

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE PIRACETAM SOBRE OS RECEPTORES
MUSCARÍNICOS E A ATIVIDADE ACETILCOLINESTERÁSICA EM CÓRTEX
MOTOR DE RATOS

Marta Maria Fonteles Marinho

6/8/1
N. 291 R
1990

FORTALEZA - CE

1990

FC-00002634-1

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE PIRACETAM SOBRE OS RECEPTORES
MUSCARÍNICOS E A ATIVIDADE ACETILCOLINESTERÁSICA EM CÓRTEX
MOTOR DE RATOS

Marta Maria Fonteles Marinho

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM FARMACOLOGIA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA - 1990

UFC	BIBLIOTECA CENTRAL
Nº.	509825
20 / 09 / 96	

M337e
1990

Marinho, Marta Maria Fonteles
Efeito da administração de Piracetam
sobre os receptores muscarínicos e a
atividade acetilcolinesterásica em cór-
tex motor de ratos / Marta Maria Fonte-
les Marinho. - Fortaleza: UFC, 1990.
102p.

Orientador: Glauce Socorro de Barros
Viana

Dissertação (Mestrado). Universidade
Federal do Ceará. Departamento de Fi-
siologia e Farmacologia.

1. Farmacologia I. Título

CDD: 615.1

COLEÇÃO
R509825

UFC	BIBLIOTECA CENTRAL
Nº.	1112
15 / 09 / 94	

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários a obtenção do Grau de Mestre em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, e encontra-se a disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Tese é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Marta Maria Fonteles Marinho

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 23 / 10 / 90

Dra. Glauce Socorro de Barros Viana
Orientadora da Dissertação

Dr. Carlos Maurício de Castro Costa

Dr. José Afonso Bruno

À Deus, autor da minha
vida e meu baluarte.

Ao meu amado esposo, Luiz
Alberto, carinhosamente, "Toddy",
pelo apoio, compreensão e amor
inefável...

Aos meus pais, Guilherme e
Hilda, pelo esforço e dedicação

AGRADECIMENTOS

À Profa. Glauce Socorro de Barros Viana, minha orientadora e amiga, a quem devo a parte mais valiosa da minha formação científica. Agradeço também por toda a consideração, estímulo e paciência demonstrados em todos os momentos de trabalho em comum.

Ao Prof. Carlos Maurício de Castro Costa por ter prontamente aceito o convite para participar da banca examinadora.

Ao Prof. José Afonso Bruno pela orientação na técnica de dissecação das estruturas cerebrais e por ter aceito o convite para participar da banca examinadora.

À Bibliotecária Norma Linhares pela colaboração na parte das referências bibliográficas.

Ao Prof. Manoel Odorico de Moraes Filho pela contribuição na confecção dos "slides".

À minha querida amiga Cléa, pelo companheirismo nas horas de estudo, de experiências no laboratório, compartilhando comigo de momentos tristes e alegres, demonstrando uma amizade sem limites.

À minha querida amiga Fernanda, pelo incentivo e amizade sincera.

A todos os professores amigos deste Departamento, que me legaram valiosa contribuição científica, em especial, ao Prof. Vietla Satyanarayana Rao pelos conselhos e estímulos constantes.

Aos meus colegas da pós-graduação pelo incentivo e

colaboração.

Aos técnicos e amigos Ana Rodrigues de Sousa (Dona Ana) e Vilany, pelo auxílio prestado, na pura satisfação do ajudar, e, em especial, a Raimundo das Chagas Marques pela contribuição na execução da parte experimental.

A todos os amigos da nossa Secretaria, na pessoa da Srta. Adelcir Oliveira Matos, que contribuíram de maneira ativa e desinteressada.

À Silvana pela confecção desta tese no computador

Aos irmãos da Igreja Cristã Evangélica do Beira-Rio, pelas constantes orações a meu favor.

À família Fonteles e Marinho pelo apoio e compreensão. Agradeço também às minhas auxiliares do lar Maria José de Andrade e Maria Cristiane Lopes pela presteza sem interesse.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo indispensável suporte financeiro

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

"Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram,
nem jamais penetrou em coração humano o
que Deus tem preparado para aqueles que
O amam."

I Coríntios 2:9

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xviii
1 - <u>INTRODUÇÃO</u>	1
1.1 - <u>O Sistema Colinérgico e a Memória</u>	1
1.2 - <u>Drogas Nootrópicas: Piracetam (Protótipo)</u>	4
1.3 - <u>Receptores Colinérgicos Muscarínicos</u>	10
1.4 - <u>Acetilcolinesterase</u>	14
1.5 - <u>Objetivos</u>	16
2 - <u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	18
2.1 - <u>Animais</u>	18
2.2 - <u>Preparo das Drogas</u>	18
2.3 - <u>Tratamento dos Grupos Experimentais</u>	19
2.4 - <u>Dissecação das Áreas Cerebrais (Hipocampo, Núcleos da Base, Córtex Motor e Somatosensorial)</u>	20
2.5 - <u>Materiais das Técnicas Empregadas</u>	21
2.6 - <u>Técnicas</u>	22
2.6.1 - <u>Determinação da Densidade de Receptores Muscarínicos (Técnica de "Binding")</u>	22
2.6.1.1 - <u>Soluções Reagentes</u>	22
2.6.1.2 - <u>Método</u>	23
2.6.2 - <u>Dosagem de Proteína</u>	25
2.6.2.1 - <u>Soluções Reagentes</u>	25
2.6.2.2 - <u>Método</u>	25
2.6.3 - <u>Determinação da Atividade Acetilcolinesterásica (AChE)</u>	26

2.6.3.1 - Soluções Reagentes.....	26
2.6.3.2 - Método.....	27
2.7 - <u>Análise Estatística</u>	28
3 - <u>RESULTADOS</u>	29
3.1 - <u>Efeito da Administração de Piracetam sobre os Receptores Colinérgicos Muscarínicos (RCM) e a Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) em Córtex Motor Cerebral de Ratos - Experimentos "in vivo"</u>	29
3.2 - <u>Estudo do Mecanismo de Ação do Piracetam sobre os Receptores Colinérgicos Muscarínicos (RCM) e a Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) em Córtex Motor de Ratos</u>	40
3.2.1 - Efeito do Piracetam sobre a Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) - Experimentos "in vitro".....	40
3.2.2 - Ação do Piracetam sobre os Sítios de Ligação da [³ H] NMS - Experimentos "in vitro" (de competição).....	43
3.2.3 - Efeito da Administração Combinada de Cloreto de Lítio e Piracetam sobre a Densidade dos RCM, Atividade Acetilcolinesterásica e Conteúdo de Proteína - Experimentos "in vivo".....	43
4 - <u>DISCUSSÃO</u>	50
5 - <u>CONCLUSÕES</u>	65
6 - <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	67

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Página
1 - Estrutura química do Piracetam.....	6
2 - Percentagem de aumento da densidade de receptores colinérgicos muscarínicos (RCM) em córtex motor cerebral de ratos jovens e velhos, com administração de Piracetam (500mg/Kg, p.o.) numa única dose (24h) ou durante 7 dias.....	34
3 - Representação gráfica do Scatchard das ligações específicas da [³ H] NMS em córtex motor cerebral de ratos jovens controles (●) e tratados com Piracetam 500mg/Kg (○), durante 15 dias. <u>Acima</u> : ligações específicas (curvas) e inespecíficas (retas) de [³ H] NMS em homogeneizados de córtex motor.....	37
4 - Representação gráfica do Scatchard das ligações específicas da [³ H] NMS em córtex motor de ratos velhos controles (●) e tratados com Piracetam 500mg/Kg, durante 7 (x) e 15 dias (▲). A, B e C: ligações específicas (curvas) e inespecíficas (retas) de [³ H] NMS em homogeneizados de córtex motor.....	38
5 - Efeito da administração de Cloreto de Lítio (50 e 100mg/Kg) e/ou Piracetam (500mg/Kg), durante 7 dias, sobre a densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos, em córtex motor de	

	ratos velhos.....	47
6 -	Interferência do Lítio no metabolismo dos fos- foinositídeos.....	63

LISTA DE TABELAS

TABELA	Página
1 - Efeito da administração do Piracetam sobre a densidade dos receptores muscarínicos no córtex motor cerebral de ratos jovens e velhos.....	30
2 - Efeito da administração do Piracetam sobre a densidade dos receptores muscarínicos e atividade acetilcolinesterásica (AChE) no córtex cerebral de ratos em função do tempo.....	31
3 - Efeito da administração de uma única dose de Piracetam sobre a densidade dos receptores muscarínicos no córtex motor cerebral de ratos jovens e velhos.....	33
4 - Efeito da administração de Piracetam sobre a densidade dos receptores muscarínicos (B_{max}) e constante de dissociação (Kd) no córtex motor de ratos jovens e velhos.....	35
5 - Efeito da administração do Piracetam sobre a atividade da Acetilcolinesterase (AChE) em córtex motor de ratos jovens e velhos.....	39
6 - Efeito da administração do Piracetam sobre o conteúdo de proteína (mg/g de tecido) em córtex cerebral de ratos jovens e velhos.....	41
7 - Efeito do Piracetam sobre a atividade da Acetilcolinesterase (AChE) em córtex cerebral de ratos jovens "in vitro".....	42
8 - Efeito do Piracetam sobre os sítios de ligação	

	da [³ H] NMS em homogeneizados de córtex motor cerebral de ratos jovens "in vitro".....	44
9	- Efeito da administração de Cloreto de Lítio e/ou Piracetam sobre a atividade dos receptores muscarínicos em córtex motor de ratos velhos.....	46
10	- Efeito da administração do Cloreto de Lítio e/ou Piracetam sobre a atividade acetilcolinesterásica (AChE) em córtex motor de ratos velhos.....	48
11	- Efeito da administração de Cloreto de Lítio e/ou Piracetam sobre o conteúdo de proteína em córtex motor de ratos velhos.....	49

RESUMO

O efeito da administração de Piracetam (100 e 500mg/Kg, v.o.), durante 1, 7 e 15 dias, sobre a densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos (RCM) e atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi estudado em córtex motor cerebral de ratos jovens e velhos.

Foi observado que o tratamento agudo (24h) não produziu nenhum efeito sobre os RCM, ao passo que, o tratamento crônico causou um aumento significativo na densidade dos receptores muscarínicos nos animais jovens (777,2fmoles/mg de proteína) e velhos (741,9fmoles/mg de proteína) em relação aos seus respectivos controles (546,0 e 545,4fmoles/mg de proteína).

A análise de Scatchard mostrou elevações nos valores encontrados para a densidade máxima dos receptores muscarínicos (B_{max}) e para a constante de dissociação (Kd) de ratos jovens ($B_{max} = 663,4$ fmoles/mg de proteína; $Kd = 0,45$ nM) e velhos ($B_{max} = 628,0$ fmoles/mg de proteína; $Kd = 0,47$ nM) não tratados (controles) em relação aos animais jovens ($B_{max} = 961,9$ fmoles/mg de proteína; $Kd = 0,82$ nM) e velhos ($B_{max} = 747,6$ fmoles/mg de proteína; $Kd = 0,84$ nM) tratados com Piracetam (500mg/Kg), durante 1 semana.

Nenhuma alteração na atividade acetilcolinesterásica foi observada nos dois grupos tratados com Piracetam (500mg/Kg) durante 1 semana, nem mesmo nos animais tratados e pré-tratados com Lítio (50 e 100mg/Kg). Contudo, com uma dose menor (100mg/Kg) foi observado uma diminuição significativa

na atividade desta enzima.

Nos experimentos "in vitro", a adição de Piracetam em concentrações variando de $1\mu\text{M}$ até 1mM não modificou a atividade da acetilcolinesterase.

A adição de Piracetam "in vitro" demonstrou que a droga não interage diretamente com os sítios colinoceptivos afastando assim a possibilidade de que um fenômeno clássico de "up - regulation" dos receptores possa explicar a elevação dos RCM.

A administração combinada de Lítio (50 e 100mg/Kg) e Piracetam (500mg/Kg), durante 1 semana, resultou no bloqueio da elevação dos RCM causada pelo Piracetam. Este resultado pode ser explicado pelo fato da droga estimular a hidrólise de fosfoinositídeos e o lítio, por sua vez, causar uma inibição desse processo hidrolítico.

O aumento na densidade dos RCM, então, pode se dever a um tipo de "up - regulation" onde o Piracetam agiria indiretamente através de um segundo mensageiro, associado às suas propriedades de alterar a fluidez e a plasticidade da membrana.

ABSTRACT

The effect of Piracetam administration (100 e 500mg/Kg, v.o.) during 1, 7 and 15 days on the muscarinic receptor density (MRD) and acetylcholinesterase activity (AChE) was studied in cerebral motor cortex of young and old rats.

It was observed that the acute treatment (24h) did not produce any effect on the MRD. On the other hand, the chronic treatment caused a significative increase in the receptor density in the young animals (777,2fmol/mg protein) and the old ones (741,9fmol/mg protein) relative to their respective controls (546,0 and 545,4fmol/mg protein)

Scatchard analysis revealed an increase in the values of receptors maximal density (B_{max}) and for the equilibrium dissociation constant (Kd) of the control groups of young ($B_{max} = 663,4\text{fmol/mg protein}$; $Kd = 0,45\text{nM}$) and old rats ($B_{max} = 628,0\text{fmol/mg protein}$; $Kd = 0,47\text{nM}$) in relation to young ($B_{max} = 961,9\text{fmol/mg protein}$; $Kd = 0,82\text{nM}$) and old animals ($B_{max} = 747,6\text{fmol/mg protein}$; $Kd = 0,84\text{nM}$) belonging to the group treated with Piracetam (500mg/Kg) during 1 week.

No alteration was seen in the acetylcholinesterase activity in the two groups treated with Piracetam (500mg/Kg) during 1 week and also in the groups treated and pretreated before with Lithium. However at a small dose (100mg/Kg) the drug caused a significant decrease in enzyme activity.

In the "in vitro" experiments the addition of Piracetam in concentrations ranging from $1\mu\text{M}$ up to 1mM did

not modify the acetylcholinesterase activity

The addition of Piracetam "in vitro" showed that the drug doesn't interact directly with colinoceptive sites discarding the possibility that a classic "up - regulation" phenomenon could explain the increase in MRD.

The combined administration of Lithium (50 and 100mg/Kg) and Piracetam (500mg/Kg) during 1 week resulted in blockade of increase in MRD caused by Piracetam alone. This result could be explained because the drug stimulates the hydrolysis of phosphoinositides and the lithium causes an inhibition of this hydrolitic process.

The increase in MRD could be the result of an "up - regulation" where Piracetam would act indirectly through a 2nd messenger, which associated with its properties altering membrane fluidity and plasticity could explain the drug effect on muscarinic receptor density.

1 - INTRODUÇÃO

Numerosos medicamentos recentemente comercializados se destinam a agir sobre o sistema nervoso central, melhorando o fluxo circulatório por efeito vasodilatador ou anti-espasmódico, enquanto outros visam melhorar a oxigenação celular. O Piracetam (2 - oxo - pirrolidina - 1 - acetamida) (FIGURA 1), um exemplo de droga nootrópica, tem sido vastamente estudado por apresentar características protetoras e estimulantes a nível cerebral, sendo considerado um ativador do metabolismo da célula nervosa.

Os agentes nootrópicos melhoram a aprendizagem e a memória nos animais velhos (VALZELLI et al, 1980; BARTUS et al, 1981; CAVOY & DELACOUR, 1988) e em animais sujeitos à hipóxia, choques eletroconvulsivos, isquemia, drogas amnéticas tais como, escopolamina e antibióticos (GAMZU, 1985; GRAU et al, 1987; PIERCEY et al, 1987). Efeitos similares foram observados nos humanos sãos e em pacientes sofrendo de patologias cerebrais (MINDUS, 1978; KAZDOVA et al, 1984).

1.1 - O Sistema Colinérgico e a Memória

O declínio das funções cognitivas e da memória com o envelhecimento normal ou patológico do cérebro tem sido atribuído a uma perda local ou generalizada das células nervosas,

dos dendritos e de sinápses, havendo mudanças degenerativas (NORDBERG & WINBLAD, 1981; NARANG & CUTLER, 1986; WHITEHOUSE & SING AU, 1986). Estudos quantitativos têm mostrado que algumas áreas cerebrais são mais susceptíveis de uma diminuição relacionada com a idade nos neurônios de pessoas normais, enquanto que outras áreas não são (BRODY, 1978; HENDERSON et al, 1980). Na doença de Alzheimer (ALZHEIMER, 1907), o envolvimento neuropatológico do córtex motor e hipocampo (CORSELLIS, 1970), e as anormalidades no sistema colinérgico sugerem um papel anatômico e bioquímico destas áreas e deste sistema, respectivamente, sobre as funções cognitivas.

Alterações neuroquímicas cerebrais, nos casos de demência, incluem mudanças na atividade de enzimas como a colina acetiltransferase (ChAT), nas concentrações de neurotransmissores tais como dopamina, norepinefrina, serotonina, além de mudanças em receptores colinérgicos e dopamínicos (COYLE et al, 1983; GOTTFRIES et al, 1983; PRICE et al, 1985). Contudo, embora todos os principais sistemas de neurotransmissão tenham sido implicados na doença de Alzheimer, os mais consistentes e dramáticos achados estão relacionados com as deficiências no sistema colinérgico.

Estudos farmacológicos no homem, bem como nos animais, sustentam a hipótese de que mudanças funcionais na atividade do sistema colinérgico afetam o processo de aprendizagem e memória. Nos primatas, grandes lesões do sistema colinérgico estão associadas às deficiências primárias cognitivas, enquanto que pequenas lesões produzem falha na memória somente quando os animais são tratados com drogas anticolinérgicas, tal como a escopolamina (PIERCEY et al, 1987)

A hipótese colinérgica é baseada no fato de que a

colina acetiltransferase (ChAT), que pode ser considerada como um marcador da atividade colinérgica pré-sináptica, tem se apresentado diminuída no hipocampo e em regiões do córtex frontal associadas com a memória e a cognição. Outros achados morfométricos e neuroquímicos da perda de corpos celulares na substância inominata (COYLE et al, 1983), deficiências na acetilcolinesterase (AChE), uma enzima que degrada a acetilcolina (ACh), bem como alterações nos níveis e na síntese do próprio neurotransmissor colinérgico, fornecem suporte para o envolvimento do sistema colinérgico na demência. É sabido também que é na substância inominata que se encontra grande parte da inervação colinérgica do córtex cerebral de mamíferos, mais especificamente no núcleo basal de Meynert (nBM), nos primatas. Nos roedores esse complexo neuronal equivalente ao nBM é conhecido como núcleo basal (nB). Lesões nesses núcleos podem simular o quadro patológico da doença de Alzheimer (McKINNEY & COYLE, 1982).

