



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

CARLOS RENATO ALVES NOGUEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTICONVULSIVANTES E NEUROPROTETORES
DA DOXICICLINA EM RATOS ADULTOS JOVENS**

FORTALEZA

2008

CARLOS RENATO ALVES NOGUEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTICONVULSIVANTES E NEUROPROTETORES
DA DOXICICLINA EM RATOS ADULTOS JOVENS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – UFC, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana

FORTALEZA

2008

N711a Nogueira, Carlos Renato Alves

Avaliação dos efeitos anticonvulsivantes e neuroprotetores da doxiciclina em ratos adultos jovens/ Carlos Renato Alves Nogueira. – Fortaleza, 2008.

96 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina. Programa de Pós-graduação em Farmacologia.

1. Epilepsia 2. Doxiciclina 3. Agentes Neuroprotetores I. Viana, Glauce Socorro de Barros (orient.). II. Título.

CDD 616.853

CARLOS RENATO ALVES NOGUEIRA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTICONVULSIVANTES E NEUROPROTETORES
DA DOXICICLINA EM RATOS ADULTOS JOVENS**

Dissertação apresentada à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – UFC, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Data da aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa
Universidade Federal do Ceará - UFC

Profa. Dra. Danielle Silveira de Macedo
Faculdade Integrada do Ceará - FIC

À Deus, de quem eu tenho ciência
que me acompanha e me orienta em
cada momento.

À minha família, que apesar da
distância sei que sempre torceu e me
apoiou em cada situação vivida da
minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana, minha orientadora, e alguém que eu considero de uma importância única em minha vida, uma Mulher a qual devo e admiro muito, gostaria de agradecer toda a força, todo o incentivo, e acima de tudo a toda compreensão e paciência que teve para comigo. Dra. Glauce, obrigado pelos conhecimentos que adquiri, pelo convívio com essa nobre equipe, pelos conselhos e por muito do que ainda hei de conquistar em minha vida!,

À Profa. Dra. Cléa Florenço de Sousa, pelo acolhimento inicial, pelo convívio e desenvolvimento de trabalhos nas mais diversas linhas de pesquisa que tive oportunidade de conhecer, pela amizade e ensinamentos. Levo comigo cada um deles para o futuro. Muito obrigado.

À Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles por ter me recebido inicialmente como bolsista de pós graduação e ter me apresentado a minha nova linha de pesquisa. Agradeço a simpatia graciosa e atenção que sempre obtive desde a época da graduação.

Às professoras Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos e Vera Targino Moreira Lima pelos trabalhos desenvolvidos e apresentados em reuniões científicas.

Às minhas amigas Aline Albuquerque de Oliveira e Patrícia Gomes (Patricinha) pelos conselhos, prestatividade, amizade, e pelo convívio durante estes longos anos de neurofarmacologia.

Ao aluno de iniciação científica Manoel Rufino de Aquino Neto pela disposição e prestatividade durante o desenvolvimento do trabalho (sua ajuda foi muito importante cara!)

À turma do Laboratório de Neurofarmacologia, aos amigos e professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial ao Flavio Maia, Jeferson Falcão, Cícero, Danielle, Kalyne, Lissiana, Thiciane, Fernando, Rivelilson e Viviane.

À Técnica Vilani, pela ajuda no desenvolvimento dos experimentos, pela simpatia de sempre e pela amizade.

Ao meu amigo e colega de profissão Marcelo Fernandes Barbosa pela força de sempre.

À meu grande amigo Tiago Rodrigues Bezerra de Menezes e família, pela amizade sincera de sempre!

Aos amigos Jayson Oliveira e Paulo Praça (Paulim) pela amizade e pelos ótimos momentos de descontração e malhação!

À toda minha imensa turma de amigos, que me presenteia com momentos maravilhosos me tornando uma pessoa mais feliz a cada dia!

À minha amiga e companheira Leslie Gentil pela força e incentivo!

À minha cunhada Karla Morais pela ajuda nas correções e normatizações do trabalho.

Aos meus pais e minha família, que me deram apoio e incentivo, não somente durante o curso de mestrado, mas em toda a vida!

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

Ao CNPq, pelo apoio financeiro indispensável para a realização do trabalho.

RESUMO

A Pilocarpina é um agonista colinérgico característico por induzir convulsões que evoluem para *status epilepticus*, similar à epilepsia do lobo temporal humana. Neste presente trabalho, nós avaliamos a possível ação neuroprotetora da doxiciclina, uma tetraciclina de segunda geração, nas convulsões induzidas pela pilocarpina em ratos Wistar machos, que receberam pilocarpina (300mg/kg i.p) presença ou na ausência de doxiciclina (25 à 100 mg/kg) administrada intraperitonealmente uma vez ao dia durante sete dias. Após a injeção de pilocarpina, foram observados os sinais colinérgicos periféricos, as latências de 1° convulsão e de morte. Foram determinadas as concentrações de aminoácidos no córtex temporal através de cromatografia líquida de alta eficiência HPLC, e a atividade do sistema antioxidante, catalase e as dosagens dos níveis de TBARS e nitrito. Os resultados mostraram que a doxiciclina não alterou os sinais colinérgicos periféricos, contudo aumentou a latência decorrida para a primeira convulsão (1.6 a 5 vezes), quando comparada ao grupo (P300). Resultados semelhantes foram demonstrados com a latência de morte, que foi aumentada de 1.9 a 9.9 vezes. Observou - se que o pré-tratamento com doxiciclina 50 mg/kg foi capaz de reduzir em 25% os níveis de MDA, 64% os níveis de nitrito e 67.7% a atividade da catalase no córtex temporal desses animais, demonstrando com clareza seu potencial antioxidante. Interessantemente, a doxiciclina diminuiu as concentrações de glutamato de 28 a 33%, e aumentou GABA em 112 e 91%, nas dose de 50 e 100mg/kg respectivamente nos animais administrados com P300, Na maior dose, a droga alterou os níveis de aspartato e taurina, diminuindo em 61% aspartato enquanto elevou os níveis de taurina em cerca de 34%. Surpreendentemente, somente a menor dose alterou os níveis de glicina, aumentando a concentração deste aminoácido em 132%. Em conclusão, mostramos que o início e a intensidade das convulsões induzidas pela pilocarpina foram significativamente reduzidos pela doxiciclina. Portanto, pelo menos em parte, este mecanismo de ação parece estar relacionado a uma diminuição nos níveis de aminoácidos excitatórios e a um aumento nas concentrações de aminoácidos inibitórios no córtex temporal desses animais.

Palavras-chave: Epilepsia. Doxiciclina. Agentes Neuroprotetores.

ABSTRACT

Pilocarpine is known to induce convulsions leading to *status epilepticus*, similar to the temporal lobe epilepsy in humans. In the present work, we evaluated the possible protection afforded by doxycycline, a 2nd generation tetracycline, against pilocarpine-induced convulsions in male Wistar rats (P300mg/kg, i.p) in the absence and in the presence of doxycycline (25 to 100 mg/kg i.p.) daily for 7 days. After the pilocarpine injection, all groups were observed for cholinergic signs, latency to the first convulsion and latency to death. Besides, amino acid concentrations in temporal cortices were determined by RP-HPLC, as well catalase activity and levels of TBARS and Nitrite. Results showed that doxycycline did not alter cholinergic signs but increased the latency time to the first convulsion (1.6 to 5 times increase), as compared to P300, and the highest effect was observed with the dose of 25 mg/kg. Similar results were demonstrated to death latency that increased from 1.9 to 9.9 times with doxycycline at the doses of 25, 50 and 100 mg/kg. In fact we showed that the pre-treatment with doxycycline decreased in 25% MDA levels, 64% nitrite levels and 67.7% catalase activity. Interestingly, doxycycline decreased glutamate concentrations in 28 and 33% and increased GABA in 112 and 91% at the doses of 50 and 100mg/kg respectively. At the higher dose the drug altered aspartate and taurine concentrations, decreased aspartate levels in 61%, while increasing taurine levels in 34%. Surprisingly, only the lower dose altered glycine levels, increasing its concentration by 132%. In conclusion, we showed that the onset and intensity of pilocarpine-induced seizures were significantly reduced by doxycycline. Furthermore, at least in part, its mechanism of action seems to be mediated by the decrease and increase of excitatory and inhibitory aminoacids, respectively. In addition the doxycycline capacity to reduce the oxidative stress associated with the pilocarpine-induced may also play a role.

Keywords: Epilepsy. Doxycycline. Neuroprotective Agents.

LISTA DE FIGURAS

1	Bloqueadores dos canais de sódio.....	24
2	Sítio de ação dos benzodiazepínicos e barbitúricos.....	24
3	Estrutura dos Receptores Glutamatérgicos.....	36
4	Estrutura dos Receptores Gabaérgicos.....	36
5	Acondicionamento dos animais.....	46
6	High Performance Liquid Chromatography (HPLC).....	52
7	Dissecação do córtex temporal.....	56
8	Latência da primeira convulsão após a administração de pilocarpina (P300) em ratos machos pré-tratados ou não com Doxiciclina (D25, D50 ou D100)....	60
9	Latência de morte após a administração de pilocarpina (P300) em ratos machos pré-tratados ou não com Doxiciclina (D25, D50 ou D100).....	62
10	Verificação da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) após a administração de P300 em córtex temporal de ratos adultos pré-tratados ou não com Doxiciclina 50mg/Kg.....	64
11	Verificação da produção de nitrito após administração de P300 em córtex temporal de ratos adultos pré-tratados ou não com Doxiciclina 50mg/Kg.....	66
12	Efeitos sobre a atividade da catalase após a administração de pilocarpina em corpo estriado de ratos adultos machos pré-tratados ou não com Doxiciclina 50 (D50).....	68
13	Concentração de Aspartato (ng/grama de tecido).....	70
14	Concentração de Glutamato (ng/grama de tecido).....	72
15	Concentração de GABA (ng/grama de tecido).....	74
16	Concentração de Glicina (ng/grama de tecido).....	76
17	Perfil cromatográfico do grupo controle P300.....	77
18	Perfil cromatográfico do grupo controle P300.....	77

LISTA DE QUADROS

1	Tipos de crises epiléticas.....	20
2	Fármacos antiepiléticos.....	22
3	Mecanismos de ação dos fármacos antiepiléticos.....	23
4	Estrutura química da Doxiciclina.....	27
5	Correlação entre os modelos experimentais e a utilidade clínica.....	32
6	Modelos experimentais e sua relação com as diferentes formas das epilepsias no ser humano.....	33
7	Parâmetros comportamentais observados.....	48

LISTA DE TABELAS

1	Grupos experimentais.....	47
2	Percentagem de alterações comportamentais após a administração de pilocarpina (P300) em ratos wistar machos pré-tratados ou não com doxiciclina (D25, D50 ou D100).....	58
3	Efeitos do pré-tratamento com doxiciclina (25, 50 ou 100mg/kg) sobre as concentrações de aminoácidos encontrados em córtex temporal de ratos submetidos à convulsões induzidas por pilocarpina 300mg/kg (P300).....	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

\pm	Mais ou menos
%	Porcentagem
$^{\circ}\text{C}$	Grau (s) Centígrado (s)
μg	Micrograma
μM	Micromolar
α	Alfa
β	Beta
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ALE	Atividade Locomotora Espontânea
ANOVA	Análise de Variância
ACh	Acetilcolina
Ca²⁺	Íons Cálcio
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
Cl⁻	Íons cloreto
CAT	Catalase
DA	Dopamina
EROs	Espécies reativas do oxigênio
GABA	Acido gama amino butírico
Cm	Centímetros
cont.	Controle
i.p.	Intraperitoneal
NMDA	N-metil-D-Aspartato
NO	Óxido Nítrico
P300	Pilocarpina 300mg/kg
SCP	Sinais colinérgicos periféricos
S.E	<i>Status Epilépticus</i>
MDA	Malonildialdeído
SNC	Sistema nervoso central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Epilepsia.....	16
1.2	Tipos de crises epiléticas.....	18
1.3	Fisiopatologia das crises epiléticas.....	21
1.4	Fármacos antiepiléticos.....	21
1.5	Tetraciclina.....	25
1.6	Doxiciclina.....	28
1.6.1	Descrição.....	28
1.6.2	Apresentação farmacêutica.....	28
1.6.3	Farmacocinética.....	28
1.6.4	Indicações.....	29
1.7	Modelos experimentais de epilepsia.....	29
1.8	Neurotransmissores e epilepsia.....	34
1.8.1	Sistema Glutamatérgico/Gabaérgico.....	34
1.8.2	Sistema Colinérgico.....	37
1.8.3	Sistema Dopaminérgico.....	37
1.9	Neuroproteção e estresse oxidativo.....	39
1.10	Mecanismos de morte neuronal e epilepsia	40
2	OBJETIVOS.....	45
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1	Animais.....	46
3.2	Tratamento dos animais.....	47
3.3	Estudo comportamental.....	48
3.4	Drogas e materiais utilizados.....	48
3.4.1	Pilocarpina.....	48
3.4.2	Cloridrato de doxiciclina.....	48
3.4.3	Material utilizado nos experimentos.....	49

3.5	Protocolo experimental.....	49
3.6	Técnicas Experimentais.....	49
3.6.1	Dosagens de Aminoácidos (HPLC).....	49
3.6.1.1	Procedimento.....	50
3.6.1.2	Determinação fluorimétrica de AA por gradiente.....	51
3.6.2	Atividade Antioxidante.....	52
3.6.2.1	Níveis de TBARS.....	52
3.6.2.2	Determinação da produção de Nitrito.....	54
3.6.2.3	Determinação da atividade enzimática da Catalase.....	55
4	RESULTADOS.....	58
4.1	Estudo comportamental.....	58
4.1.1	Latência de Convulsão.....	59
4.1.2	Latência de Morte.....	61
4.2	Avaliação da atividade antioxidante.....	63
4.2.1	Níveis de TBARS.....	63
4.2.2	Verificação da produção de nitrito.....	65
4.2.3	Verificação da atividade da catalase.....	67
4.3	Aspectos bioquímicos (HPLC).....	69
4.3.1	Determinação dos níveis de Aspartato.....	70
4.3.2	Determinação dos níveis de Glutamato.....	71
4.3.3	Determinação dos níveis de GABA.....	73
4.3.4	Determinação dos níveis de Glicina.....	75
5	DISCUSSÕES.....	79
5.1	Estudo comportamental.....	80
5.2	Estudo neuroquímico.....	82
5.3	Estudo da determinação dos níveis de aminoácidos.....	85
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	87

7	CONCLUSÃO.....	89
	REFERÊNCIAS.....	90

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epilepsia

A epilepsia é uma desordem cerebral caracterizada por crises epiléticas crônicas e repetidas, clinicamente diversificadas provenientes de descargas elétricas anormais e recorrentes, dentre as quais podemos citar as convulsões (FUCHS et al., 2004). Em geral, não existe nenhuma causa reconhecível, embora surja freqüentemente após alguma lesão cerebral, como traumatismo, infecção (meningite) ou crescimento de tumor ou outros tipos de doença neurológica (HOPKINS et al., 1995)

Trata-se do distúrbio cerebral sério mais comum em todo o mundo. É, possivelmente, a mais universal de todas as entidades médicas. Aproximadamente 100 milhões de pessoas terão epilepsia em algum momento de suas vidas e 5% da humanidade terão pelo menos uma crise epilética durante a vida (o que também não é epilepsia).

Em países mais desenvolvidos, a incidência é de aproximadamente 1%, ou seja, cinquenta milhões de pessoas são portadoras desta condição, subindo para 2% em nações menos desenvolvidas (BEAGLEHOLE et al., 1996). Nos países desenvolvidos, espera-se que 1% da população desenvolva epilepsia até os 20 anos de idade. Mais de 3% da população deverá ter epilepsia aos 80 anos. Nesses países, a tendência dos últimos anos sugere que a freqüência dos casos novos em crianças diminua e na população idosa aumente.

Epilepsia ocorre principalmente nos extremos de faixa etária, acometendo mais as crianças (particularmente abaixo de 2 anos de idade) e os idosos (mais de 65 anos). Os homens são 1,1 a 1,7 vezes mais acometidos que as mulheres nas epilepsias recém-diagnosticadas.

A taxa de incidência de epilepsia é variada na literatura, indo de 11 a 131 por 100.000 pessoas por ano e a prevalência de 1,5 a 30 por 1000. Nos Estados Unidos, a prevalência de epilepsia é maior na população não branca, embora não esteja claro se essa diferença decorra de fatores raciais ou socioeconômicos ou de ambos.

Estima-se que o número de novos casos por ano está em torno de dois milhões em todo o mundo. Pelo menos 50% dos casos começam na infância ou adolescência, e sabe-se que, 70% a 80% das pessoas com epilepsia podem ter uma vida normal se tiverem um tratamento adequado (BEAGLEHOLE et al., 1996). Embora drogas antiepilépticas sejam comumente usadas para controlar e prevenir convulsões, seu uso prolongado carrega um risco considerável de morbidade. A decisão de iniciar uma terapia com anticonvulsivantes é tomada apenas quando os riscos de novas convulsões superam os riscos do tratamento (SIRVEN, 2002). Aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo têm epilepsia refratária aos atuais tratamentos medicamentosos (PORTER; ROGAWSKI, 1992) e, além disso, muitas vezes, o fracasso do tratamento é atribuído à necessidade de retirada, devida aos efeitos colaterais.

Crise epiléptica pode durar de segundos a minutos, porém a sua repercussão pode durar uma vida inteira. Estima-se que cerca de 3,5 milhões de pessoas têm epilepsia na América Latina e aproximadamente 100 mil casos novos somam-se a cada ano, de cada 100 pessoas, 1 a 2 têm epilepsia. Pelo menos 50% dos casos começam na infância ou adolescência. O Ministério da Saúde não tem uma estimativa real da prevalência e incidência de epilepsia no Brasil. Na América Latina, 1,5 a 2 % das pessoas são acometidas e fazendo-se uma estimativa supõe - se que, em grandes capitais, como em Teresina, por exemplo, temos de 7.590 a 15.180 portadores e que 37.900 a 53.130 pessoas terão pelo menos uma crise epiléptica ao longo da sua vida.

A grande prevalência das epilepsias na América Latina é muito preocupante, pois além das grandes dificuldades econômicas temos baixo investimento em áreas sociais, com altas taxas de desemprego e subemprego, dificuldades geográficas e falta de uma política de saúde para as epilepsias. Essa alta prevalência também afeta a economia, aumentando os custos diretos e indiretos das epilepsias.

A epilepsia é a condição neurológica mais comum em todo o mundo. No Brasil, foram feitos apenas alguns poucos estudos epidemiológicos sobre essa condição, como, por exemplo, na cidade de São Paulo em 1986 pela liga Brasileira de Epilepsia. Marino et al. (1986) encontraram na grande São Paulo, uma prevalência de 11,9 em 1 000 indivíduos. Fernandes et al. (1998), utilizando o questionário de rastreamento neurológico para epilepsia, numa combinação de três protocolos, o da Organização Mundial da Saúde (OMS), do International Community-Based Epilepsy Research Group (ICBERG) e o de Porto Alegre constataram taxas de prevalência de 16,5 em 1 000 indivíduos para epilepsia ativa (presença

de crise, em vigência de tratamento ou não, nos últimos 24 meses) e de 20,3 em 1 000 para epilepsia inativa. Borges et al. (2004) encontraram uma prevalência de epilepsia de 18 em 1 000 habitantes em São José do Rio Preto, uma cidade do interior do Estado de São Paulo (LI et al., 2005).

