans, C. (Eds.), Free Radicals, Lipoprotein Oxidation and Atherosclerosis, London: Richelieu Press, p. 431-456, 1995.

GIORGIO, O.; DE MONTIS, G.; PORCEDDU, M. L.; MELE, S.; CALDERINI, G.; TOFFANO, G.; BIGGIO, G. Developmental and age-related changes in D₁-dopamine receptors and dopamine content in the rat striatum. **Develop. Brain Res.**, v. 35, p. 283-290, 1987.

GONÇALVES, T.; CARVALHO, A. P.; OLIVEIRA, C. R. Antioxidant effect of calcium antagonists on microsomal membranes isolated from different brain áreas. **European J. Pharmacol.**, v. 204, p. 315-332, 1991.

GOTTIEB, A.; KEYDOR, I.; EPSTEIN, H. T. Rodent brain growth stages. An analytical review, **Biol. Neonate**, v. 32, p. 166-167, 1977.

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-58, 1981.

HABLITZ, J. J.; HEINCMANN, U. Extracellular K^+ and Ca^{2+} changes during epileptiform discharges in the immature rat cortex. **Dev. Brain Res.**, v. 36, p. 299-303, 1987.

HARKANY, T.; DIJKSTRA, I. M.; OOSTERINK, B. J. ET AL. Increased amyloid precursor protein expression and serotonergic sprouting following excitotoxic lesion of the rat magnocellular nucleus basalis: neuroprotection by $Ca(2+)$ antagonist nimodipine. **Neuroscience**, v. 101, p. 101-114, 2000.

HARRIS, E. D. Regulation of antioxidant enzymes. **FASEB J.**, v. 6, p. 2675-2683, 1992.

HART, Y. M.; SANDER, J. W. A. S.; JOHNSON, A. L. Shorvon SD for the NGPSE (National General Practice Study of Epilepsy). Recurrence after a first seizure. **Lancet**, v. 336, p. 1271-1274, 1990.

HAAS, H.; HARTFELDER, A. α -Isopropyl - α -N-methyl-N-homoveratryl - α -amino propyl]-3,4-dimethoxyphenylacetonitrile eine Substanz mit coronargefäßweiternden Eigenschaften. **Arzneim-Forsch**, 12: 549-58, 1962.

HARTIG, P. R. Molecular biology of 5-HT receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 10, p. 64-69, 1989.

HAUERBERG, J.; ROSENORN, J.; SKRIVER, E. B. Does nimodipine influence sex difference in outcome after aneurysmal subarachnoid haemorrhage? **Acta Neurochir.** (Wien), v. 138, p. 1168-1171, 1996.

HAUSER, K. F.; McLAUGHLIN, P. J.; ZAGON, I. S. Endogenous opioids regulate dentritic growth and spine formation in developing rat brain. **Brain Res.**, v. 416, p. 157-161, 1987.

HEACOCK, A. M.; FISHER, S. K.; AGRANOFF, B. W. Enhanced coupling of neonatal muscarinic receptors in rat bbrain to phosphoinositide turnover. **J. Neurochem.** v. 48, p. 1904-1911, 1987.

HEINEMANN, U.; LOUVEL, J. Changes in $[Ca^{2+}]_0$ and $[K^+]_0$ during repetitive electrical stimulation and during pentetrazol induced seizure activity in the sensorimotor cortex of cats. **Pflugers Arch.**, v. 398, p. 310-317, 1983.

HENRY, P. D. Atherosclerosis, calcium and calcium antagonists. **Circulation**, v. 72, p. 456-9, 1985.

HERSCH, S. M.; GUTEKUNST, C. A.; REES, H. D.; HEILMAN, C. J.; LEUEY, A. I. Distribution of M1-M4 muscarinic receptor proteins in the rat striatum: light and electron microscopic immunocytochemistry using subtype-specific antibodies. **J. Neurosci.**, v. 14, p. 3351-3363, 1994.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin. Hematol.**, v. 26, p. 277-285, 1989.

HESDORFFER, D. C.; LOGROSCINO, G.; CASCINO, G.; ANNEGERS, J. F.; HAUSER, W. A. Risk of unprovoked seizure after acute symptomatic seizures: effect os status epilepticus. **Ann Neurol.**, v. 44, p. 908-912, 1998.

HIRSCH, E. H.; BARAM, T. Z.; SNEAD III, O. C. Ontogenetic study of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. **Brain Res.**, v. 583, p. 120-126, 1992.

HOLMES, G. L. Epilepsy in the developing brain: lessons from laboratory and clinic. **Epilepsia**, v. 38, p. 12-30, 1997.

HONCHAR, M. P.; OLNEY, J. W.; SHERMAN, W. R. Systemic cholinergic agents induce seizures and brain damage in lithium-treated rats. **Science**, v. 220, p. 323-325, 1983.

HRUSKA, R. E.; LUDMER, L. M.; PERT, A.; PETER, J. R.; BUNNEY, W. E. Effects of lithium on [³H]quinuclidinyl benzilate binding to rat brain muscarinic cholinergic receptors. **J. Neurosci. Res.**, v. 11, p. 171, 1984.

HULME, E. C.; BIRDSALI, N. J. M.; BUCKLEY, N. J. Muscarinic receptor subtypes. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 30, p. 633-673, 1990.

HUNTLEY, G. W.; HENDRY, S. H. C.; KILLACKEY, H. P.; CHALUPA, L. M.; JONES, E. G. Temporal sequence of neurotransmitter expression by developing neurons of fetal monkey visual cortex. **Dev. Brain Res.**, v. 43, p. 69-96, 1988.

HUONG, N. T.; MATSUMOTO, K.; KASAI, R.; YAMASAKI, K.; WATANABE, H. In vitro antioxidant activity of vietnamese ginseng saponin and its components. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 21, p. 978-981, 1998.

HUSSAIN, S.; SLIKKER JR. W.; ALI, S. F. Age-related changes in antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione in different regions of mouse brain. **Int. J. Devl. Neuroscience**, v. 13, p. 811-817, 1995.

HYMAN, S. E.; NESTLER, E. J. Initiation and adaptation: a paradigm for understanding psychotropic drug action. **Am. J. Psychiatry**, v. 153, p. 2, 1996.