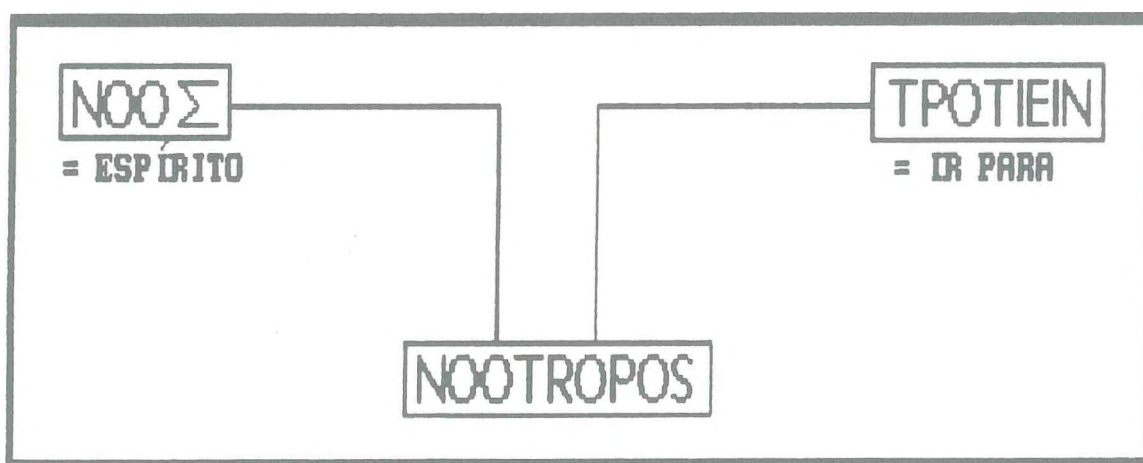
Mudanças na atividade pós-sináptica, com um número diminuído de receptores e /ou mudanças na afinidade ou função do receptor com o avanço da idade, podem ser outra explicação estrutural para a diminuição da função intelectual. O efeito da idade sobre os receptores muscarínicos, no cérebro de idosos normais, ainda não foi bem esclarecido. Nenhuma mudança ou diminuição no número dos receptores tem sido registrada nas áreas corticais do cérebro, em indivíduos normais ou dementes (WHITE et al, 1977; PERRY, 1980).

Um melhor entendimento das alterações desses receptores, nessas condições, é importante para a compreensão da disfunção no sistema colinérgico, servindo para identificar as características dos neurônios corticais colinoceptivos

inervados por esse sistema e também para a tentativa terapêutica de aumentar a função colinérgica nos casos patológicos, pois muitas drogas neuroativas atuam diretamente ou indiretamente, estimulando ou inibindo esses receptores.

1.2 - Drogas Nootrópicas: Piracetam (Protótipo)

Nos últimos anos, uma variedade de substâncias tem sido clinicamente testada em pacientes idosos, para o tratamento das desordens cérebro-vasculares relacionadas com a idade, e para as síndromes orgânicas cerebrais dos senescentes; os agentes nootrópicos constituem um exemplo. Sendo chamadas de "protetoras cerebrais" ou drogas "psicoativas" (SPAGNOLI & TOGNONI, 1983), as substâncias nootrópicas, segundo GIURGEA (1972), inauguram uma nova classe de medicamentos que estimulam o sistema nervoso central (SNC) de maneira diferente dos psicotrópicos, pois não provocam sonolência, nem sedação ou efeito tranquilizante, e não apresentam, também, atividade excitante ou alucinógena (MOYERSOONS & GIURGEA, 1974).



Uma droga nootrópica (GIURGEA, 1977; GIURGEA et al, 1981) deve: facilitar a aprendizagem; melhorar a memória, ser antiamnésica; facilitar a transferência interhemisférica, reduzir a sensibilidade cerebral às convulsões, hipóxia ou intoxicações químicas e não induzir efeitos colaterais autonômicos e comportamentais, quando administradas em altas doses e por longo tempo.

Os agentes nootrópicos podem ser classificados em 4 tipos, de acordo com o seu modo de ação, segundo SARTER (1986):

- 1 - Drogas agindo por melhorar o estado cerebral depois de uma administração crônica;
- 2 - Drogas que melhoram a aprendizagem (ou capacidade de reaprendizagem) por aumentar componentes não específicos (não associativos), tais como motivação, vigilância e etc;
- 3 - Drogas que melhoram a consolidação da memória,
- 4 - Drogas que facilitam a recuperação.

Sintetizado em 1963, o Piracetam (2 - oxo -pirrolidina - 1 - acetamida) é tido como o protótipo das drogas nootrópicas. É classificado como uma droga que melhora a atividade cerebral cronicamente, podendo ser gerontoprofilático. Seu peso molecular é igual a 142, e apresenta, quimicamente, certa semelhança com o ácido gama-aminobutírico (GABA). O núcleo da molécula pode ser obtido a partir da simples supressão de uma molécula de água do ácido seguida de uma ciclização (STUBBE & CYPRISSIAK, 1967) (FIGURA 1).

A toxicidade aguda do Piracetam foi estudada em rato e em camundongo, sendo a dose letal de ingestão situada acima de 10g/Kg. A toxicidade crônica (rato Wistar e cão Beagle)

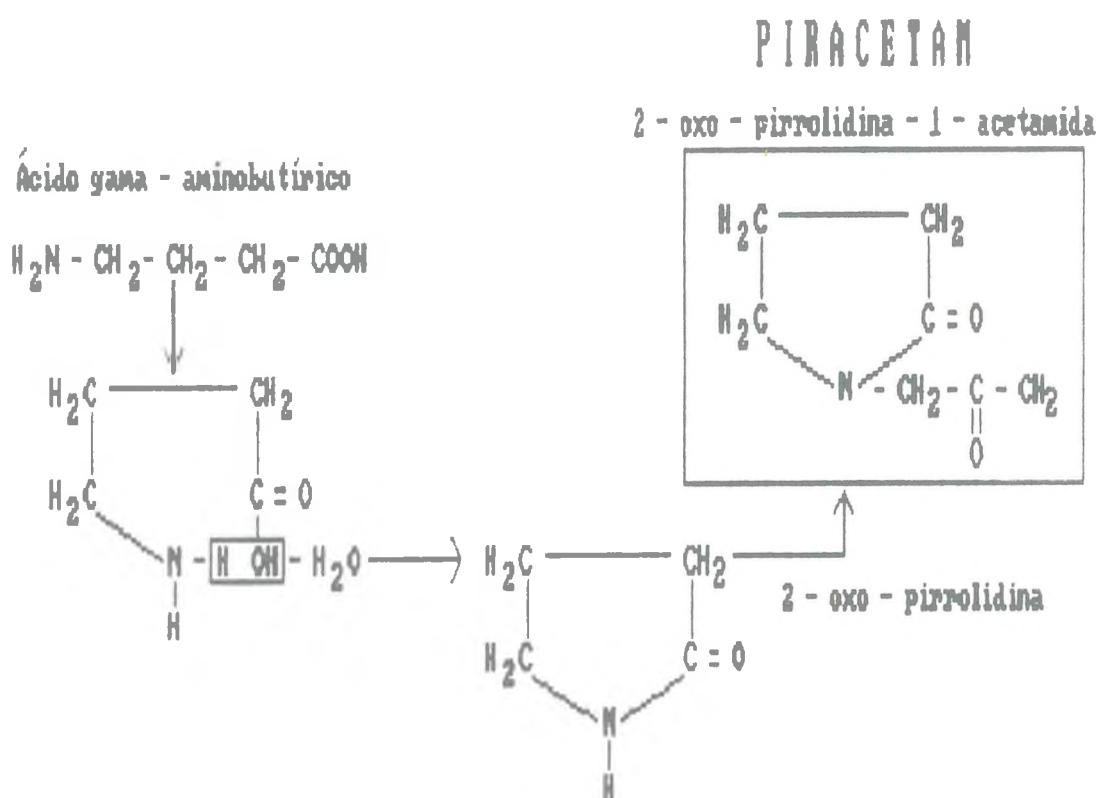


FIGURA 1 - Estrutura química do Piracetam

foi nula, mesmo acima de 1g/Kg/dia, durante 6 meses, no rato, e de 10g/Kg/dia no cão (GIURGEA, 1972).

Os estudos farmacocinéticos permitiram mostrar que a velocidade de distribuição no organismo deste agente nootrópico é rápida, atingindo a taxa sanguínea máxima no homem depois de 30 minutos. Sua eliminação também é feita rapidamente. O tempo de meia eliminação, no homem, é de cerca de 5 horas. A eliminação é total e se faz exclusivamente por via urinária (85 a 100%). Em consequência, a molécula do Piracetam não é metabolizada.

O estudo da distribuição dessa droga nos órgãos foi realizado no rato, utilizando-se Piracetam marcado por C_{14} (OSTROWSKI et al, 1975). Foi concluído que, para a maior parte dos órgãos (fígado, rins, coração), a concentração do Piracetam era proporcional à concentração sanguínea. Para o cérebro e cerebelo do rato e o líquido cefalorraquidiano humano, as concentrações máximas eram alcançadas após períodos mais longos, entre 3 e 4 horas, e os tempos de meia-vida eram marcadamente mais elevados (7,7 horas). Desse modo, a concentração cerebral pareceu aumentar regularmente em relação à concentração sanguínea, indicando, claramente, uma afinidade particular da molécula pelo cérebro através de um trofismo pelo tecido cerebral.

Nos testes farmacológicos clássicos, o Piracetam não demonstrou qualquer efeito. Não apresentou propriedade analgésica, nem anticolinérgica, anti-histamínica ou mesmo espasmolítica (BOISSIER; HOFF, 1980). Não exerceu ação no sistema cardiovascular ou respiratório (GIURGEA, 1972) nem interferiu no comportamento do animal.

A atividade bioquímica do Piracetam sobre o metabo-

lismo cerebral de animais normais, ao nível dos centros produtores de energia, consiste essencialmente numa aceleração da glicólise anaeróbica e respiratória, traduzindo-se por aumento do consumo de glicose e de lactato, e por uma produção maior de ATP (DOMANSKA & ZALESKA, 1979). O crescimento das potencialidades energéticas das células nervosas será a principal consequência do aumento das taxas de ATP e da relação ATP/ADP. Os centros consumidores de ATP, tais como as biossínteses das macromoléculas (fosfolipídios, ácidos nucleicos, etc.), serão os mais beneficiados, havendo um aumento de 30 a 50% na concentração dos derivados fosfatados orgânicos e, principalmente, dos fosfolipídios.

Nos casos de hipóxia, o Piracetam acelera os processos de restauração da atividade bioquímica normal da célula. A síntese dos ácidos ribonucleicos, particularmente atingida pela hipóxia, volta mais depressa ao normal.

As proteínas são sintetizadas ao nível dos polirribossomos. Uma célula terá uma síntese proteica tanto mais ativa quanto mais elevado for seu teor em polirribossomos. Nas células nervosas, a ligação entre a capacidade de memorização e o teor em polirribossomos já foi estabelecida. Com o envelhecimento, o número de polirribossomos diminui. O Piracetam, contudo, manifesta seu efeito, reformando as estruturas ativas (polirribossomos), a partir das estruturas inativas (monômeros).

Dados farmacológicos e bioquímicos tendem a evidenciar uma ativação específica da célula do córtex cerebral na presença desse nootrópico. Suas indicações clínicas são "a priori", numerosas. Seu emprego é justificado sempre que a célula cerebral for submetida a um estado de "stress" ou de

lismo cerebral de animais normais, ao nível dos centros produtores de energia, consiste essencialmente numa aceleração da glicólise anaeróbica e respiratória, traduzindo-se por aumento do consumo de glicose e de lactato, e por uma produção maior de ATP (DOMANSKA & ZALESKA, 1979). O crescimento das potencialidades energéticas das células nervosas será a principal consequência do aumento das taxas de ATP e da relação ATP/ADP. Os centros consumidores de ATP, tais como as biossínteses das macromoléculas (fosfolipídios, ácidos nucleicos, etc.), serão os mais beneficiados, havendo um aumento de 30 a 50% na concentração dos derivados fosfatados orgânicos e, principalmente, dos fosfolipídios.

Nos casos de hipóxia, o Piracetam acelera os processos de restauração da atividade bioquímica normal da célula. A síntese dos ácidos ribonucleicos, particularmente atingida pela hipóxia, volta mais depressa ao normal.

As proteínas são sintetizadas ao nível dos polirribossomos. Uma célula terá uma síntese proteica tanto mais ativa quanto mais elevado for seu teor em polirribossomos. Nas células nervosas, a ligação entre a capacidade de memorização e o teor em polirribossomos já foi estabelecida. Com o envelhecimento, o número de polirribossomos diminui. O Piracetam, contudo, manifesta seu efeito, reformando as estruturas ativas (polirribossomos), a partir das estruturas inativas (monômeros).

Dados farmacológicos e bioquímicos tendem a evidenciar uma ativação específica da célula do córtex cerebral na presença desse nootrópico. Suas indicações clínicas são "a priori", numerosas. Seu emprego é justificado sempre que a célula cerebral for submetida a um estado de "stress" ou de

sofrimento, tais como:

- oxigenação cerebral deficiente;
- agressão pelos tóxicos mais diversos;
- perturbações de natureza desconhecida, em que o funcionamento da célula cortical está comprometido como, perturbações da memorização, do aprendizado e da concentração intelectual.

Os efeitos do Piracetam melhorando a aprendizagem e a memória (VINCENT et al, 1985; MONDADORI et al, 1986), e sua indicação nas síndromes psico-orgânicas senis, têm sido objeto de numerosos estudos. Seu envolvimento com o sistema colinérgico constitui um problema de considerável interesse para a obtenção de futuras drogas para o tratamento da doença de Alzheimer. Poucos dados sugerem que o Piracetam pode interferir com funções colinérgicas pré-sinápticas, talvez aumentando a captação neuronal de alta afinidade da colina (WURTMAN et al, 1981; PEDATA et al, 1985). Contudo, SHIH & PUGSLEY (1985), juntamente com outros autores, não confirmaram essa hipótese. O efeito combinado do Piracetam e dos precursores colinérgicos sobre a síntese da acetilcolina e/ou liberação deste neurotransmissor é ainda controversa.

Muitos experimentos evidenciam uma grande perda dos terminais nervosos pré-sinápticos colinérgicos do córtex cerebral e hipocampo na demência pré-senil, não sendo isto acompanhado por alguma mudança significativa nos receptores pós-sinápticos, segundo QUIRION & col. (1986). Desse modo, os receptores muscarínicos colinérgicos pós-sinápticos podem representar um possível alvo de atuação dessas drogas nootrópicas (PILCH & MÜLLER, 1988).

1.3 - Receptores Colinérgicos Muscarínicos

O conceito de que a maioria das drogas, hormônios e neurotransmissores produziam seus efeitos interagindo com os receptores nas células, foi introduzido por John Newport Langley, em 1905. LANGLEY (1906) criou o termo "substâncias receptivas" ou "receptoras" quando escreveu sobre os sítios de ação da atropina e pilocarpina e também da nicotina e curare. A partir daí, então, o conceito de receptores passou a ser vastamente utilizado pelos farmacologistas. O receptor seria, portanto, um sítio de competição para agonista e antagonista, e o estímulo produzido pelo agonista através de um mecanismo ainda não bem esclarecido, levaria a uma determinada resposta fisiológica (LADURON, 1984).

A idéia que a sensibilidade dos tecidos às drogas era principalmente controlada pelas propriedades e quantidades de receptores presentes num determinado tecido (YOSHIDA, 1984), embora outros fatores também não fossem excluídos, juntamente com a compreensão dos efeitos agonistas e antagonistas sobre o comportamento, levaram não só à perspectiva de criação de novas drogas mais específicas e eficazes, mas também estimularam os cientistas à pesquisa exaustiva da natureza desses receptores, investigando suas propriedades neuroquímicas e estruturais.

Os receptores colinérgicos muscarínicos (RCM) são abundantes no sistema nervoso central. Evidências oriundas dos estudos funcionais e de "binding", usando radioligantes, têm revelado características importantes desses receptores no cérebro, podendo-se citar como exemplo, antagonistas

clássicos de receptores muscarínicos, como N - metil - escopolamina ($[^3\text{H}]$ NMS) e benzilato de quinuclidil ($[^3\text{H}]$ QNB), que se ligam com alta afinidade a uma única população de receptores (HULME et al, 1978). Outros estudos, porém, têm sugerido a existência de ligações heterogêneas com agonistas e antagonistas nestes receptores (RCM) em vários tecidos de mamíferos, incluindo o cerebral (CAULFIELD & STRAUGHAM, 1983; CORTÉS & PALACIOS, 1986). Recentemente, a Pirenzepina (PZ), um composto com atividade antimuscarínica seletiva, tem sido apontada por HAMMER et al (1980), em distinguir subclasses diferentes de RCM.

Os subtipos de receptores muscarínicos M_1 e M_2 são caracterizados por exibirem uma alta e uma baixa seletividade à Pirenzepina (PZ), respectivamente. Parecem também diferir quanto as suas distribuições e mecanismos de acoplamento receptor-efetor (HEPLER et al, 1987).

EVANS, WATSON & YAMAMURA (1985), examinando o desenvolvimento dos receptores muscarínicos em córtex cerebral e coração de camundongos, através da técnica de "binding" e usando Pirenzepina ($[^3\text{H}]$ PZ) e benzilato de quinuclidil ($[^3\text{H}]$ QNB) como ligantes, encontraram predominantemente no córtex cerebral, receptores muscarínicos com alta afinidade para $[^3\text{H}]$ PZ, ditos receptores M_1 (RCM₁), enquanto que, no coração a grande quantidade encontrada foi de M_2 (RCM₂).

No sistema nervoso central de ratos, o subtipo M_1 pareceu predominar no corpo estriado, hipocampo e córtex cerebral; o subtipo M_2 , embora em pouca quantidade foi predominante em cerebelo e tronco cerebral (MIYOSHI et al, 1987).

Na década de 80, com o desenvolvimento da cromatogra-

fia líquida de alta "performance" (HPLC), os sítios de ligação dos RCM foram purificados e sua natureza glico-proteica confirmada (HAGA & HAGA, 1985). A sequência de aminoácidos destas proteínas foi, determinada com o auxílio da tecnologia do DNA recombinante (FUKUDA et al, 1987; BONNER et al, 1987), representando um avanço na caracterização dessas moléculas receptoras. BONNER et al (1987) registraram a existência de quatro genes diferentes para codificar os receptores muscarínicos de ratos, sendo designados de m_1 , m_2 , m_3 e m_4 . Estudos em suínos permitiram a caracterização de dois subtipos de receptores, o PM_1 cerebral, e o PM_2 atrial (PERALTA et al, 1988). Os receptores humanos HM_1 e HM_2 foram codificados com base na análise da sequência de nucleotídeos codificadores dos receptores colinérgicos de suínos, apresentando uma sequência praticamente idêntica ao PM_1 e PM_2 , respectivamente. Já os receptores HM_3 e HM_4 apresentaram sequências de aminoácidos diferentes das observadas nos suínos.