O tratamento medicamentoso eficaz está disponível há mais de 100 anos. Com o diagnóstico e o tratamento adequados, aproximadamente 80-90% das crianças e 75 % nos adultos terão suas crises facilmente controladas com medicação de baixo custo e um mínimo de efeitos indesejados. Isso lhes permitirá acesso a uma vida inteiramente normal, desde que o diagnóstico seja feito precocemente e o acompanhamento médico seja apropriado. Por outro lado, se não tratada, pode levar à morte.

Acredita-se que pelo menos 25% dos pacientes com epilepsia no Brasil são portadores em estágios mais graves, ou seja, com necessidade do uso de medicamentos por toda a vida, sendo as crises freqüentemente incontroláveis e então candidatos à intervenção cirúrgica. No Brasil, existem somente sete a oito centros de tratamento cirúrgico para epilepsia aprovados pelo Ministério da Saúde.

Apesar do progresso da ciência, as elevadas taxas de epilepsia nos países do Terceiro Mundo continuam sendo problema de saúde pública. Com o custo cumulativo do uso de determinadas drogas, muitos pacientes abandonam o tratamento. Os principais problemas associados às epilepsias derivam principalmente de limitações impostas pelas próprias crises, seu tratamento e a eventuais lesões neurológicas.

1.2 Tipos de crises epilépticas

Admite-se epilepsia como um grupo de doenças que têm, em comum, crises epilépticas que ocorrem na ausência de condição tóxico-metabólica ou febril. Crises epilépticas são eventos clínicos que refletem disfunção temporária de um conjunto de neurônios de parte do encéfalo (crises focais) ou de área mais extensa envolvendo os dois hemisférios cerebrais (crises generalizadas). A crise epiléptica é causada por uma descarga elétrica anormal excessiva e transitória das células nervosas, decorrente de correntes elétricas.

Crises parciais são aquelas nas quais, em geral, as primeiras manifestações clínicas e eletroencefalográficas indicam ativação de um sistema neuronal limitado à parte de um

hemisfério cerebral. Na classificação das crises epiléticas, a consciência é entendida como a capacidade de responsividade e percepção consciente. Quando está alterada, diz-se que há comprometimento da consciência. O que distingue a crise parcial simples da complexa é o comprometimento da consciência na última. Na crise parcial complexa, admite-se o envolvimento hemisférico bilateral, principalmente das estruturas mesiais temporais durante o período de alteração da consciência.

Nas crises generalizadas, as descargas neuronais são bilaterais e envolvem simultaneamente amplas áreas de ambos os hemisférios cerebrais. A consciência é quase sempre comprometida e as manifestações motoras afetam os dois lados do corpo. As crises podem ser convulsivas (com fenômenos motores) ou não. No primeiro caso, são classificadas como tônicas, quando o corpo fica rígido, clônicas, quando há contrações rítmicas seguidas de relaxamento, tônico-clônicas, se os dois sintomas estiverem presentes e mioclônicas, caso haja contrações não ritmadas e erráticas de apenas alguns grupos musculares. Caso não haja fenômenos motores, as crises são denominadas atônicas (perda do tônus muscular, sem rigidez) ou de ausência (perda de contato com o ambiente) (COMMISSION, 1989; LOSCHER, 1997).

Quadro 1 – Tipos de crises epiléticas

1. Crises Parciais (ou focais)

Crises parciais simples (CPS)

- com sinais motores
- com sinais sensitivos somatossensoriais ou especiais
- com sinais ou sintomas autonômicos
- com sintomas psíquicos.

Crises parciais complexas (CPC)

- início de crise parcial simples seguida por alteração da consciência
- alteração de consciência no início

Crises secundariamente generalizadas

- CPS evoluindo para crises tônico-clônicas generalizadas (CTCG)
- CPC evoluindo para CTCG
- CPS evoluindo para CPC e então para CTCG.

2. Crises Generalizadas (desde o início)

CTCG Crises de ausência

Crises de ausência atípica

Crises mioclônicas

Crises tônicas

Crises clônicas

Crises atônicas.

3. Crises não classificáveis (informações incompletas ou inadequadas)

Fonte: Adaptado de Brunton et al. (2006)

1.3 Fisiopatologia das crises epilépticas

A fisiopatologia da epilepsia ainda não está completamente definida. Os modelos de convulsão em animais reproduzem alterações comportamentais e eletroencefalográficas que são semelhantes à epilepsia em humanos (BEN-ARI et al., 1980, 1981). Estes modelos são utilizados para estudar o envolvimento dos sistemas de neurotransmissores como moduladores da epileptogênese, como também permitem observar as alterações comportamentais, histopatológicas, e outros dados neuroquímicos relacionados ao processo convulsivo (CAVALHEIRO et al., 1994; MARINHO et al., 1997, 1998; COSTA-LOTUFO et al., 2002).

Sabe-se que atividade convulsiva está associada a mudanças bioquímicas em algumas áreas cerebrais e afeta diversos neurotransmissores: dopamina, glutamato, serotonina, ácido γ -aminobutírico (GABA) (CAVALHEIRO et al., 1994; MARINHO et al., 1997); o metabolismo dos carboidratos; os sistemas de segundos mensageiros e a expressão gênica, processos envolvidos na fisiopatologia das alterações neuronais (SIMONIC et al., 2000).

1.4 Fármacos antiepilépticos

O controle da epilepsia é realizado com drogas, que são capazes de controlar até 80% dos casos, porém, cerca de 20% dos pacientes portadores desta condição possuem uma epilepsia não controlada, daí a necessidade da investigação de novas alternativas terapêuticas para o desenvolvimento de novos agentes capazes de controlar tal condição.

Atualmente, o tratamento farmacológico da epilepsia consiste na utilização de drogas capazes de potencializar a ação de neurotransmissores inibitórios, tais como o GABA, que, através da abertura dos canais aniônicos de cloreto, hiperpolariza a célula e, desta forma, impedindo ou minimizando o desenvolvimento de descargas elétricas mais fortes e recorrentes.

A grande maioria dos fármacos atualmente utilizados possui boa tolerabilidade, contudo os riscos de morbidade desenvolvidos pelo paciente podem ser, em alguns casos,

drásticos. Os benzodiazepínicos consistem na maior classe de fármacos utilizados (principalmente no grande mal), e o diazepam, midazolam, e o bromazepam são os principais representantes desta classe que atuam facilitando a abertura dos canais de cloreto e, desta forma, potencializando as ações do GABA (**Quadro 3**). Outra classe de fármacos são os barbitúricos, que também atuam potencializando os efeitos gabaérgicos e cujos representantes principais são o fenobarbital, muito utilizado em crises generalizadas e juvenis e o pentobarbital, comumente utilizado em modelos experimentais de indução de sono.

Quadro 2 - Fármacos antiepiléticos

Subclasse	Protótipos	Outros exemplos
Barbitúricos	Fenobarbital	Metharbital
Benzodiazepínicos	Diazepam	Clonazepam, Nitrazepam
Ácidos carboxílicos	Ácido valpróico	
Hidantoínas	Fenitoína	Mefenitoína
Succinimidas	Fensuximida	
Tricíclicos	Carbamazepina	
Novos Agentes	Felbamato Gabapentina Lamotrigina Tiagabina Topiramato Vigabatrina	

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, 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 (MUSICCO et al., 1997; FUCHS et al., 2004).

A classificação clínica aceita da epilepsia reconhece duas categorias principais, as crises parciais, onde a descarga neuronal é iniciada localmente ou crises generalizadas, onde a descarga envolve todo o cérebro.

O estudo da epilepsia em roedores é realizado através da administração sistêmica de altas doses de pilocarpina, ocasionando convulsões e subsequente desenvolvimento de estado epilético (TURSKI et al., 1983a, 1983b, 1989), acompanhado por lesões cerebrais que são semelhantes, em muitos aspectos, às lesões observadas em cérebro de pacientes epiléticos (TURSKI et al., 1983a; LEITE et al., 1990; CAVALHEIRO et al., 1991).

Quadro 3 - Mecanismos de ação dos fármacos antiepiléticos

Fármacos	Mecanismo de Ação
Benzodiazepínicos, Barbitúricos, Gabapentina, Tiagabina e Vigabatrina	Potencialização Gabaérgica
Carbamazepina, Fenitoína e Barbitúricos e Acido Valpróico em altas doses	Bloqueio dos canais de Sódio
Etosuximida e Acido Valpróico	Bloqueio dos canais de Cálcio
Felbamato, Lamotrigina e Topiramato	Antagonismo ao Ácido Glutâmico

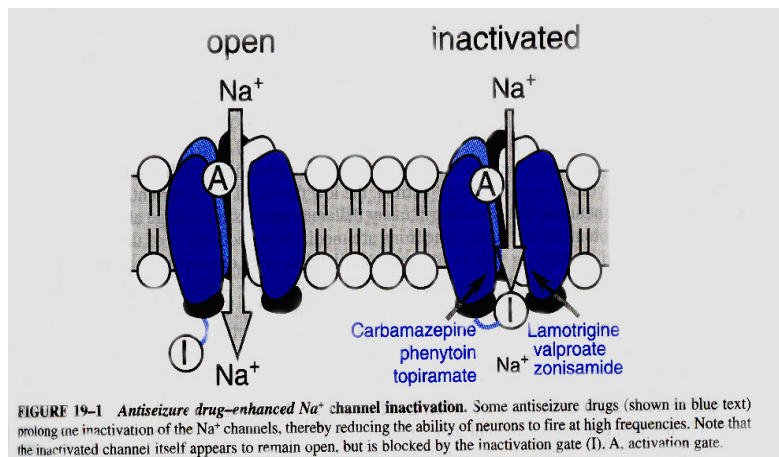


Figura 1 – Bloqueadores de canais de sódio.

Fonte: Brunton et al. (2006)

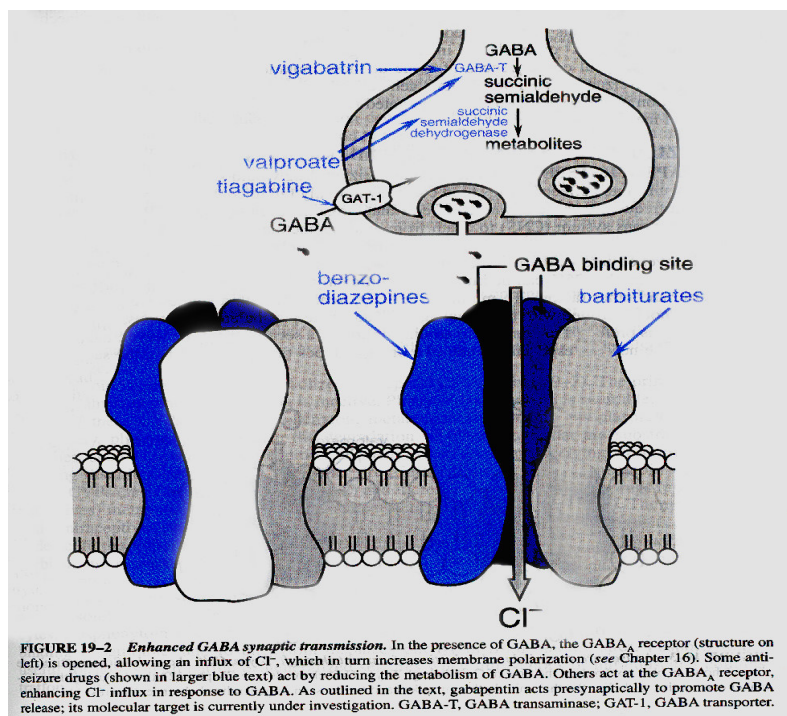


Figura 2 – Sítio de ação dos benzodiazepínicos e barbitúricos.

Fonte: Brunton et al. (2006)

1.5 Tetraciclina

Nos dias atuais, existem diversas alternativas terapêuticas capazes de proporcionar ao indivíduo portador de epilepsia uma vida perfeitamente normal. Contudo, ocorrem também casos refratários aos tratamentos convencionais, que não respondem ao tratamento farmacológico usual. Portanto, o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas torna-se essencial, afinal, desta forma, o estudo e desenvolvimento de drogas neuroprotetoras tornam-se muito importantes como estratégias medicamentosas para o tratamento destas condições.

As tetraciclina são os protótipos dos antimicrobianos de amplo espectro, sendo muito eficazes no tratamento de diversas patologias. Seu mecanismo de ação ocorre por penetração nos microorganismos em parte por difusão passiva e em parte por transporte ativo. O mecanismo de ação destes fármacos ocorre através de ligação com a subunidade 30S ribossomal, inibindo, desta maneira, a síntese protéica bacteriana. Entre os usos clínicos das tetraciclina podemos citar infecções do trato respiratório, como bronquites e sinusites, tratamento de acne, infecções urinárias entre outras.

Estudos recentes têm demonstrado a participação das tetraciclina em diversos sistemas, em particular sob o sistema nervoso, onde as mesmas parecem apresentar efeitos neuroprotetores em diversas desordens centrais (YRJANHEIKKI et al., 1999). Estes efeitos têm se tornado evidentes a partir da descoberta de que a minociclina poderia reverter danos cerebrais através da diminuição da atividade da oxido nítrico sintetase induzível (LIN et al., 2001; ZHU et al., 2002), da prevenção da neurotoxicidade induzida pelo glutamato (TIKKA et al., 2001; YRJANHEIKKI et al., 1999) e da inibição da caspase-ativadora de apoptose (SANCHEZ MEJIA et al., 2001).

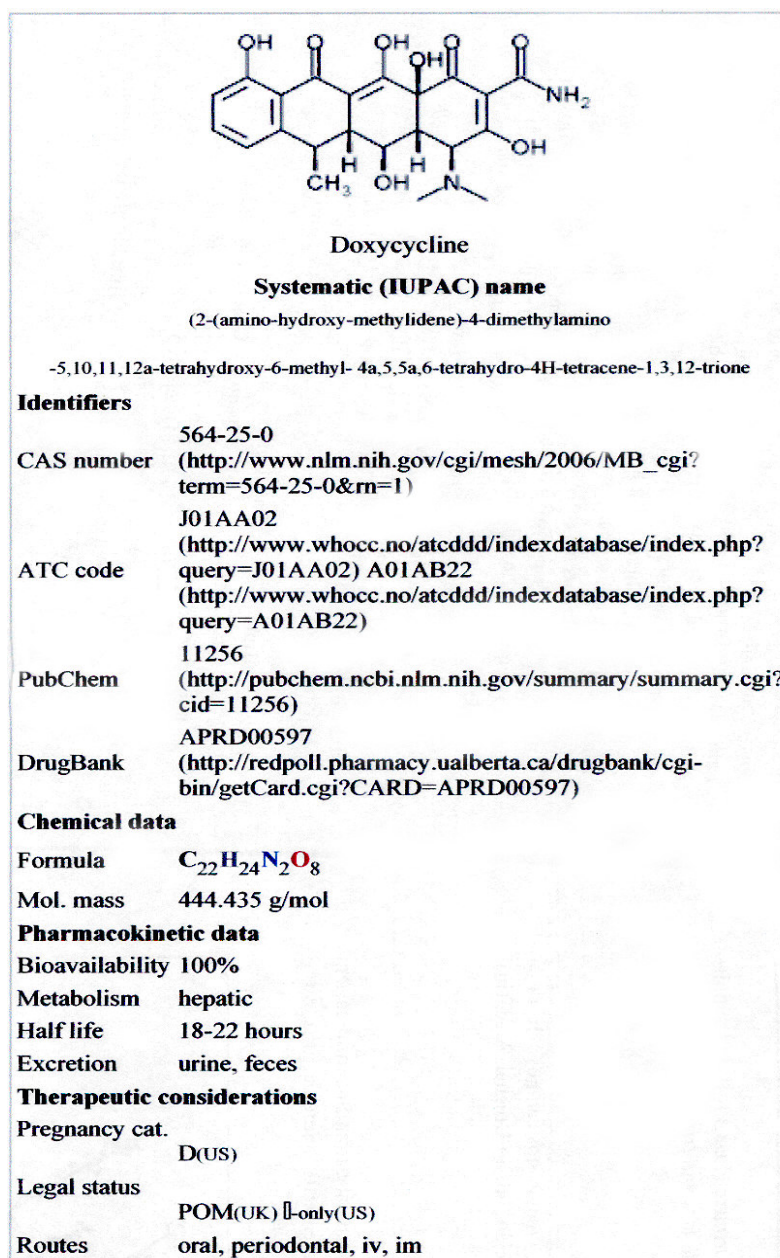
Os efeitos antiinflamatórios e antiapoptóticos das tetraciclina têm sido ultimamente associados com a sua atividade neuroprotetora. Estudos recentes mostram que tal classe de fármacos é capaz de reduzir a síntese de óxido nítrico induzível, a atividade da caspase-1, a formação da interleucina 1- β , atividade das metaloproteinases, bem como a síntese das ciclooxigenases e prostaglandinas. Em nível mitocondrial, já foi demonstrado que a minociclina foi capaz de inibir a liberação de fatores antiapoptóticos, tais como, citocromo c, AIF e *smac/diablo*. Em culturas celulares, também foi demonstrado que as tetraciclina em

geral são capazes de inibir a morte celular induzida por diversos insultos, incluindo a excitotoxicidade mediada pelo receptor NMDA (ZHU et al., 2002), peróxido de hidrogênio (ZHU et al., 2002; LIN et al., 2003).

Em células expostas a níveis tóxicos de óxido nítrico, seu efeito neuroprotetor foi associado com a inibição do gene p38 (LIN et al., 2001).

Recentemente, foram publicados resultados atribuindo ações neuroprotetoras da doxiciclina em modelos animais de isquemia-hipóxia (LAUREN et al., 2005). Estas ações nos levam a crer que o tratamento com tetraciclinas, em especial a minociclina e a doxiciclina pode ser responsável pelo sucesso em reduzir o dano cerebral em diversos modelos experimentais, entre eles o modelo de Parkinson (DU et al., 2001; HE et al., 2001; WU et al., 2002), Huntington (CHEN et al., 2000), Esclerose unilateral amiotrófica (LIN et al., 2001), hemorragias cerebrais, isquemia focal ou generalizada (ARVIN et al., 2002) ou até mesmo trauma cerebral (POWER et al., 2003).

Quadro 4 – Estrutura Química da Doxiciclina



Fonte: Wikipedia, The Free Encyclopedia

1.6 Doxiciclina

1.6.1 Descrição

Usada na forma de cloridrato, a doxiciclina é uma tetraciclina bacteriostática de amplo espectro, que atua por inibição da síntese de proteínas e bloqueia a união do RNA de transferência ao complexo ribossômico do RNA mensageiro. A união reversível é produzida na subunidade ribossômica 30S dos organismos sensíveis. Esta droga não inibe a síntese da parede celular bacteriana.