INSEL, T. R.; BATTABLIA, G.; FAIRBANKS, D. W.; De SOUZA, E. B. The ontogeny of brain receptors for corticotropin-releasing factor and the development of their functional association with adenylate cyclase. **J. Neurosci.**, v. 8, p. 4151-4158, 1988.

INSEL, T. R. The development of Brain and Behavior. In : Bloom, F. E. & Kupfer, D. J. (Eds.). **Psychopharmacology**, cap 60, p. 683-694, New York : Raven Press, Ltda, 1995.

JANIS, R. A.; TRIGGLE, D. J. Drug acting on calcium channels. In: Hurwitz, L. H., Partidge, L. D., Leach, J. K. (Eds.), **Calcium Channels: their Properties, Functions, Regulation and Clinical Relevance**. CRC Press, Boca Raton, p. 195-249, 1991.

JANZ, D. etiology of convulsive status epilepticus. **Adv. Neurol.**, v. 34, p. 47-54, 1983.

JAYA, P. Nimodipine - Monograf Ubat 154, 2000.

JOBE, P. C. common pathogenic mechanisms between depression and epilepsy: an experimental perspective. **Epilepsy & Behavior.**, v. 4, p. S14-S24, 2003.

JONES, E. G. The development of the primate neocortex - an oveview. **Fetal Neural Development and Adult Schizophrenia**, New York : Cambridge University Press; p. 40-65, 1991.

JOPE, R. S. High affinity choline trasport and acetylCoA production in brain and their roles in the regulation of acetylcholine synthesis. **Brain Research Rev.**, v. 1, p. 313-344, 1979.

JOPE, R. S.; MORRISETT, R. A.; SNEAD, O. C. Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats. **Experimental. Neurology**, v. 91, p. 471-480, 1986.

JOPE, R. S.; SIMONATO, M.; LALLY, K. Acetylcholine content in rat brain is elevated by status epilepticus induced by lithium and pilocarpine. **J. Neurochem.** v. 49, p. 944-951, 1987.

JULIUS, D. Molecular biology of serotonin receptors. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 14, p. 335, 1991.

KAKARIEKA, A.; SCHAKEL, E. H.; FRITZE, J. Clinical experiences with nimodipine in cerebral ischemia. **J. Neural. Transm. Suppl.**, v. 43, p. 13-21, 1994.

KAMINSKI, R. M.; MAZUREK, M.; TURSKI, W. A.; KLEINROK, Z.; CZUCZWAR, S. J. Amlodipine enhances the activity of antiepileptic drugs against pentylenetetrazole-induced seizures. **Biochem. Behav.**, v. 68, p. 661-668, 2001.

KAWAGUCHI, K.; HENSHALL, D. C.; SIMON, R. P. Parallel dose-response studies of the voltage-dependent Na^+ channel antagonist BW619C89, and the voltage-dependent Ca^{2+} channel antagonist nimodipine, in rat transient focal cerebral ischemia. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 364, p. 99-105, 1999.

KAZDA, S.; TOWARD, R. Nimodipine: a new calcium antagonist drug with a preferential cerebrovascular action. **Acta Neurochir.**, v. 63, p. 259-65, 1982.

KEBABIAN, J. W.; CALNE, D. B. Multiple receptors for dopamine. **Nature**, v. 277, p. 93-96, 1979.

KEOGH, A. M.; SCHROEDER, J. S. Calcium antagonists and atherosclerosis. **Reperfusion**, v. 2, p. 5-8, 1990.

KESSLER, R. M.; ANSARI, M. S.; SCHMIDT, D. E.; DE PAULIS, T.; CLANTON, J. A.; INNIS, R.; AL TIKRITI, M.; MANNING, R. G.; GILLESPIE, D. High affinity dopamine D₂ receptors. **Life Science**, v. 49, p. 617-28, 1991.

KIM, H.; CHOI, D.; JHOO, W.; LEE, D.; KOO, C.; KIM, C. Aspalactone, a new antiplatelet agent, attenuates the neurotoxicity induced by kainic acid in the rat. **Life Sci.**, v. 61, p. 373-381, 1997.

KIMURA, H.; KANEKO, Y.; WADA, J. A. Catecholaminergic and cholinergic systems and amygdaloid kindling. *Kindling2* (ed. Wada J.A.), p. 265-287. Raven Press. New York., 1981.

KONOPACKI, J.; MACIVER, M. B.; BLAND, B. H.; ROTH, S. H. Carbachol-induced EEG 'theta' activity in hippocampal brain slices. **Brain Res.**, v. 405, p. 196-198. 1987.

KONTUR, P. J.; LERANTH, C.; REDMOND, D. E. Jr.; ROTH, R. H.; ROBBINS, R. J. Tyrosine hydroxylase immunoreactivity and monoamine and metabolite levels in cryopreserved human fetal ventral mesencephalon. **Exp. Neurol.**, v. 121, p. 172-180, 1993.

KRIZ, J.; ZUPAN, G.; SIMONIE, A. Differential effects of dihydropyridines calcium channel blockers in kainic acid-induced experimental seizures in rats. **Epilepsy Res.**, v. 52, p. 215-225, 2003.

KUBOVA, H.; MOSHE, S. L. Experimental models of epilepsy in Young animals. **J. Child. Neurol.**, v. 9, p. 3-11, 1994.

KULKARNI, S. K.; GEORGE, B. Protective effects of GABAergic drugs and other anticonvulsivants in lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. **Meth Fin Exp.Clin Pharmacol.**, v. 18, p. 335-340, 1996.

KVALE, I.; FOSSE, V. M.; FONNUM, F. Development of neurotransmitter parameters in lateral geniculate body, superior collicus and visual cortex of the albino rat. **Dev. Brain Res.**, v. 7, p. 137-145, 1983.

ANGLEY, M. S.; SORKIN, E. M. Nimodipine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in cerebrovascular disease. **Drugs**, v. 37, p. 669-99, 1989.

LAMBE, E. K.; KRIMER, L. S.; GOLDMAN-RAKIC, P. S. Differential postnatal development of catecholamine and serotonin inputs to identified neurons in prefrontal cortex of rhesus monkey. **J. Neurosci.** v. 20, p. 8790-8787, 2000.

LASLO, A. M.; EASTWOOD, J. D.; URQUHART, B.; LEE, T. Y.; FREEMAN, D. Subcutaneous administration of nimodipine improves bioavailability in rabbits. **J. Neurosci. Methods**, v. 139, p. 195-201, 2004.