Com relação a interação droga-receptor, a estimulação destes receptores muscarínicos resulta na ativação de vários sistemas transmembrana de sinalização, incluindo: a) inibição direta da adenilciclase e uma diminuição no AMP cíclico (HARDEN et al, 1986); b) ativação direta da fosfolipase C e um aumento na concentração celular de fosfato de inositol (InsP) e diacilglicerol (DG) (HARDEN et al, 1986); c) aumento no Ca^{+2} citosólico induzido pelo InsP, seguido de aumento nas concentrações celulares de ácido aracdônico e GMP cíclico (DEGEORGE et al, 1987); d) regulação de uma variedade de condutâncias iônicas de membrana (CHRISTIE & NORTH, 1988), como por exemplo, a abertura de certa classe de canais de K^+ (CODINA et al, 1987).

Uma clara associação das subclasses de receptores com respostas bioquímicas particulares não foi ainda estabelecida. YAMAMURA & SMITH (1984), GIL & WOLFE (1985) sugeriram que os RCM₁ estariam relacionados com o metabolismo de fosfoinositídeos, sendo isso confirmado, posteriormente, por McKINNEY et al (1988); este tipo de receptor seria mediador de efeitos excitatórios no córtex e hipocampo (DUTAR & NICOLL, 1988). Já os receptores M₂ (RCM₂) estariam envolvidos com a inibição da atividade da adenilciclase nos tecidos cerebrais.

Estudos ontogênicos do cérebro de rato sugerem que os receptores M₁ e M₂ podem apresentar, no período pós-natal, modelos de desenvolvimento diferentes, sendo os RCM₁ primeiramente desenvolvidos (MIYOSHI et al, 1987), aumentando sua densidade com o avanço da idade (EVANS et al, 1985). Em cérebros humanos adultos, GARVEY et al (1984), encontraram os dois subtipos de receptores muscarínicos no córtex frontal.

A perda de moléculas receptoras sinápticas ou uma diminuição da afinidade para com seus respectivos neurotransmissores, pode ser a base para o envelhecimento do cérebro. Estudos sobre alterações no receptor colinérgico durante a velhice e nos casos de demência são disponíveis, mas incertos. A densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos (RCM), tanto no homem como nos animais idosos em relação aos animais jovens, está diminuída (FREUND, 1980; PEDIGO et al, 1984) ou não está alterada (MORIN & WASTERLAIN, 1980, DRAVID, 1983). Já nos casos patológicos, como na doença de Alzheimer, a população desses receptores parece também estar diminuída (WOOD et al, 1983), não alterada (REISINE et al, 1978; LANG & HENKE, 1983) ou ainda, segundo JENNI - EIERMANN et al (1984), pode apresentar-se aumentada.

A técnica de "binding" (BENNETT Jr., 1978) e os estudos autorradiográficos muito têm contribuído para o esclarecimento destas alterações. A densidade de receptores muscarínicos (B) expressa em fentomoles por miligrama de proteína, para cada concentração do ligante radioativo utilizada é determinada pelos experimentos de "binding", sendo a densidade máxima (B_{max}) destes receptores, bem como a constante de dissociação no equilíbrio (Kd), obtida pela análise de Scatchard (BURT, 1981).

1.4 - Acetilcolinesterase

Em 1914, DALE sugeriu que deveria existir uma enzima que hidrolizava a acetilcolina (ACh). Contudo, somente em 1926, LOEWI & NAVRATIL demonstraram que esta enzima realmente existia. STEDMAN et al (1932) mediram a velocidade de hidrólise da acetilcolina por meios químicos e mostraram que a enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina era diferente das outras esterases até então conhecidas. A enzima foi chamada colina-esterase e foi encontrada primeiramente no soro de cavalo. Posteriormente, as colinesterases foram também encontradas no soro e células sanguíneas de outros animais, e em tecidos nervosos, incluindo partes do cérebro. Somente na década de 40 esta enzima pode ser melhor caracterizada, a partir de estudos cinéticos dessa reação enzimática. ALLES & HAWES (1940) compararam o substrato cinético da colinesterase em soro humano com o das células sanguíneas, e observaram que estes substratos eram diferentes. Eles também demonstraram

que, enquanto a colinesterase dos eritrócitos humanos hidrolisava acetil - beta - metil - colina numa velocidade significativa, a colinesterase sérica dificilmente hidrolisava este substrato (MAIN, 1979).

Em 1949, AUGUSTINSSON & NACHMANSOHN denominaram a colinesterase do eritrócito e também predominante no tecido nervoso de acetilcolinesterase (AChE) e a colinesterase sérica de butirilcolinesterase ou pseudocolinesterase (BuChE), haja visto que estudos anteriores (MENDEL & RUDNEY, 1943, NACHMANSOHN, 1944) revelaram que a colinesterase das células sanguíneas era específica, hidrolisando somente ésteres da colina e a colinesterase sérica não era; que também a colinesterase presente no tecido nervoso hidrolisava a ACh muito mais rapidamente que a butirilcolinesterase. Dessa forma, então, a acetilcolinesterase é uma enzima ligada as membranas celulares com a função fisiológica de hidrolisar a ACh liberada dos neurônios colinérgicos.

As colinesterases estão localizadas na membrana pós-sináptica, podendo também ser encontradas no axônio do nervo, sarcolema e sarcoplasma do tecido muscular, em tecidos não neuronais tais como: plasma, eritrócitos e plaquetas (MAIN, 1979). Em cérebros de ratos, uma alta concentração de AChE foi observada em neurônios do striatum, no núcleo lateral do tálamo, no tubérculo olfatório e no núcleo accumbens, em outras áreas a atividade acetilcolinesterásica apresentou-se em menor grau (PALKOVITS & JACOBOWITZ, 1974). Em camundongos neonatais, FIEDLER et al (1987) observaram que a atividade da enzima era baixa, havendo aumento e posterior equilíbrio 20 dias após o nascimento. BALDUINI et al (1987) também encontraram atividade aumentada durante o desenvolvimento do cere-

bro de ratos.

Em encéfalo humano, estudos feitos por VIANA et al (1984), revelaram que as maiores concentrações de acetilcolinesterase estavam no neocóstriado, seguindo-se o neocerebelo, paleocerebelo e paleocóstriado.

A acetilcolinesterase pode apresentar-se em diferentes formas moleculares que se diferenciam através da solubilidade e modo de ligação à membrana celular (MASSOULIÉ & BON, 1982). Atualmente existem seis formas moleculares diferentes; G_1 e G_4 são as predominantes no cérebro (PERRY, 1986). Estudos em tecidos corticais têm revelado a perda seletiva da forma molecular G_4 (tetramétrica) nos casos de demência senil e pré-senil (ATACK et al, 1983).

1.5 - Objetivos

O presente trabalho procura mostrar que o Piracetam poderá ser utilizado no tratamento das disfunções cerebrais, principalmente dos casos de demência senil, por sua influência na densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos. Para isso, então, foram feitos estudos com alguns componentes do sistema colinérgico (receptor muscarínico e atividade acetilcolinesterásica) no córtex motor de ratos, em função da idade, após tratamento crônico com Piracetam, sendo determinada:

- a) a densidade (B_{max}) e a afinidade (Kd) dos receptores muscarínicos nos grupos tratados e não tratados.
- b) a atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) e o

conteúdo de proteína em ambos os grupos.

- c) a provável atuação da substância sobre os sítios colinoceptivos e sobre a acetilcolinesterase (mecanismo de ação).

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - Animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar de ambos os sexos, jovens (3 - 4 meses) e velhos (12 - 30 meses), com peso variando de 100 - 200g e 200 - 380g, respectivamente. Os animais foram fornecidos pelo biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará.

Durante os experimentos todos os animais foram mantidos em caixas com no máximo 6 animais, em condições ambientais semelhantes, submetidos a um ciclo de alternância de claridade e escuridão a cada 12 horas, determinado pela duração do dia e da noite na região, com livre acesso à água e ração do tipo "Purina" (Brasil).

2.2 - Preparo das Drogas

Ampolas com 200mg/ml de Piracetam (Nootropil - Rhodia S.A., Bélgica) foram utilizadas nos experimentos para a administração oral.

Dez gramas de Hidróxido de Lítio (VETEC - Química Fina Ltda, Brasil), dissolvidas em água bidestilada foram

necessárias para a obtenção de uma solução de 100mg/ml de Cloreto de Lítio, ajustado a um pH 7,6 com o auxílio de ácido clorídrico concentrado (Reagen - Quimibrás Indústrias S.A , Brasil).

2.3 - Tratamento dos Grupos Experimentais

Ratos albinos de ambos os sexos foram separados em grupo de 4 a 6 animais, divididos em faixas etárias diferentes (3 - 4 meses e 12 - 30 meses), sendo tratados entre 8 e 10h da manhã, durante 1, 7 e 15 dias, com 100 e/ou 500mg/Kg de Piracetam . Também foram feitas administrações combinadas de Piracetam (500mg/Kg) e Cloreto de Lítio (50 e 100mg/Kg). Para tais experimentos foram utilizados ratos albinos (12 - 30 meses), os quais foram tratados inicialmente com Cloreto de Lítio e, após 30 minutos, com Piracetam, durante 7 dias . As drogas foram administradas por via oral, utilizando-se uma cânula intra-gástrica de polietileno, num volume final de 1ml para cada animal. Os animais controles foram tratados com solução salina 0,9%.

Trinta minutos depois da administração da(s) droga(s), os animais foram observados durante 90 minutos no meio e no final do tratamento, a fim de se verificar possíveis alterações comportamentais nos grupos tratados.

Após vinte e quatro horas da última administração, os animais foram sacrificados, seus cérebros removidos e as áreas cerebrais dissecadas sobre gelo.

2.4 - Dissecação das Áreas Cerebrais (Hipocampo, Núcleos da Base, Córtex Motor e Somatossensorial)

Os animais foram decapitados com uma guilhotina Harvard, USA, e, em seguida, os encéfalos foram rapidamente retirados e colocados numa lâmina de metal sobre gelo.

Acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi liberada das leptomeninges com a ajuda de uma pinça reta de microdissecação que divulsionou o córtex, delicadamente, em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex já divulsionado foi rebatido para os lados, expondo parte do hipocampo que, com divulsionamento foi descolado e retirado.

Os núcleos da base (caudado, putamen e globo pálido) foram isolados das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação, sendo a sua retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex.

Após retirada dos núcleos, o rebatimento da camada cortical foi desfeito, procurando-se reconstituir o contorno dos hemisférios cerebrais e recolocar o córtex na sua posição inicial. Com uma tesoura de microdissecação foi retirada uma porção superior e mediana do córtex, numa extensão de cerca de 3 - 5mm, tendo como limite posterior um plano imaginário que dividiria o cérebro em partes iguais, anterior e posterior. Esta porção retirada corresponde à área motora do córtex fronto-parietal (ZILLES & WREE, 1985).

O córtex somatossensorial foi retirado com o auxílio da tesoura de microdissecação, numa extensão de cerca de 3 - 5mm anteriores ao plano frontal já mencionado anteriormente,

imediatamente acima da fissura rinal, na face lateral de cada hemisfério cerebral.

Após a dissecação, cada área cerebral foi colocada em papel de alumínio, pesada e armazenada a -10°C para uso posterior. O córtex motor foi utilizado nos nossos experimentos, sendo conservado no máximo, durante 24 horas. Contudo, em alguns experimentos iniciais esta área foi estocada por um maior período de tempo (máximo de 7 dias), sendo, porém, os tecidos considerados viáveis para experimentação da mesma forma que os outros (BURKE & GREENBAUM, 1987; FIEDLER & col., 1987).

2.5 - Materiais das Técnicas Empregadas

Foram utilizados os seguintes materiais nas diversas técnicas experimentais empregadas:

- Balança analítica (modelo H5, Mettler, Suíça);
- Balança Mettler (modelo P3, Suíça);
- Banho-maria (FANEM, São Paulo, Brasil);
- Cubetas de plástico (Sarstedt, Alemanha Oriental);
- Espectrofotômetro (modelo DU, Beckman, Fullerton, CA, EUA) com medidor de absorvância digital (Modernization System, Gilford, Oberlin, Ohio, EUA);
- Homogeneizadores (Belco, EUA);
- Micropipetas (H.E. Pedersen, Dinamarca);
- Pipetador automático (Gilson, Middleton, WS, EUA);
- Filtro de fibra de vidro (GF/B, Whatman, Maidstone, England);

- Aparelho para filtração a vácuo (Millipore apparatus, Bedford, MA, EUA);
- Estufa de secagem (modelo 315 SE, FANEM, São Paulo, Brasil)
- Frascos de vidro para contagem de cintilação (Value Vials, Beckman, Fullerton, CA, EUA);
- Contador de cintilação líquida (LS - 100, Beckman, Fullerton, CA, EUA).

2.6 - Técnicas

2.6.1 - Determinação da Densidade de Receptores Muscarínicos (Técnica de "Binding")

2.6.1.1 - Soluções Reagentes

As seguintes soluções reagentes foram empregadas nessa técnica:

- Solução estoque de N - metil - escopolamina: cloreto de [^3H] NMS (85 Ci/mmol, New England Nuclear, Boston, MA, EUA) 23,52nM em tampão fosfato de sódio 150mM, pH 7,4;
- Solução estoque de atropina: sulfato de atropina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 0,5mM em água bidestilada;
- Tampão fosfato de sódio: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) 150mM em água bidestilada, pH 7,4, ajustado com solução de HCl, 1N (Merck, Rio de Janeiro, Brasil);
- Coquetel de cintilação: 0,5g de p - bis - 2 - (5 - fenil-

oxazolil) benzeno, POPOP (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 4,0g de 2,5 - difeniloxazol, PPO (Sigma, St. Louis, MO, EUA) O volume foi completado para 1000ml com tolueno para cintilação (Beckman, Fullerton, CA, EUA).

2.6.1.2 - Método

A densidade de receptores muscarínicos foi determinada utilizando-se [³H]N - metil - escopolamina como ligante específico dos receptores muscarínicos, por apresentar, segundo WHEATLEY (1988), a capacidade de:

- interagir com os sítios específicos existentes nos fragmentos de membranas dos tecidos homogeneizados;
- ficar retida no filtro de fibra de vidro que permite apenas a filtração de partículas de tamanho inferior a 1 μ m.

Desse modo a [³H] NMS marca especificamente os receptores colinérgicos presentes no tecido estudado (B - "bound").

A atropina (12,5 μ M), outro antagonista muscarínico, é acrescentada, na forma não marcada, nos tubos correspondentes ao "binding" não específico, numa concentração muito superior a da [³H] NMS (2,35nM), para assim interagir, seletivamente, com os mesmos sítios de ligação do receptor, deslocando o ligante tritiado, deixando-o livre. Este ligante livre (F - "free") é retido no filtro, e a radioatividade é contada por cintilação líquida, correspondendo às ligações não específicas.

Assim, homogeneizados a 10% (peso/volume) do tecido cerebral em estudo foram feitos em tampão fosfato de sódio. Rapidamente, alíquotas de $10\mu\text{l}$ de homogeneizado foram pipetadas em duplicatas e triplicatas, na presença ou não de sulfato de atropina, respectivamente, segundo DOMBROWSKI (1983). Todas as amostras foram incubadas com [^3H] NMS 2,35nM e tampão fosfato de sódio num volume final de $200\mu\text{l}$, para experimentos de ponto único. Nos experimentos de saturação, o ligante foi utilizado em concentrações que variavam de 0,058 a 9,408nM.

Após incubação a 37°C , em banho-maria, por 30 minutos, a reação foi terminada por filtração a vácuo em filtros GF/B Whatman. Os tubos de ensaio foram lavados 3 vezes com 4ml de solução gelada de cloreto de sódio 0,9% (peso/volume). Os filtros foram secos em estufa a 60°C , por no mínimo 2 horas, e colocados em frascos contendo 3ml do coquetel de cintilação. A radioatividade foi medida após 2 horas, de modo a permitir que os filtros ficassem translúcidos, em um contador de cintilação líquida, com eficiência média de 48%. A ligação específica foi calculada pela diferença da ligação total e da ligação não específica, sendo os resultados expressos em fentomoles por miligrama de proteína.

2.6.2 - Dosagem de Proteína

2.6.2.1 - Soluções Reagentes

Para a dosagem de proteína foram usados os seguintes reagentes:

- Reagente A: Na_2CO_3 (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) a 2% em 0,1N NaOH (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil);
- Reagente B: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 0,5% em $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Grupo Química, Rio de Janeiro, Brasil) a 1%;
- Reagente C: solução de cobre alcalina (24ml do reagente A com 1ml do reagente B, misturados no momento de usar);
- Reagente de Folin - Ciocalteau - fenol (Laborclin, Piraquara, PR, Brasil) 1:1 em água bidestilada;
- Solução de albumina sérica bovina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 1mg/ml em água bidestilada.

2.6.2.2 - Método

A quantidade de proteína em homogeneizados de córtex cerebral foi determinada utilizando albumina sérica bovina como padrão, de acordo com o método de LOWRY e colaboradores (1951), que emprega duas reações de formação de cor para analisar a concentração proteica fotometricamente.

Inicialmente é feita uma reação biureto de baixa eficiência qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor

azulada na presença de ligações peptídicas. Esta cor biureto é característica de todas as proteínas e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa do ensaio. Depois, o método emprega uma mistura complexa de sais inorgânicos, o reagente de Folin-Ciocalteu, que produz uma cor verde azulada intensa na presença de tirosina ou triptófano livres ou ligados à proteínas. Como as quantidades desses dois aminoácidos são geralmente constantes nas proteínas solúveis, com poucas exceções, a cor das reações (verde - azulada) é indicativa da presença de proteína e a intensidade da cor proporcional à concentração. Esta coloração é medida no comprimento de onda de 750nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA.

2.6.3 - Determinação da Atividade Acetilcolinesterásica (AChE)

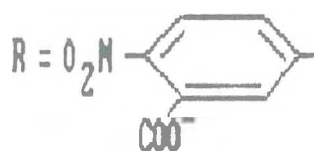
2.6.3.1 - Soluções Reagentes

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

- tampão fosfato de sódio. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) 0,1M em água bidestilada, pH 7,0;
- solução de iodeto de acetiltiocolina, ATC (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 75mM em água bidestilada;
- solução do ácido 5:5' - ditiobis - 2 - nitrobenzoato, DTNB (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 10mM em tampão fosfato de sódio.