1.6.2 Apresentação farmacêutica

O cloridrato de doxiciclina consiste fisicamente como pó cristalino amarelo e higroscópico, altamente solúvel em água, apresentando pH variando entre 2,0 e 3,0. Sua forma farmacêutica mais comum é apresentada na forma de comprimidos de 100 mg para a administração oral.

1.6.3 Farmacocinética

A doxiciclina é absorvida por via oral, de 90% a 100%. É parcialmente inativada pelo metabolismo hepático. Sua meia-vida normal é de 12 a 22 horas e é eliminada por via renal por filtração glomerular e por via fecal; também se excreta no leite materno. O uso simultâneo com laxantes ou antiácidos que contenham magnésio pode originar uma diminuição da absorção devida ao aumento do pH intragástrico. Os barbitúricos, fenitoína e carbamazepina podem originar a diminuição das concentrações séricas de doxiciclina. Posto que as penicilinas podem interferir com o efeito bacteriostático da doxiciclina, é melhor evitar o tratamento combinado. O bicarbonato de sódio também pode diminuir a absorção das tetraciclinas através da ionização das mesmas em meio alcalino.

1.6.4 Indicações

Infecções do trato geniturinário causadas por *Chlamydia trachomatis*, uretrite causada por *C. trachomatis* e *Ureaplasma urealyticum*, infecções retais não-complicadas causadas por *Chlamydia trachomatis*, otite média e faringite bacteriana produzida por *Staphylococcus aureus*. A dose usual para adultos é de 100mg a cada 12 horas no primeiro dia, em seguida de 100 a 200mg uma vez ao dia ou de 50 a 100mg a cada 12 horas; dose máxima: até 300mg/dia ou até 600mg/dia durante 5 dias em infecções gonocócicas agudas. Doses pediátricas - crianças de 45kg ou menos: 2,2mg/kg a cada 12 horas no primeiro dia, em seguida de 2,2 a 4,4mg/kg uma vez ao dia; crianças com mais de 45kg: a mesma dosagem que para adultos. Porém, o uso crônico de doxiciclina como neuroprotetor poderia trazer um aumento na resistência bacteriana à este fármaco, o que poderia ser evitado utilizando doses mais baixas do que as que são utilizadas na terapêutica usual, ou agudamente.

1.7 Modelos experimentais de epilepsia

Em uma tentativa de melhorar os conhecimentos acerca da epilepsia no ser humano, as pesquisas passaram também a se desenvolver em animais de laboratório. A relevância de um modelo experimental é determinada pelo grau em que o modelo serve como testemunha do fenômeno natural. Apesar do freqüente aparecimento de diferentes modelos experimentais, poucos são aqueles que resistem a um exame rigoroso e à prova do tempo. Isso é esperado, pois o modelo experimental não passa de um modelo, que mimetiza algumas das características desta ou daquela forma de epilepsia.

Com o passar do tempo, os modelos que mais se assemelham com a patologia humana ou que guardam estreitas relações com esta permanecerão, em detrimento dos demais. Nesse sentido, torna-se fundamental a diversificação dos modelos experimentais gerando distintos pontos de vista e permitindo uma compreensão mais holística dos fenômenos que caracterizam as epilepsias. Finalmente, para que um modelo experimental seja classificado como um modelo de epilepsia ele deve preencher os seguintes requisitos: demonstrar a presença de atividade epileptiforme nos registros eletroencefalográficos e clinicamente apresentar uma atividade semelhante àquelas observadas durante uma crise epiléptica.

A classificação dos modelos experimentais de epilepsias transformou-se drasticamente nos últimos 30 anos. Um dos catalisadores dessa mudança certamente foi o rápido desenvolvimento da genética molecular, que modificou a visão científica a respeito das relações entre meio ambiente e código genético.

Anteriormente, os modelos foram classificados como: genéticos, onde o aparecimento das crises epiléticas espontâneas ou induzidas estava relacionado com aspectos associados à formação e ao desenvolvimento do sistema nervoso; e não genéticos, onde as crises epiléticas eram desencadeadas através da estimulação química ou elétrica do sistema nervoso em animais "normais" (JASPER et al., 1969; PÚRPURA et al., 1972; MELLO et al., 1986). O objetivo dessa classificação era correlacionar os diferentes modelos com os distintos tipos de epilepsias existentes.

Nesta época, esses modelos experimentais serviram decisivamente como *screening* farmacológico de drogas antiepiléticas. O principal objetivo dos pesquisadores de então estava centrado na contenção das crises convulsivas, ou seja, em um tratamento sintomático, mas não necessariamente curativo. Esses modelos alcançaram grande relevância, principalmente na década de 1960, quando muitas drogas antiepiléticas foram desenvolvidas (WHITE, 1997). Paralelamente, esses modelos contribuíram substancialmente com informações a respeito dos mecanismos envolvidos na gênese e manutenção das crises.

A partir das décadas de 1970 e 1980, com o aparecimento de modelos experimentais crônicos induzidos, sendo o principal destes o modelo do Kindling, os estudos das drogas antiepiléticas se voltaram para a identificação de agentes capazes de prevenir a epileptogênese e/ou diminuir os déficits comportamentais de longa duração decorrentes das crises. No entanto, as grandes restrições de parte dos clínicos em relação a real validade deste modelo para as epilepsias humanas, resultaram em um enorme retardo na incorporação da porção "aplicada" dos dados obtidos com o modelo do abrasamento.

Nas décadas de 1980 e 1990, dois outros modelos foram extensamente utilizados: o modelo da pilocarpina e o modelo do ácido caínico (TURSKI et al., 1983; BEN-ARI et al., 1979; LEITE et al., 2002). Ambos os modelos replicam características fenomenológicas das epilepsias humanas do lobo temporal (BEN-ARI, 1985; TURSKI et al., 1989). Assim, a administração local ou sistêmica desses compostos resulta em um padrão de crise límbica duradoura bastante característica (*status epilepticus*), que após um período conhecido como

silencioso (de 3 a 14 dias), leva o animal a apresentar crises espontâneas e recorrentes (TURSKI et al., 1983). A lesão cerebral induzida pelo *status epilepticus* nesses modelos pode ser considerada como equivalente a um evento epileptogênico (ou seja, capaz de gerar epilepsia) no ser humano, como por exemplo, uma convulsão febril (MATHERN et al., 1996).

Cavalheiro et al. (1991) determinaram os efeitos em longo prazo da convulsão através da administração da pilocarpina em ratos, que são caracterizadas por três fases distintas:

- **Primeira fase:** período agudo, de 1 a 2 dias de duração que corresponde ao modelo de convulsões límbicas repetidas e estado epiléptico;
- **Segunda fase:** período sem convulsão (período silencioso), caracterizado por um progressivo retorno ao EEG e comportamento normal, compreendendo a duração de 4 - 44 dias;
- **Terceira fase:** período de convulsões espontâneas recorrentes, começando entre 5 - 45 dias depois da administração da pilocarpina e permanecendo por toda a vida do animal (LEITE et al., 1990; CAVALHEIRO et al., 1991).

Na fase aguda, podem ser identificados compostos com eficácia no tratamento da epilepsia refratária e/ou neuroproteção contra danos induzidos por convulsões sustentadas (JOPE et al., 1986; CAVALHEIRO et al., 1987, TURSKI et al., 1987; HIRSCH et al., 1992; LEITE et al., 2002).

A administração aguda de altas doses de pilocarpina, agonista muscarínico colinérgico, induz mudanças comportamentais e convulsões que progridem, dentro de uma a duas horas, para *status epilepticus* (SE). O modelo de convulsão com pilocarpina em roedores, especialmente o modelo com ratos, tem fornecido informações sobre características comportamentais e neuroquímicas, associadas com atividade convulsiva, que se assemelham à epilepsia lobo temporal humana. Outros estudos sugerem mudanças permanentes em diferentes sistemas neuroquímicos com uma intensificação do estresse oxidativo, que pode ocorrer após as convulsões e SE induzidos por pilocarpina. Entretanto, acredita-se ser importante o estudo da atividade enzimática relacionada ao mecanismo de estresse oxidativo durante as convulsões e SE.

Atualmente, apesar de não haveremos ainda ultrapassado o desafio de 20 anos atrás, muitos grupos de pesquisa estão buscando terapias farmacológicas capazes de reverter o quadro epiléptico já instalado, principalmente, através do redirecionamento das alterações plásticas decorrentes do estado epiléptico. Em um outro nível, busca-se também a ação profilática sobre aquelas epilepsias que podem ser previstas com um elevado grau de certeza, como por exemplo, as epilepsias que sucedem um trauma cranio-encefálico grave. O quadro abaixo resume alguns modelos experimentais e suas respectivas alocações dentro da classificação das epilepsias no homem.

Quadro 5 - Correlação entre os modelos experimentais e a utilidade clínica

Modelo Experimental	Crise Tônico e/ou Clônica Generalizada	Crise de Ausência e Mioclônica Generalizada	Crise de Ausência Generalizada	Crise Parcial
Eletrochoque Máximo (extensão tônica)	Carbamazepina, Fenitoína, Valproato, Fenobarbital			
Pentilenotetrazol Subcutâneo		Etossuximida, Valproato, Fenobarbital, Benzodiazepínicos, Felbamato, Gabapentina, Tiagabina		
Descargas Espícula-onda			Etossuximida, Valproato, Benzodiazepínicos, Lamotrigina, Topiramato	
Kindling Elétrico				Carbamazepina, Fenitoína, Valproato, Fenobarbital, Benzodiazepínicos, Felbamato, Gabapentina, Lamotrigina, Oxcarbazepina, Topiramato, Tiagabina, Vigabatrina, Zonisamida

Fonte: J Epilepsy Clin Neurophysiol 2006; 12 (1 suppl.1): 18-21

Quadro 6 - Modelos experimentais e sua relação com as diferentes formas das epilepsias no ser humano

MODELO EXPERIMENTAL	TIPO DE EPILEPSIA	SITUAÇÃO
<i>Injeção ou aplicação tópica de metais</i>		
Cobalto (1960)	Epilepsia focal (1)	Semicrônico
Ácido túngstico (1960)	Epilepsia focal (1), grande mal	Agudo
Creme de alumínio (1937)	Epilepsia focal recorrente, pequeno mal e crises de ausência	Semicrônico
<i>Estimulação química</i>		
Penicilina (1945)	Pequeno mal mioclônico, epilepsia corticoreticular generalizada	Agudo
Estricnina (1900)	Crises com foco cortical	Agudo
Ouabaína (1966)	Epilepsia límbica	Agudo
Pentilenotetrazol (1960)	Pequeno mal e crises generalizadas	Agudo
Picrotoxina (1960)	Epilepsias do lobo temporal (2)	Agudo e crônico (2)
Bicuculina (1970)	Epilepsia de longa duração (2)	Agudo e crônico (2)
Substâncias colinomiméticas (1949)	Epilepsias focais e do lobo temporal	Agudo e crônico
Hidrazinas e piridoxais (1949)	Crises generalizadas	Agudo
Insulina (1940)	Crises metabólicas	Agudo
<i>Estimulação elétrica</i>		
Eletrochoque (1870)	Epilepsia focal	Agudo
Abrasamento (1969)	Crises parciais e generalizadas, pequeno mal e auras	Agudo e crônico
<i>Neurotoxinas</i>		
Ácido caínico (1970)	Epilepsia do lobo temporal	Agudo e crônico
Ácido ibotênico (1979) Ácido domóico (1987) - ?	Epilepsia do lobo temporal Epilepsia do lobo temporal	Agudo e crônico Agudo e crônico

Fonte: Modificado de Mello et al. (1986)

Nota: Ao lado do modelo, entre parênteses, encontra-se o ano de sua descrição

1.8 Neurotransmissores e epilepsia

1.8.1 Sistema glutamatérgico/gabaérgico

Vários sistemas de neurotransmissores parecem estar envolvidos com os mecanismos da epileptogênese. Contudo, vários trabalhos sugerem que os principais mecanismos resultam de um desequilíbrio ocasionado pelo aumento da transmissão excitatória glutamatérgica e/ou diminuição da resposta inibitória gabaérgica (RIBEIRO et al., 2005).

O aminoácido L-glutamato é considerado o mais importante mediador de sinais excitatórios no SNC de mamíferos e está envolvido em muitos aspectos da função normal incluindo cognição, memória e aprendizagem (FONNUN, 1984; OTTERSEN; STORM-MATHISEN, 1984; HEADLEY; GRILLNER, 1990). Simultaneamente, o glutamato desempenha um importante papel no desenvolvimento do SNC, como indução sináptica, migração, diferenciação e morte celular (JOHNSTON, 1995; VALLANO, 1998).

O glutamato exerce seu papel por ativação dos receptores glutamatérgicos, localizados nas membranas pré e pós-sinápticas, bem como nas membranas das células gliais (MELDRUM et al., 1999). Desta forma, a concentração de glutamato no fluído extracelular é que determina a extensão da estimulação dos receptores (DANBOLT, 2000). Os receptores glutamatérgicos podem ser ionotrópicos (ativados pelo NMDA, AMPA ou cainato) e metabotrópicos e, portanto, acoplados a proteína G (COTMANN, 1995; PIN; DUVOISIN, 1995). Os receptores NMDA, AMPA e cainato são canais iônicos que abrem após serem ativados aumentando o influxo de Na^+ ou de Na^+ e Ca^{++} (DANBOLT, 2000). Portanto, a ativação destes receptores causa uma despolarização da membrana sináptica desencadeando uma resposta excitatória. O excesso de glutamato na fenda sináptica poderá induzir uma excessiva ativação de receptores glutamatérgicos levando à excitotoxicidade (OLNEY, 1981).

Existem várias indicações de que o cálcio tem um papel na epileptogênese (HEINEMANN; PUMAIN, 1981; PUMAIN et al., 1984). Durante as convulsões, a concentração de cálcio intracelular aumenta e o cálcio extracelular diminui (HEINEMANN et al., 1977). A origem do influxo de cálcio neuronal durante os potenciais epileptogênicos não é conhecida. A hipótese existente é que, num processo patológico como é o estado epiléptico, há liberação de glutamato que, por sua vez, ativa os receptores de NMDA levando à necrose

neuronal por elevação da concentração de cálcio, ativando, potencialmente, enzimas dependentes de cálcio (MELDRUM; GARTHWAITE, 1990). Assim, seria esperado que os antagonistas dos receptores de NMDA bloqueassem a entrada de cálcio e protegessem as células neuronais contra as lesões em várias condições patológicas, inclusive nas convulsões induzidas por pilocarpina. A provável participação do Ca^{++} , nestes processos, possibilita a investigação das ações dos bloqueadores de canais de cálcio sobre o desenvolvimento das convulsões.

A neurotransmissão sináptica inibitória no SNC de mamíferos é mediada principalmente pelo GABA. Este neurotransmissor é encontrado em altas concentrações no SNC (PAUL, 1995; OLSEN; De LOREY, 1999). Assim como o glutamato, o GABA é armazenado em vesículas sinápticas e liberado para o meio extracelular de modo dependente de Ca^{++} , onde ativa seus receptores. Os receptores gabaérgicos estão divididos em três tipos, de acordo com as propriedades farmacológicas, bioquímicas e eletrofisiológicas: GABA-A e GABA-C (ionotrópicos) e GABA-B (metabotrópico), (COOPER et al., 1996; OLSEN; De LOREY, 1999).

Os receptores GABA A e GABA C são, portanto, canais iônicos que permitem a entrada de Cl^- na célula, provocando uma hiperpolarização localizada na membrana neuronal o que dificulta o disparo do potencial de ação necessário para a liberação de neurotransmissores (PAUL, 1995). Assim, a ação do GABA desencadeia a redução da excitabilidade neuronal. Além do sítio para ligação do GABA, os receptores GABA A possuem sítios de ligação para os benzodiazepínicos, barbitúricos e álcool, dentre outros os quais atuam como agonistas da transmissão inibitória do GABA, sendo alguns desses fármacos comumente utilizados no tratamento de processos convulsivos (MEHTA; TCKU, 1999; RAOL et al., 2005).

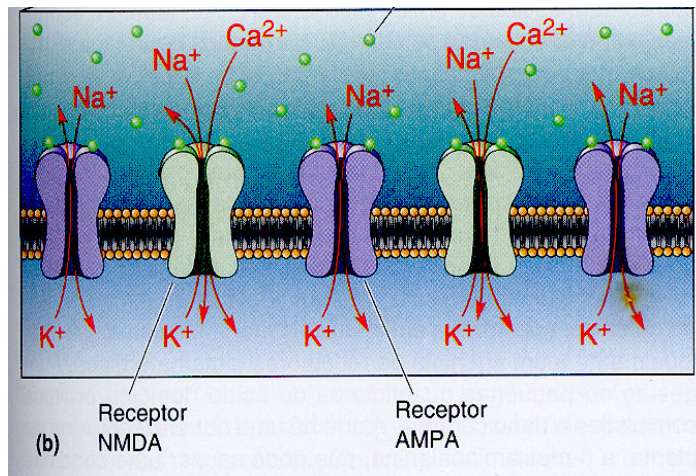


Figura 3 – Estrutura dos receptores Glutamatergicos
 Fonte: Bear, Connors e Paradiso (2002)

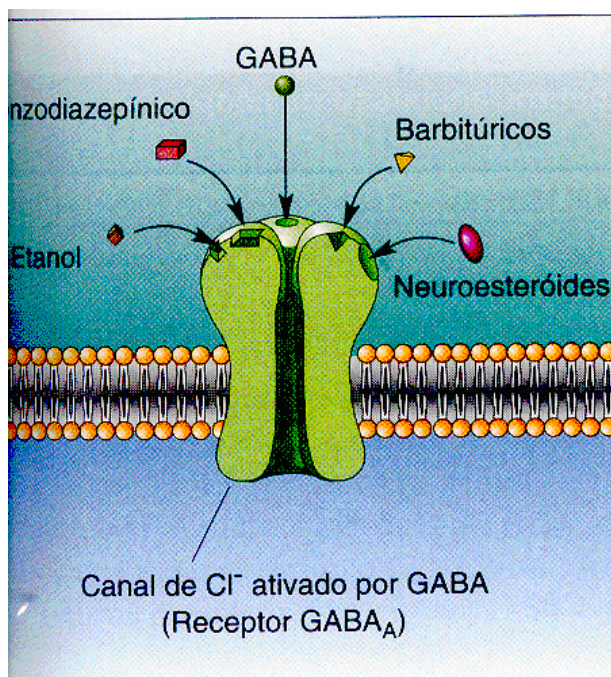


Figura 4 – Estrutura do receptor Gabaérgico
 Fonte: Bear, Connors e Paradiso (2002)

1.8.2 Sistema colinérgico

A acetilcolina é o neurotransmissor colinérgico que é responsável pelos principais efeitos excitatórios no cérebro (OLNEY et al., 1983 e 1986; NATHANSON et al., 1999). Os efeitos da acetilcolina no cérebro ocorrem com a ativação dos receptores colinérgicos muscarínicos, que correspondem a cerca de 99% dos receptores cerebrais, o restante corresponde aos receptores nicotínicos (PEPEU, 1983; ELGOYHEN et al., 2000)

Estudos sobre epileptogênese colinérgica têm favorecido o conhecimento das propriedades excitatórias da ACh (OLNEY et al., 1986; SAVOLAINEN; HIRVONEN, 1992). Vários modelos animais de convulsões induzidas por agentes colinérgicos têm recentemente sido desenvolvidos para explorar esses mecanismos, bem como, o papel do sistema colinérgico cerebral na epilepsia humana (OLNEY et al., 1983; TURSKI et al., 1983a, 1983b, 1983c, 1983d; JOPE et al., 1986; HIRSCH et al., 1992).