LAUDER, J. M. Ontogeny of the serotonergic system in the rat: Serotonin as a developmental signal. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 600, p. 297-313, 1990.

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

LEFKOWITZ, R. J.; HOFFMAN, B. B.; TAYLOR, P. Neurohumoral transmission: the autonomic and somatic motor nervous system. In: Gilman, A.G., Rudden, R.W., Molinoff, P.B., Limbird, L.E., Hardman, J.G., eds. **The pharmacological basis of therapeutics**. New York: MacGraw-Hill, Cap 6, p. 105-140, 1996.

LEITE, J. P.; BORTOLOTTO, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 14, p. 511-517, 1990.

LEONARD, C. S.; LLINÁS, R. Serotonergic and cholinergic inhibition of mesopontine cholinergic neurons controlling REM sleep: an in vitro electrophysiological study. **Neuroscience**, v. 59, p. 309, 1994.

LEVALLOIS, C.; VALENCE, C.; BALDET, P.; PRIVAT, A. Mosphological and morphometric analysis of serotonin-containing neurons in primary dissociated cultures of human rhombencephalon: a study of development. **Brain Res. Dev. Brain. Res.**, v. 99, p. 243-252, 1997.

LIANG, L. P.; HO, Y. S.; PATEL, M. Mitochondrial superoxide production in kainite-induced hippocampal damage. **Neuroscience**, v. 101, p. 563-570, 2000.

LIAO, C. F.; THEMHEN, A. P. N.; JOHO, R.; BARBERIS, C.; BIRNBAUMER, M.; BIRNBAUMER, L. Molecular cloning and expression of a fifth muscarinic acetylcholine receptor. **J. Biol. Chem.**, v. 264, p. 7328-7337, 1989.

LIDOV, H. G.; MOLLIVER, M. E. Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. **Brain Res. Bull.** v. 9, p. 559-604, 1982.

LING, E. A.; TANG, F. R.; LEE, W. L.; YANG, J.; SIM, M. K. Expression of metabotropic glutamate receptor 1 α in the hippocampus of rat pilocarpine model of status epilepticus. **Epilepsy Research**, v. 46, p. 179-189, 2001.

LIPTON, S.; ROSENBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **N. Engl. J. Med.**, v. 330, p. 613-622, 1994.

LITTLE, H. J.; DOLIN, S. J.; HALSEY, M. J. Calcium channel antagonists decrease the ethanol withdrawal syndrome. **Life Sci.**, v. 39, p. 2059-2065, 1986.

LIU, X. Q.; REN, Y. L.; QIAN, Z. Y.; WANG, G. J. Enzyme kinetics and inhibition of nimodipine metabolism in human liver microsomes. **Acta. Pharmacol. Sin.**, v. 21, p. 690-694, 2000.

LIU, K. J.; LIU, S.; MORROW, D.; PETERSON, S. L. Hydroethidine detection of superoxide production during the lithium-pilocarpine model of status epilepticus. **Epilepsy Research**, v. 49, p. 226-238, 2002.

LOUP, F.; FRITSCHY, J. M.; KIENER, T.; BOUILLERET, V. GABAergic neurons and GABA_A-receptors in temporal lobe epilepsy. **Neurochemistry International**, v. 34, p. 435-445, 1999.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDAL, R. J. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, S. R.; LIAO, Y. C.; FUH, J. L.; LIRNG, J. F.; WANG, S. J. Nimodipine for treatment of primary thunderclap headache. **Neurology**, v. 62, p. 1414-1416, 2004.

LUNDY, P. M.; SHAW, R. R. Modification of cholinergically-induced convulsive activity and cyclic GMP levels in the CNS. **Neuropharmacology**, v. 22, p. 55-63, 1983.

McDONALD, J. W.; GAROFALO, E. A.; HOOD, T.; SACKELLARES, J. C.; GILMAN, S.; MCKELVER, P. E.; TRONCOSO, J. C.; JOHNSTON, M. V. Altered excitatory and inhibitory amino acid receptor binding in hippocampus of patients with temporal lobe epilepsy. **Ann. Neurol.**, 29: 529-541, 1991.

MAEHLY, A.C.; CHANCE, B. The assay catalases and peroxidases. **Methods Biochem. Anal.**, v. 1, p. 357-359, 1954.

MAK, I. T.; BOEHME, P.; WEGLICKI, W. B. Antioxidant protective effects of calcium channel blockers against free radical injury in endothelial cells: correlation with preservation of glutathione levels. **Circ Res**, v. 70, p. 1099-103, 1992.

MAK, I. T.; BOHEME, P.; WEGLICKI, W. B. Protective effects of calcium channel blockers against free radical-impaired endothelial cell proliferation. **Biochem Pharmacol**, v. 50, p. 1531-4, 1995.

MAK, I. T.; ZHANG, J.; WEGLICKI, W. B. Protective effects of dihydropyridine calcium channel blockers against endothelial cell oxidative injury due to combined nitric oxide and superoxide. **Pharmacological Research**, v. 45, p. 27-33, 2002.

MANCIA, G.; VAN ZWIETEN, P. A. Third generation calcium antagonists: further developments. **Blood Press**, v. 5, p. 376-7, 1996.

MARINHO, M. M. F.; SOUSA, F. C. F.; BRUIN, V. M. S.; AGUIAR, L. M. V.; PINHO, R. S. N.; VIANA, G. S. B. Inhibitory action of a calcium channel blocker (nimodipine) on seizures and brain damage induced by pilocarpine and lithium-pilocarpine in rats. **Neuroscience Letters**, v. 235, p. 13-16, 1997.

MARINHO, M. M. F.; SOUSA, F. C. F.; BRUIN, V. M. S.; VALE, M. R.; VIANA, G. S. B. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. **Neurochemistry International**, v. 33, p. 299-306, 1998.

MARTTILA, R. J.; ROYTTA, M.; LORENTZ, H.; RINNE, U. K. Oxygen toxicity protecting enzymes in the human brain. **J. Neural. Transmission**, v. 74, p. 87-95, 1988.

MARTTILA, R. J.; RINNE, U. K. Oxygen toxicity protecting enzymes in aging and Parkinson's disease. In **Parkinsonism and Aging** (eds Calne, D. E., Comi, G., Cripp, D., Horowski, R. and Trabucchi, M.). Raven Press, New York, p. 89-95, 1989.