2.6.3.2 - Método

A atividade acetilcolinesterásica foi determinada segundo ELLMAN e colaboradores (1961), tendo como princípio a medida da velocidade de produção de tiocolina à proporção que a acetiltiocolina (ACT), utilizada como substrato é hidrolisada. Isto é acompanhado pela reação contínua do tior com o íon 5:5 - ditiobis - 2 - nitrobenzoato (I) para produzir o ânion amarelo do ácido 5 - tio - 2 - nitro - benzóico (II), cuja coloração é medida em 412 nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU acoplado a um sistema de modernização da Gilford, EUA, o que permitiu leituras automáticas em sistema digital e forneceu maior sensibilidade (leitura em décimos de milésimos de absorbâncias).



A atividade enzimática é medida através da leitura da variação da absorbância por minuto, durante 3 minutos, sendo a reação linear durante pelo menos 10 minutos (ALLES & HAWES, 1953). A atividade específica foi expressa em nmoles de ATC hidrolisados por miligrama de proteína por minuto.

2.7 - Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi feita em computador TRS - 80 modelo 4, Radio Sherp, sendo comparada a média dos experimentos obtidos através do teste t de Student não pareado, baseado num nível de significância de 5%.

Nos experimentos de saturação foi feita a análise de regressão linear.

3 - RESULTADOS

3.1 - Efeito da Administração de Piracetam sobre os Receptores Colinérgicos Muscarínicos (RCM) e a Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) em Cortex Motor Cerebral de Ratos - Experimentos "in vivo"

A TABELA 1 apresenta o efeito da administração oral do Piracetam, durante uma semana, sobre a densidade dos receptores muscarínicos, no córtex motor de ratos jovens e velhos em função da concentração da droga. Os resultados mostram um aumento significativo no número de receptores, expressos em femtomoles por miligrama de proteína, no grupo dos ratos jovens (777,2fmoles/mg de proteína, $p < 0,05$) e idosos (741,9fmoles/mg de proteína, $p < 0,01$), na dose de 500mg/Kg de Piracetam, equivalendo a um percentual de aumento de 42,34% e 36,03%, respectivamente, em relação aos grupos controle (546,0 e 545,4fmoles/mg de proteína). Embora não significativo, um pequeno aumento na densidade destes sítios receptores foi também observado após a administração de 100mg/Kg da droga nos animais de idade avançada.

O efeito da administração crônica de Piracetam (500mg/Kg), alterando a densidade dos receptores muscarínicos foi verificado mesmo após uma semana de tratamento (485fmoles/mg de proteína, $p < 0,01$), sem haver alteração na atividade acetilcolinesterásica (TABELA 2). Nesta mesma tabela, com a administração de Piracetam (500mg/Kg) durante 15 dias foi observado novamente um aumento significativo

TABELA 1 - Efeito da administração do Piracetam sobre a densidade dos receptores muscarínicos no córtex motor cerebral de ratos jovens e velhos.

PIRACETAM (mg/Kg)	RECEPTOR MUSCARÍNICO (fmol/mg de proteína)	
	JOVENS	VELHOS
0	546,0 ± 39,20 (18)	545,4 ± 42,76 (6)
100	495,3 ± 16,37 (5)	590,2 ± 38,49 (3)
500	777,2 ± 87,45 (8)*	741,9 ± 11,68 (8)**

Os animais foram tratados com Piracetam (100 e 500mg/Kg, por via oral), diariamente, durante 1 semana. Os valores representam a média ± desvio padrão do número de animais em parênteses.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$ (teste t de Student)

TABELA 2 - Efeito da administração do Piracetam sobre a densidade dos receptores muscarínicos e atividade acetilcolinesterásica (AChE) no córtex motor de ratos em função do tempo.

TEMPO DE ADMINISTRAÇÃO	RECEPTOR MUSCARÍNICO (fmol/mg proteína)	ATIVIDADE DA AChE (nmol/mg proteína/min.)
Controle	356,0 ± 28,03 (10)	23,9 ± 2,41 (9)
1 semana	485,0 ± 31,03 (4)*	20,4 ± 3,98 (6)
2 semanas	499,3 ± 65,06 (6)*	25,2 ± 0,82 (6)

Ratos jovens foram tratados com Piracetam 500mg/Kg, por via oral. Os valores representam a média ± desvio padrão do número de animais em parênteses.

* $p < 0,01$ (teste t de Student)

(499,3fmoles/mg de proteína, $p < 0,01$) dos RCM nos ratos jovens.

Nenhuma diferença significativa no número de receptores foi vista após vinte e quatro horas de administração de uma única dose de Piracetam 500mg/Kg, por via oral, nos dois grupos estudados (TABELA 3). Estes resultados foram também expressos de maneira percentual na FIGURA 2, mostrando um aumento e uma diminuição não significativa de 6,4% e de 4% na densidade dos receptores colinérgicos de ratos jovens e velhos, respectivamente, em relação aos seus controles (100%). Nesta mesma figura foi observado também que, com uma semana de tratamento (Piracetam 500mg/Kg), houve um aumento dos RCM de 31,08% ($p < 0,05$) nos animais jovens e de 18,7% ($p < 0,01$) nos velhos.

Os resultados das curvas de saturação (TABELA 4) mostraram um aumento nos valores encontrados para as densidades máximas dos receptores muscarínicos (B_{max}) tanto nos ratos jovens (961,9fmoles/mg de proteína, $p < 0,05$) como nos de idade avançada (747,6fmoles/mg de proteína, $p < 0,05$) tratados diariamente com 500mg/Kg de Piracetam, durante uma semana, por via oral, quando comparados com os valores dos seus respectivos controles, 663,4 e 628,0fmoles/mg de proteína. Houve também um aumento nos valores da constante de dissociação de equilíbrio (Kd) de ambos os grupos (0,82 e 0,84nM) em relação aos controles jovens (0,45nM) e velhos (0,47nM), respectivamente. Os valores de Kd não se apresentaram diferentes e só uma pequena diminuição nos valores de B_{max} foi vista ao se comparar os animais jovens e velhos não tratados com a droga.

As FIGURAS 3 e 4 mostraram "Scatchard" representa-

TABELA 3 - Efeito da administração de uma única dose de Piracetam sobre a densidade dos receptores muscarínicos no córtex motor cerebral de ratos jovens e velhos.

CONDIÇÃO	RECEPTOR MUSCARÍNICO (fmol/mg de proteína)	
	JOVENS	VELHOS
Controle	592,9 ± 12,72 (7)	620,8 ± 9,30 (3)
Piracetam	630,8 ± 24,16 (7)	600,5 ± 53,8 (3)

Os animais foram sacrificados 24 horas depois da administração de Piracetam (500mg/Kg, por via oral) Os valores representam a média ± desvio padrão do número de animais em parênteses.

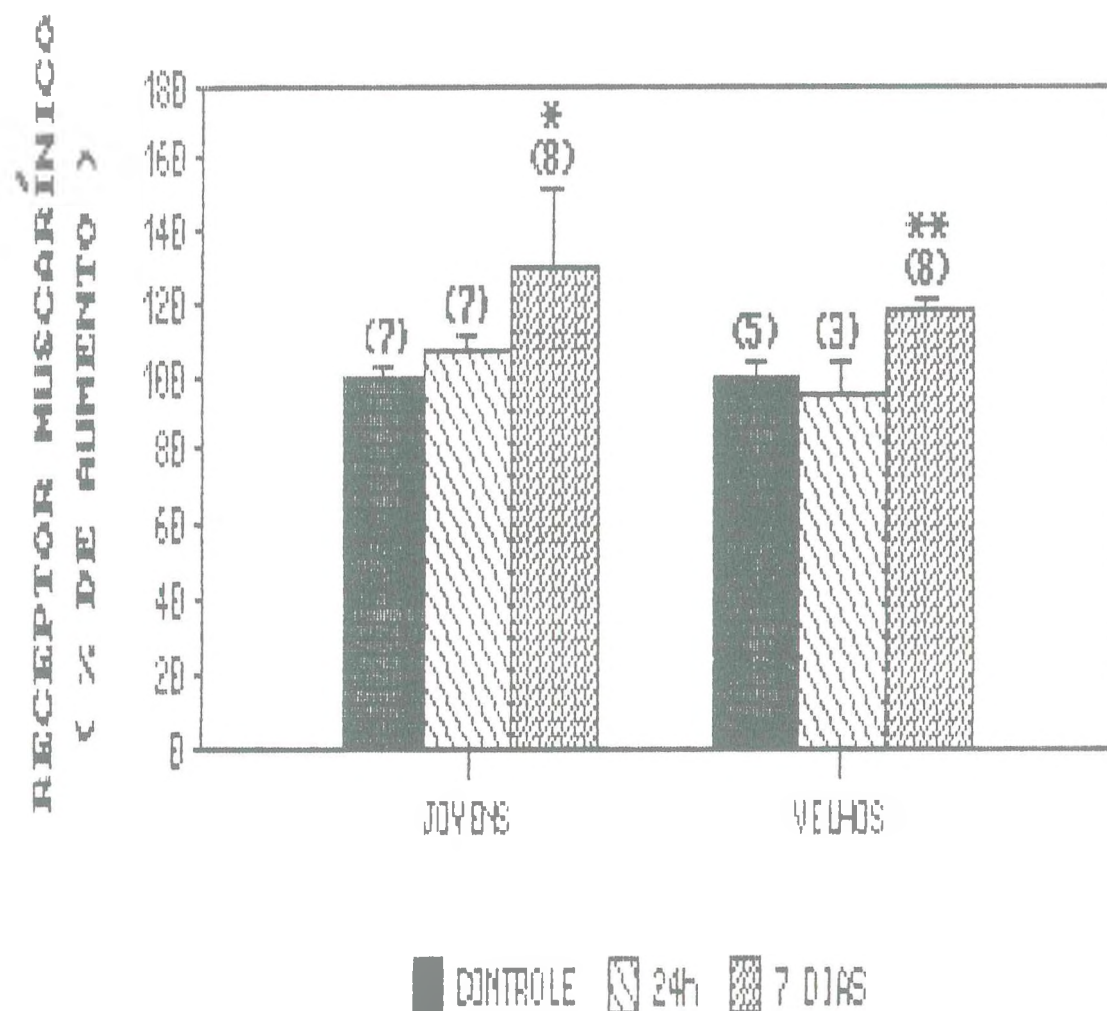


FIGURA 2 - Percentagem de aumento da densidade de receptores colinérgicos (RCM) em córtex motor cerebral de ratos jovens e velhos, com administração de Piracetam (500mg/Kg, por via oral) numa única dose (24h) ou durante 7 dias, diariamente. Os valores mostrados em parênteses representam o número de animais utilizados.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$ (teste t de Student)

TABELA 4 - Efeito da administração de Piracetam sobre a densidade dos receptores muscarínicos (B_{max}) e constante de dissociação (Kd) no córtex motor de ratos jovens e velhos.

RATOS	TRATAMENTO	B_{max} (fmol/mg Proteína)	Kd (nM)
Jovens	Controle	663,4 ± 101,81 (4)	0,45 ± 0,06 (4)
	Piracetam	961,9 ± 109,70 (4)*	0,82 ± 0,15 (4)*
Velhos	Controle	628,0 ± 33,54 (3)	0,47 ± 0,05 (3)
	Piracetam	747,6 ± 12,24 (3)*	0,84 ± 0,06 (4)**

Os animais foram tratados com Piracetam, diariamente, durante 1 semana (500mg/Kg, p.o.). Os valores representam a média ± desvio padrão do número de experimentos em parênteses feito com o tecido cerebral de 3 - 4 animais.

* $p < 0,05$

** $p < 0,01$ em relação aos respectivos controles (teste t de Student)

tivos do "binding" específico da [^3H] N - metilescopolamina nos córtices cerebrais motores de ratos jovens e idosos depois da administração de Piracetam 500mg/Kg, durante uma e duas semanas. Os coeficientes de correlação obtidos por regressão linear nos animais jovens (FIGURA 3) foram $r = 0,988$ e $r = 0,970$ para o controle ($B_{\text{max}} = 664,8$ fmoles/mg de proteína; $K_d = 0,47\text{nM}$) e para o grupo tratado com Piracetam (500mg/Kg), durante 15 dias ($B_{\text{max}} = 774,7$ fmoles/mg de proteína; $K_d = 0,55\text{nM}$). Já nos idosos (FIGURA 4) os valores dos coeficientes de correlação obtidos foram $r = 0,986$ para o grupo controle ($B_{\text{max}} = 634$ fmoles/mg de proteína; $K_d = 0,45\text{nM}$) e $r = 0,976$ e $r = 0,940$ para os grupos tratados com Piracetam (500mg/Kg) durante 7 ($B_{\text{max}} = 738,2$ fmoles/mg de proteína; $K_d = 0,90\text{nM}$) e 15 dias ($B_{\text{max}} = 838,7$ fmoles de proteína; $K_d = 0,95\text{nM}$), respectivamente. A representação gráfica das curvas de saturação de ligações específicas e inespecíficas são também apresentadas em cada figura.

A atividade da Acetilcolinesterase (ACHE) foi alterada de maneira significativa com a administração de Piracetam 100mg/Kg, durante uma semana, nos dois grupos de idade (TABELA 5), sendo os valores obtidos equivalentes a 17,1 nmoles/mg de proteína/minuto (jovens) e 12,75 nmoles/mg de proteína/minuto (velhos) em relação aos seus respectivos controles (22,95 e 24 nmoles/mg de proteína/minuto). Já com uma dose maior (500mg/Kg) foi observado um pequeno aumento da atividade acetilcolinesterásica, porém sem nenhum significado estatístico.

O conteúdo de proteína no córtex cerebral de ratos jovens e velhos foi aumentado cerca de 12 e 17%, respectivamente, depois de duas semanas de tratamento com Piracetam

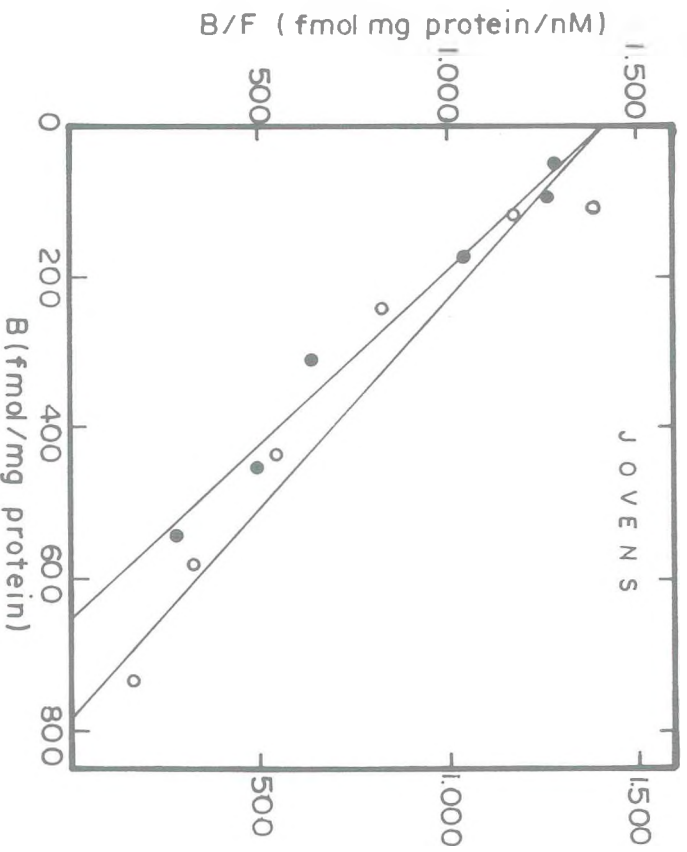
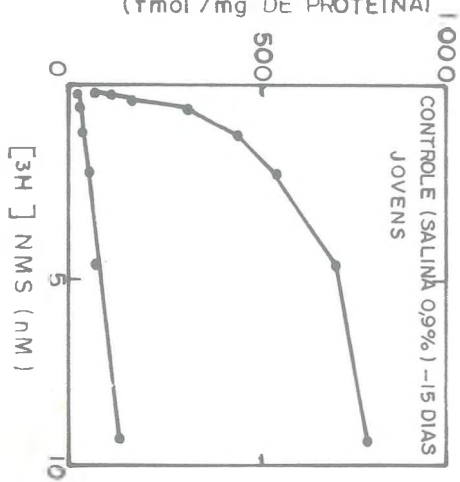
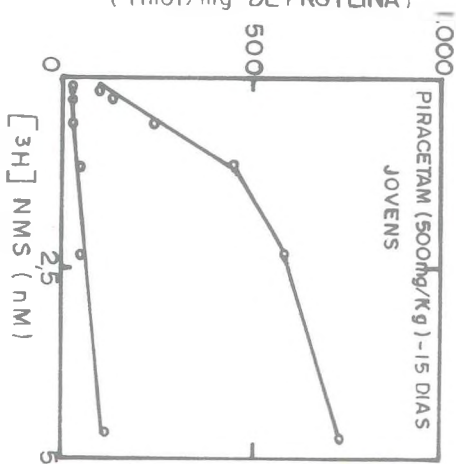


FIGURA 3 - Representação gráfica do Scatchard das ligações específicas da [^3H] NMS em córtex motor cerebral de ratos jovens controles (●) e tratados com Piracetam 500mg/Kg (○), durante 15 dias. Acima: ligações específicas (curvas) e inespecíficas (retas) de [^3H] NMS em homogeneizados de córtex motor

[³H] NMS LIGADA
(fmol/mg DE PROTEÍNA)



[³H] NMS LIGADA
(fmol/mg DE PROTEÍNA)



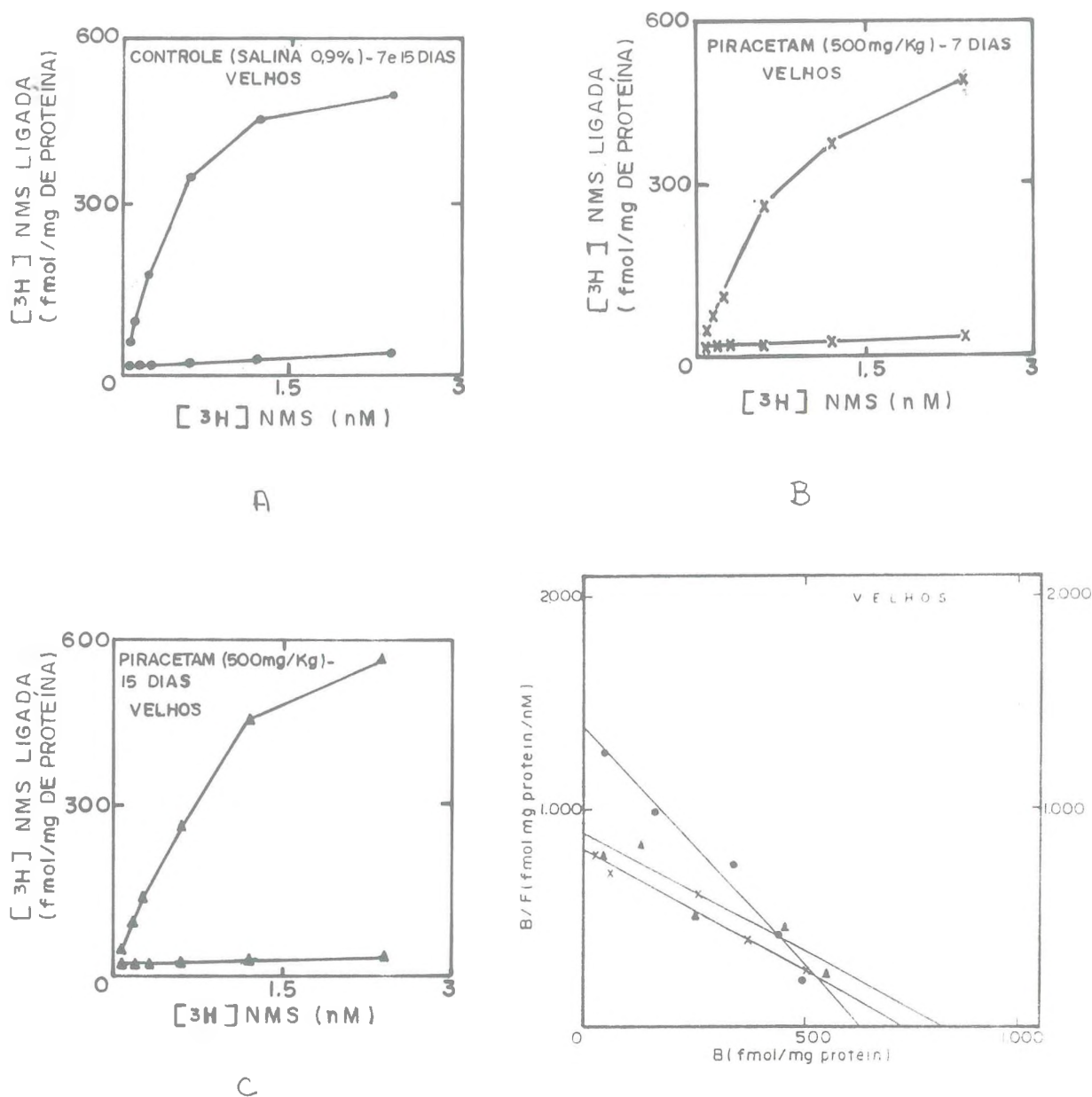


FIGURA 4 - Representação gráfica do Scatchard das ligações específicas da [³H] NMS em córtex motor de ratos velhos controles (●) e tratados com Piracetam 500mg/Kg, durante 7 (x) e 15 dias (▲) A, B e C ligações específicas (curvas) e inespecíficas (retas) de [³H] NMS em homogeneizados de córtex motor

TABELA 5 - Efeito da administração do Piracetam sobre a atividade da Acetilcolinesterase (AChE) em córtex motor de ratos jovens e velhos.