A clonagem gênica revelou a existência de cinco tipos de receptores muscarínicos (M1, M2, M3, M4, e M5) (BONNER et al., 1987; LIAO et al., 1989; NATHANSON et al., 1999), sendo todos eles receptores acoplados à proteína G, onde os membros com numeração ímpar (M1, M3, e M5), atuam através da via do fosfato de inositol, enquanto os de numeração par (M2 e M4) operam inibindo a adenilato ciclase, portanto, reduzindo o AMPc intracelular (PERALTA et al., 1987 e 1988; HULME et al., 1990; WESS et al., 1990)

Os receptores M1, também conhecidos como neurais, são principalmente encontrados nos neurônios do SNC e periféricos, bem como em células parietais gástricas. Atuam como mediadores dos efeitos excitatórios, tal excitação é produzida por uma redução na condutância ao potássio, que provoca despolarização da membrana.

1.8.3 Sistema dopaminérgico

A dopamina (DA) exerce seus efeitos biológicos por interagir com os receptores específicos. Esses receptores foram classificados originalmente segundo Keibabian e Calne (1979), como receptores dopaminérgicos D1 (RD1) e D2 (RD2). Realizam suas ações por se acoplarem e ativarem diferentes complexos de proteína G. O receptor D1 interage com o complexo de proteína Gs, resultando em ativação da adenilil ciclase e um aumento nos níveis

de AMPc intracelular. Os receptores D2 interagem com um complexo de proteína GI para inibir a produção de AMPc (COOPER et al., 1991; CIVELLI et al., 1993).

O avanço da biologia molecular (incluindo clonagem de genes) e o aperfeiçoamento de técnicas de radioligantes possibilitaram a identificação de quatro subtipos de receptores D2 (D2c, D2L, D3 e D4) e um subtipo de receptor D1 (D5). O receptor D2 foi dividido em dois subtipos: D2c (curto) e o D2L (longo), onde o D2L se diferencia do D2c por possuir 29 aminoácidos a mais na sua estrutura. Esses dois subtipos parecem ter uma farmacologia idêntica. Um terceiro subtipo de receptor D2 determinado foi D3, encontrado em altos níveis em certas regiões do sistema límbico cerebral, enquanto, baixos níveis são observados no corpo estriado. O perfil farmacológico do subtipo D3 é similar, mas não idêntico ao D2. O mecanismo efetor do subtipo D3 ainda não é conhecido (COOPER et al., 1991).

O quarto subtipo de receptor D2 recentemente clonado foi D4. O gene desse receptor possui alta homologia para os genes dos receptores D2 e D3. As características farmacológicas desse subtipo lembram as do D2 e D3 e o mecanismo efetor do D4 também é desconhecido (CIVELLI et al., 1993).

Os neurônios dopaminérgicos formam três sistemas principais. Cerca de 75% da dopamina no cérebro ocorrem na via *nigro estriatal*, cujos corpos celulares encontram na substância negra e cujos axônios terminam no corpo estriado. O segundo sistema importante é a via *mesolímbica/mesocortical*, cujos corpos celulares ocorrem em grupos no mesencéfalo com fibras que se projetam para partes do sistema límbico, particularmente, o *núcleo acumbente* e o *núcleo amigdalóide*, bem como para o córtex. Por fim, o sistema *túbero-hipofisário*, caracterizado por ser um grupo de neurônios curtos, que seguem seu trajeto do núcleo arqueado do hipotálamo para a eminência mediana e a hipófise, cujas secreções são por elas reguladas.

O sistema dopaminérgico tem sido também implicado em exercer uma importante função no mecanismo de propagação das convulsões (BARONE et al., 1990 a,b). A estimulação de receptores dopaminérgicos do tipo D1 parece potencializar, enquanto que o bloqueio desses receptores previne as convulsões induzidas por altas doses de pilocarpina. O inverso parece acontecer com os receptores D2 (BARONE et al., 1991).

1.9 Neuroproteção e estresse oxidativo

A prolongada excitação dos neurônios durante as convulsões pode levar a injúria e morte celular, resultantes de mecanismos bioquímicos ainda pouco esclarecidos. Um dos mecanismos propostos envolve a formação de uma quantidade excessiva de radicais livres (FLOYD, 1990; REITER et al., 1997) levando a alterações estruturais em proteínas celulares, membranas lipídicas, DNA e RNA (estresse oxidativo) (BENI; MORETTI, 1995). Em modelos de epilepsia em roedores, mostrou-se que o estresse oxidativo contribui em grande parte com a morte de células neuronais e gliais (ARNAIZ et al., 1998). O cérebro é um alvo preferencial do processo peroxidativo, pois apresenta uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados. Pesquisas sugerem que o aumento na quantidade de radicais livres e/ou diminuição nos sistemas de defesa antioxidantes foram reportados durante os processos convulsivos (BERG et al., 1995; NAFFAH-MAZZACORATTI et al., 2001).

Vários estudos relacionam o envolvimento do estresse oxidativo ao processo convulsivo e demonstraram um aumento em diversos marcadores de formação de espécies reativas (BASHKATOVA et al., 2003; PATSOUKIS et al., 2004) e proteína carbonila assim como redução na atividade da enzima Na⁺, K⁺-ATPase (PATSOUKIS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2004) em modelos de convulsão induzida pelo PTZ. Estes dados sugerem que a geração de ERO e ERN estariam relacionadas com os efeitos convulsivantes e neurotóxicos do PTZ. Do mesmo modo, o tratamento com antioxidantes foi capaz de atenuar as convulsões por PTZ e/ou os danos induzidos por espécies reativas (KABUTO et al., 1998; BASHKATOVA et al., 2003).

As espécies reativas de oxigênio são capazes de gerar estresse oxidativo em consequência de suas propriedades oxidantes e reação com os constituintes celulares (JOSEPHY, 1997; TIMBRELL, 2000). Estas são geradas por uma variedade de processos, podendo atacar uma diversidade de biomoléculas alvo, tais como DNA, lipídios e proteínas. As principais EROs vinculadas ao estresse oxidativo são o radical ânion superóxido (O⁻²), radical hidroxil (-OH), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito (ONOO⁻). Estes, por sua vez, são neutralizados por um elaborado sistema de defesa antioxidante constituído de enzimas tais como catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, além de sistemas de defesa não enzimáticos tais como vitaminas A, E e C,

flavonóides, ubiquinonas e glutathione reduzida (ALEXI et al., 1998; GIANNI et al., 2004). Neste contexto, o estado de estresse oxidativo pode resultar tanto de um aumento na produção de EROs, quanto na redução da capacidade antioxidante celular total (DAWSON; DAWSON, 1996; HALLIWELL, 1992). Estudos bioquímicos sugerem que reações de oxidação podem ser importantes em várias patologias cerebrais e estão associadas com um desequilíbrio da regulação redox no SNC (AMES et al., 1993; WEBER, 1999).

Existem várias maneiras de definir-se neuroproteção, contudo, de um modo geral, podemos afirmar que consiste em um conjunto de eventos e ou alternativas capazes de evitar danos neuronais, sejam estes acidentais ou não.

Diversos tipos de insultos, tais como hipóxia cerebral, isquemia trauma cerebral, entre outros, podem alterar a fisiologia do sistema nervoso central, tais danos podem ser modulados via atividade neurotransmissora excitatória excessiva ou pela redução na atividade neurotransmissora inibitória. Portanto, o aumento de sódio intracelular, bem como o de cálcio pode levar despolarizações celulares contribuindo, desta forma, para um aumento nos processos apoptóticos e excitotóxicos. (ALÉXIS et al., 2002).

1.10 Mecanismos de morte neuronal e epilepsia

A morte neuronal pode ser originada por pelo menos três mecanismos principais, que são eles: a ativação de cascatas excitotóxicas (aumento de cálcio intracelular, modificação nos níveis de aminoácidos excitatórios, ativação de óxido nítrico sintase, estresse oxidativo e produção de radicais livres de oxigênio), a indução de apoptose e o processo traumático (acidentes, pancadas).

Quando falamos em neuroproteção, devemos também ressaltar a homeostase do cálcio no meio celular e seu papel no desenvolvimento de mortes neuronais, sejam estas por estresse oxidativo ou por cascatas apoptóticas. Sabemos atualmente, que a concentração intracelular de cálcio pode ser alterada por diversos mecanismos moleculares, entre eles podemos citar:

- **Aumento na neurotransmissão de glutamato e excitotoxicidade:**

O Glutamato é um neurotransmissor excitatório que atua no sistema nervoso central e age em diversos tipos de receptores, os ionotrópicos (NMDA e AMPA), que estão relacionados com a permeabilidade de canais iônicos a diversos íons, como o cálcio e os metabotrópicos que estão acoplados a proteína G. Atividade excessiva de glutamato é observada em diversas patologias, tais como, epilepsia, hipóxia associada com isquemia e trauma craniano. A neurotoxicidade do glutamato tem sido apontada como um importante evento na injúria cerebral aguda. A estimulação de receptores glutamatérgicos induz a produção de superóxidos que constituem um dos mediadores da injúria neuronal excitotóxica no SNC. Radicais livres estão implicados em uma gama de processos fisiológicos e patológicos e anormalidades associadas com a SOD têm sido documentadas em processos neurodegenerativos (COYLE et al., 1993).

A neurotoxicidade glutamatérgica é, em parte, mediada por EROs formados como consequência de vários processos incluindo NO e a produção de peróxidos (ALABADI et al., 1999; NAKAKI et al., 2000; RADENOVIC'et al., 2003; LI et al., 2001). Radicais superóxidos reagem rapidamente com NO para formar peroxinitrito citotóxico, que atua através de peroxidação lipídica (LEE et al., 2001). Embora existam várias fontes intracelulares de radicais livres, a mitocôndria é a mais importante (CIRIOLO et al., 2001).

O glutamato exerce sua ação inibitória através da ligação com canais iônicos do tipo NMDA e não NMDA, de modo a aumentar a condutância ao cálcio e ao sódio, existindo um grande número de interações regulatórias entre a ativação de receptores glutamatérgicos e outros sistemas de neurotransmissores, transporte iônico, ativação gênica e modificação de receptor. A flexibilidade e complexidade destas interações colocam as transmissões mediadas pelo glutamato numa posição chave para a modulação do limiar de vias excitatórias na epileptogênese (CHAPMAN, 2000).

- **Canais iônicos e Epilepsia**

Os canais iônicos podem ser classificados como voltagem dependentes ou dependentes de ligantes quando o estímulo primário para sua atividade é a alteração no potencial de membrana ou a ligação de um mensageiro químico respectivamente. O papel de canais

iônicos na excitabilidade neuronal está bem estabelecido e a identificação de mutações nos genes associados à epilepsia hereditária enfatiza o balanço que mantém a homeostase elétrica no SNC (GEORGE, 2004).

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).

Canais de cálcio tornam-se permeáveis ao cálcio extracelular quando a membrana celular é despolarizada. Bloqueadores de canais de cálcio têm lugar estabelecido no tratamento de várias condições patológicas do SCV (FREHER et al., 1999). Contudo muitos tecidos fora do SCV são funcionalmente dependentes do influxo de cálcio extracelular através de canais iônicos na membrana celular.

O envolvimento de canais de cálcio na excitabilidade celular é demonstrado na capacidade de algumas drogas antiepilépticas em prevenir o desenvolvimento de crises convulsivas parciais e tônico-clônicas generalizadas. É sabido que o íon cálcio pode estar envolvido com a gênese do processo convulsivo, bloqueadores de canais de cálcio foram eficazes em prevenir as convulsões por eletrochoque e audiogênicas em camundongos (SAHADEVAN; REMA, 2002).

- **Alterações mitocondriais**

A mitocôndria funciona como um reservatório de cálcio para a célula, porém, esse cálcio pode, em condições patológicas ser lançado no citoplasma e esse excesso citoplasmático de cálcio poderia induzir a uma série de reações enzimáticas que culminariam em morte celular.

- **Formação de óxido nítrico (NO).**

O óxido nítrico é um gás expresso pelas células endoteliais em resposta a estímulos vasculares e liberado em condições fisiológicas, contudo, em condições patológicas este gás pode ser expresso através da enzima óxido nítrico sintase induzível, que ocorre em condições patológicas. Em condições fisiológicas, o óxido nítrico é liberado nas células endoteliais com papel neuroprotetor, dilatando e aumentando o fluxo sanguíneo e a irrigação cerebral. Contudo, a enzima i-NOS é ativada em células inflamatórias, como, por exemplo, as originadas de lesões isquêmicas.

Constitui um importante mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais. Possui, ainda, um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto, o NO é potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante. A determinação laboratorial do NO é complexa, a caracterização de ativadores e inibidores específicos da síntese de NO constitui o novo desafio para o entendimento e o tratamento de várias doenças. Estudos envolvendo o NO têm sido um dos principais alvos da indústria farmacêutica.

A síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS). Uma variedade de isoformas de NOS tem sido purificada em diferentes tecidos de mamíferos e muitas já tiveram seus genes clonados. Estudos bioquímicos e análise seqüencial de aminoácidos revelaram que estas isoformas representam uma família de proteínas e, aparentemente, são produtos de três genes distintos. Assim, as isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio (Ca^{++}) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, bem como a NOS induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas.

A c-NOS e a i-NOS diferem quanto ao peso molecular, à forma de ativação e à capacidade de síntese de NO, já foram caracterizadas, purificadas e tiveram os genes clonados. A isoforma constitutiva compreende a NOS neuronal (n-NOS, tipo I), presente normalmente nos neurônios, bem como a NOS endotelial (e-NOS, tipo III), presente

normalmente nas células endoteliais vasculares e nas plaquetas. As isoformas da NOS estão esquematizadas

A c-NOS produz pequenas quantidades de NO, da ordem de nano ou picomols, e sua ativação depende da interação com a calmodulina, que, por sua vez, é controlada pelos níveis de Ca^{++} . A i-NOS não é expressa sob condições normais, é induzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, incluindo-se macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condriócitos, neutrófilos e plaquetas. Esta isoforma requer algumas horas para ser expressa, mas, uma vez sintetizada, libera quantidades maiores de NO que a c-NOS e a produção deste continua indefinidamente até que a L-arginina ou os cofatores necessários para sua síntese sejam depletados ou ocorra a morte celular.

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 nucleicos, danificando-as. Além disso, seus prováveis produtos de decomposição, o $\text{OH}\cdot$, 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, 1998b).

2 OBJETIVOS

- **GERAL**

Avaliação dos efeitos neuroprotetores da Doxiciclina 25, 50 ou 100mg/kg sobre a fase aguda do processo convulsivo em ratos Wistar machos (200-230g). As doses utilizadas foram escolhidas de forma que não ultrapassassem a dosagem terapêutica usual em humanos (100mg/kg), em dados da literatura e experimentos piloto, visando garantir a total integridade fisiológica dos animais e evitando, desta forma, efeitos tóxicos.

- **ESPECÍFICOS**

- ✓ Avaliação de aspectos comportamentais
- ✓ Determinação de latências de convulsão e de morte
- ✓ Atividade antioxidante: Determinação da atividade da Catalase, TBARS e Nitrito.
- ✓ Aspectos neuroquímicos: Determinação da concentração de aminoácidos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso variando entre 200 e 230 gramas, 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 06 animais, em condições ambientais semelhantes, com ciclo claro / escuro alternado de 12 horas, recebendo ração padrão tipo Purina e água *ad libitum*.



Figura 5 – Acondicionamento dos animais

3.2 Tratamento dos animais

Ratos albinos Wistar (200-230g) foram pré-tratados com Doxiciclina 25, 50 ou 100mg/kg diariamente durante sete dias, no sétimo dia, após a última administração de doxiciclina, foi administrada uma dose única de pilocarpina 300mg/kg. O grupo controle recebeu salina a 0,9% e, no último dia, após a última administração de salina, também recebeu a mesma dose de pilocarpina.

Observações comportamentais foram realizadas após os tratamentos. Os animais foram tratados diariamente com doxiciclina (25, 50 ou 100mg/kg) durante 7 dias. No sétimo dia, meia hora após a última administração de doxiciclina, foi administrada pilocarpina (300mg/kg) e os animais foram observados durante 7 horas. Após as sete horas de observação, aqueles que sobreviveram ao estresse convulsivo foram decapitados e seus encéfalos foram retirados sob o gelo para que se isole a área cerebral em estudo (córtex temporal).

Tabela 1 – Grupos experimentais

GRUPOS EXPERIMENTAIS	DROGAS UTILIZADAS
GRUPO NORMAL	H ₂ O Destilada
CONTROLE P300	Pilocarpina 300 mg/kg
D25 + P300	Doxiciclina 25mg/kg + Pilocarpina 300 mg/kg
D50 + P300	Doxiciclina 50mg/kg + Pilocarpina 300 mg/kg
D100 + P300	Doxiciclina 100mg/kg + Pilocarpina 300 mg/kg
D50	Doxiciclina 50mg/kg

3.3 Estudo comportamental

Os animais tratados e controles são colocados em gaiolas contendo 6 animais, em ambiente reservado, sendo feita a observação direta. Os animais foram observados após a última administração da droga, no sétimo dia e durante sete horas conforme protocolo já estabelecido.

Quadro 7 - Parâmetros comportamentais observados

Parâmetros	Características
Sinais colinérgicos periféricos (SCP)	Miose, cromodacriorréia, piloereção, diarreia
Tremores	
Movimentos estereotipados	Aumento das atividades de roer, coçar-se e mastigar
Latência da primeira convulsão	Tempo (em segundos) para o aparecimento da primeira convulsão (tônico / clônica com ou sem <i>rearing</i>)
Estado epilético	Convulsões intermitentes durante 30 minutos

3.4 Drogas e materiais utilizados

3.4.1 Pilocarpina

Cloridrato de pilocarpina (Sigma Chemical Co.,USA) dissolvida em água destilada e administrada via intraperitoneal.

3.4.2. Cloridrato de doxiciclina

Foram preparadas soluções de 25, 50 e 100 mg/kg de doxiciclina HCL (Galena) em água destilada e administrada via intraperitoneal.