MASSIEU, L.; RIVERA, A.; TAPIA, R. Convulsions and inhibition of glutamate decarboxylase by pyridoxal phosphate- γ -glutamyl hydrazone in the developing rat. **Neurochemical Research**, v. 19, p. 183-187, 1994.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 52, p. 711-760, 1983.

MEISTER, A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and reversal; applications in research and therapy. **Pharmacol. Ther.**, v. 51, p. 155-94, 1991.

MELDRUM, B.; GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 11, p. 379-387, 1990.

MELLO FILHO, A. C.; HOFFMAN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hidrogen peroxide aremediated by intracellular iron. **Biochem. J.**, v. 218, p. 273-275, 1983.

MELTZER, H.Y.; MATSUBARA, S.; LEE, J. C. Classification Of typical and atypical antipsychothic drugs on the basis of dopamine D1 and D2- and serotonin pKi values. **J Pharmacol Exp Therap.**, v. 251, p. 238-246, 1989.

MELTZER, H. Y.; NASH, J. F. Effects of antipsychotic drugs on serotonin receptors. **Pharmac. Rev.**, v. 43, p. 587-604, 1991.

MERINEY, S. D.; GRAY, D. B.; PILAR, G. Morphine-induced delay of normal cell death in the avian ciliary ganglion. **Science**, v. 228, p. 1451-1453, 1985.

MEYER, F. B.; ANDERSON, R. E.; SUNDT, T. M.; YAKSH Jr., T. L.; SHARBROUGH, F. W. Supression of petilenetetrazole seizures by oral administration of a dihydropyridine calcium antagonist. **Epilepsia**, v. 28, p. 409-414, 1987.

MICHELSON, H. B.; LOTHMAN, E. W. An ontogenic study of kindling using rapidly recurring hippocampal seizures. **Dev. Brain Res.**, v. 61, p. 79-85, 1991.

MICHOTTE, Y.; KHAN, G. M.; SMOLDERS, I.; EBINGER, G. Anticonvulsant effect and neurotransmitter modulation of focal and systemic 2-chloroadenosine against the development of pilocarpine-induced seizures. **Neuropharmacology**, v. 39, p. 2418-2432, 2000.

MIKATI, M. A.; HOLMES, G. L.; WERNER, S.; BAKKAR, N.; CARMANT, L.; LIU, Z.; STAFSTROM, C. E. Effects of nimodipine on the behavioural sequalae of experimental status epilepticus in prepubescent rats. **Epilepsy & Behaviour**, v. 5, p. 168-174, 2004.

MORILAK, D. A.; PORTEUS, M. H.; GIARANELLO, R. D. Molecular and cellular mechanisms of brain development. In: Bloom, F. E. & Kupfer, D. J. (Eds.). **Psychopharmacology**, v. 59, p. 671-681, New York: Raven Press, Ltda, 1995.

MONYER, H.; SEEBURG, P. H.; WISDEN, W. Glutamate-operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing. **Neuron**, v. 6, p. 799-810, 1991.

MORRISETT, R. A.; JOPE, R. S.; SNEAD, O. C. Effects of dugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administration of pilocarpine to lithium-pretread rats. **Exp. Neurol.** v. 97, p. 193-200, 1987 a.

MORRISETT, R. A.; JOPE, R. S.; SNEAD III, O. C. Status epilepticus is produced by administration of cholinergic agonists to lithium-treated rats : comparison with Kainic acid. **Exp. Neurol.**, v. 98, p. 594-605, 1987 b.

MOSHE, S. L. Epileptogenesis and the immature brain. **Epilepsia**, v. 28, p. S3-S15, 1987.

MUSICCO, M.; BEGHI, E.; SOLARI, A.; VIANI, F. Treatment of first tonic-clonic seizure does not improve the prognosis of epilepsy. First Seizure Trial Group (FIRST Group). **Neurology**, v. 49, p. 991-998, 1997.

NADLER, J. V.; OKAZAKI, M. M. Glutamate receptor involvement in dentate granule cell epileptiform activity evoked by mossy fiber stimulation. **Brain Research**, v. 915, p. 58-69, 2001.

NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G.; CAVALHEIRO, E. A.; FERREIRA, E. C.; ABDALLA, D. S. P.; AMADO, D.; BELLISSIMO, M. I. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Res.**, v. 46, p. 121-128, 2001.

NAKAKI, T.; MISHIMA, A.; SUZUKI, E.; SHINTANI, F.; FUJII, T. Glufosinate ammonium stimulates nitric oxide production through *N*-methyl D-aspartate receptors in rat cerebellum. **Neurosci. Lett.**, v. 290, p. 209-212, 2000.

NATHANSON, N. M.; MCKINNON, L. A.; KALAYDJIAN, A. E.; HAMILTON, S. E.; ROSOFF, M. L.; NADLER, L. S. Molecular analysis of the regulation of muscarinic receptor expression and function. **Life Sciences**, v. 64, p. 375-379, 1999.

NAYLER, W. G. Classification and tissue selectivity of calcium antagonists. **Z. Kardiol.**, v. 5, p. 206-208, 1990.

NICOLETTI, F.; IADOROLA, M. J.; WROBLEWSKI J. T.; COSTA, E. Excitatory amino acid recognition sites couples with inositol phospholipid metabolism : developmental changes and interaction with alpha-1 adrenoreceptors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 1931-1935, 1986.

NITECKA, L.; TREMBLAY, E.; CHARTON, G.; BOUILLOT, J. P.; BERGER, M. L.; BEN-ARI, Y. Maturation of kainic acid seizure-brain damage syndrome in the rat: II. Histopathological sequelae. **Neuroscience**, v. 13, p. 1073-1094, 1984.

NUCERA, E.; SCHAVINO, D.; RONCALLO, C.; DE PASQUALE, T.; BUONOMO, A.; POLLASTRINI, E.; PATRIARCA, G. Delayed-type allergy to oral nimodipine. **Contact Dermatitis**, v. 47, p. 246-247, 2002.

OGREN, S. O.; PAKH, B. Effects of dopamine D₁ e D₂ receptor agonists and antagonists on seizures induced by chemoconvulsants in mice. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 72, p. 213-220, 1993.

OLIVER, C. N.; STARKE-REED, P. E.; STADTMAN, E. R.; LIKU, G. J.; CARNEY, J. M.; FLOYD, R. A. Oxidative damage to proteins, loss of glutamine synthetase activity and production of free radicals during ischemia/reperfusion-induced injury to gerbil brain. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 5144-5147, 1990.