ANIMAIS	CONCENTRAÇÃO DO PIRACETAM (mg/Kg)	ATIVIDADE DA AChE (nmol/mg de proteína/minuto)
	0	22,95 ± 2,16 (5)
JOVENS	100	17,10 ± 1,30 (6)*
	500	25,95 ± 4,05 (5)
	0	24,00 ± 0,63 (3)
VELHOS	100	12,75 ± 1,83 (3)**
	500	31,65 ± 2,77 (3)

Ratos jovens e velhos foram tratados, diariamente, com Piracetam (100 e 500mg/Kg, por via oral, 1 semana). Os valores acima representam a média ± desvio padrão do número de animais em parênteses.

* p < 0,05

** p < 0,01 em relação aos respectivos controles (teste t de Student)

500mg/Kg, sendo esse valor somente significativo nos animais jovens (TABELA 6). Os valores obtidos foram de 107,05 e 103,3mg/g de tecido para os grupos controles jovens e velhos e de 119,64 e 121,34mg/g de tecido para os grupos testes, respectivamente.

3.2 - Estudo do Mecanismo de Ação do Piracetam sobre os Receptores Colinérgicos Muscarínicos (RCM) e sobre a Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) em Córtex Motor de Ratos

3.2.1 - Efeito do Piracetam sobre a Atividade da Acetilcolinesterase (AChE) - Experimentos "in vitro"

Concentrações variadas de Piracetam (1, 5, 10, 100 e 1000 μ M) foram acrescentadas ao meio de reação usado para ensaios enzimáticos, contendo homogeneizados de córtex motor de ratos. A incubação foi feita durante 30 minutos, prosseguindo-se com a determinação da atividade enzimática. A TABELA 7 apresenta os resultados destes experimentos tendo sido obtidos os valores de 27,0; 24,3; 30,3; 27,5 e 28,8nmoles/mg de proteína/minuto para as concentrações utilizadas, respectivamente, e de 29,1nmoles/mg de proteína/minuto para o grupo controle.

TABELA 6 - Efeito da administração do Piracetam sobre o conteúdo de proteína (mg/g de tecido) em córtex cerebral de ratos jovens e velhos.

CONDIÇÃO	CONTEÚDO DE PROTEÍNA (mg/g de tecido)	
	JOVENS	VELHOS
Controle	107,05 ± 4,32 (19)	103,30 ± 9,63 (6)
Piracetam	119,64 ± 3,71 (17)*	121,34 ± 3,27 (5)

Os animais foram tratados, diariamente, com 500mg/Kg de Piracetam, por via oral, durante 2 semanas. Os valores representam a média ± desvio padrão do número de experimentos em parênteses.

* $p < 0,05$ (teste t de Student)

TABELA 7 - Efeito do Piracetam sobre a atividade da Acetilcolinesterase (AChE) em córtex motor cerebral de ratos jovens (in vitro)

PIRACETAM (μ M)	ATIVIDADE DA AChE (nmol/mg de proteína/minuto)
0	29,1 \pm 1,25 (2)
1	27,0 \pm 0,40 (2)
5	24,3 \pm 0,21 (2)
10	30,3 \pm 0,65 (2)
100	27,5 \pm 0,50 (2)
1000	28,8 \pm 1,32 (2)

O Piracetam, nas concentrações indicadas, foi adicionado no meio de reação usado para ensaios enzimáticos, contendo homogeneizados de 4 animais. A incubação foi feita durante 30 minutos. Os valores representam a média \pm desvio padrão do número de experimentos em parênteses.

3.2.2 - Ação do Piracetam sobre os Sítios de Ligação da [³H] NMS - Experimentos "in vitro" (de competição)

O Piracetam nas concentrações de 10, 100 e 1000 μ M foi adicionado ao meio de reação contendo tampão fosfato de sódio 150nM, pH 7,4, e uma alíquota do homogeneizado a 10% do córtex cerebral de ratos jovens. Em seguida, antes de se adicionar o ligante radioativo ([³H] NMS), a droga foi incubada por 10 minutos, prosseguindo-se, então, toda a metodologia requerida pela técnica de "binding".

Os resultados mostraram que não houve nenhuma alteração na ligação específica da N - metilescopolamina aos receptores muscarínicos, quando se comparou os valores obtidos com as concentrações utilizadas (444,5; 491,9 e 524,2fmoles/mg de proteína) ao controle determinado (481,6fmoles/mg de proteína) (TABELA 8).

3.2.3 - Efeito da Administração Combinada de Cloreto de Lítio e Piracetam sobre a Densidade dos RCM, Atividade Acetilcolinesterásica e Conteúdo de Proteína - Experimentos "in vivo"

Animais de idade avançada foram tratados com Cloreto de Lítio (50 e 100mg/Kg) e/ou Piracetam (500mg/Kg) durante 7 dias, diariamente por via oral. As administrações em conjunto foram feitas inicialmente com Cloreto de Lítio e, após 30 minutos, com Piracetam. Todos os animais foram observados e nenhuma alteração comportamental foi detectada.

A densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos

TABELA 8 - Efeito do Piracetam sobre os sítios de ligação da [³H] NMS em homogeneizados de córtex motor cerebral de ratos jovens "in vitro".

CONCENTRAÇÃO DO PIRACETAM (μM)	SÍTIOS DE LIGAÇÃO DA [³ H] NMS (fmol/mg de proteína)
0	481,6 ± 17,20 (3)
10	444,5 ± 5,88 (3)
100	491,9 ± 3,18 (3)
1000	524,2 ± 30,65 (3)

O Piracetam, nas concentrações indicadas, foi adicionado no meio de reação contendo homogeneizados de tecidos cerebrais de 3 animais. A incubação foi feita durante 10 minutos antes da filtração. Os valores representam a média ± desvio padrão do número de experimentos em parênteses.

no córtex motor cerebral não foi alterada nos animais tratados com 50 (430,60fmoles/mg de proteína) e 100mg/Kg (404,20fmoles/mg de proteína) de Cloreto de Lítio em relação ao grupo controle (410,30fmoles/mg de proteína). Já nas administrações feitas de maneira combinada, o Piracetam (500mg/Kg) teve seu efeito de aumento do número de RCM (455,40fmoles/mg de proteína), visto também em resultados anteriores, bloqueado ao se fazer um pré - tratamento com Lítio 50mg/Kg (367,90fmoles/mg de proteína) e 100mg/Kg (416,20fmoles/mg de proteína), sendo o seu valor reduzidos a aproximadamente 20% e 9%, respectivamente (TABELA 9, FIGURA 5).

A atividade acetilcolinesterásica (nmol/mg de proteína/minuto) e o conteúdo de proteína, expresso em miligrama por grama de tecido, são apresentados nas TABELAS 10 e 11, respectivamente, não havendo qualquer alteração significativa nos grupos em estudo.

TABELA 9 - Efeito da administração de Cloreto de Lítio e/ou Piracetam sobre a densidade dos receptores muscarínicos em córtex motor de ratos velhos

DENSIDADE DOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS (fmol/mg de proteína)	
Controle	410,30 ± 21,36 (10)
Piracetam (500mg/Kg)	455,40 ± 18,09 (8)
Cloreto de Lítio (50mg/Kg)	430,60 ± 30,08 (7)
Cloreto de Lítio (100mg/Kg)	404,20 ± 23,22 (11)
Cloreto de Lítio (50mg/Kg) + Piracetam (500mg/Kg)	367,90 ± 23,56 (5)*
Cloreto de Lítio (100mg/Kg) + Piracetam (500mg/Kg)	416,20 ± 46,41 (5)

Ratos Wistar foram tratados com Cloreto de Lítio e/ou Piracetam por via oral, diariamente, durante 1 semana. As administrações combinadas foram feitas inicialmente com Cloreto de Lítio e, após 30 minutos, com Piracetam. Cada resultado representa a média ± desvio padrão do número de experimentos em parênteses.

* $p < 0,02$ (teste t de Student) em relação ao grupo Piracetam (500mg/Kg).

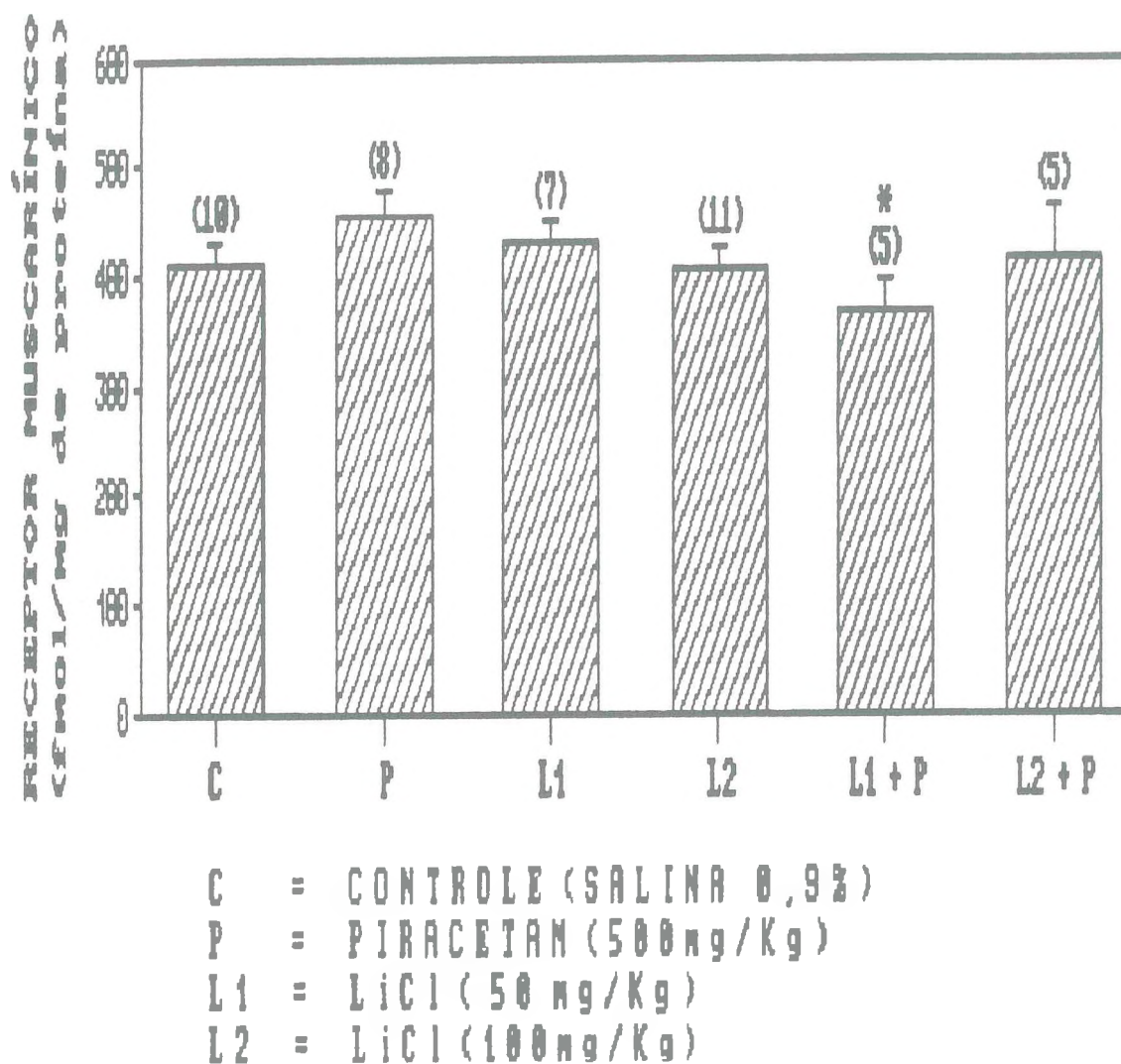


FIGURA 5 - Efeito da administração de Cloreto de Lítio (50 e 100mg/Kg) e/ou Piracetam (500mg/Kg), durante 7 dias, sobre a densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos, em córtex cerebral de ratos velhos.

* $p < 0,02$ (teste t de Student)

TABELA 10 - Efeito da administração de Cloreto de Lítio e/ou Piracetam sobre a atividade acetilcolinesterásica (AChE) em córtex motor de ratos velhos.

ATIVIDADE ACETILCOLINESTERÁSICA (nmol/mg de proteína/minuto)	
Controle	19,54 ± 0,51 (11)
Piracetam (500mg/Kg)	19,80 ± 1,11 (7)
Cloreto de Lítio (50mg/Kg)	20,80 ± 0,90 (7)
Cloreto de Lítio (100mg/Kg)	20,40 ± 0,60 (8)
Cloreto de Lítio (50mg/Kg) + Piracetam (500mg/Kg)	19,52 ± 0,54 (5)
Cloreto de Lítio (100mg/Kg) + Piracetam (500mg/Kg)	22,26 ± 1,34 (4)

Os animais receberam, por via oral, Cloreto de Lítio e/ou Piracetam, durante 1 semana, diariamente. As administrações combinadas foram feitas inicialmente com Lítio e, após 30 minutos, com Piracetam. Cada resultado representa a média ± desvio padrão do número de experimentos em parênteses

TABELA 11 - Efeito da administração de Cloreto de Lítio e/ou Piracetam sobre o conteúdo de proteína em córtex motor de ratos velhos.

	CONTEÚDO DE PROTEÍNA (mg/g de tecido)
Controle	125,10 ± 1,65 (7)
Piracetam (500mg/Kg)	130,20 ± 4,64 (4)
Cloreto de Lítio (50mg/Kg)	120,20 ± 9,43 (4)
Cloreto de Lítio (100mg/Kg)	135,25 ± 5,50 (3)
Cloreto de Lítio (50mg/Kg) +	107,32 ± 6,57 (3)
Piracetam (500mg/Kg)	
Cloreto de Lítio (100mg/Kg) +	138,25 ± 6,35 (3)
Piracetam (500mg/Kg)	

Os animais receberam, por via oral, Cloreto de Lítio e/ou Piracetam, durante 1 semana, diariamente. As administrações combinadas foram feitas inicialmente com Lítio e, após 30 minutos, com Piracetam. Cada resultado representa a média ± desvio padrão do número de experimentos em parênteses

4 - DISCUSSÃO

Estudos farmacológicos em várias espécies e no homem têm sustentado a hipótese de mudanças funcionais na atividade colinérgica central afetarem os processos de aprendizagem e memória (HAROUTUNIAN et al, 1985; BURKE & GREENBAUM, 1987, ALTAVISTA et al, 1988). WHITEHOUSE & SIN AU (1986) chegaram a afirmar que o sistema colinérgico era o mais afetado nos casos de demência pré-senil e senil.

Tentativas terapêuticas envolvendo drogas colinérgicas (agonistas, precursores, agentes anticolinesterásicos) foram feitas no sentido de compensar, pelo menos em parte, a profunda disfunção nesse sistema, porém sem sucesso (CORKIN, et al, 1982; IVERSEN, 1986). Estudos feitos por BARTUS et al (1981) revelaram um ótimo efeito da combinação do precursor colina com drogas nootrópicas, principalmente com Piracetam, sobre a memória de ratos velhos. Efeitos positivos dessa combinação foram também vistos numa triagem clínica com pacientes dementes (FRIEDMAN et al, 1981) e confirmados, posteriormente, por PLATEL et al (1984), em camundongos. Contudo resultados negativos foram registrados por ENNACEUR & DELACOUR (1987). Assim, o uso da combinação de precursores colinérgicos com Piracetam, no tratamento de pacientes com Alzheimer ainda é muito discutido. O mecanismo pelo qual esse nootrópico aumenta os efeitos das drogas colinérgicas sobre a memória e outras funções cognitivas tem sido considerado de grande interesse para o desenvolvimento de novas

estratégias terapêuticas para essa patologia. Alguns dados sugerem que o Piracetam pode interferir nas funções colinérgicas pré-sinápticas, talvez aumentando a captação de colina (WURTMAN et al, 1981) ou aumentando os níveis de colina livre no cérebro (PEDATA et al, 1985); outros estudos, porém, não confirmam estes dados (SHIH & PUGSLEY, 1985; FRANKLIN et al, 1986). PILCH & MÜLLER (1988) têm sugerido efeitos pós-sinápticos do Piracetam, o que vem a concordar com os resultados do presente trabalho que apresentam como possível alvo de atuação do Piracetam, os receptores colinérgicos pós-sinápticos.