3.4.3 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 refrigerada (modelo Eppendorf);
- Centrífuga (modelo J-21C, Beckman, CA, USA);
- Cubetas para leitura em espectrofômetro (Sarstedt, Alemanha Oriental);
- Espectrofotômetro (Modelo Beckman DU, Fullerton, CA, USA) com medidor de absorvância digital e outros acessórios (acoplado ao sistema de modernização Gilford, Oberlin, Ohio, USA);
- Estufa de secagem e esterilização (modelo 315 SE FANEN, SP, Brasil);
- Guilhotina (Harvard, USA);
- Homogeneizadores (Bellico, USA);
- Micropipetas (H,E. Pedersen, Dinamarca)
- Medidor de pH, modelo B374 (Micronal, SP, Brasil).

3.5 Protocolo experimental

Os animais foram tratados durante sete dias com doxiciclina 25, 50 ou 100mg/kg intraperitonealmente pela manhã. No último dia de tratamento (sétimo dia), meia hora após a última administração de doxiciclina, os animais receberam uma dose de 300mg/kg de pilocarpina intraperitonealmente para se iniciar a experimentação.

3.6 Técnicas experimentais

3.6.1 Dosagens de aminoácidos (HPLC)

Para a determinação dos níveis de aminoácidos em córtex cerebral dos animais, foi retirada a área cerebral correspondente ao córtex temporal para a posterior preparação dos homogenatos.

Para a preparação do homogenato, foi utilizado um volume de 10% da área em ácido perclórico 0,1M.

3.6.1.1 Procedimento

As determinações de aminoácidos foram determinadas através do uso de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), que consiste em uma pré-coluna de derivatização na presença de ortoftaraldeído (OPA). O aparelho foi programado com um detector fluorimétrico (330-450)nm acoplado a um integrador.

A coluna cromatográfica utilizada foi a C18, 250 × 4.6mm, 5 μ que percorria a coluna a uma velocidade de 1.0 ml/min. A fase móvel **A** consistiu em 50mM NaH₂PO₄ em 20% de metanol ajustada para PH de 5.5. A fase móvel **B** consistiu em 100% de metanol. As fases foram preparadas com água ultramente purificada (Mili-Q system) e filtrada com o uso de filtros milipore de 0.22 μ m.

Preparo das amostras:

Os sete aminoácidos analisados foram preparados em fase móvel A. Para o preparo das amostras, foi utilizado homogenatos cerebrais à 10% em ácido perclórico 0.1M. Após o preparo, estes foram centrifugados à 14000rpm durante 30 minutos e o sobrenadante filtrado em filtros milipore 0.22 μ m.

Solução de Derivatização:

13.5mg de OPA foi dissolvido em 250 μ l de etanol, juntamente com 10 μ l de 2-mercaptoetanol, o volume da solução foi então completado para 2.25ml com tampão borato, pH 9.3. A solução foi filtrada com o milipore 0.22 μ m. A solução foi acondicionada em vidro âmbar no refrigerador, por no máximo duas semanas. Para as derivatizações, 20 μ l da amostra foi diluída em 20 μ l de OPA e injetada no HPLC após um minuto de agitação.

3.6.1.2 Determinação fluorimétrica de aminoácidos (aa) por gradiente

Para o funcionamento do aparelho, e do gradiente foi necessária a preparação das duas fases móveis:

FASE MÓVEL A:

- 50 mM NaH₂PO₄
- **Volume final = 250 ml**
- 20% v/v MetOH

- pH = 5.5

FASE MÓVEL B:

- Metanol puro (Padrão HPLC)

DERIVATIZAÇÃO PRÉ-COLUNA

TAMPÃO BORATO

- Bórax 1,24g

- Água Mili Q

- Levar o pH para 9,3 (com NaOH ou HCL) → **Volume final = 50 ml**



Figura 6 – HPLC (High Performance Liquid Cromatography)

3.6.2 Atividade antioxidante

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

MÉTODO

Ratos Wistar, machos (200-230g), foram utilizados para a obtenção do homogeneizado de cérebro, conforme descrito a seguir. Os animais foram observados durante 7h após administração da pilocarpina (300mg/kg). Aqueles que sobreviveram ao período de observação foram sacrificados e o cérebro dissecado para a retirada do córtex temporal. No grupo tratado somente com pilocarpina 300mg/kg, foram utilizados somente os animais que apresentaram convulsão e estado epilético.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O grau de lipoperoxidação nas áreas cerebrais 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 (1mg/mL), foi preparado 4mL (em triplicata) de soluções a 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL. O branco foi feito com água destilada (4 mL) e a cada tudo das soluções de MDA 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 532 nm após 1 min da adição do DTNB, e determinada a equação da curva padrão de MDA.

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

$\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ (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

3.6.2.2 Determinação da produção de nitrito**MÉTODO DA PREPARAÇÃO DA CURVA-PADRÃO**

Foi pesado 7mg de NaNO_2 e dissolvido em 10 mL de água bidestilada (estoque-10mM) foi feita as diluições em série (10 e 20x), ficando 1mM, 100 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM , 0,625 μM , 0,312 μM . Foi feita uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN et al., 1981).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Em um tubo branco, foi adicionado 500 μL do reagente mais 500 μL de água destilada, em um outro tubo teste, foi adicionado 500 μL do reagente mais 500 μl do homogenato de

tecido a 10% em água destilada. Foi feita a leitura em espectrofotômetro a 560nm e os resultados expressos em nM.

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, houve posteriormente a adição de 20 mL de acetonitrila (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) e 10 mL de tetrahidrofurano (Sigma, MO, EUA) para um volume final de 500 mL.

3.6.2.3 Determinação da atividade enzimática da catalase (CAT).

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 Maehly e Chance (1954) e Chance e Maehly (1955).

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 automática 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.



Figura 7 – Dissecação do córtex temporal. (visão frontal)

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Foi preparado o meio da reação com H₂O₂ (18 mL) mais Tampão Tris HCl 1M, EDTA 5M 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).

SOLUÇÕES REAGENTES

As seguintes soluções reagentes foram empregadas nessa técnica:

Tampão Tris HCl 1M, EDTA 5 mM, pH 8,0

Pesou-se 12,11 de Trisma Base (1M) e 0,19 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).

Análise estatística

Os dados foram expressos como média ± EPM e analisados com ANOVA seguidos de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. Resultados foram considerados significantes com p<0.05

4 RESULTADOS

4.1 Estudo comportamental

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.

Após 3 a 5 minutos da injeção de pilocarpina, os animais apresentaram mudanças comportamentais, incluindo acinesia, movimentos estereotipados e aumento dos sinais colinérgicos periféricos (miose, piloereção, cromodacriorréia, diarreia e movimentos mastigatórios). Essas mudanças foram menos pronunciadas nos grupos pré-tratados com doxiciclina.

Tabela 2 - Percentagem de alterações comportamentais após a administração de pilocarpina (P300) em ratos Wistar machos pré-tratados ou não com doxiciclina (D25, D50 ou D100)

Alterações comportamentais (%)	P300	D25+P300	D50+P300	D100+P300
Número de animais	20	20	20	12
SCP*	100	100	100	100
ME** (Número de animais)	4	5	5	00
Convulsões	100(20)	100(20)	88.9(18)	16.7(02)***
Morte	100(20)	100(20)	100(20)	100(12)

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

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

*** Significativo em relação ao grupo controle P300

4.1.1 Latência de convulsão

Poucos minutos após a administração de pilocarpina, 300mg/Kg, i.p. (P300) os animais mostraram sinais colinérgicos periféricos (miose, piloereção, cromodacriorréia, diarreia, tremores), e movimentos estereotipados, seguidos por convulsões motoras límbicas.

Na observação dos animais que convulsionaram, podemos verificar que o tempo em segundos decorrido para o aparecimento da primeira convulsão foi significativamente aumentado em todos os grupos pré-tratados com doxiciclina, quando comparados ao controle (P300). Contudo, o maior efeito (423 %) foi observado com a dose de 25mg/kg. (**Controle P300** = 740 ± 77.00 ; **D25 + P300** = 3870 ± 426.5 ; **D50 + P300** = 2820 ± 381.1 ; **D100 + P300** = 2091 ± 247.2). Ademais, nenhuma diferença significativa foi demonstrada entre as doses de 25 e 50 mg/kg, sugerindo que o efeito máximo da droga já foi obtido. Sinais colinérgicos periféricos e movimentos estereotipados permaneceram inalterados em todos os grupos pré-tratados com doxiciclina. Nenhum animal, dos grupos que receberam apenas água destilada ou apenas doxiciclina apresentou atividade convulsiva (**Figura 8**).

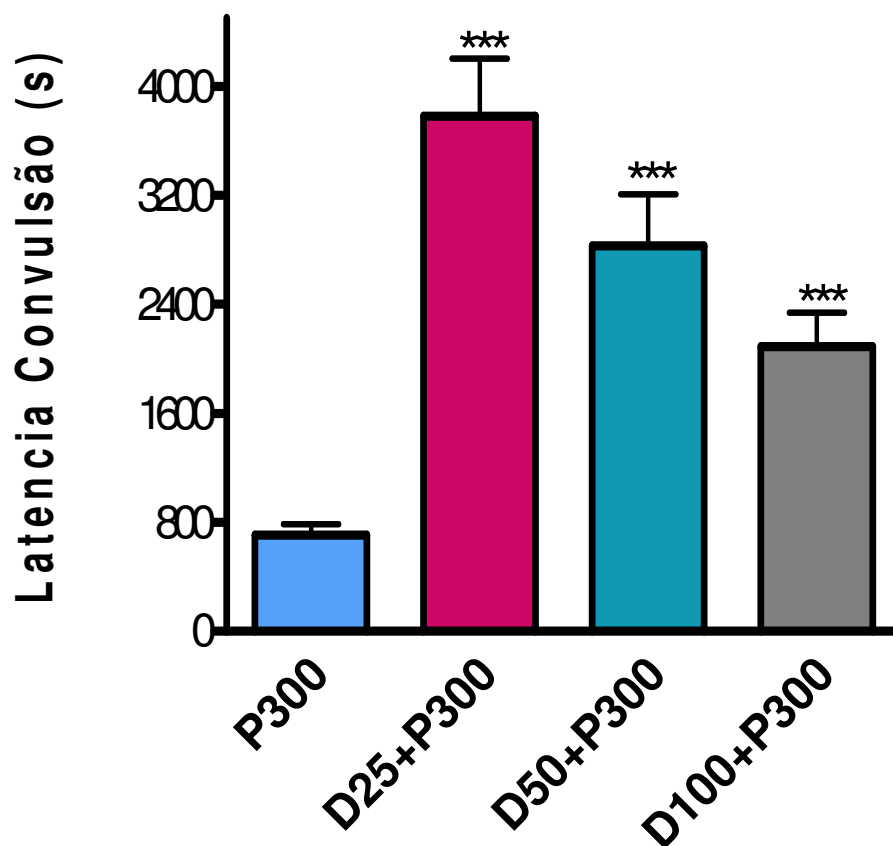


Figura 8 - Latência da primeira convulsão após a administração de pilocarpina (P300) em ratos machos pré-tratados ou não com Doxícilina (D25, D50 ou D100)

Ratos Wistar machos (200 – 230g) foram tratados ou não com Doxícilina (25, 50 ou 100mg/kg, i.p.) durante 7 dias e após 30 minutos da última administração da droga, com pilocarpina (300mg/kg, i.p.). Os controles receberam água destilada durante sete dias (10ml/kg) seguidos de P300 no último dia. Os animais foram submetidos a um período de 7 h de observação. As barras representam média, \pm E.P.M (N=6). *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*.)

4.1.2 Latência de morte

Na observação dos animais que não morreram, verificamos que a latência de morte em segundos foi significativamente aumentada em todos os grupos pré-tratados com doxiciclina, quando comparados ao controle. (**Controle P300** = $1638 \pm 648,5$; **D25 + P300** = 8030 ± 1055 ; **D50 + P300** = 10771 ± 1477 ; **D100 + P300** = 6877 ± 1010). Interessantemente, este aumento não ocorreu de forma dose dependente, tendo sido maior na dose de 50mg/kg. Nesse parâmetro, ao contrário do anterior, foi notado dose efeito com as duas primeiras doses. Contudo, apesar do aumento do tempo de morte com a dose maior de doxiciclina, o efeito foi menor com relação às outras duas doses, indicando uma possível toxicidade da doxiciclina com esta maior dose.

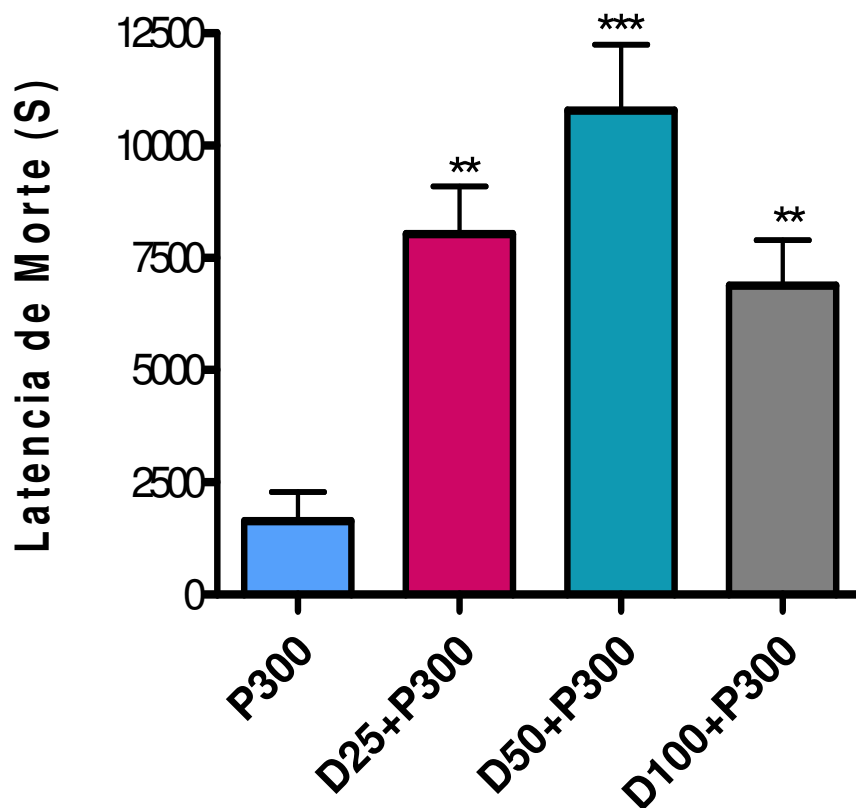


Figura 9 - Latência de morte após a administração de pilocarpina (P300) em ratos machos pré-tratados ou não com Doxiciclina (D50 ou D100)

Ratos Wistar machos (200 – 230g) foram tratados ou não com Doxiciclina (25, 50 ou 100mg/kg, i.p.) durante 7 dias e após 30 minutos da última administração da droga com pilocarpina (300mg/kg, i.p.). Os controles receberam água destilada durante sete dias (10ml/kg) seguidos de P300 no último dia. Os animais foram submetidos a um período de 7h de observação. As barras representam média, \pm E.P.M. *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

4.2 Avaliação da peroxidação lipídica

Para realizarmos os estudos das atividades antioxidantes, decidimos nos concentrar em apenas uma dose, que, no caso, foi a dose intermediária (50mg/kg), tendo em vista o grande volume de áreas experimentais já dissecadas em relação aos demais grupos, que, até então, seriam suficientes para realizarmos apenas uma parte dos experimentos até o momento atual.

4.2.1 Verificação da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) após administração de pilocarpina 300mg/kg (P300) em córtex temporal de ratos pré-tratados ou não com doxiciclina 50 mg/kg (D50)

Os resultados da verificação da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em córtex temporal de ratos adultos tratados ou não com Doxiciclina (50mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração de pilocarpina na dose de 300mg/Kg, i.p., e sacrificados 7h após a última administração, foram expressos em μmol de MDA/ grama de tecido.

Podemos observar claramente um aumento nos níveis de TBARS, indicativo de peroxidação lipídica verificado quando os animais são submetidos ao tratamento com pilocarpina 300 mg/kg ou Doxiciclina 50 mg/kg administrados isoladamente em relação ao grupo normal (H_2O). Contudo, uma redução significativa nos níveis de TBARS foi notada nos grupos P300 pré-tratados com doxiciclina em relação ao grupo controle P300 após 7h de observação (**Controle P300** = $2,28 \pm 0,047$; **D50+P300** = $1,71 \pm 0,117$; **D50** = $2,35 \pm 0,120$ **H₂O** = $1,15 \pm 0,054$) (**Figura 10**).

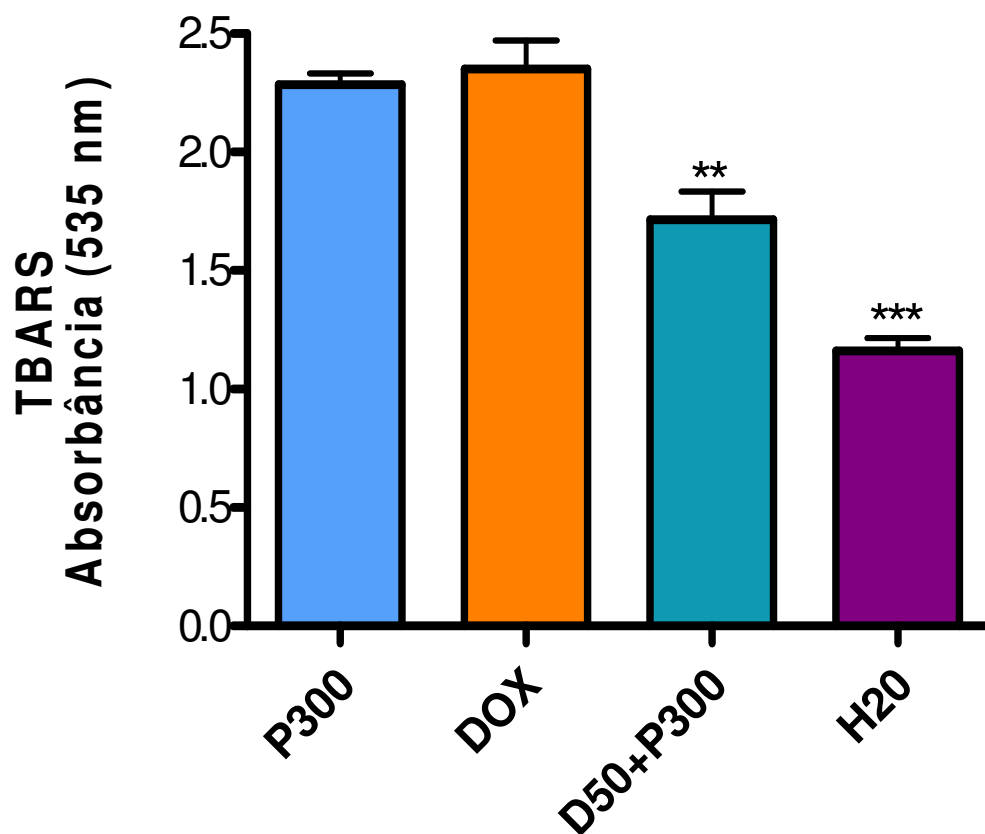


Figura 10 - Avaliação da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) após a administração de P300 em córtex temporal de ratos adultos pré-tratados ou não com Doxíciclina 50mg/Kg.