OLNEY, J. W.; FULLER, T. A.; DE-GRUBAREFF, T. Kainate-like neurotoxicity of folates. **Nature**, v. 292, p. 165-167, 1981.

OLNEY, J. W.; DE-CUBAREFF, T.; LABRUYERE, J. Seizure-related brain damage induced by cholinergic agents. **Nature**, v. 301, p. 520-522, 1983.

OLNEY, J. W.; COLLINS, R. C.; SLOVITER, R. S. Excitotoxic mechanisms of epileptic brain damage. **Adv. Neurol.**, v. 44, p. 857-877, 1986.

OPIE, L. H. Calcium channel antagonists in the treatment of coronary artery disease: fundamental pharmacological properties relevant to clinical use. **Prog Cardiovasc Dis.**, v. 38, p. 273-290, 1996.

ORTIZ, J. G.; MOSHÉ, S. L.; SPERBER, E. F.; VELISEK, L.; FERCHMIN, P.; CLAUDIO, O. I. Plasticity of excitatory amino acid transporters in experimental epilepsy. **Epilepsia**, v. 41, p. 104-110, 2000.

PALMER, G. C.; STAGNITTO, M. L.; RAY, R. K.; KNOWELS, M. A.; HARVEY, R.; GARSKE, G. E. Anticonvulsant properties of calcium channel blockers in mice: \square - Methyl- D- L-Aspartate-and Bay K8644-induced convulsions are potently blocked by the dihydropyridines. **Epilepsia**, v. 34, p. 372-380, 1993.

PANI, L.; KUZMIN, A.; GESELL, G. L.; ROSSETTI, Z. L. Nimodipine inhibits cocaine-induced dopamine release and motor stimulation. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 176, p. 245-246, 1990a.

PANI, L.; KUZMIN, A.; DIANA, M.; DE MONTIS, G.; GESELL, G. L.; ROSSETTI, Z. L. Calcium receptor antagonists modify cocaine effects in the central nervous system differently. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 190, p. 217-221, 1990b.

PANTONI, L.; ROSSI, R.; INZITARI, D.; BIANCHI, C.; BENEKE, M.; ERKINJUNTTI, T.; WALLIN, A. Efficacy and safety of nimodipine in subcortical vascular dementia: a subgroup analysis of the Scandinavian Multi-Infarct Dementia Trial. **J. Neurol. Sci.**, v. 175, p. 124-134, 2000.

PATEL, S.; MILLAN, M. H.; MELLO, L. M.; MELDRUM, B. S. 2-amino-7-phosphonoheptanoic acid (2-APH) infusion into entopeduncular nucleus protect against limbic seizures in rats. **Neuroscience Letters**, v. 64, p. 226-230, 1986.

PATEL, S.; MELDRUM, B. S.; FINE, A. Susceptibility to pilocarpine-induced seizures in rats increases with age. **Behav. Brain. Res.**, v. 31, p. 165-167, 1988.

PATEL, M.; LI, Q. Y. Age dependence of seizure-induced oxidative stress. **Neuroscience**, v. 118, p. 431-37, 2003.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **Academic Press**, New York, 1986.

PERALTA, E. G.; ASHKENASI, A.; WINSLOW, J. W.; SMITH, D. H.; RAMACHANDRAN, J.; CAPON, D. J. Distinct primary structures, ligand-binding properties and tissue-specific expression of four human muscarinic acetylcholine receptors. **EMBO J.**, v. 6, p. 3923-3929, 1987.

PERALTA, E. G.; ASHKENASI, A.; WINSLOW, J. W.; RAMACHANDRAN, J.; CAPON, D. J. Differential regulation of PI hydrolysis and adenylyl cyclase by muscarinic receptor subtypes. **Nature**, v. 334, p. 434-437, 1988.

PEREDERY, O.; BLOMME, M. A.; PARKER, G. Absence of maternal behaviour in rats with lithium/pilocarpine seizure induced brain damage: support of Macleans triune brain theory. **Physiol. Behav.**, v. 52, p. 665-671, 1992.

PEROUTKA, S. J. 5-Hydroxytryptamine receptor subtypes. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 7, p. 45, 1988.

PERSINGER, M. A.; LEUNG, L. S.; STEWART, L. S. Diurnal variation in pilocarpine-induced generalized tonic-clonic seizure activity. **Epilepsy Research**, v. 44, p. 207-212, 2001.

PHILBERT, M. A.; BEISWANGER, C. M.; WATERS, D. K.; REUHL, K. R.; LOWNDES, H. E. Cellular and regional distribution of reduced glutathione in the nervous system of the rat: histochemical localization by mercury orange and *o*-phthaldialdehyde-induced histofluorescence. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 107, p. 215-227, 1991.

PILEBLAD, E.; CARLSSON, A. *In vivo* effects of the Ca^{2+} antagonist nimodipine on dopamine metabolism in mouse brain. **J. Neural. Transm.**, v. 66, p. 171-187, 1986.

PILEBLAD, E.; CARLSSON, A. The Ca^{2+} antagonist nimodipine decreased and Ca^{2+} agonist bay K-8644 increases catecholamine synthesis in mouse brain. **Neuropharmacology**, v. 26, p. 101-105, 1987.

PIREDDA, S.; GALE, K. A crucial epileptogenic sites in the deep prepiriform cortex. **Nature**, v. 317, p. 623-625. 1985.

POPOLI, P.; PEZZOLA, A.; SCOTTI DE CAROLIS, A. Effects of calcium antagonist nimodipine on pentylenetetrazole-induced seizures in rats and rabbits. **Arch. Int. Pharmacodyn.**, v. 292, p. 58-67, 1988.

PRANZATELLI, M. R. Regional differences in the ontogeny of 5-hydroxytryptamine - 1C binding sites in rat brain and spinal cord. **Neuroscience Letters**, v. 149, p. 9-11, 1993.

PRIEL, M. R.; DOS SANTOS, N. F.; CAVALHEIRO, E. A. Developmental aspects of the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res.**, v. 26, p. 115-121, 1996.

PUCILOWSKI, O. Psychopharmacological properties of calcium channel inhibitors. **Psychopharmacology**, v. 109, p. 12-29, 1992.

PUMAIN, R.; KURCEWICZ, I.; LOUVEL, J. Fast extracellular calcium transients: involvement in epileptic processes. **Science**, v. 222, p. 177-179, 1984.