Como modelo para estudar os prováveis efeitos do Piracetam sobre os receptores muscarínicos foram escolhidos ratos Wistar jovens e velhos devido ao fato de estudos anteriores indicarem que os roedores sofriam perdas de receptores muscarínicos corticais de maneira semelhante àquelas ocorridas no colinoceptores humanos (FREUND, 1980 e 1984)

O Piracetam é praticamente atóxico. Estudos de toxicidade aguda realizados em ratos, por via oral e intravenosa, indicaram que as doses letais excediam a 10g/Kg e 8g/Kg, respectivamente; nos estudos de toxicidade crônica, ratas tratadas por 6 meses, por via oral, com até 1000mg/Kg, não sofreram qualquer anormalidade comportamental, hematológica, bioquímica ou histológica (HOFF, 1980). Seu efeito também não se diferenciou quanto ao sexo dos animais.

Nossos experimentos foram feitos, na sua maioria, com a dose de 500mg/Kg durante 1 semana, haja visto que, nessas condições, o efeito da administração da droga sobre os RCM já era evidenciado, além do mais outros trabalhos apontaram resultados positivos do Piracetam sobre a memória também

nessa faixa de dose e tempo (VALZELLI et al, 1986; PORSOLT et al, 1987; PILCH & MÜLLER, 1988).

Os resultados deste trabalho, utilizando um tratamento crônico com 500mg/Kg de Piracetam, demonstraram um aumento da densidade de receptores muscarínicos colinérgicos no córtex motor de ratos jovens e velhos, concordando, em parte, com estudos semelhantes feitos por PILCH & MÜLLER (1988), em camundongos. Estes autores encontraram alterações nos receptores de ratos velhos, mas não nos jovens. A observação de elevação desses sítios de ligação em ambas as idades, não pode ser explicada por um aumento não específico do "binding" da [³H] NMS, visto que esse efeito não foi observado depois de uma única dose oral da droga e nem tão pouco nos experimentos objetivando demonstrar uma possível interação do Piracetam com os sítios de ligação da [³H] NMS "in vitro".

A elevação do número de RCM não foi vista quando a droga foi administrada numa única dose e os animais sacrificados 24h depois, refletindo respostas negativas do Piracetam agudamente (GELBMANN & MÜLLER, em preparação).

As alterações dos receptores colinérgicos muscarínicos (RCM) com a idade não foram ainda definidas. Redução no número dos RCM em humanos adultos (BROOKSBANK et al, 1978) e idosos tem sido detectada em várias áreas cerebrais tais como hipocampo, córtex temporal e frontal (RINNE, 1987); contrariamente outros investigadores não encontraram nenhuma mudança no que tange a este parâmetro (DAVIES & VERTH, 1982; ALLEN et al, 1983).

ALTAVISTA et al (1988), em seus dados preliminares, sugeriram uma diminuição difusa de neurônios colinérgicos,

afetando todas as regiões cerebrais; RINNE (1987), no entanto, pressupôs que certas vias de neurotransmissão é que seriam afetadas pela idade ao invés de áreas cerebrais.

A não diminuição do número de neurônios nos cérebros de ratos velhos (HOLLANDER & BARROWS, 1968; STURROCK, 1977) tem sugerido que os roedores não sejam modelos ideais para estudar o envelhecimento do SNC. Todavia, a disfunção cognitiva com o avanço da idade tem sido estabelecida (GOLD & McGAUGH, 1975; FREUND & WALKER, 1978) e, realmente, as perdas celulares ou mudanças nas células nervosas e nos seus processos devem ser a causa do envelhecimento funcional.

Nos nossos experimentos, comparando os animais controles jovens e velhos, não foram observadas diminuições acentuadas desses receptores e, muitas vezes, nenhuma alteração foi detectada. FREUND (1980), estudando os receptores colinérgicos em camundongos, observou que só após 18 meses de idade havia uma diminuição do número desses sítios e que, provavelmente, a perda dos RCM ocorreria, só que existiria um mecanismo compensatório efetivo antes do estabelecimento da deficiência no sistema colinérgico que aparece com a idade. Este mecanismo seria refletido por um aumento na síntese das moléculas receptoras nos neurônios remanescentes e que, com o passar do tempo, havendo grandes perdas neuronais, deixaria de existir, tornando-se, então, evidente a diminuição dos receptores.

A faixa etária dos animais idosos utilizados no presente trabalho variou de 12 - 30 meses. Talvez fosse necessária uma variação menor e/ou animais idosos ainda.

Os ensaios utilizando concentrações variadas do ligante radioativo, ditos de "saturação", apresentaram,

através dos "plots" de Scatchard, isotermas lineares na ligação específica da [^3H] NMS, sugerindo o envolvimento de uma única população homogênea de receptores. Os valores da constante de dissociação (K_d) obtidos nesses experimentos, não se diferenciaram entre os controles jovens e velhos, semelhante aos resultados conseguidos por RINNE (1987) em cérebro humano. Recentes dados da literatura também mostram que, durante o desenvolvimento, quase nenhuma diferença nos valores de K_d dos RCM existe no cérebro de rato (PINTOR et al, 1986) e de coelho (YAVIN & HAREL, 1979).

Com relação ao efeito de administração crônica do Piracetam, em ambas as idades, nos experimentos de Scatchard, foi observado uma elevação da densidade máxima dos receptores ($B_{\text{máx}}$) e também dos valores de K_d . O aumento dos valores da constante de dissociação do radioligante contraria os achados de PILCH & MÜLLER (1988), que não encontraram nenhuma mudanças nos valores deste parâmetro após tratamento com a droga em camundongos. O aumento do K_d reflete uma diminuição da afinidade do ligante para os receptores, indicando modificações funcionais desses sítios. BIRDSALL et al (1980) sugeriram que os sítios de baixa afinidade poderiam representar formas ativas do receptor; dessa forma, então, o agente nootrópico estaria mantendo esses sítios em estado ativado. Por outro lado, esta diminuição na afinidade pode ter ocorrido na tentativa de manter o funcionamento normal do sistema colinérgico, haja visto ter sido observado um aumento dos RCM após o tratamento com Piracetam. Entretanto, isto pode ser especulativo, pois no conhecido fenômeno de "down-regulation", provocado pela administração de acetilcolinesterásicos, nenhuma alteração nos valores de K_d foi evidenciada

(UCHIDA et al, 1979). Já os resultados dos valores de B_{max} concordam com os dados obtidos nos ensaios com uma única concentração de [3H] NMS (ensaios de "um ponto"), demonstrando alterações na densidade dos RCM.

A atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) não foi afetada pelo Piracetam na dose de 500mg/Kg nem mesmo nos animais tratados e pré-tratados com Lítio (50 e 100mg/Kg), porém, com uma dose menor de Piracetam (100mg/Kg) foi observada uma diminuição significativa da atividade acetilcolinesterásica nos dois grupos de idade em estudo. A atuação do Piracetam a nível enzimático, nos experimentos "in vitro", revelou que a droga parece não interferir na enzima, haja visto que nenhuma alteração na sua atividade foi detectada mesmo em concentrações altas de Piracetam.

BERING & MULLER (1985), analisando a interação do Piracetam com vários receptores do SNC, encontraram uma ligação dessa substância com o receptor glutamatérgico em concentrações 20 vezes menores do que a necessária para interação com o receptor muscarínico. Este achado é de grande importância haja visto que o L - glutamato é empregado em terapêutica para melhorar processos de memória e aprendizagem (VOGEL & BROVERMAN, 1966). Talvez as alterações nos processos de neurotransmissão glutamatérgica e colinérgica causadas pelo Piracetam, possam estar envolvidas nos efeitos terapêuticos da droga.

Apesar de ser um derivado do ácido gama - aminobutírico (GABA), nenhuma evidência da interação do Piracetam com mecanismos gabaérgicos nas sinapses do SNC foi constatada (SOURANDER et al, 1987) Posteriormente, porém, MAILLIS et al (1988) registraram interações dessa substância com efeitos

sinápticos do glutamato, acetilcolina e GABA, em estudos microiontoforéticos com o córtex somatossensorial e hipocampo de rato. Esses autores postularam o envolvimento do Piracetam nos mecanismos neuromodulatórios e na plasticidade sináptica em geral.

O conhecimento da participação desse agente nootrópico na atividade neuronal e, principalmente, na interação neurotransmissor - receptor é de fundamental importância para a elucidação de seus efeitos sobre as funções cognitivas. Nossos resultados mostrando uma alteração na densidade dos RCM podem contribuir também, apresentando efeitos pós-sinápticos "per si" da droga. A maneira pela qual o Piracetam aumenta o número desses receptores no córtex motor de ratos jovens e velhos não está clara. É sabido que muitas substâncias ditas "psicoativas" atuam, diretamente ou indiretamente, estimulando ou inibindo os sítios de ligação (WHITEHOUSE & SIN AU, 1986). Nossos ensaios investigando atuações diretas a nível de receptor corroborariam com os de PILCH & MULLER (1988), no que tange a uma ação não específica da droga, através dos resultados obtidos nos experimentos "in vitro" de competição. Sugestões de interação do Piracetam com os RCM somente em concentrações elevadas foram citadas por BERING & MULLER (1985), contudo, em nossos ensaios onde incubamos até 1mM de Piracetam, não evidenciamos qualquer diminuição no "binding" da [³H] NMS.

Mecanismos fisiológicos regulando os receptores após tratamentos crônicos, podem estar envolvidos no efeito do Piracetam sobre os sítios colinérgicos. O fenômeno de "up - regulation" pode explicar o aumento da densidade dos RCM, representando uma plasticidade sináptica. SCHWARTZ et al

(1978) destacaram duas possibilidades de alterações na sensibilidade das células pós-sinápticas, a primeira dela advoga que, tais processos podem funcionar apenas durante a sinaptogênese e/ou sob condições artificiais como a desnervação e o bloqueio prolongado da transmissão. A segunda considera que tais alterações possam representar mecanismos homeostáticos reguladores do controle sináptico, os quais estariam presentes sempre e seriam mantidos dentro de certos limites apesar das acentuadas variações do fluxo sináptico.

A plasticidade do receptor foi observada nos ratos jovens e adultos, mas não foi encontrada nos ratos (PEDIGO & POLK, 1985; PEDIGO, 1986) ou em camundongos (PILCH & MÜLLER, 1988) velhos; isso sugere uma falha da plasticidade do sistema muscarínico com a idade. Outros autores, contudo, cogitaram a idéia da plasticidade também nos idosos, mas até uma certa idade, onde haveria uma redução drástica da capacidade de reserva e as perdas neuronais não poderiam ser mais compensadas (FREUND, 1980; CARLSSON, 1985; VIGET & BRILEY, 1989). Fenômenos de plasticidade também foram observados em cérebros humanos após lesões subcorticiais, através de estudos post-mortem dos RCM (BRACCO et al, 1982). PILCH & MÜLLER (1988) não concordaram em relacionar o efeito da administração do Piracetam com processos de plasticidade, haja visto que a droga não interagiu diretamente com o receptor e isso é necessário para a regulação. Estes mesmos autores também sugeriram uma diminuída plasticidade do receptor em animais idosos por diminuição da fluidez da membrana (FREUND et al, 1986).

YOSHIDA (1984) sugeriu que o processo de "up-regulation" poderia se originar de um efeito depressor sobre

a destruição dos receptores, incluindo a internalização, e também de um aumento da síntese e transporte intracelular desses sítios. Mecanismos de fosforilação - desfosforilação podem também regular os RCM (EHRlich et al, 1982); um aumento no "binding" do [³H] QNB foi observado com a desfosforilação dos receptores (HO et al, 1988). É sabido que o Piracetam estimula a síntese de proteína no cérebro de ratos jovens e idosos (PLATT et al, 1974; MOUREN et al, 1972), e que as atividades enzimáticas associadas aos lisossomos são reduzidas (PLATT et al, 1974). A droga causa desfosforilação das proteínas de membrana, segundo HENRY et al (1979), e também estimula a síntese de fosfolipídios, consequentemente, aumentando a plasticidade e fluidez da membrana.

O aumento da síntese proteica não pode explicar o efeito do Piracetam, pois esta elevação não foi observada depois da administração de uma única dose. Nossos resultados em mg/g de tecido do conteúdo de proteína, também não nos forneceram suportes suficientes para fazer tal relacionamento, haja visto que somente um pequeno aumento significativo do conteúdo proteico foi evidenciado nos animais jovens, além do mais a parcela de proteína correspondente aos receptores é mínima, diante do conteúdo proteico cortical.

Foi sugerido por BARTUS et al (1984) e WECKER (1986) a atuação do Piracetam na neurotransmissão, através de modificações do metabolismo dos fosfolipídios. MOUREN et al (1972) registraram um aumento de 30 a 50% da concentração dos derivados fosfatados orgânicos e, em particular, dos fosfolipídios, devido ao crescimento energético celular obtido pela elevação das taxas de ATP. Preparações neuronais e sinaptosomais evidenciaram, com o uso da droga, um incremento

de aproximadamente 50% da atividade enzimática da fosfolipase A_2 (WOELK, 1979), que hidrolisa o glicerofosfato, aumentando os níveis de fósforo (P) e, conseqüentemente, de ATP. Este mesmo autor, investigando o efeito do Piracetam (100mg/Kg, intraperitoneal, durante 3 semanas) sobre o metabolismo fosfolipídico em coelhos, comprovou o aumento da incorporação de ^{32}P no sistema fosfatidilinositol. O Piracetam parece também aumentar a quantidade de inositol no cérebro, haja visto que o inositol livre deve ser derivado das reações de glicólise anaeróbica, pois o inositol plasmático não pode atravessar a barreira hematoencefálica. Por sua vez a glicólise é acelerada por esse agente nootrópico, e isso poderia funcionar como um fator regulatório para o sistema de segundo mensageiro envolvendo a hidrólise de fosfoinositídeos (COOPER et al, 1986).

A hidrólise fosfolipídica do inositol estimulada pelo receptor tem sido proposta como um mecanismo de transdução para neurotransmissores e hormônios no SNC e periférico (FARESE, 1984). Essa hidrólise participa do mecanismo para mobilização de Ca^{++} , ativação da proteína quinase C, estimulação da guanilato - ciclase e liberação de ácido aracônico (NISHIZUKA, 1984). Os dois produtos formados da hidrólise dos fosfoinositídeos são IP_3 ou $InsP_3$ (trifosfato - 1,4,5 de inositol ou fosfato de inositol), que está envolvido na mobilização de Ca^{++} , e DG (diacilglicerol), que ativa a proteína quinase C. Estes produtos funcionam como segundos mensageiros, iniciando uma cascata de sinais que vão conduzir a uma resposta fisiológica. Eles poderão agir isoladamente, cooperativamente, ou de modo antagônico, dependendo do mecanismo modulatório necessário.

O evento principal nesse processo de transdução é a estimulação da fosfodiesterase (PDE), uma fosfolipase C específica, feita pela ligação do agonista ao receptor de membrana. A PDE estimula a hidrólise de 4,5 - bifosfato de fosfatidilinositol (PIP₂ ou PtdIns(4,5)P₂) levando à formação desses dois segundos mensageiros. O fosfato de inositol, que é solúvel na água, faz uma ligação ao receptor (R₂) no retículo endoplasmático, liberando cálcio e, conseqüentemente, aumentando a concentração intracelular desse íon, que poderá diretamente produzir uma resposta biológica ou poderá ativar uma calmodulina - quinase, promovendo a fosforilação de proteínas específicas, proporcionando também uma resposta biológica. Paralelamente, o diacilglicerol (lipofílico) poderá também promover uma resposta fisiológica pela produção de prostaglandinas e ácido aracdônico que, por sua vez, poderá estimular a guanilato - ciclase e gerar GMPc. O DG também, por estimular a proteína quinase C, poderá fosforilar as proteínas (COOPER et al, 1986).

O papel exato e as funções do sistema fosfoinositídico junto aos receptores no cérebro não é conhecida ainda. Estudos em outros tecidos têm sugerido que a via da proteína quinase C e os lipídios do inositol podem ser fundamentais na regulação da proliferação celular (BERRIDGE, 1984, HIRASAWA & NISHIZUKA, 1985), pois a estimulação máxima da hidrólise dos fosfoinositídios, de acordo com BALDUINI et al (1987), coincidiu com o período de crescimento cerebral nos ratos, sugerindo que esse sistema no córtex cerebral esteja envolvido no processo de divisão e diferenciação celular. BALDUINI et al (1987) também encontraram uma correlação entre os sítios receptores e o metabolismo do fosfoinositol. Usando organofos-

fato cronicamente, em córtex cerebral de ratos, eles observaram uma diminuição na densidade dos RCM e um acúmulo de [^3H] InsPs (fosfatos de inositol) estimulado por carbacol, havendo posterior recuperação de forma paralela e num mesmo tempo.

Pelo que foi expresso anteriormente, associando-se às ações sobre o sistema fosfoinositídico, aumentando a hidrólise de fosfoinositóis, e metabolismo energético, o Piracetam poderia aumentar os níveis de inositol, e, de acordo com a correlação feita, poderia produzir um aumento na densidade dos RCM. Para melhor averiguar a participação dessa substância sobre o mecanismo fosfoinositídico foram feitos experimentos "in vivo" utilizando, conjuntamente, Piracetam e Cloreto de Lítio (LiCl) e os efeitos dessa interação sobre os receptores foram observados.

ALLISON et al (1976) foram os primeiros a evidenciar que o Lítio afetava o sistema dos fosfoinositídios pela inibição da enzima inositol - 1 - fosfatase, levando a uma diminuição do inositol livre e, correspondentemente, aumentando o nível de inositol - 1 - fosfato (IP_1 ou InsP_1) (FIGURA 6), no cérebro de roedores e bovinos (HALLCHER & SHERMAN, 1980), e em eritrócitos humanos (AGAM & LIVNE, 1989). Também BERRIDGE et al (1982) argumentaram que o tratamento crônico com Lítio levaria a uma redução no inositol intracelular e, portanto, depleção do conteúdo da membrana de fosfatidil - 4,5 - bifosfato (PIP_2 ou $\text{PtdIns}_{(4,5)}\text{P}_2$) em experimentos "in vitro", sendo estes efeitos posteriormente confirmados "in vivo". Assim, o Lítio bloqueia a formação de inositol, impedindo o mecanismo de ativação do receptor.

Nossas observações revelaram que o tratamento crônico

com LiCl não altera a densidade dos receptores muscarínicos colinérgicos no córtex cerebral de ratos idosos. Já a administração combinada de LiCl e Piracetam pareceu bloquear os efeitos observados com o Piracetam sozinho. O Lítio parece, então, interferir no mecanismo de ação deste nootrópico (FIGURA 6). Com relação à atividade acetilcolinesterásica, nenhuma modificação significativa foi vista tanto nos animais tratados só com Lítio, como também naqueles tratados com as duas drogas. O conteúdo de proteína não foi alterado e também não houve qualquer alteração comportamental nos grupos.