Ratos Wistar machos foram tratados ou não com Doxíciclina (50mg/kg, i.p.) durante sete dias e após 30 minutos da última administração com pilocarpina (300mg/kg, i.p.). Os controles receberam água destilada durante sete dias (10 ml/kg), seguidos de P300. Os animais foram submetidos a um período de 7h de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A peroxidação lipídica foi determinada em homogenatos de córtex temporal desses animais conforme discutido em materiais e métodos. As barras representam media, \pm E.P.M. *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

4.2.2 Avaliação da produção de nitrito após administração de pilocarpina 300mg/kg (P300) em córtex temporal de ratos adultos pré-tratados ou não com doxiciclina 50mg/kg (D50)

Os resultados da determinação da produção de nitrito em córtex temporal de ratos adultos administrados com P300 e pré-tratados ou não com Doxiciclina (50mg/kg, i.p.). A administração de pilocarpina na dose de 300mg/kg, i.p., ocorreu 30 minutos após a última dose de doxiciclina e os animais foram sacrificados 7 horas depois. Os resultados foram expressos em μM .

O pré-tratamento com doxiciclina foi capaz de reduzir significativamente os níveis de nitrito no córtex temporal desses animais em relação ao grupo controle P300. (**Controle P300** = $1,290 \pm 0,072$; **D50** = $0,368 \pm 0,024$; **D50+P300** = $0,358 \pm 0,016$; **H₂O** = $0,350 \pm 0,009$) (**Figura 3**). O grupo controle normal (H₂O) apresentou níveis basais de nitrito bem inferiores aos níveis encontrados no grupo controle P300. Do mesmo modo, o grupo tratado apenas com doxiciclina apresentou níveis de nitrito semelhantes aos do grupo normal (H₂O).

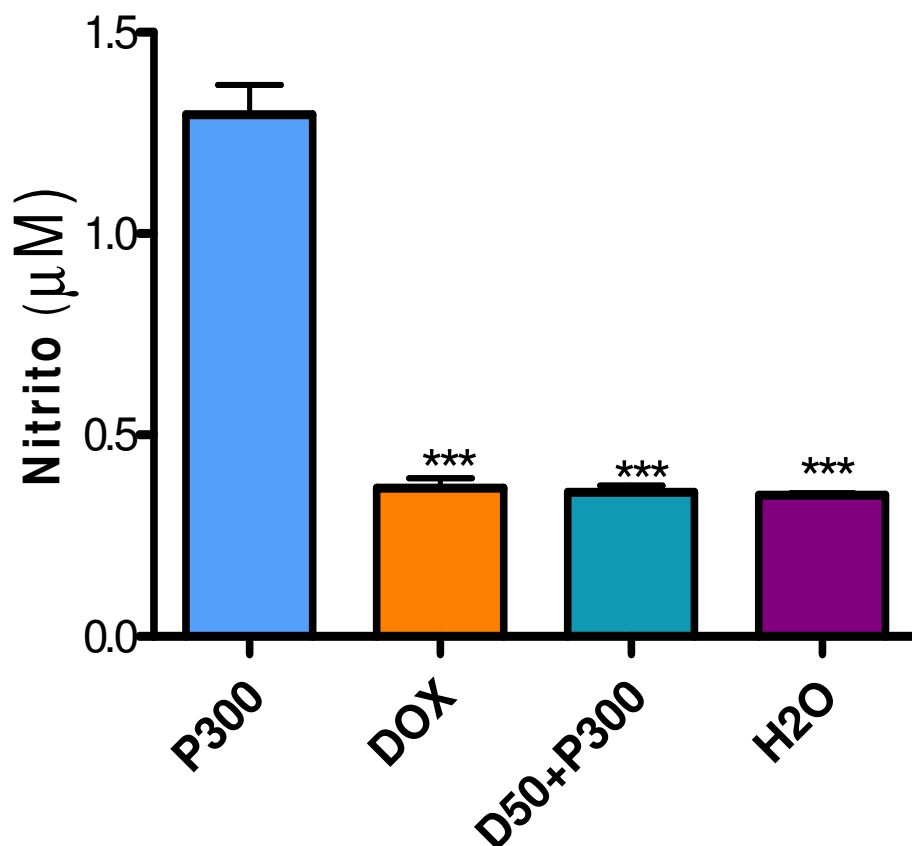


Figura 11 – Avaliação da produção de nitrito após administração de P300 em córtex temporal de ratos adultos pré-tratados ou não com Doxiciclina 50 mg/Kg

Ratos Wistar machos adultos foram tratados com Doxiciclina (50mg/kg, i.p.) durante sete dias e após 30 minutos da última administração da droga com pilocarpina (300mg/kg, i.p.). Os controles receberam água destilada durante sete dias 10ml/kg, seguidos de P300. Os animais foram observados durante 7h. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A produção de nitrito foi determinada em 100 μ L de homogenato. As barras representam media, \pm E.P.M. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo P300. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

4.2.3 Avaliação da atividade da catalase após administração de pilocarpina 300mg/kg (P300) em córtex temporal de ratos adultos pré-tratados ou não com doxiciclina 50mg/kg (D50)

Os resultados da verificação da atividade da catalase em córtex temporal de ratos adultos pré-tratados ou não com Doxiciclina (50mg/Kg, i.p.) 30 minutos antes da administração de pilocarpina na dose de 300mg/Kg, i.p., e sacrificados 7h após a última administração, foram expressos como absorbância em nm.

O pré-tratamento com doxiciclina, foi capaz de reduzir significativamente atividade da catalase no córtex temporal desses animais em relação ao grupo controle P300. (**Controle P300** = $52,40 \pm 10,39$; **D50** = $6,030 \pm 1,93$; **D50+P300** = $16,92 \pm 2,63$; **H₂O** = $9,215 \pm 2,89$) (**Figura 3**). O grupo controle normal (H₂O) apresentou níveis basais de catalase bem inferiores aos níveis encontrados no grupo controle P300 e semelhantes aos dos grupos com doxiciclina sozinha ou na presença de P300.

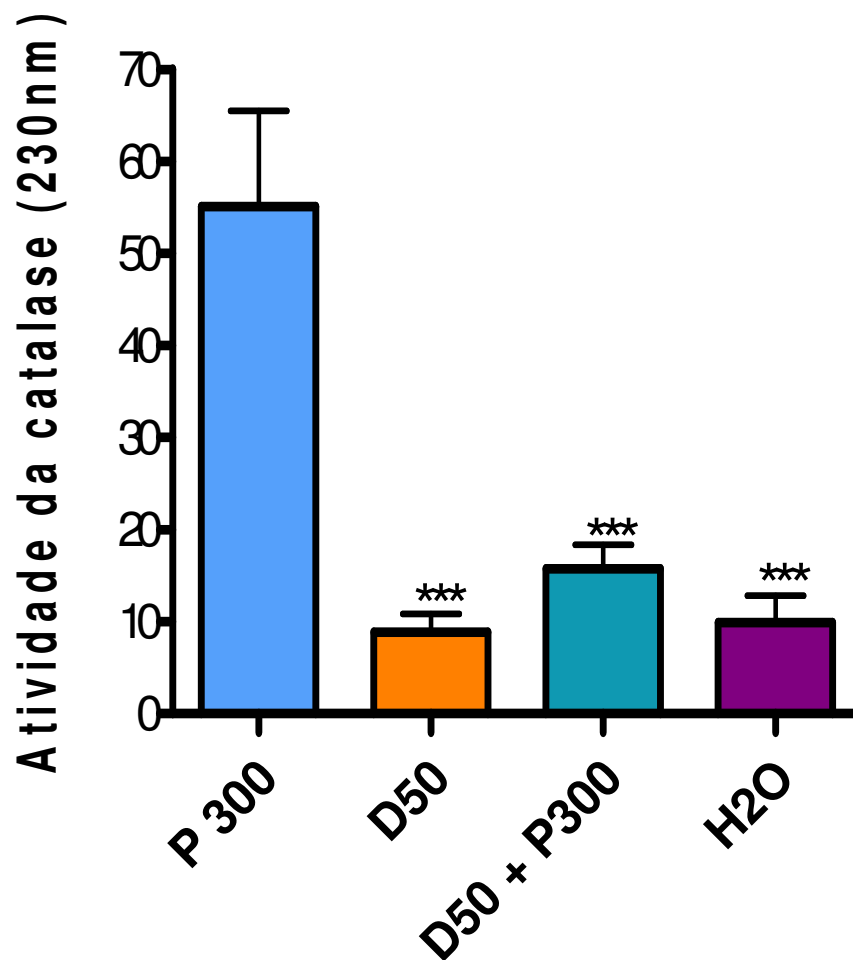


Figura 12 - Atividade da catalase após a administração de pilocarpina em corpo estriado de ratos adultos machos pré-tratados ou não com Doxícilina 50 (D50)

Ratos Wistar machos (200-230g) foram tratados com Doxícilina (50mg/kg, i.p.) durante sete dias e 30 minutos após a última administração da droga com pilocarpina (300mg/kg, i.p.). Os controles receberam água destilada, seguidos de P300. Os animais foram observados durante 7 h. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A atividade da catalase foi determinada em 20 μ L de homogenato como descrito em materiais e métodos. As barras representam a média, \pm E.P.M. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle P300. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

4.3 Aspectos neuroquímicos (HPLC)

Efeitos do pré-tratamento com doxiciclina 25, 50 ou 100mg/kg sobre a concentração de aminoácidos em córtex temporal de ratos adultos após a administração da pilocarpina 300mg/kg (P300).

Os resultados das determinações dos níveis de aminoácidos em córtex temporal de ratos adultos tratados com doxiciclina 25, 50 ou 100mg/kg, i.p., durante sete dias e após a última administração injetados com pilocarpina 300 mg/kg, i.p., e sacrificados 7h depois foram expressos em ng/grama de tecido, e apresentados nas figuras 13 à 16.

A figura 13 mostra os resultados da determinação dos níveis de aspartato no córtex temporal dos animais nos diversos grupos estudados. Observou-se uma redução significativa no grupo P300 pré-tratado com doxiciclina (100mg/kg) com relação aos grupos H₂O e P300. Enquanto uma tendência à redução nos níveis de aspartato foi observada no grupo D25+P300, os valores deste aminoácido no grupo D50+P300 mantiveram-se inalterados.

4.3.1 Determinação dos níveis de Aspartato

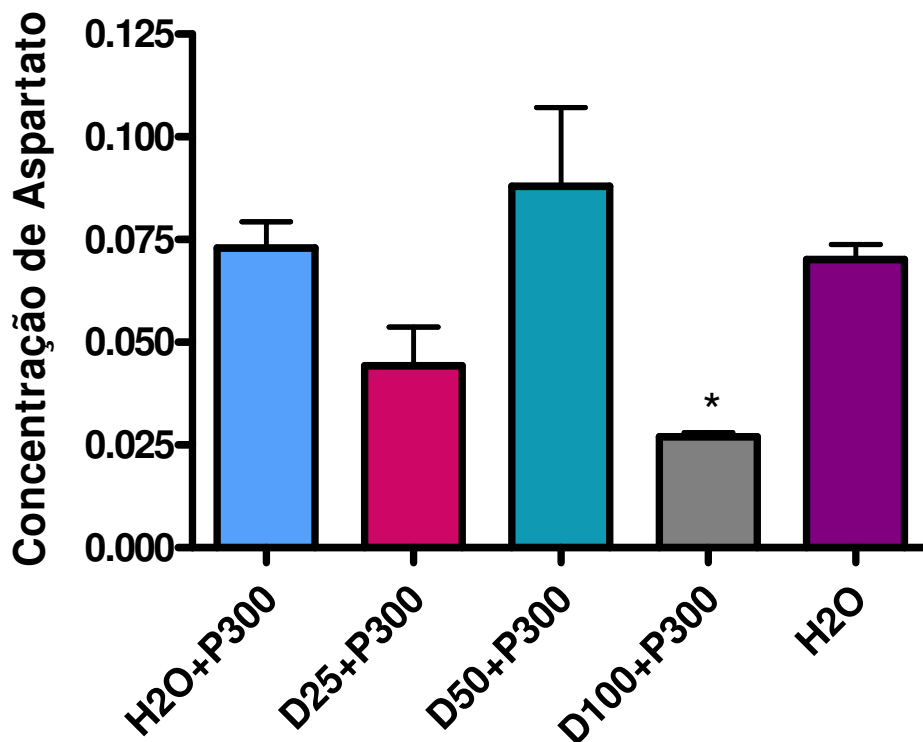


Figura 13 – Efeitos da Doxíciclina sobre as concentrações de Aspartato (ng/grama de tecido) em córtex temporal de ratos no modelo de convulsão induzido por pilocarpina

Ratos Wistar machos (200 – 230g) foram pré-tratados ou não com Doxíciclina (25, 50 ou 100mg/kg, i.p.) e após 30 minutos com pilocarpina (300mg/kg, i.p.). Os controles receberam água destilada, seguidos de P300. Os animais foram submetidos a um período de 7h de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de aspartato foi determinada em 20 μ L de homogenato. As barras representam media, \pm E.P.M. * $p < 0,05$ comparado ao grupo H2O e ao controle P300. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls).

4.3.2 Determinação dos níveis de Glutamato

A **Figura 14** mostra uma redução significativa nos níveis de glutamato nos grupos P300 pré-tratados com doxiciclina nas três doses estudadas em relação ao grupo **P300**, sendo que estes valores foram semelhantes ao grupo **H₂O, controle P300** ($0,107 \pm 0,0048$), **D25+P300** ($0,062 \pm 0,0035$) **D50+P300** ($0,077 \pm 0,0035$) e **D100+P300** ($0,072 \pm 0,0033$), e **H₂O** ($0,616 \pm 0,0013$).

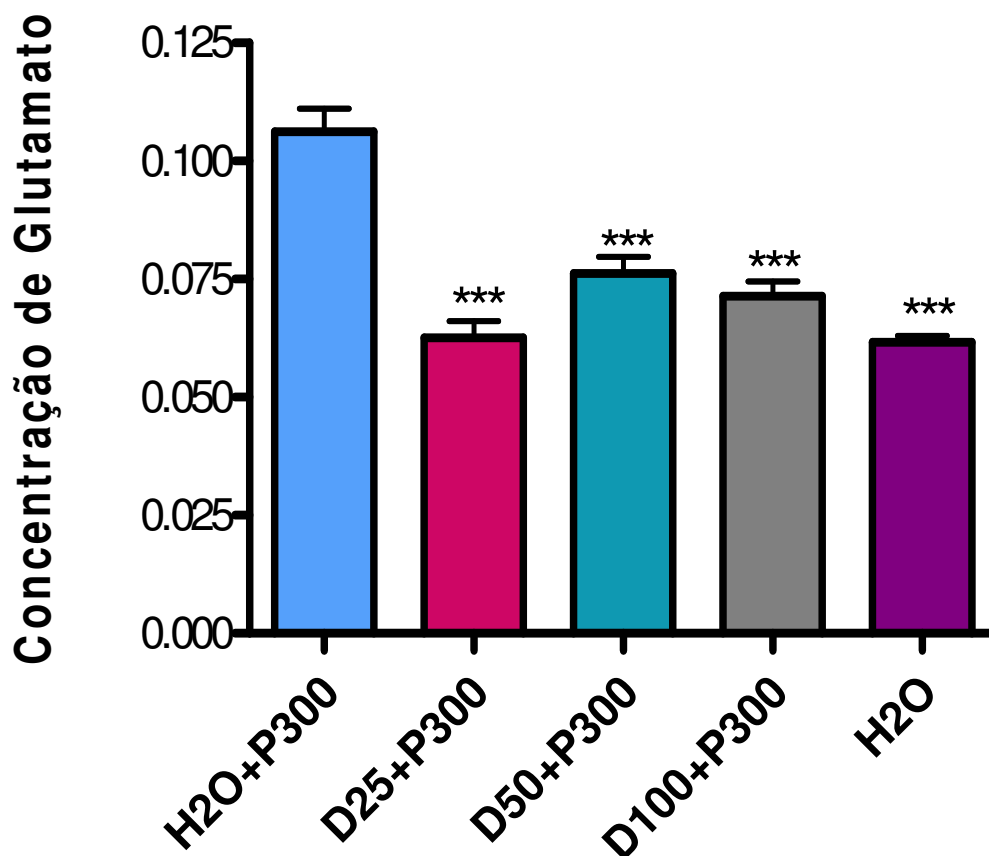


Figura 14 – Efeitos da Doxíciclina sobre as concentrações de Glutamato (ng/grama de tecido) em córtex temporal de ratos no modelo de convulsões induzidas por pilocarpina

Ratos Wistar machos (200 – 230g) foram pré-tratados ou não com Doxíciclina (25, 50 ou 100mg/kg, i.p.) e após 30 minutos com pilocarpina (300mg/kg, i.p.). Os controles receberam água, seguidos de P300. Os animais foram submetidos a um período de 7h de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de glutamato foi determinada em 20 μ L de homogenato. As barras representam media, \pm E.P.M. *** p<0,001 comparado ao grupo H2O e controle P300. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

4.3.3 Determinação dos níveis de GABA

A **Figura 15** mostra um aumento significativo nos níveis de GABA nos grupos P300 pré-tratados com doxiciclina com relação ao grupo administrado apenas com P300, **controle P300** ($0,033 \pm 0,0028$), **D25+P300** ($0,0632 \pm 0,0068$), **D50+P300** ($0,07 \pm 0,004$) e **D100+P300** ($0,063 \pm 0,003$).