RADENOVIC, L.; VASILJEVIS, I.; SELAKOVIC, V.; JOVANOVIC, M. 7-Nitroindazole reduces nitrite concentration in rat brain after intrahippocampal kainate-induced seizure. **Comparative Biochem. and Physiol.**, v. 135, p. 443-450, 2003.

RAJDER, S.; REYNOLDS, I. J. Calcium influx but not pH or ATP level mediates glutamate-induced changes in intracellular magnesium in cortical neurons. **Journal of Neurophysiol.**, v. 74, 1995.

RAMSCH, K. D.; AHR, G.; TETTENBORN, D.; AUER, L. M. Overview on pharmacokinetics of nimodipine in healthy volunteers and in patients with subarachnoid hemorrhage. **Neurochirurgia** (Stuttg), v. 28, p. 74-8, 1985.

RAMSCH, K. D.; GRAEFE, K. H.; SCHERLING, D.; SOMMER, J.; ZIEGLER, R. Pharmacokinetics and metabolism of calcium-blocking agents nifedipine, nitrendipine, and nimodipine. **Am. J. Nephrol.**, v. 6, p. 73-80, 1986.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Farmacologia. 5 ed., Elsevier, Rio de Janeiro, p. 234-237, 2004.

RAO, P. A.; MOLINOFF, P. B.; JOYCE, J. N. Ontogeny of dopamine D1 and D2 receptor subtypes in rat basal ganglia: a quantitative autoradiographic study. **Dev. Brain Res.**, v. 60, p. 161-177, 1991.

RAPS, S. P.; LAI, J. C. K.; HERTZ, L.; COOPER, A. J. L. Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons. **Brain Res.**, v. 493, p. 398-401, 1989.

REHNCRONA, S.; FOLBERGROVA, J.; SMITH, D. S.; SIESJO, B. K. Influence of complete and pronounced incomplete cerebral ischemia and subsequent recirculation on cortical concentrations of oxidized and reduced glutathione in the rat. **J. Neurochem.** v. 34, p. 477-486, 1980.

REIRIZ, J.; AMBROSIO, S.; COBOS, A.; BALLARIN, M.; TOLOSA, E.; MAHY, N. Dopaminergic function in rat brain after oral administration of calcium channel blockers or haloperidol, a microdialysis study. **J. Neural. Transm.**, v. 95, p. 195-207, 1994.

REITER, R.; TANG, L.; GARCIA, J. J.; MUÑOZ-HOYOS, A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. **Life Sci.**, v. 60, p. 2255-2271, 1997.

REPRESA, A.; TREMBLAY, E.; SCHOEVART, D.; BEN-ARI, Y. Development of high affinity kainate *binding* sites in human and rat hippocampi. **Brain. Res.** v. 384, p. 170-174, 1986.

REUTER, H. Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. **Nature**, v. 301, p. 569-574, 1983.

RONG, Y.; DOCTROW S. R.; TOCCO, G.; BAUDRY, M. EUK-134, a synthetic superoxide dismutase and catalase mimetic, prevents oxidative stress and attenuates kainate-induced neurophatology. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p. 9897-9902, 1999.

ROONEY, T. A.; NAHORKI, S. R. Postnatal ontogeny of agonist and depolarization-induced phosphoinositide hydrolysis in rat cerebral cortex. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 243, p. 333-341, 1987.

ROSSETTI, Z. L.; ISOLA, D.; DE VRY, J.; FADDA, F. Effects of nimodipine on extracellular dopamine levels in the rats nucleus accumbens in ethanol withdrawal. **Neuropharmacology**, v. 38, p. 1361-1365, 1999.

SAGAR, H. J.; OXBURY, J. M. Hippocampal neuron loss in temporal lobe epilepsy: correlation with early childhood convulsions. **Ann. Neurol.**, v. 22, p. 334-340, 1987.

SALES, N.; MARTRES, M. P.; BOUTHENETT, M. L.; SCHWARTZ, J. C. Ontogeny of dopaminergic D2 receptors in the rat nervous system: characterization and detailed autoradiographic mapping with [¹²⁵I] iodosulpride. **Neuroscience**, v. 28, p. 673-700, 1989.

SAVOLAINEN, K. M.; TERRY, J. B.; NELSON, S. R.; SAMSOM, F. E.; PASDERNIK, T. L. Convulsion and cerebral inositol-1- phosphate levels in rats treated with diisopropyl fluorophosphate. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 63, p. 137-138, 1988 a.

SAVOLAINEN, K. M.; NELSON, S. R.; SAMSON, F. E. Soman-induced convulsions affect the inositol lipip signaling sistem: Potentiation by lithium; attenuation by atropine and diazepam. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 96, p. 305-314. 1988 b.

SAVOLAINEN, K. M.; HIRVONEN, M. R. Second messengers in cholinergic-induced convulsions and neuronal injury. **Toxicology Letters**, v. 64 / 65, p. 437-445, 1992.

SCHAMBRA, U. B.; DUNCAN, G. E.; BREESE, G. R.; FORMARETTO, M. G.; CARON, M. G.; FREMEAUX, R. T. J. Ontogeny of D_{1A} and D₂ dopamine receptor subtypes in rat brain using in situ hybridization and receptor binding. **Neuroscience**, v. 62, p. 65-85, 1994.

SCOTT, M. D.; LUBIN, B. H.; ZUO, L.; KUYPERS, F. A. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 118, p. 7-16, 1991.

SCRIABINE, A.; SCHUURMAN, T.; TRABER, J. Pharmacological basis for the use of nimodipine in central nervous system disorders. **FASEB J.**, v. 3, p. 1799-1806, 1989.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with ellman reagents. **ANAL. Biochem.**, v. 25, p. 192-205, 1988.

SHEN, W. Z.; LUO, Z. B.; ZHENG, D. R.; YEW, D. T. Immunohistochemical studies on the development of 5-HT (serotonin) neurons in the nuclei of the reticular formations of human fetuses. **Pediatr. Neurosci.**, v. 15, p. 291-295, 1989.

SHIVAKUMAR, B. R.; ANANDATHEERTHAVARADA, H. K.; RAVINDRANATH, V. Free radical scavenging systems in developing rat brain. **Int. J. Devl. Neuroscience.** v. 9, p. 181-185, 1991.