Em se tratando de alterações feitas pelo Piracetam e por outros nootrópicos sobre a fluidez da membrana, sabe-se, através de estudos feitos por WOOD et al (1986), que eles aumentam a fluidez das membranas do SNC. Se esse efeito tem correlação com o sistema de receptores nada pode ser afirmado. É sabido que, quando os lipídios são metilados, eles são translocados do lado citoplasmático para fora da membrana e que essa translocação aparentemente diminui a viscosidade da membrana. Isso pode resultar numa liberação aumentada de agentes neuroativos, um aumento na densidade dos receptores e ativação da fosfolipase A_2 que liberaria ácido aracdônico com uma subsequente produção de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (COOPER et al, 1986). Não se sabe porém, como o Piracetam altera a fluidez da membrana; é conhecido, como já mencionado anteriormente, que ele estimula a biossíntese de fosfolipídios, ativa a fosfolipase A_2 e interfere no metabolismo energético. Talvez esses efeitos possam contribuir de alguma forma para essas modificações na membrana.

O efeito do Piracetam, então, não parece ser um

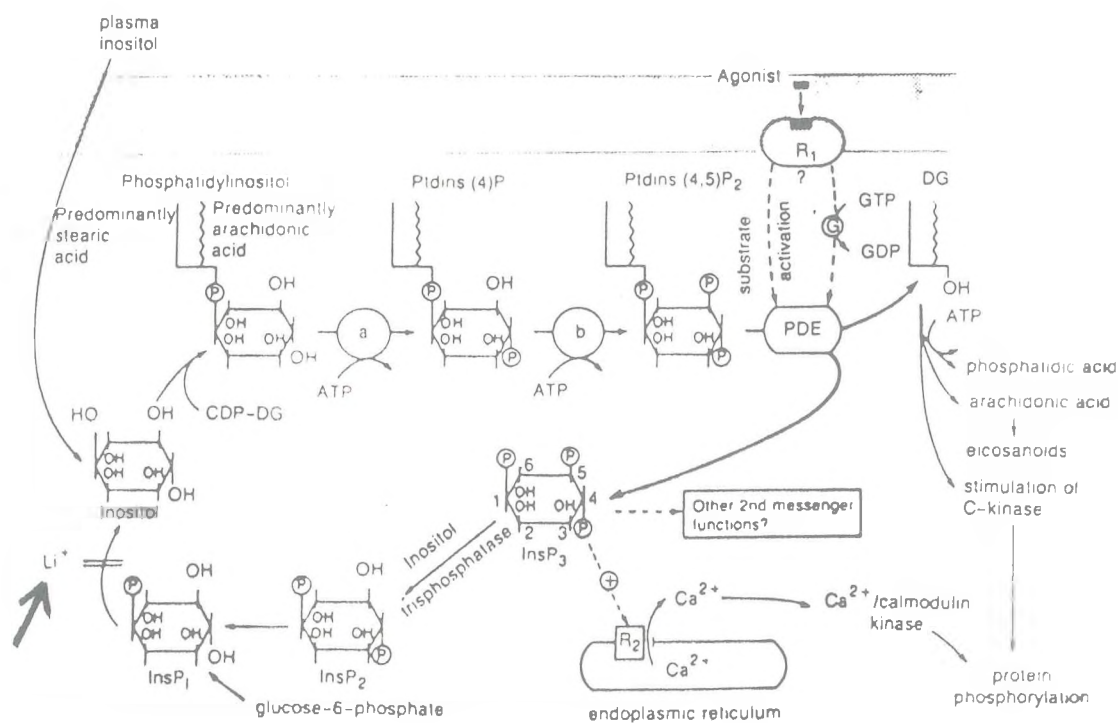


FIGURA 6 - Interferência do Lítio no metabolismo dos fosfoinositídeos. Retirado de COOPER et al (1986)

fenômeno clássico de "up - regulation", haja visto que a droga não se ligou ao receptor muscarínico. Contudo, não só a ocupação, mas também a ativação do receptor é requerida para a regulação do sítio de ligação no receptor (EL - FAKAHANY & LEE, 1986). Desse modo, esse efeito sobre os RCM pode representar um tipo de "up - regulation" com a droga agindo indiretamente através de um segundo mensageiro.

5 - CONCLUSÕES

O estudo dos efeitos da administração de Piracetam sobre os receptores colinérgicos e a atividade acetilcolinesterásica em córtex motor cerebral de ratos jovens e velhos permitiu as seguintes conclusões

- 1 - A administração de Piracetam causou um aumento significativo da densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos (RCM) em córtex motor cerebral de ratos jovens e velhos. Este aumento foi dependente da dose administrada e da duração do tratamento.
- 2 - A análise de Scatchard mostrou que a administração crônica da droga (500mg/Kg) causa uma elevação na densidade máxima dos receptores colinérgicos (B_{max}), bem como nos valores da constante de dissociação (K_d) nos dois grupos etários.
- 3 - A administração de Piracetam (500mg/Kg) não provocou alterações significativas da atividade acetilcolinesterásica em córtex motor de ratos, nem mesmo nos animais tratados e pré-tratados com Lítio (50 e 100mg/Kg)
- 4 - O Piracetam não alterou a atividade acetilcolinesterásica "in vitro".
- 5 - O fenômeno de "up - regulation" parece ser, a primeira vista, o mecanismo pelo qual o Piracetam aumenta a densidade dos RCM no córtex motor dos dois grupos etários estudados.
- 6 - O pequeno aumento do conteúdo proteico observado nos

ratos jovens e velhos não nos forneceu suporte suficientes para associar o mecanismo de "up - regulation" do Piracetam com um aumento da síntese proteica, além do mais a parcela de proteína correspondente aos receptores é mínima, diante do conteúdo proteico cortical.

- 7 - A elevação do número de receptores colinérgicos nos dois grupos etários não parece ser um fenômeno clássico de "up - regulation", haja visto que a droga não interagiu diretamente com os RCM
- 8 - O fato do pré-tratamento com Lítio ter bloqueado o efeito do Piracetam de aumentar a densidade dos RCM sugere o possível envolvimento da droga com o mecanismo dos fosfoinositídeos. É sabido que o Piracetam aumenta a hidrólise de fosfoinositóis e que o Lítio bloqueia esse processo hidrolítico. A droga pode, então, produzir um tipo de "up - regulation", agindo indiretamente através de um segundo mensageiro, associando-se a isto suas propriedades de alterar a fluidez e a plasticidade da membrana

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGAM, G. & LIVNE, A. Inositol - 1 - phosphatase of human erythrocytes is inhibited by therapeutic lithium concentrations. Psychiatry Res., 27: 217-24, 1989.
- ALLEN, S.J.; BENTON, J.S.; SMITH, C.C.T.; BOWEN, D.M.; DAVISON, A.N. Biochemical evidence of selective nerve cell changes in the normal aging human and rat brain. J. Neurochem., 41: 256-65, 1983.
- ALLES, G.A. & HAWES, R.C. apud MAIN, A.R. Mode of action of anticholinesterases. Pharmacol. Ther., 6(3): 579-628, 1979.
- ALLES, G.S. & HAWES, R.C. Cholinesterase in the blood of man. J. Biol. Chem., 53: 110-24, 1953.
- ALLISON, J.H.; BLISNER, M.E.; HOLLAND, W.H.; HIPPS, P.P.; SHERMAN, W.R. apud NEWMAN, M.E. & LERER, B. Effects of lithium and desipramine administration on agonist - stimulated inositol phosphate accumulation in rat cerebral cortex. Biochem. Pharmacol., 32(10): 1991-95, 1988.
- ALTAVISTA, M.C.; BENTIVOGLIO, A.R.; CROCIANI, P.; ROSSI, P.; ALBANESE, A. Age-dependent loss of cholinergic neurones in basal ganglia of rats. Brain Res., 455: 177-81, 1988.
- ALZHEIMER, A. apud NARANG, P.K. & CUTLER, N.R. Pharmacotherapy in Alzheimer's disease: basis and rationale. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiat., 10: 519-31, 1986.
- ATAK, J.R.; PERRY, E.K.; PERRY, R.H. apud PERRY, E.K. The

- cholinergic hypothesis-ten years on. British Medical Bulletin, 42(42): 63-9, 1986.
- AUGUSTINSSON, K.B. & NACHMANSOHN, D. Distinction between acetylcholine esterase and other choline ester-splitting enzymes. Science, 110: 98-9, 1949.
- BALDUINI, W.; MURPHY, S.D.; COSTA, L.G. Developmental changes in muscarinic receptor-stimulated phosphoinositide metabolism in rat brain. J. Pharmacol. Exp. Ther., 241(2): 421-7, 1987.
- BARTUS, R.T.; DEAN, R.L.; BEER, B. apud ENNACEUR, A. & DELACOUR, J. Effect of combined or separate administration of Piracetam and choline on learning and memory in the rat. Psychopharmacology, 92: 58-67, 1987.
- BARTUS, R.T.; DEAN, R.L.; SHERMAN, K.A.; FRIEDMAN, E.; BEER, B. Profound effect of combining choline and Piracetam on memory enhancement and cholinergic functions in aged rats. Neurobiol. Aging, 2: 3-8, 1981.
- BENNETT, Jr., J.P. Methods in binding studies. In: YAMAMURA, H.I.; ENNA, S.J.; KUCHAR, M.J. Neurotransmitter receptor binding. New York, Raven Press, 1978. p. 57-90.
- BERRIDGE, M.J. Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. Biochem. J., 220: 345-60, 1984.
- BERRIDGE, M.J.; DOWNES, C.P.; HANLEY, M.R. Lithium amplifies agonist - dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands. Bioch. Journal, 206: 587-95, 1982.
- BERING, B. & MÜLLER, W.E. Interaction of Piracetam with several neurotransmitter receptors in the central nervous system. Arzneimittelforschung, 35(2): 9, 1985.
- BIRDSALL, N.J.M.; HULME, E.C.; BURGEN, A.S.V. The character

- of the muscarinic receptors in different regions of the rat brain. Proc. R. Soc. Lon., 207: 1-12, 1980.
- BOISSIER, J.R. Données pharmacologiques et biochimiques fondamentales sur la thérapeutique nootrope. Fotocópia
- BONNER, T.I.; BUCKLEY, N.J.; YOUNG, A.C.; BRANN, M.R. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. Science, 237: 527-32, 1987.
- BRACCO, L. CORRADETTI, R.; AMADUCCI, L. Acute subcortical lesions modify cortical muscarinic receptors in human brain. Neurosci. Lett., 34: 227-31, 1982.
- BRODY, H. apud FREUND, G. Cholinergic receptor loss in brains of aging mice. Life Sci., 26: 371-5, 1980.
- BROOKSBANK, B.W.L.; MARTINEZ, M.; ATKINSON, D.J.; BALASS, R. NORBERG & WINBLAD, B. Cholinergic receptors in human hippocampus: regional distribution and variance with age. Life Sci., 29: 1937-44, 1981.
- BURKE, R.E. & GREENBAUM, D. Effect of postmortem factors on muscarinic receptor subtypes in rat brain. J. Neurochem., 49(2): 592-96, 1987.
- BURT, D.R. Receptor binding analysis & interpretation, 1981
Fotocópia
- CARLSSON, A. Neurotransmitter changes in the aging brain. Dan. Med. Bull., 32(Suppl. 1): 40-3, 1985.
- CAULFIELD, M. & STRAUGHAM, D. Muscarinic receptors revisited. Trends Neurosci., 6: 73-5, 1983.
- CAVOY, A. & DELACOUR, J. Effects of Piracetam on learned helplessness in rats. Physiol. Behav., 42: 545-9, 1988.
- CHRISTIE, M.J. & NORTH, M.J. Control of ion conductance by muscarinic receptors. Trends Pharmacol. Sci., suppl. Feb. 30-3, 1988.

- CODINA, J.; YATANI, A.; GRANET, D.; BROWN, A.M.; BIRNBAUMER, L. The subunit of the GTP binding protein GK opens atrium potassium channels. Science, 236: 442-5, 1987.
- COOPER, J.R.; BLOOM, F.E.; ROTH, R.H. Acetylcholine. In -----, The Biochemical basis of neuropharmacology, 5 ed. New York, Oxford University, 1986. Cap. 6. p. 106-23.
- CORKIN, S.; DAVIS, K.L.; GROWDON, J.H.; USDIN, E.; WURTMAN, R.J. apud PLATEL, A.; JALFRE, M.; PAWELEC, C.; PORSOLT, R.D. Habituation of exploratory activity in mice: effects of combinations of Piracetam and choline on memory process. Biochem. Behav., 21: 209-12, 1984.
- CORSELLIS, J.A.N. apud NORDBERG, A. & WINBLAD, B. Cholinergic receptors in human hippocampus - regional distribution and variance with age. Life Sci., 29: 1973-44, 1981.
- CORTÉS, R. & PALACIOS, J.M. Muscarinic cholinergic receptor subtypes in the rat brain. I. Quantitative autoradiographic studies. Brain Res., 362: 227-38, 1986.
- COYLE, J.T.; PRICE, D.L.; DeLONG, M.R. Alzheimer disease: A disorder of cortical cholinergic innervation. Science, 219: 1184-90, 1983.
- DALE, H.H. The action of certain esters and esters of choline and their relations to muscarine. J. Pharmacol. Exp. Ther., 6: 147-90, 1914.
- DAVIES, P. & VERTH, A.H. Regional distribution of muscarinic acetylcholine receptors in normal and Alzheimer's type dementia brains. Brain Research, 138: 385-92, 1982.
- DEGEORGE, J.J.; OUSLEY, A.H.; MCCARTHY, K.D.; MORELL, P. apud HEPLER, J.R.; HUGHES, A.R.; HARDEN, T.K. Evidence that muscarinic cholinergic receptors selectively interact with either the cyclic AMP or the inositol phosphate second-

- messenger response systems. Biochem. J., 247: 793-6, 1987.
- DOMANSKA-JANIK, K. & ZALESKA, M. The action of Piracetam on ^{14}C - glucose metabolism in normal and posthypoxic rat cerebral cortex slices. Pol. J. Pharmacol. Pharm., 29: 111-6, 1977.
- DOMBROWSKI, A.M.; JERKINS, A.A.; KAUFFMAN, F.C. Muscarinic receptor binding and oxidative enzyme activities in the adult rat superior cervical ganglion: effects of 6 - hydroxydopamine and nerve growth factor. J. Neurosci., 3(10): 1963-70, 1983.
- DRAVID, A.R. Deficits of cholinergic enzymes and muscarinic receptors in the hippocampus and striatum of senescent rats: effects of chronic hydergine treatment. Arch. Int. Pharmacodyn., 246(2): 195-202, 1983.
- DUTAR, P. & NICOLL, R.A. Stimulation of phosphatidylinositol (PI) turnover may mediate the muscarinic suppression of the M - current in hippocampal pyramidal cells. Neurosci. Lett., 85: 89-94, 1988.
- EHRlich, Y.H.; WHITTEMORE, S.R.; GARFIELD, M.K.; GRABER, S.G.; LENOX, R.H. Protein phosphorylation in the regulation and adaptation of receptor function. Prog. Brain Res., 56: 375-96, 1982.
- EL-FAKAHANY, E.E. & LEE, J. Agonist - induced muscarinic acetylcholine receptor down - regulation in intact rat brain cells. Eur. J. Pharmacol., 132: 21-30, 1986.
- ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES, Jr., V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem. Pharmacol., 7: 88-95, 1961.
- ENNACEUR, A. & DELACOUR, J. Effect of combined or separate

- administration of Piracetam and choline on learning and memory in the rat. Psychopharmacology, 92: 58-67, 1987
- EVANS, R.A.; WATSON, M.; YAMAMURA, H.I.; ROESKE, W.R. Differential ontogeny of putative M₁ and M₂ muscarinic receptor binding sites in the murine cerebral cortex and heart. J. Pharmacol. Exp. Ther., 235(3): 612-8, 1985
- FARESE, R.V. Phospholipids as intermediates in hormone action. Mol. Cell. Endocrinol., 35: 1-14, 1984.
- FIEDLER, E.P.; MARKS, M.J.; COLLINS, A.C. Postnatal development of cholinergic enzymes and receptors in mouse brain. J. Neurochem., 49(3) 983-90, 1987.
- FRANKLIN, S.R.; SETHY, V.H.; TANG, A.H. Amnesia produced by intracerebroventricular injections of hemicholinium - 3 in mice was prevented by pretreatment with piracetam - like compounds Pharmacol. Biochem. Behav., 25: 925-7, 1986.
- FREUND, G. Cholinergic receptor loss in brains of aging mice. Life Sci., 26(5): 371-5, 1980.
- FREUND, G. & WALKER, D. W. apud FREUND, G. Cholinergic receptor loss in brains of aging mice. Life Sci., 26(5): 371-5, 1980.
- FREUND, G.; BROPHY, T.R.; SCOTT, J.D. Membrane fluidization increases low - affinity muscarinic receptor binding in brain; changes with aging. Exp. Gerontol., 21: 37-44, 1986.
- FRIEDMAN, E.; SHERMAN, K.A.; FERRIS, S.H.; REISBERG, B.; BARTUS, R.T.; SCHNECK, M.K. Clinical response to choline plus piracetam in senile dementia: relation to red - cell choline levels. N. Engl. J. Med., 304: 1490-1, 1981
- FUKUDA, K.; KUBO, T.; AKIBA, I.; MAEDA, A.; MISHINA, M.