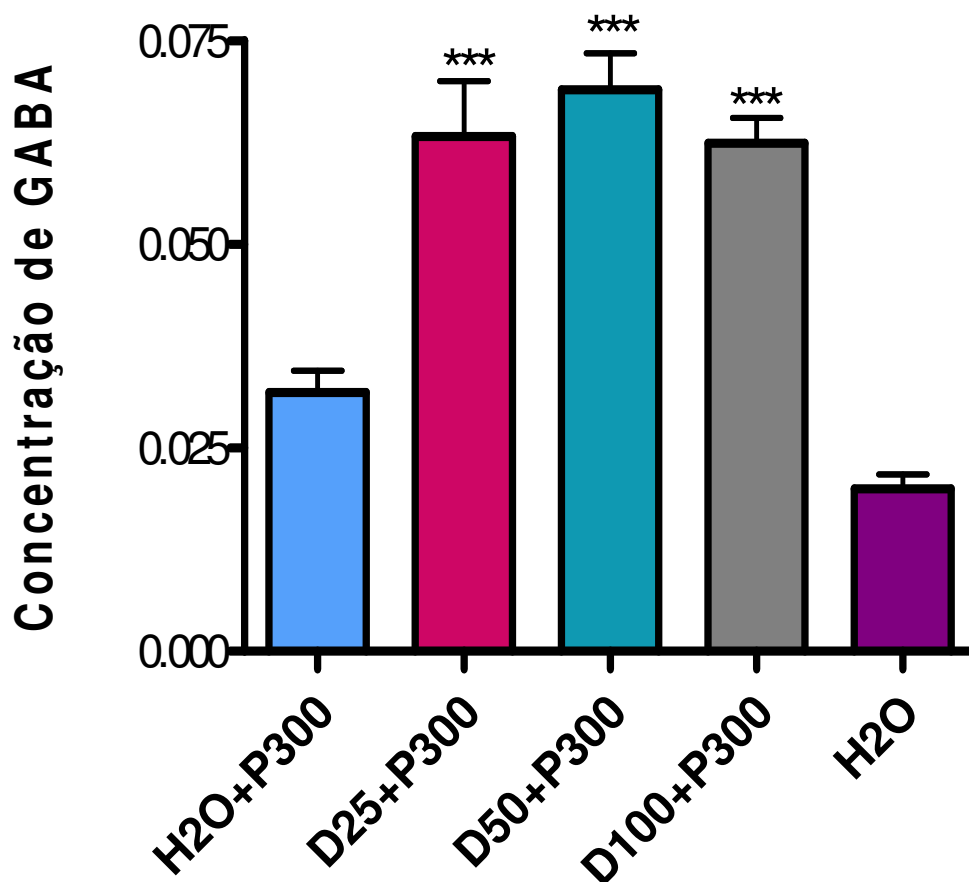


Figura 15 – Efeitos da Doxiciclina sobre as concentrações de GABA (ng/grama de tecido) em córtex temporal de ratos no modelo de convulsões induzidas por pilocarpina

Ratos Wistar machos (200 – 230g) foram pré-tratados ou não com Doxiciclina (25, 50 ou 100mg/kg, i.p.) e após 30 minutos com pilocarpina (300mg/kg, i.p.). Os controles receberam água destilada, seguidos de P300. Os animais foram submetidos a um período de 7h de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de GABA foi determinada em 20 μ L de homogenato. As barras representam média, \pm E.P.M. do número de animais representado no interior das barras *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle P300. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

4.3.4 Verificação dos níveis de Glicina

Podemos observar também um aumento significativo nos níveis de glicina nos grupos P300 pré-tratados com doxiciclina na dose de 25mg/kg ($0,068 \pm 0,014$) em relação ao grupo **controle P300** ($0,019 \pm 0,000$), como demonstra a **Figura 16**. Enquanto uma tendência para aumento nos níveis de glicina foi também observada no grupo D50+P300, os valores deste aminoácido no grupo D100+P300 foram semelhantes àqueles do grupo P300.

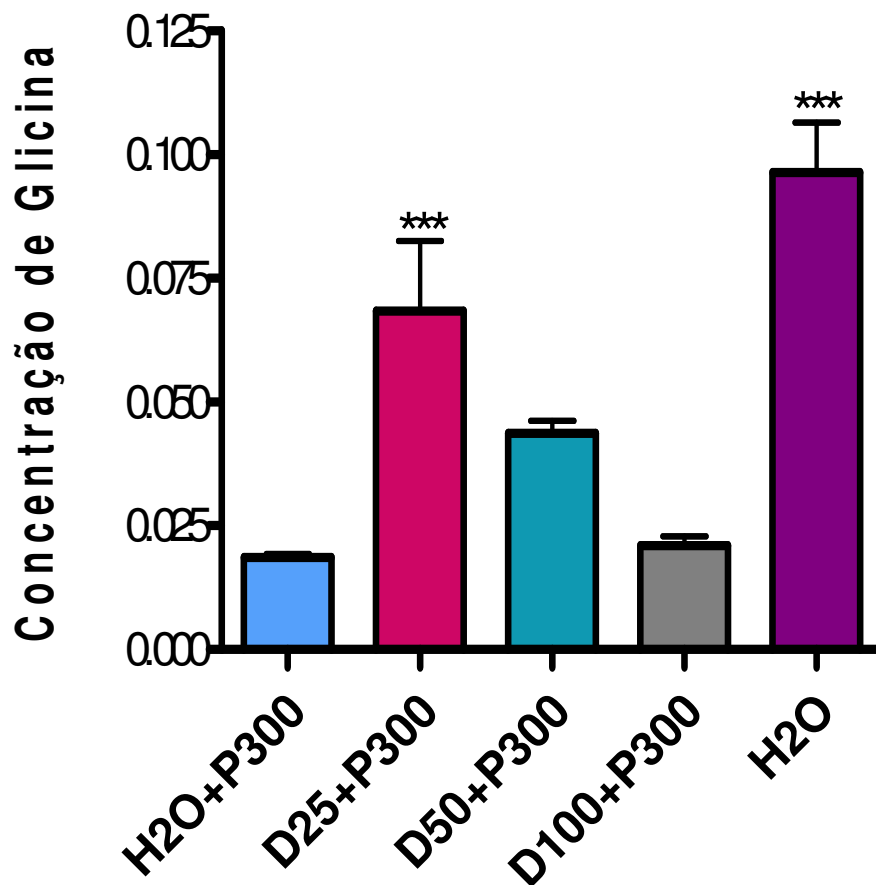


Figura 16 – Efeitos da Doxiciclina sobre as concentrações de Glicina (ng/grama de tecido) em córtex temporal de ratos no modelo de convulsões induzidas por pilocarpina

Ratos Wistar machos (200 – 230g) foram pré-tratados ou não com Doxiciclina (25, 50 ou 100mg/kg, i.p.) e após 30 minutos com pilocarpina (300mg/kg, i.p.). Os controles receberam água destilada, seguidos de P300. Os animais foram submetidos a um período de 7h de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de Glicina foi determinada em 20 μ L de homogenato. As barras representam média, \pm E.P.M. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo H2O e controle P300. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Perfil cromatográfico representativo de homogenatos corticais (cortex temporal) de ratos tratados com P30 (pilocarpina, 300 mg/kg, i.p.) durante sete dias.

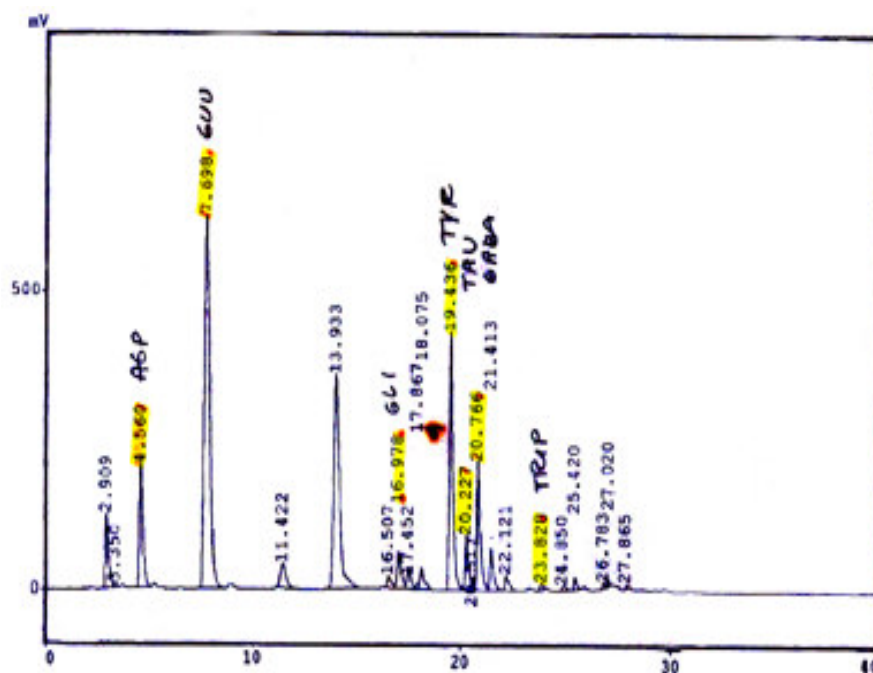


Figura 17 - Perfil cromatográfico do grupo controle P300

Perfil cromatográfico representativo de homogenatos corticais (cortex temporal) de ratos administrados com P30 e pré - tratados com D25 (doxiciclina, 25 mg/kg, i.p.) durante sete dias.

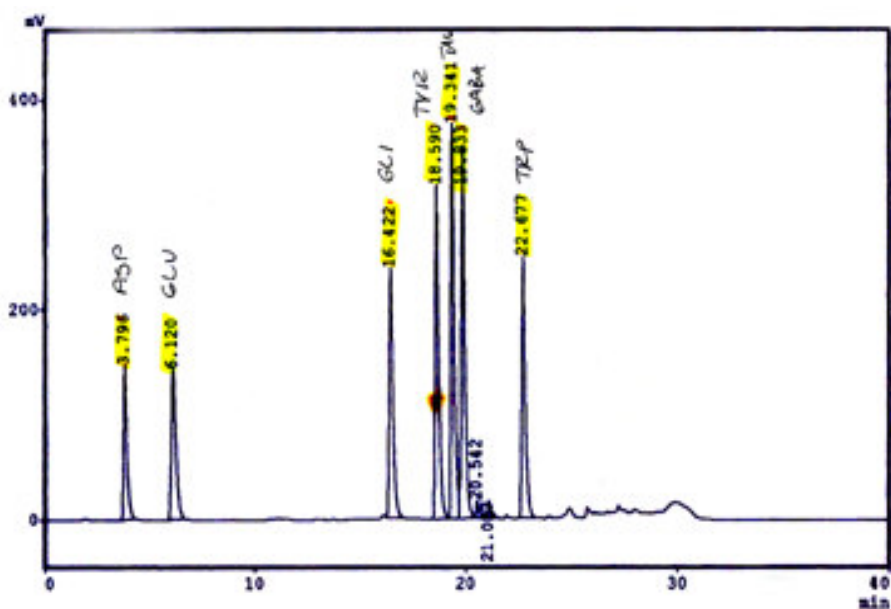


Figura 18 - Perfil cromatográfico do grupo D25 + P300.

Tabela 3 - Efeitos do pré-tratamento com doxiciclina (25, 50 ou 100 mg/kg) sobre as concentrações de aminoácidos em córtex temporal de ratos submetidos a convulsões induzidas por pilocarpina 300 mg/kg (P300)

CONCENTRAÇÕES DE AMINOÁCIDOS (ng/grama de tecido)

GRUPO	ASP	GLU	GLI	TIR	TAU	GABA	TRIP
H₂O	7.0 ± 0.36	6.1 ± 1.3*	9.6 ± 1.0*	6.2 ± 0.39	2,2 ± 0.14	20.0 ± 0.1*	0.73 ± 0.14
P300	7.0 ± 0.36	10.7 ± 0.48	1.9 ± 0.07	6.5 ± 0.53	2.3 ± 0.13	3.3 ± 0.28	0.56 ± 0.11
D25+	4.4 ±	6.2 ±	6.8 ±	6.2 ±	2.7 ±	6.3 ±	0.84 ±
P300	0.94*	0.30*	1.40*	0.41	0.15	0.60*	0.10
D50+	7.4 ±	7.7 ±	4.4 ±	6.4 ±	2.6 ±	7.0 ±	0.90 ±
P300	1.50	0.35 *	0.25*	0.47	0.18	0.46*	0.13
D100+	2.7 ±	7.2 ±	2.2 ±	6.1 ±	3.1 ±	6.3 ±	0.78 ±
P300	0.10*	0.33*	0.19	0.21	0.17	0.30*	0.10

* Significativo em relação ao grupo controle P300

Ratos wistar machos foram tratados ou não com doxiciclina (25, 50 ou 100 mg/kg i.p) ou água destilada (10ml/kg) diariamente durante sete dias. Trinta minutos após a última administração da droga, estes animais receberam a dose única de pilocarpina (P300 mg/kg, i.p.). Imediatamente após a morte, os cérebros desses animais foram dissecados e retirado o córtex temporal sob o gelo para em seguida realização da determinação dos aminoácidos. (ANOVA e Student-Newman-Keuls como teste *post-hoc*).

5 DISCUSSÕES

A literatura apresenta vários trabalhos indicativos da ação antiinflamatória dos derivados de tetraciclinas como doxiciclina e minociclina, ações estas não relacionadas com o efeito antimicrobiano das drogas. Dentre estas podemos citar: a inibição de metaloproteases da matrix celular (GOLUB et al., 1991; PAEMEN et al., 1996), redução na liberação de radicais livres de oxigênio a partir neutrófilos polimorfonucleares (GABLER; CREAMER, 1991) e inibição de óxido nítrico sintase induzida e da enzima conversora de interleucina-1 beta (AMIN et al., 1997; YRJANHEIKKI et al., 1998). Tanto a minociclina, quanto a doxiciclina são altamente lipofílicas penetrando a barreira hematoencefálica melhor do que muitos outros antibióticos, além de serem relativamente pouco tóxicas (KLEIN; CUNHA, 1995).

Os mecanismos neuroprotetores desses derivados de tetraciclina ainda não são muito bem conhecidos. Evidências têm mostrado que essas drogas inibem a produção de sintase induzida do NO (iNOS) através do aumento na degradação do mRNA responsável pela expressão da iNOS, além de reduzir também as concentrações da proteína enzimática (iNOS) propriamente dita (AMIN et al., 1997; YRJANHEIKKI et al., 1998). Além disso, os derivados da tetraciclina inibem algumas metaloproteases (PAEMEN et al., 1996; GREENWALD et al., 1998) e caspases 1 e 3 (YRJANHEIKKI et al., 1998; CHEN et al., 2000) pela redução da expressão do mRNA dessas drogas. Tendo em vista que caspases 1 e 3 promovem a apoptose celular e a inibição destas pode resultar em neuroproteção (GOBBEL; CHAN, 2001) é possível que a neuroproteção da minociclina e da doxiciclina sejam devidas pelo menos em parte pela redução da apoptose induzida por caspases.

Alternativamente, um outro mecanismo para justificar a neuroproteção dessas drogas seria uma interação direta com radicais livres ou com ERO. Existem evidências de que os derivados de teraciclinas são capazes de seqüestrar radicais superóxidos (VAN BARRE et al., 1987) e peroxinitrito (WHITEMAN; HALLIWELL, 1997). Trabalhos recentes mostraram que tanto a minociclina quanto a doxiciclina são capazes de reduzir a morte neuronal por apoptose (TIKKA et al., 2001).

O presente trabalho visou apresentar os efeitos neuroprotetores antiepilépticos de um antibiótico, a doxiciclina, que, em trabalhos atuais, vem mostrando alta capacidade em

reverter danos cerebrais, sejam eles induzidos ou não. Tendo em vista que a Pilocarpina, quando administrada em doses moderadamente altas mimetiza a epilepsia do lobo temporal humano, resolvemos estudar tal região cerebral.

Tem sido mostrado também que as tetraciclinas, tais como a minociclina e a doxiciclina, tem ação antiinflamatória e neuroprotetora contra danos isquêmicos quando administrados após o insulto cerebral (YRJANHEIKK et al., 1998).

As convulsões induzidas por pilocarpina têm sido largamente exploradas em modelos animais, haja vista, como foi anteriormente citado mimetiza a epilepsia do lobo temporal humano (TLE), seja em fatores comportamentais ou encefalográficos, bem como em danos neuroanatomicos (OLNEY et al., 1983; TURSKE et al., 1983, 1989; PERSINGER et al., 1988). Danos ao sistema nervoso central podem ser causados via exacerbação de vias excitatórias ou pela diminuição de vias inibitórias neuromoduladoras

Neste mesmo sentido, este trabalho objetivou estudar o processo convulsivo desencadeado através de uma única dose de pilocarpina (300mg/Kg, i.p), bem como as ações da Doxiciclina no processo convulsivo em ratos adultos, através da análise das alterações comportamentais e neuroquímicas em córtex temporal, a saber: atividade da enzima catalase (CAT), o conteúdo de nitrito, o índice de lipídio peroxidação e os níveis de aminoácidos cerebrais (ASP, GLU, TRP, etc).

5.1 Estudo comportamental

O estudo comportamental do presente trabalho analisou as alterações ocorridas após o pré-tratamento por sete dias com Doxiciclina, seguidos da indução do período convulsivo após a administração da pilocarpina 300mg/kg no sétimo dia. As alterações epiléticas observadas com a administração de pilocarpina 300 mg/kg incluíram um exacerbado aumento em todos os sinais colinérgicos periféricos, dentre eles, tremores, diarreia, salivação e aumento de todas as secreções glandulares. 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 (JOBÉ, 2003).

Nosso estudo comportamental feito em animais tratados com uma única dose de pilocarpina (300mg/Kg, i.p.; P300) apresentou as características descritas na literatura. Todos os animais observados por 7h apresentaram sinais colinérgicos periféricos, movimentos estereotipados e convulsões, desencadeando-se também o estado epiléptico, porém com baixa mortalidade.

No presente trabalho foi apresentado que a doxiciclina também protege os animais contra as convulsões induzidas pela pilocarpina, efeitos semelhantes foram observados não somente no aumento do tempo para o início do aparecimento das primeiras convulsões, mas também no aumento da latência de morte desses animais. Contudo, curiosamente, a relação dose-resposta não pôde ser observada, haja vista que os efeitos neuroprotetores foram melhor percebidos na dose menor, ou seja, de 50mg/kg, e, interessantemente, foi observado que, com o aumento da dose de doxiciclina utilizada notamos que, além de um decréscimo nas características neuroprotetoras pode ser também percebido um efeito tóxico da droga. Possivelmente, em altas doses (iguais ou superiores 100mg/kg, i.p.), a doxiciclina apresenta toxicidade, desde que foi observado que, quando os animais recebem doxiciclina na dose de 200mg/kg, i.p. em dose única diária, ocorre significativo aumento na incidência da morte desses animais, justificando a não utilização desta dosagem em nosso trabalho. Portanto, o aumento na dose de doxiciclina não está diretamente ligado à um aumento na sua capacidade neuroprotetora.

Com relação ao pré-tratamento com a Doxiciclina observamos uma notável proteção contra as convulsões induzidas pela Pilocarpina, contudo, na dose menor (25mg/kg) ocorreu o melhor efeito neuroprotetor no que diz respeito às latências da primeira convulsão e de morte. Nossos estudos apresentaram que as tetraciclinas, tais como a Doxiciclina e Minociclina além de terem suas ações neuroprotetoras em situações isquêmicas e inflamatórias bem como terem participações neuroprotetoras em desordens neurodegenerativas, como esclerose múltipla e atividade antiamilóidogênica (mal de Alzheimer), estes fármacos também apresentaram ações antiepileptogênicas.

Nossos resultados confirmaram essa ação anticonvulsivante da Doxiciclina, 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 P300.

5.2 Estudo neuroquímico

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 (OLIVER et al., 1990; DEXTER et al., 1994; SPERK, 1994; BENI; MORETTI, 1995); todavia pouco se sabe sobre a relação entre injúria oxidativa cerebral e a epilepsia humana.