SHULZ, J. N.; HENSAHW, D. R.; SIWEK, D.; JENKINS, B. G.; FERRANTE, R. J.; CIPOLLONI, P. B.; KOWALL, N. W.; ROSEN, B. R.; BEAL, M. F. Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. **J. Neurochem.**, v. 64, p. 2239-2247, 1995.

SIBLEY, D. R.; MONSMA, F. J. Molecular biology of dopamine receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 13, p. 61-68, 1992.

SIESJO, B. K. Cell damage in the brain: a speculative synthesis. **J. Cereb. Blood Flow Metab.** v. 1, p. 155-185, 1981.

SIMIC, M. G.; HUNTER, E.; JOVANOVIC, S. V. Electron versus H-atom transfer in chemical repair. In: **Anticarcinogenesis and radiation protection**. Cerutti P, Nygaard OF, Simic MG, eds. New York: Plenum, p. 17-24, 1987.

SIMONIC, A.; GINJA, J.; VARLJEN, J.; ZUPAN, G.; ERAKOVIC, V. Lithium plus pilocarpine induced status epilepticus – biochemical changes. **Neuroscience Research**, v. 36, p. 157-166, 2000.

SLIVKA, A.; MYTILINEOU, C.; COHEN, G. Histochemical evaluation of glutathione in brain, **Brain Res.** v. 409, p. 1391-1393, 1987a.

SLIVKA, A.; SPINA, M. B.; COHEN, G. Reduced and oxidized glutathione in human and monkey brain. **Neurosci. Lett.** v. 74, p. 112-118, 1987b.

SMOLDERS, I.; VAN BELLE, K.; EBINGER, G.; MICHOTTE, Y. Hippocampal and cerebellar extracellular amino acids during pilocarpine-induced seizures in freely moving rats. **Europ. J. of Pharmacol.**, v. 319, p. 21-29, 1997.

SO, E.L. Classification and epidemiologic considerations of epileptic seizures and epilepsy. **Neuroimaging Clin N Am**, v. 5, p. 513-526, 1995.

SOKOLOFF, P.; GIROS, B.; MARTRES, M. P.; BOUTHENET, M. L.; SCWARTZ, J. C. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. **Nature**, v. 347, p. 146-151, 1990.

SPERBER, E. F.; VELISKOVA, J.; GERMANO, I. M.; FRIEDMAN, L. K.; MOSHE, S. L. Age-dependent vulnerability to seizures. In: Jasper's basic mechanisms of the epilepsies: advances in neurology, Vol. 79, 3rd edition (Delgado-Escueta AV, Wilson WA, Olsen RW, Porter RJ, eds), p. 161-169. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.

SPERK, G. Kainic acid seizures in the rat. **Prog. Neurobiol.**, v. 42, p. 1-32, 1994.

STANWOOD, G. D.; McELLIGOT, S.; LU, L.; McGONIGLE, P. Ontogeny of dopamine D3 receptors in the nucleus accumbens of the rat. **Neurosc. Letters**, v. 223, p. 13-16, 1997.

SUNDSTROM, E.; KOLARE, S.; SOUVERBIE, F.; SAMUELSSON, E. B.; PSCHERA, H.; LUNELL, N. O.; SEIGER, A. Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. **Brain Res. Dev. Brain Res.**, v. 75, p. 1-12, 1993.

SWANN, J. W.; BRADY, R. I.; SMITH, K. L.; PIERSON, M. G. Synaptic mechanisms of focal epileptogenesis in the immature nervous system. In: Swann, J. W., Messer, A., eds. Disorders of the developing nervous system: Emerging views on their origins, diagnoses and treatment New York, p. 19-49, 1988.

SWANN, J. W.; SMITH, K. L.; BRADY, R. J. Age-dependent alterations in the operations of hippocampal neural networks. **Ann. NY Acad. Sei.**, v. 627, p. 264-76, 1991.

SWANN, J. W.; SMITH, K. L.; GOMEZ, C. M.; BRADY, R. J. The ontogeny of hippocampal local circuits and focal epileptogenesis, in: J. Engel Jr., C. Wasterlain, E.A. Cavalheiro, U. Heinemann, G. Avanzini. Eds., Molecular Neurobiology of Epilepsy **Epilepsy Res. Suppl.**, v. 9, p. 115-126, 1992.

SWANN, J. W.; SMITH, K. L.; BRADY, R. J.; PIERSON, M. G. Neurophysiological studies of alterations in seizure susceptibility during brain development, in: P. Schwartzkroin (Ed.), Epilepsy. Models, Mechanisms, and Concepts, **Cambridge Univ. Press**, p. 209-243, 1993.

TICE, M. A. B.; HASHEMI, T.; TAYLOR, L. A.; McQUADE, R. D. Distribution of muscarinic receptor subtypes in rat brain from postnatal to old age. **Develop. Brain Res.**, v. 92, p. 70-76, 1996.

TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; SCHWARTZ, M.; CZUCZWAR, S. J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav. Brain Res.**, v. 9, p. 315-335, 1983a.

TURSKI, W. A.; CZUCZWAR, S. J.; KLEINROK, Z.; TURSKI, L. Cholinomimetics produce seizures and brain damage in rats. **Experientia**, v. 39, p. 1408-1411, 1983b.

TURSKI, W. A.; CAVALHEIRO, E. A.; TURSKY, L.; KLEINROK, Z. Intrahippocampal bethanechol in rats: behavioural, electroencephalographic and neuropathological correlates. **Behav. Brain Res.**, v. 7, p. 361-370, 1983c.

TURSKI, W. A.; CZUCZWAR, S. J.; CAVALHEIRO, E. A.; TURSKI, L.; KLEINROK, Z. Acute and long-term effects of systemic pilocarpine in rats: Spontaneous recurrent seizures as a possible model of temporal lobe epilepsy. **Arch. Pharmacol.**, v. 16R, p. 324, 1983d.

TURSKI, L.; CAVALHEIRO, E. A.; TURSKI, W. A.; MELDRUM, B. S. Excitatory neurotransmission within substantia nigra pars reticulata regulates threshold for seizures produced by pilocarpine in rats: effects of intranigral 2-amino-7-phosphonoheptanoate and N-methyl-D-aspartate. **Neuroscience**, v. 18, p. 61-77, 1986.