- NUMA, S. Molecular distinction between muscarinic acetylcholine receptor subtypes. Nature, 327(6123): 623-8, 1987.
- FUSSA - FILHO, R. & PALERMO NETO, J. Sobre a plasticidade do sistema nervoso central. Cien. Cult., 38(9): 1569-74, 1986.
- GAMZU, E. Animal behavioral models in the discovery of compounds to treat memory dysfunction. Ann NY Acad. Sci., 444: 370-9, 1985.
- GARVEY, J.M ; ROSSOR, M.; IVERSEN, L.L. Evidence for multiple muscarinic receptor subtypes in human basis. J. Neurochem., 43(2): 299-302, 1984.
- GELBMANN & MÜLLER apud PILCH, H. & MÜLLER, W.E. Piracetam elevates muscarinic cholinergic receptor density in the frontal cortex of aged but not of young mice. Psychopharmacology, 94(1): 74-8, 1988.
- GIL, D.W. & WOLFE, B.B. Pirenzepine distinguishes between muscarinic receptor - mediated phosphoinositide breakdown and inhibition of adenylate cyclase. J. Pharmacol. Exp. Ther., 232(3): 608-16, 1985.
- GIURGEA, C. apud GRAU, M. Effect of Piracetam on eletrocorticogram and local cerebral glucose utilization in the rat. Gen. Pharmacol., 18(2): 205-11, 1987.
- GIURGEA, C. Nootropic Drugs. Progr. Neuropsychopharmacol., 1: 235-47, 1977.
- GIURGEA, C.; GREINDL, G.; PREAT, S. apud SARTER, M. Some considerations of different modes of action of nootropic drugs. Neuropsychobiology, 15: 192-200, 1986.
- GOLD, P.E. & McGAUGH, J.L. apud FREUND, G. Cholinergic receptor loss in brains of aging mice. Life Sci., 26:

- 371-5, 1980.
- GOTTFRIES, C.G.; ADOFSSON, R.; AQUILONIUS, S.M.; CARLSON, A.; WISBERG, A.; WINBLAD, B. Biochemical changes in dementia disorders of Alzheimer's type. Neurobiol. Aging, 4: 261-71, 1983.
- GRAU, M.; MONTERO, J.L.; BALASCH, J. Effect of Piracetam on electrocorticogram and local cerebral glucose utilization in the rat. Gen. Pharmacol., 18(2): 205-11, 1987.
- GREMO, F.; PALOMBA, M.; MARCHISIO, A.M.; MARCELLO, C.; MULAS, M.L.; TORELLI, S. Heterogeneity of muscarinic cholinergic receptors in the developing human fetal brain: regional distribution and characterization. Early Hum. Dev., 15: 165-77, 1987.
- HAGA, K. & HAGA, K. apud HAGA, T.; HAGA, K.; BERSTEIN, G.; NISHIYAMA, T.; UCHIYAMA, H.; ICHIYAMA, A. Molecular properties of muscarinic receptors. Trends Pharmacol. Sci., Suppl. Feb.: 12-18, 1988.
- HAGA, T.; HAGA, K.; BERSTEIN, G.; NISHIYAMA, T.; UCHIYAMA, H.; ICHIYAMA, A. Molecular properties of muscarinic receptors. Trends Pharmacol. Sci., Suppl. Feb.: 12-18, 1988.
- HALLOHER, L.M. & SHERMAN, W.R. The effect of lithium ion and other agents on the activity of myo - inositol - 1 - phosphatase from bovine brain. J. Biol. Chem., 255(22): 10896-901, 1980.
- HAMMER, R.; BERRIE, C.P.; BIROSALL, N.J.M.; BURGEN, A.S.V.; HULME, E.C. Pirenzepine distinguishes between different subclasses of muscarinic receptors. Nature, 283(5742): 90-2, 1980.
- HARDEN, T.K.; TANNER, L.I.; EVANS, T.; MASTERS, S.B.; BROWN,

- J.H. apud HEPLER, J.R.; HUGHES, A.R.; HARDEN, T.K. Evidence that muscarinic cholinergic receptors selectivity interact with either the cyclic AMP or the inositol phosphate second messenger response systems. Biochem. J., 247: 793-6, 1987.
- HAROUTUNIAN, V.; BARNES, E.; DAVIS, K.L. Cholinergic modulation of memory in rats. Psychopharmacology, 87: 266-71, 1985.
- HENDERSON, G.; TOMLINSON, B.E.; GIBSON, P.H. Cell counts in human cerebral cortex in normal adults throughout life using an image analysing computer. J. Neurol. Sci., 46(1): 113-36, 1980.
- HENRY, R.L.; NALBANDIAN, R.M.; OZANDE, J. apud HOFF, H.V. Nootropil: datos basicos, científicos y clínicos. 4 ed. rev. UCB, 1980. p. 91.
- HEPLER, J.R.; HUGHES, A.R.; HARDEN, T.K. Evidence that muscarinic cholinergic receptors selectivity interact with either the cyclic AMP or the inositol phosphate second messenger response systems. Biochem. J., 247: 793-6, 1987.
- HO, A.K.S.; DUFIELD, R.; LING, C.T. Phosphorylation of muscarinic acetylcholine receptor (mAChR): Effects of calcineurin. Trends Pharmacol Sci., Suppl. Feb: 12-18, 1988.
- HOFF, H.V. Nootropil: datos basicos, científicos y clínicos. 4 ed. rev. UCB, 1980. p. 91.
- HOLLANDER J. & BARROWS, C.H. apud FREUND, G. Cholinergic receptor loss in brains of aging mice. Life Sci., 26: 371-5, 1980.
- HULME, E.C.; BIRDSALL, N.J.M.; BURGEM, A.S.V.; MEHTA, P. The binding of antagonists to brain muscarinic receptors. Mol.

Pharmacol., 14: 737-50, 1978.

IVERSEN, L.L. apud PILCH, H. & MÜLLER, W.E. Piracetam elevates muscarinic cholinergic receptor density in the frontal cortex of aged but not of young mice

Psychopharmacology, 94(1): 74-8, 1988.

JENNI - EIERMANN, S.; VONHAHN, H.P.; HONEGGER, C.G.; ULRICH, J. Studies on neurotransmitter binding in senile dementia

Gerontology, 30: 350-8, 1984.

KAZDOVA, E.; BOHAC, O.; DOLEZAL, V.; FABER, J.; SLANSKA, J.; TUCEK, S. Treatment of dementia with high dosis of lecithin and piracetam. Acta Nerv. Super., 26: 244-5, 1984.

LADURON, P.M. Criteria for receptor sites in binding studies.

Biochem. Pharmacol., 33(6): 833-9, 1984.

LANG, W. & HENKE, H. Cholinergic receptor binding and autoradiography in brains of non - neurological and senile dementia of Alzheimer - type patients. Brain Res., 267: 271-80, 1983.

LANGLEY, J.N. apud LADURON, P.M. Criteria for receptor sites in binding studies Biochem. Pharmacol., 33(6): 833-9, 1984.

LOEWI, O. & NAVRATIL, E. apud MAIN, A.R. Mode of action of anticholinesterases. Pharmacol. Ther., 6(3): 579-628, 1979.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 263-75, 1951.

McKINNEY, M. & COYLE, J.T. Regulation of neocortical muscarinic receptors: effects of drug treatments and lesions. J. Neurosci., 2: 97-105, 1982.

McKINNEY, M.; ANDERSON, D.; VELLA-ROUNTREE, L. Different

- agonist - receptors active conformations for rat brain M_1 and M_2 muscarinic receptors that are separately coupled to biochemical effector systems. Mol. Pharmacol., **35**: 39-47, 1988.
- MAILLIS, A.; KARAYANIDIS, F.; KOUTSOUKUS, E.; ANGELOPOULOS, E.; STEFANIS, C. Effects of Piracetam on single central neurons. Neuropsychobiology, **19**: 139-45, 1988.
- MAIN, A.R. Mode of action of anticholinesterases. Pharmacol Ther., **6**(3): 579-628, 1979.
- MAUSSOULIÉ, J. & BON, S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. Ann. Rev. Neurosci., **5**: 57-106, 1982.
- MINDUS, P.S. Some clinical studies with Piracetam, a nootropic substance. Neuropsych., **1**: 73-81, 1978.
- MIYOSHI, R.; KITO, S.; SHIMIZU, M.; MATSUBAYASHI, H. Ontogeny of muscarinic receptors in the rat brain with emphasis on the differentiation of M_1 - and M_2 - subtypes - semi-quantitative in vitro autoradiography. Brain Res., **420**: 302-12, 1987.
- MONDADORI, C.; CLASSEN, W.; BORKOWSKI, J.; DUCRET, T.; BUERKI, H.; SCHADÉ, A. The effects of oxiracetam on learning and memory in animals. Comparison to piracetam. Neuropharmacology, **2**(Suppl. 3): 27-38, 1986.
- MORIN, A.M. & WASTERLAIN, C.G. Aging and rat brain muscarinic receptors as measured by quinuclidinyl benzilate binding. Neurochem. Res., **5**: 301-8, 1980.
- MOUREN, P.; POINSO, Y.; FRESCO, R.; SOUBEYRAND, J.; RUSSO, J.P. Estudo clinico do Piracetam - ativador do metabolismo da célula nervosa. Trabalho realizado no Serviço de Moléstias Nervosas do Hospital Saint - Marguerite -

Marselha. Fotocópia.

- MOYERSOONS, F. & GIURGEA, C. Protective effect of piracetam in experimental barbiturate intoxication: EEG and behavioural studies. Arch. Int. Pharmacodyn., 210(1): 38-48, 1974.
- NACHMANSON, D. On the specificity of choline esterase in neurons tissue. Science, 100: 454-69, 1944.
- NARANG, P.K. & CUTLER, N.R. Pharmacotherapy in Alzheimer's disease: basis and rationale. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry, 10: 519-31, 1986.
- NISHIZUKA, Y. Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. Science, 225: 1365-70, 1984.
- NORDBERG, A. & WINBLAD, B. Cholinergic receptors in human hippocampus - regional distribution and variance with age. Life Sci., 29: 1973-44, 1981.
- OSTROWSKI, J.; KEIL, M.; SCHRAVEN, E. Autoradiographische untersuchungen zur verterlung von piracetan - ¹⁴C bei ratte und hund. Arzneimittelforschung, 25(4): 589-96, 1975.
- PALKOVITS, M. & JACOBOWITZ, D.M. Topographic atlas of catecholamine and acetylcholinesterase - containing neurons in the rat brain. II - Hindbrain (Mesencephalon, Rhombencephalon). J. Comp. Neurol., 157: 29-42, 1974
- PEDATA, F.; MORONI, F.; BANFI, S.; PEPEU, G. Effects of nootropic agents on brain cholinergic mechanisms. Clin. Neuropharmacol., 7: 772-3, 1985.
- PEDIGO, N.W. apud VIGET, X. & BRILEY, M. Muscarinic receptor plasticity in rats lesioned in the nucleus basalis of meynert. Neuropharmacology, 28(7): 727-32, 1989.
- PEDIGO, N.W. & POLK, D.M. Reduced muscarinic receptor

- plasticity in frontal cortex of aged rats after chronic administration of cholinergic drugs. Life Sci., 37: 1443-9, 1985.
- PEDIGO, N.W.; MINOR Jr.; L.D.; KRUMREI, T.N. Cholinergic drug effects and brain muscarinic receptor binding in aged rats. Neurobiol. Aging, 5: 227-33, 1984.
- PERALTA, E.G.; WINSLOW, J.W.; ASHKENAZI, A.; SMITH, D.H.; RAMACHANDRAN, J.; CAPON, D.J. Structural basis of muscarinic acetylcholine receptor subtype diversity. Trends Pharmacol. Sci., Suppl. Feb: 7-11, 1988.
- PERRY, E.K. The cholinergic hypothesis - ten years on. British Medical Bulletin, 42(42): 63-9, 1986.
- PERRY, E.K. apud NORDBERG, A. & WINBLAD, B. Cholinergic receptors in human hippocampus - regional distribution and variance with age. Life Sci., 29: 1973-44, 1981.
- PIERCEY, M.F.; VOGELSANG, G.D.; FRANKLIN, S.R.; TANG, A.H. Reversal of scopolamine - induced amnesia and alterations in energy metabolism by the nootropic piracetam: implications regarding identification of brain structures involved in consolidation of memory traces. Brain Res., 424: 1-9, 1987.
- PILCH, H. & MÜLLER, W.E. Piracetam elevates muscarinic cholinergic receptor density in the frontal cortex of aged but not of young mice. Psychopharmacology, 94(1): 74-8, 1988.
- PINTOR, A.; ALLEVA, E.; MICHALEK, H. Postnatal maturation of brain cholinergic systems in the precocial murid *acomys cahirinus*: comparison with the altricial rat. Int. J. Dev. Neurosci., 4: 375-82, 1986.
- PLATEL, A.; JALFRE, M.; PAWELEC, C.; ROUX, S.; PORSOLT, R.D.

- Habituation of exploratory activity in mice: effects of combinations of Piracetam and choline on memory process. Biochem. Behav., 21: 209-12, 1984.
- PLATT, D. & HERING, F. Messenger lysosomaler enzymaktivitäten sowie von Leutin. Inkorporationsraten im Gehirn junger und alter Ratten nach Gabe von Piracetam. Arzneimittelforschung, 24(10): 1588-90, 1974.
- PORSOLT, R.D.; LENNEGREE, A.; AVRIL, I.; STÉRU, L.; DOUMONT, G. The effects of Exifone, a new agent for senile memory disorder, on two models of memory in the mouse. Biochem. Behav., 27: 253-6, 1987.
- PRICE, D.L.; WHITEHOUSE, P.J.; STRUBLE, R.G. Alzheimer's disease. Annu. Rev. Med., 36: 349-56, 1985.
- QUIRION, R.; MARTEL, J.C.; ROBITAILLE, Y.; ETIENNE, P.; WOOS, P.; NAIR, N.P.V.; GAUTHIER, S. apud PILCH, H. & MÜLLER, W.E. Piracetam elevates muscarinic cholinergic receptor density in the frontal cortex of aged but not of young mice. Psychopharmacology, 94(1): 74-8, 1988.
- REISINE, T.D.; YAMAMURA, H.I.; BIRD, E.D.; SPOKES, E.; ENNA, S.J. Pre and postsynaptic neurochemical alterations in Alzheimer's disease. Brain Res., 159(2): 477-81, 1978.
- RINNE, J.O. Muscarinic and dopaminergic receptors in the aging human brain. Brain Res., 404: 162- , 1987.
- SARTER, M. Some considerations of different modes of action of nootropic drugs. Neuropsychobiology, 15: 192-200, 1986.
- SCHWARIZ, J.C.; COSTENTIN, J.; MARTRES, M.P.; PROTAIS, P.; BAUDRY, M. Modulation of receptor mechanisms in the SNC: hyper- and hyposensibility to catecholamines. Neuropharmacol., 17: 665-85, 1978.
- SHIH, Y.H. & PUGSLEY, T.A. The effects of various cognition

- enhancing drugs on in vitro rat hippocampal synaptosomal sodium dependent high affinity choline uptake. Life Sci., 36(22): 2145-52, 1985.
- SOURANDER, L.B.; PORTIN, R.; MÖLSÄ, P.; LAHDES, A.; RINNE, U.K. Senile dementia of the Alzheimer type treated with aniracetam: a new nootropic agent. Psychopharmacology, 91: 90-5, 1987.
- SPAGNOLI, A. & TOGNONI, G. "Cerebroactive drugs". Clinical Pharmacology and therapeutic role in Cerebro - vascular Disorders. Drugs, 26: 44-69, 1983.
- STEDMAN, E.; STEDMAN, E.L.; EASSON, L.H. CCXLY. Choline esterase. An enzyme present in the blood serum of the horse. Biochem. J., 26: 2056-66, 1932.
- STRUBBE, J.H. & CYPRISIAK, E. Dérivés de l'acide (2 - oxo - pirrolidone) acétique. Rev. Industrie Chimique Belge, 32(3), 112, 1967.
- STURROCK, R.R. apud FREUND, G. Cholinergic receptor loss in brains of aging mice. Life Sci., 26: 371-5, 1980.
- UCHIDA, S.; TAKEYASU, K.; MATSUDA, T.; YOSHIDA, H. Changes in muscarinic acetylcholine receptors of mice by administration of diisopropylfluorophosphate and papaverine. Life Sci., 24: 1805-12, 1979.
- VALZELLI, L.; BAIGUERRA, G.; GIRAUD, O. Difference in learning and retention by albino swiss mice. Part III. Effect of some brain stimulants. Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol., 8(6): 337-41, 1986.
- VALZELLI, L.; BERNASCONI, S.; SALA, A. Piracetam activity may differ according to the age of the recipient mouse. Int. Pharmacopsychiatry, 15: 150-6, 1980.
- VIGET, X. & BRILEY, M. Muscarinic receptor plasticity in rats

- lesioned in the nucleus basalis of meynert. Neuropharmacology, 28(7): 727-32, 1989.
- VINCENT, G.; VERDERESE, A.; GAMZU, E. The effects of aniracetam on the enhancement and protection of memory. Ann. NV Acad. Sci., 444: 489-91, 1985.
- VOGEL, W.; BKOVERMAN, D.M.; DRAGUNS, J.G. The role of glutamic acid in cognitive behaviors. Psychol. Bull., 65(6): 367-82, 1966.
- WECKER, L. Neurochemical effects of choline supplementation. Can. J. Physiol. Pharmacol., 64: 329-33, 1986.
- WHEATLEY, M.; HULME, E.C.; BIRDSALL, N.J.M.; CURTIS, C.A.M.; EVELEIGH, P.; PEDDER, E.K.; POYNER, D. Peptide mapping studies on muscarinic receptors: receptor structure and location of the ligand binding site. Trends Pharmacol. Sci., Suppl. Feb.: 19-24, 1988.
- WHITE, P.; GOODHARDT, M.J.; KEET, J.P.; HILEY, C.R.; CARROSCO, L.H. WILLIAMS, I.E.I. Neocortical cholinergic neurons in elderly people. Lancet, 1(8013): 668-71, 1977.
- WHITEHOUSE P.J. & SING AU, K.S. Cholinergic receptors in aging and Alzheimer's disease. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry, 10: 665-76, 1986.
- WOELK, H. Sun Einpluk von piracetam auf die neuronale und synaptosomale phospholipase A₂ - Aktivitat. Arzneimittelforschung, 29(4): 615-8, 1979.
- WOOD, P.L.; ETIENNE, P.; LAL, S.; NAIR, N.P.V.; FINLAYSON, M.H.; PAETAU, A.; BIRD, E.D. A post - mortem comparison of the cortical cholinergic system in Alzheimer's disease and Pick's disease. J. Neurol. Sci., 62: 211-7, 1983.
- WOOD, W.G.; GORKA, C.; ARMBRECHT, H.J.; WILLIAMSON, L.S.; STRONG, R. Fluidizing effects of antrophenoxine in vitro on

- brain and liver membranes from different age groups of mice. Life Sci., 39(22): 2089-94, 1986.
- WURTMAN, R.J.; MAGILL, S.G.; REINSTEIN, D.K. Piracetam diminishes hippocampal ACh levels in rats. Life Sci., 28: 1091-3, 1981.
- YAMAMURA, H.I. & SMITH, T.L. Stimulation of synaptosomal acidic phospholipid synthesis is mediated by the M₁ muscarinic receptor subtype. Soc. Neurosci. Abst., 10: 568, 1984.
- YAVIN, E. & HAREL, S. Muscarinic binding sites in the developing rabbit brain. FEBS Lett., 97(1): 151-4, 1979.
- YOSHIDA, H. Introduction: Receptors and receptor - mediated responses. London, Mac Millan, 1984.
- ZILLES, K. & WREE, A. CórteX: aereal and laminar structure. In: PRAXINOS, A. ed. The rat nervous system: Forebrain and midbrain Sydney, Academic Press, 1985, v. 1, cap. 10, 375-415.