Os resultados do presente trabalho nos indicam uma ação antioxidante da doxiciclina evidenciada pela redução nos níveis corticais de MDA no grupo em que a doxiciclina foi associada com pilocarpina, contudo, interessantemente, tal efeito não pôde ser observado quando a doxiciclina foi administrada sozinha, sugerindo uma possível ação antagônica entre a doxiciclina e a pilocarpina na diminuição dos níveis de MDA. O mecanismo molecular pelo quais as tetraciclinas medeiam seus efeitos antioxidantes ainda não foi totalmente esclarecido. Pesquisas sugerem que tal ação pode estar relacionada com suas ações anti-apoptóticas e antiinflamatórias. Muitos estudos mostram que o pré tratamento com as tetraciclinas, bem como a doxiciclina são capazes de reduzir a indução da óxido nítrico sintase induzível, reduzir a atividade das caspases (caspase – 1), formação de interleucina 1- β , a atividade das metaloproteinases, e ainda, a produção da ciclooxigenase e prostaglandinas. Trabalhos indicam ainda que as tetraciclinas foram capazes de inibir morte celular *in vitro* dos danos causados pela ativação do receptor NMDA (ZHU et al., 2002), peróxido de hidrogênio (ZHU et al., 2002; LIN et al., 2003), e do óxido nítrico (LIN et al., 2001).

VERIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NITRITO

O óxido nítrico (NO) é um gás expresso normalmente pelas células endoteliais e tem grande importância no processo de vasodilatação (e-NOS). Seu papel na fisiopatologia tem sido estudado em modelos de isquemia focal ou generalizada em camundongos.

Atualmente, sabe-se que existem duas isoformas enzimáticas capazes de sintetizar o óxido nítrico, uma delas, a isoforma constitutiva (c-NOS) que é produzida normalmente pelos tecidos e induz à síntese de níveis fisiológicos de óxido nítrico. Já a outra isoforma, é a óxido nítrico sintase induzível (i-NOS), que ocorre em reação ao estresse oxidativo em condições patológicas.

A estimulação de receptores de glutamato induz a liberação de óxido nítrico (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 O₂· 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 nucleicos, 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 O₂·.

As tetraciclina são utilizadas na clínica em diversas condições patológicas a fim de evitar infecções, proliferação de microorganismos ou até mesmo por sua ação inflamatória. A descoberta de suas ações antiinflamatórias proporcionou suas aplicações em diversas doenças tais como acne vulgar e artrite reumatóide. Contudo, seus efeitos antioxidantes ainda não foram completamente estabelecidos, o que se sabe é que estes fármacos são capazes de inibir a isoforma induzível da óxido nítrico sintase. (YRJANHEIKKI, et al., 1999).

Nossos dados revelam que a doxiciclina exerce efeitos protetores no córtex temporal de ratos adultos, 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 tetraciclinas não ter sido elucidado com exatidão, existem evidências que sugerem que suas ações têm caráter gênico, induzindo a expressão de genes antiinflamatórios que, por sua vez, inibem a inibição da micróglia, da COX-2, da própria óxido nítrico sintase induzível (i-NOS) e também pode atuar ativando genes neuroprotetores como o Bcl-2, que se acumula na mitocôndria e exerce seus efeitos antagonizando genes deletérios como Bax, Bak e Bid. (WANG et al., 2002). Contudo, mais estudos usando esses compostos durante o estado epiléptico devem ser realizados para o pronto esclarecimento do efeito neuroprotetor das tetraciclinas contra as espécies reativas de oxigênio (Eros), na patogênese da epilepsia do lobo temporal induzida por pilocarpina.

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE (CAT)

O estresse oxidativo neuronal leva, como já foi citado, à formação de espécies reativas de oxigênio bem como do íon peroxinitrito, que são o resultado da interação entre as moléculas de oxigênio e elétrons provenientes da cadeia transportadora nas mitocôndrias, estes, contudo, são convertidos, por ação da SOD (superóxido dismutase), a peróxido de hidrogênio, que, por sua vez, é detoxificado pelas enzimas glutathiona peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT). Essas enzimas constituem, assim, um sistema antioxidante endógeno, que atua prevenindo o dano neuronal induzidos pelos radicais livres e EROs (REMMEN et al., 2004). O *status epilepticus* pode alterar esses sistemas antioxidantes, indicando uma resposta celular ao aumento dos radicais livres (NAFFAH-MAZZACORATTI et al., 2001; FREITAS et al., 2004a).

Neste trabalho, foi observado que a atividade da catalase observada no córtex temporal dos animais durante o estresse convulsivo é significativamente aumentada, provavelmente relacionado a maior liberação de radicais tóxicos nessas áreas. Ao investigar as ações da doxiciclina, foi visto que o pré-tratamento dos animais, antes da indução do processo convulsivo, resultou em um efeito estabilizante da atividade da catalase no córtex temporal dos animais, mantendo-a em níveis normais, sugerindo uma diminuição da produção de radicais livres na presença dessa droga e confirmando sua ação protetora contra as alterações bioquímicas induzidas pelo processo convulsivo.

5.3 Estudo da determinação dos níveis de aminoácidos

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

Tem sido sugerido que a atividade convulsiva está diretamente relacionada a um aumento na liberação e a uma ineficiente recaptação de aminoácidos excitatórios, tais como glutamato e aspartato. A ativação do receptor NMDA medeia a excitotoxicidade e morte neuronal em muitas desordens neurodegenerativas bem como no processo isquêmico (DIRNAGL et al., 1999; LEE et al., 1999; GAGLIARDI, 2000). Dados anteriores mostraram que a minociclina é capaz de proteger neurônios da medula espinhal contra a excitação provocada pela ativação do receptor NMDA (TIKKA; KOISTINAHO, 2001).

Em estudos recentes tem sido demonstrado que ocorre um aumento na densidade de receptores glutamatérgicos no hipocampo, córtex frontal e no corpo estriado de animais submetidos à ensaios convulsivos (FREITAS et al., 2004), sugerindo que isso pode ser adquirido durante o *status epilepticus*. Também foi demonstrado por esses autores que ocorre *downregulation* dos receptores gabaérgicos em diferentes áreas cerebrais submetidas à convulsões induzidas por pilocarpina. O GABA é o principal neurotransmissor inibitório no córtex cerebral, mantendo o tônus inibitório que se contrabalança com a excitação neuronal (FRITSCHY et al., 1999). Quando esse balanço é descontrolado as convulsões ocorrem (TREIMAN, 2001).

Neste estudo, apresentamos que a doxiciclina na dose de 100mg/kg diminuiu significativamente os níveis de aspartato e glutamato, e aumentou as concentrações de GABA e triptofano. Alterações em muitos neurotransmissores têm sido implicadas para a elucidação das crises epiléticas (MODY et al., 1987; BABB et al., 1989). Portanto, podemos demonstrar que a doxiciclina pôde proteger os neurônios contra a morte celular gerada pelas convulsões induzidas pela pilocarpina através de uma diminuição nas concentrações de glutamato e aspartato no córtex temporal desses animais. Observamos também um significativo aumento

nas concentrações de GABA e taurina nos grupos pré-tratados com doxiciclina em relação ao grupo submetido apenas à administração de pilocarpina.

No presente trabalho, mostramos que a doxiciclina é capaz de proteger os animais contra as convulsões induzidas por pilocarpina, haja vista que houve um aumento na latência da primeira convulsão e na latência de morte. É sugerido que a fisiopatologia das convulsões está relacionada com um aumento na liberação de aminoácidos excitatórios como aspartato e glutamato. A ativação de receptores NMDA medeia a excitotoxicidade e a morte neuronal em muitas desordens neurodegenerativas e na isquemia (DIRNAGL et al., 1999; LEE et al., 1999; GARGLIARDI, 2000). Recentemente, Tikka e colaboradores demonstraram que a minociclina protege neurônios da coluna espinhal *in vitro* contra os danos da ativação do receptor NMDA, indicando que ativação desse receptor é capaz de induzir a micrógliia e, posteriormente à morte neuronal.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. Embora todos os grupos experimentais tenham manifestado os sinais colinérgicos periféricos iniciados com a injeção da pilocarpina, nem todos os animais dos grupos pré-tratados com doxiciclina convulsionaram. Podemos ainda observar que houve um considerável aumento no tempo para que fosse iniciada a primeira convulsão nos animais pré-tratados com a droga, onde observamos um aumento de 281% no grupo pré-tratado com doxiciclina na dose de 50mg.
2. Observamos ainda que não pôde ser notado um efeito dose/resposta no que diz respeito á atividade neuroprotetora da doxiciclina, haja visto que a dose menor (50mg/kg) se mostrou mais eficiente que a dose maior (100mg/kg) tanto no prolongamento das convulsões como da morte. Percebemos ainda, indicativos de toxicidade da doxiciclina em doses mais altas (superiores a 100mg/kg).
3. Ocorreu um aumento significativo na produção de MDA nos grupos P300 e D50, indicando que o tratamento com doxiciclina sozinha não foi capaz de bloquear a peroxidação lipídica no córtex cerebral desses animais, contudo, podemos observar que, quando os animais são pré-tratados com doxiciclina, antes de administrar a pilocarpina o estresse oxidativo diminui, demonstrando um possível efeito antagônico entre as duas drogas.
4. Com relação aos níveis de nitrito encontrados, podemos observar mais um indicativo de ação neuroprotetora da doxiciclina quando administrada antes da injeção da pilocarpina, afinal houve um considerável decréscimo nos níveis de nitrito no grupo pré-tratado com doxiciclina na dose de 50mg/kg em relação ao grupo que submetemos apenas á administração de pilocarpina, uma diminuição de aproximadamente 260%.
5. Quanto aos níveis de aminoácidos percebemos considerável diminuição nas concentrações de glutamato no córtex cerebral dos grupos pré-tratados com doxiciclina, indicando uma possível via neuroprotetora, notamos também em contrapartida um considerável aumento nos níveis de aminoácidos inibitórios como

glicina e GABA no córtex temporal desses animais, sugerindo a participação destes do desencadear de crises epilépticas induzidas pela pilocarpina.

7 CONCLUSÃO

Com o desenvolvimento deste trabalho, podemos observar que o pré-tratamento com doxiciclina interfere com vários sistemas antioxidantes e neuroprotetores quando os animais são submetidos ao estresse convulsivo induzido pela pilocarpina na dose de 300mg/kg. Tal efeito foi evidenciado através da diminuição da formação de radicais livres e de óxido nítrico (NO), demonstrados através de uma significativa melhora na resposta das enzimas antioxidantes como a catalase (CAT) e na diminuição na formação de nitrito após o período de observação nos animais submetidos convulsões induzidas por P300 quando pré-tratados com doxiciclina. Estes efeitos, adicionados a uma redução nos níveis de aminoácidos excitatórios como o glutamato e, por outro lado, um aumento nos níveis de aminoácidos inibitórios como glicina e GABA reforçam a existência de uma possível via modulatória desses aminoácidos no controle e desenvolvimento de crises epiléticas quando ocorre no pré-tratamento com doxiciclina.

REFERÊNCIAS

- ALABADÍ, J. A.; THIBAUT, J. L.; PINARD, E.; SEYLAZ, J.; LASBENNES, F. 7-Nitroindazole, a selective inhibitor of nNOS, increases hippocampal extracellular glutamate concentration in status epilepticus induced by kainic acid in rats. **Brain Res.**, v. 839, n. 2, p. 305-312, Aug. 1999.
- BABB, T. L.; PRETORIUS, J. K.; KUPFER, W. R.; FELDBLUM, S. Recovery of decreased glutamate decarboxylase immunoreactivity after rat hippocampal kindling. **Epilepsy Res.**, v. 3, n. 1, p. 18-30, Jan./Feb. 1989.
- 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. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 195, p. 157-162, 1991.
- 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: CARPENTER, M. B.; BERNARDI, G.; DI CHIARA, G.; STANZIONE, P. (Ed.). **Basal Ganglia III**. New York: Plenum Press, 1990a. p. 568.
- 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.
- BEAGLEHOLE, R.; BONITA, R.; KJELLSTROM, T. **Epidemiologia básica**. 1. ed. [S.l.]: Lis Gráfica Editora, 1996.
- BEAR, M. F.; CONNORS, B. W.; PARADISO, M. A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 2. ed. São Paulo: Artmed, 2002.
- 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.
- 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.

BORGES, M.; LI, L. M.; GUERREIRO, C. A.; YACUBIAN, E.; CORDEIRO, J.; TOGNOLA, W. *et al.* Urban prevalence of epilepsy: populational study in São José do Rio Preto, a medium-sized city in Brazil. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 62, n. 2A, p. 199–204, 2004.

BRUNTON, L.; PARKER, K.; BLUMENTHAL, D.; BUXTON, I. (Ed.). **Goodman & Gilman's**: manual of pharmacology and therapeutics. New York: McGraw Hill, 2006.

CAVALHEIRO, E. A.; LEITE, J. P.; BORTOLOTTI, 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.

CHEN, J. F.; WEISS, B. Ontogenetic expression of D₂ dopamine receptor mRNA in rat corpus striatum, **Dev. Brain Res.**, v. 63, p. 95, 1991.

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

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

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

DEMIRYÜREK, A.; TUNCAY; ÇAKICI; İCLAL; KANZIK; İLKER. Peroxynitrite: A Putative Cytotoxin. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 82, n. 3, p. 113-117, 1998.

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, 1998.

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.

FALCONER, M. A. Genetic and related aetiological factors in temporal lobe epilepsy. A review. **Epilepsia**, v. 12, p. 13-31, 1971

FERNANDES, J.; SANDER, J.W. Epidemiologia e história natural das epilepsias. In: COSTA, J.; PALMINI, A.; YACUBIAN, E.; CAVALHEIRO, E. (Ed.). **Fundamentos neurobiológicos das epilepsias: aspectos clínicos e cirúrgicos**. São Paulo: Lemos, 1998. p. 3-20.

FLOYD, R. A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. **FASEB J.**, v. 4, n. 9, p. 2587-2597, June 1990.

FREHER, M.; CHALLAPALLI, S.; PINTO, JV.; SCHWARTZ, J.; BONOW, RO.; GHEORGIADÉ, M. Current status of calcium channel blockers in patients with cardiovascular disease. **Curr. Probl. Cardiol.**, v. 24, p. 236-240, 1999.

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 adult rats: monoamine content 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.; 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 cortex and striatum after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. **Neurosci. Lett.**, v. 365, n. 2, p. 102-105, June 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 cortex. **Pharmacol. Biochem. and Behaviour**, v. 78, p. 327-332, 2004b.

FRITSCHY, J. M.; KIENER, T.; BOUILLERET, V.; LOUP, F. GABAergic neurons and GABA(A)-receptors in temporal lobe epilepsy. **Neurochem. Int.**, v. 34, n. 5, p. 343-445, May 1990.

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

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

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

HOPKINS, A.; SHORVON, S. Computed tomography in first uncomplicated generalised seizure. Is grossly oversold. **BMJ**, v. 10, p. 1007-1008, 1995.

HULME, E. C. Muscarinic acetylcholine receptors: typical G-coupled receptors. **Symp Soc Exp Biol.**, v. 44, p. 39-54, 1990.

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.

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

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

LEITE, J. P.; BORTOLOTTI, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Spontaneous recurrent seizures in rats: an experimental model of partial epilepsy. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 14, n. 4, p. 511-517, Winter 1990.

LIAO, C. F.; THEMEN, 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.

LÖSCHER, W. Animal models of intractable epilepsy. **Prog. Neurobiol.**, v. 53, p. 239-258, 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. **Neurochem. Int.**, v. 33, n. 4, p. 299-306, Oct. 1998.

MARINO JUNIOR, R.; CUKIERT, A.; PINHO E. Epidemiological aspects of epilepsy in Sao Paulo: a prevalence study. **Arq. Neuropsiquiatr.**, v. 44, n. 3, p. 243–254, 1986.

MELLO, L.; BORTOLOTTI, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Modelos experimentais de epilepsia: uma revisão. **Neurobiologia**, v. 49, p.231-268, 1986.

MODY, I.; HEINEMANN, U. NMDA receptors of dentate gyrus granule cells participate in synaptic transmission following kindling. **Nature**, v. 326, p. 701-704, 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, L. S.; ROSOFF, M. L.; HAMILTON, S. E.; KALAYDJIAN, A. E.; MCKINNON, L. A.; NATHANSON, N. M. Molecular analysis of the regulation of muscarinic receptor expression and function. **Life Sci.**, v. 64, n. 6/7, p. 375-379, 1999.

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.

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.

OLIVER, C. N.; STARKE-REED, P. E.; STADTMAN, E. R.; LIU, G. J.; CARNEY, J. M.; FLOYD, R. A. Oxidative damage to brain 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, n. 13, p. 5144-5147, July 1990.

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

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

PEPEU, G. Brain acetylcholine: an inventory of our knowledge on the 50th anniversary of its discovery. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 4, p. 416-418, 1983.

PERALTA, E. G.; ASHKENAZI, 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, n. 13, p. 3923-3929, Dec. 1987.

PERALTA, E. G.; WINSLOW, J. W.; PETERSON, G. L.; SMITH, D. H.; ASHKENAZI, A.; RAMACHANDRAN, J.; SCHIMERLIK, M. I.; CAPON, D. J. Primary structure and biochemical properties of an M2 muscarinic receptor. **Science**, v. 236, p. 600-605, 1987.

PORTER, R. J.; ROGAWSKI, M. A. New antiepileptic drugs: from serendipity to rational discovery. **Epilepsia**, v. 33, suppl. 1, p. S1-S6, 1992.

REMMEN, H. V.; SABIA, W. Q. M.; FREEMAN, G.; ESTLACK, L.; YANG, H.; GUO, Z. M.; HUANG, T. T.; STRONG, S.; LEE, S.; EPSTEIN, C. J.; RICHARDSON, A. Multiple deficiencies in antioxidant enzymes in mice result in a compound increase in sensitivity to oxidative stress. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 36, p. 1625-1634, 2004.

SAGAR, H. J.; OXBURY, J. M. Hippocampal neuron loss in temporal lobe epilepsy: correlation with early childhood convulsions. **Ann. Neurol.**, v. 22, n. 3, p. 334-340, Sept. 1987.

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

SIRVEN, J. I. Antiepileptic drug therapy for adults: When to initiate and how to choose. **Mayo Clin. Proc.**, v. 77, n. 12, p.1367-1365, 2002.

TIKKA, T.; FIEBICH, B. L.; GOLDSTEINS, G.; KEINANEN, R.; KOISTINAHO, J. Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. **J. Neurosci.**, v. 21, n. 8, p. 2580-2588, Apr. 2001

TURSKI, L.; IKONOMIDOU, C.; TURSKI, W. A.; BORTOLOTTI, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Review: cholinergic mechanisms and epileptogenesis. The seizures induced by pilocarpine: a novel experimental model of intractable epilepsy. **Synapse**, v. 3, n. 2, p. 154-171, 1989.

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.

WESS, J.; BONNER, T. I.; DÖRJE, F.; BRANN, M. R. Delineation of muscarinic receptor domains conferring selectivity of coupling to guanine nucleotide-binding proteins and second messengers. **Mol. Pharmacol.**, v. 38, p. 517-523, 1990.

WHITE, H.S. Clinical significance of animal seizure models and mechanism of action studies of potential antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 38, suppl. 1, p. S9-S17, 1997.

YRJÄNHEIKKI, J.; KEINÄNEN, R.; PELLIKKA, M.; HÖKFELT, T.; KOISTINAHO, J. Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 26, p. 15769-15774, Dec. 1998.