TURSKI, L.; CAVALHEIRO, E. A.; TURSKI, W. A.; MELDRUM, B. S. Role of a striatonigral pathway in regulation of the threshold for limbic seizures in rats. In: **Advances in Epileptology**, v. 16, P. Wolf, M. Dam, D. Janz, and F.F. Dreifuss, eds., p. 115-118, Raven, New York, 1987a.

TURSKI, L.; MELDRUM, B. S.; CAVALHEIRO, E. A.; CALDERAZZO-FILHO, L.; BORTOLOTO, Z. A.; IKONOMIDOU-TURSKI, C.; TURSKI, W. A. Paradoxical anticonvulsant activity of the excitatory amino acid N-methyl-D-aspartate in the rat caudate-putamen. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, p. 1689-1693, 1987b.

TURSKI, L.; CAVALHEIRO, E. A.; BORTOLOTTO, Z. A.; IKONOMIDOU-TURSKI, C.; KLEINROK, Z.; TURSKY, W. A. Dopamine-sensitive anticonvulsant site in the rat striatum. **Journal Neuroscience**, v. 8, p. 4027-4037, 1988.

TURSKI, L.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, W. A.; BORTOLOTTO, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. **Synapse**, v. 3, p. 154-171, 1989.

UEDA, Y.; YOKAYAMA, H.; NIWA, R.; KONAKA, R.; OHYA-NISHIGUCHI, H.; KAMADA, H. Generation of lipid radicals in hippocampal extracellular space during kainic acid-induced seizures in rats. **Epilepsy Res.**, v. 26, p. 329-333, 1997.

VANHATALO, S.; RIIKONEN, R. Nitric oxide metabolites, nitrates and nitrites in the cerebrospinal fluid in children with west syndrome. **Epilepsy Res.**, v. 46, p. 3-13, 2001.

VAN LUIJTELAAR, G.; ATES, N.; COENEN, A. M. L. Role of L-type calcium channel modulation in nonconvulsive epilepsy in rats. **Epilepsia**, v. 36, p. 86-92, 1995.

VAN LUIJTELAAR, G.; WIADERMA, D.; ELANTS, C.; SCHEENEN, W. Opposite effects of T-and L-type Ca^{++} channel blockers in generalized epilepsy. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 406, p. 381-389, 2000.

VAN TOL, H. H. M.; BUNZOW, J. R.; GUAN, H. C.; SUNAHARA, R. K.; SEEMAN, P.; NIZNIK, H. B.; CIVELLI, O. Cloning of the gene for a human dopamine D4 receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine, **Nature**, v. 350, p. 610-614, 1991.

VETROVEC, G. W. Hemodynamic and electrophysiologic effects of first- and second-generation calcium antagonists. **Am. J. Cardiol.**, v. 73, p. 34-38, 1994.

VINGE, E.; ANDERSSON, K. E.; BRANDT, L.; LJUNGGREN, B.; NILSSON, L. G.; ROSENDAL-HELGESEN, S. Pharmacokinetics of nimodipine in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 30, p. 421-425, 1986;

VON BORELL, E. H. The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. **J. Anim. Sci.**, v. 79, p. 260-267, 2001.

YANPALLEWAR, S. U.; HOTA, D.; RAI, S.; KUMAR, M.; ACHARYA, S. B. Nimodipine attenuates biochemical, behavioural and histopathological alterations

induced by acute transient and long-term bilateral common carotid occlusion in rats. **Pharmacol. Res.**, v. 49, p. 143-150, 2004.

WEISS, J.; BONNER, T. L.; DORJE, F.; BRANN, M. R. Delineation of muscarinic receptor domains conferring selectivity of coupling to guanine nucleotide-binding proteins and 2nd messengers. **Mol. Pharmacol.**, v. 38, p. 517-523, 1990.

WILLIS, A. L.; NAGEL, B.; CHURCHHILL, V.; WHYTE, M. A.; SMITH, D. L.; MAHMUD, I.; PUPPIONE, D. L. Antiatherosclerotic effects of nicardipine and nifedipine in cholesterol-fed rabbits. **Atherosclerosis**, v. 68, p. 1366-9, 1985.

WOODWARD, J. J.; COOK, M. E.; LESLIE, S. W. Characterization of DHP sensitive calcium channels in rat brain synaptosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 85, p. 7389-7393, 1988.

WYSS, J. M.; VAN GROEN, T. The limbic system. In: COON, P. M. Neuroscience in Medicine. 1st ed. Philadelphia: J. B. Lippincourt Company, Cap. 18, p. 336; 1995.

WASTERLAIN, C. G.; MAZARATI, A. M.; SHIRASAKA, Y.; THOMPSON, K. W.; PENIX, L.; LIU, H.; KATSUMORI, H. Seizure-induced hippocampal damage and chronic epilepsy: a Hebbian theory of epileptogenesis. In: Jasper's basic mechanisms of the epilepsies: advances in neurology, Vol. 79, 3rd edition (Delgado-Escueta AV, Wilson WA, Olsen RW, Porter RJ, eds), p. 829-843. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

WEINSHENKER, D.; SZOT, P. The role of catecholamines in seizure susceptibility: new results using genetically engineered mice. **Pharmacol. & Therapeut.**, v. 94, p. 213-233, 2002.

WOODWARD, J. J.; COOK, M. E.; LESLIE, S. W. Characterization of DHP sensitive calcium channels in rat brain synaptosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 85, p. 7389-7393, 1988.

ZALESKA, M. M.; FLOYD, R. A. Regional lipid peroxidation in rat brain in vitro: possible role of endogenous iron. **Neurochem. Res.**, v. 10, p. 397, 1985.

ZANCHETTI, A. Lacidipine – the monograph. **Chester Adis International**, p. 1-60, 1997.

ZAPATAR, P.; JAVALOY, J.; ROMAN, J. F.; VIDAL, M. T.; HORGA, J. F. Anticonvulsant effects of nimodipine and two novel dihydropyridines (PCA 50922 and PCA 50941) against seizures elicited by pentilenetetrazole and eletroconvulsive shock in mice. **Brain Res.**, v. 796, p. 311-314, 1998.

ZUPAN, G.; ERAKOVIC, V.; SIMONIĆ, A.; KRIZ, J.; VARLJEN, J. The influence of nimodipine, nicardipine and amlodipine on the brain free fatty acid level in rats with penicilin-induced seizures. **Prog. Neuro-Phychopharmacol. & Biol. Psychiat.**, v. 23, p. 951-961, 1999.