



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

MICHELE ALBUQUERQUE JALES DE CARVALHO

**EFEITO DO SILDENAFIL EM MODELO DE COLINÉRGICO DE
CONVULSÃO EM CAMUNDONGOS E DE ESTRESSE *IN VITRO*:
ABORDAGEM COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA**

FORTALEZA

2016

MICHELE ALBUQUERQUE JALES DE CARVALHO

**EFEITO DO SILDENAFIL EM MODELO DE COLINÉRGICO DE
CONVULSÃO EM CAMUNDONGOS E DE ESTRESSE *IN VITRO*:
ABORDAGEM COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA**

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará
como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marta
Maria de França Fonteles

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- C321e Carvalho, Michele Albuquerque Jales de.
 Efeito do sildenafil em modelo de colinérgico de convulsão em camundongos e de estresse *in vitro*: abordagem comportamental e neuroquímica / Michele Albuquerque Jales de Cravalho. – 2016.
 101 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado em Farmacologia, Fortaleza, 2016.
 Área de Concentração: Farmacologia.
 Orientação: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles.
1. Citrato de Sildenafil. 2. Estresse Oxidativo. 3. Astrócitos. I. Título.

CDD 615.1

**EFEITO DO SILDENAFIL EM MODELO DE COLINÉRGICO DE
CONVULSÃO EM CAMUNDONGOS E DE ESTRESSE *IN VITRO*:
ABORDAGEM COMPORTAMENTAL E NEUROQUÍMICA**

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia da
Universidade Federal do Ceará
como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marta
Maria de França Fonteles

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles (orientadora)

Prof . Dra. Alice Maria Costa Martins

Prof. Dr. Emiliano Ricardo Vasconcelos Rios

Dedico esta dissertação a minha grande heroína, meu exemplo de vida, minha mãezinha, Dona Olindina Ferreira de Albuquerque. Um grande Ser Humano, vencedora, humilde, amável e sábia. Que sempre acreditou em mim. Que me incentiva e me fortalece em todos os momentos da minha vida. Você é um grande presente de Deus! Obrigada por ser minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus amado pela vida, por permitir que os meus sonhos possam se concretizar, por me amparar e me dar força para acreditar, enfrentar e superar cada desafio. Muito obrigada pela graça de eu chegar onde estou.

"Tu és a paz na tribulação e na angústia, és a rocha que alicerça meus projetos, e o embalo harmonioso que me acalma nas noites de inquietação".

"Tu és a luz que ilumina meu caminho e a energia que me faz caminhar".

Aos meus amados pais, por todo amor e dedicação! Por vocês terem me dado à vida e por serem meu exemplo de humildade, dignidade, fé, perseverança e amor. Por sempre sonharem tanto com meu sucesso e minha felicidade. Amo muito vocês!

Aos meus amados e companheiros irmãos, vocês são anjos que Deus me enviou para tornar minha caminhada mais feliz! Obrigada por essa grande parceria!

Ao meu querido companheiro e grande incentivador, meu marido! Sou muito agradecida pela sua paciência e dedicação a nossa família e pela sua grande contribuição no meu crescimento pessoal e profissional. Por sempre acreditar em mim e me ajudar a conquistar meus sonhos. Você é muito importante pra mim!

Aos meus lindos filhos, por me inspirarem e me ensinarem a ser uma pessoa melhor e a viver o amor incondicional! Vocês são grandes presentes de Deus!

Aos queridos amigos Alana e Klistenes pela amizade, pela dedicação e companheirismo. Vocês sabem o quanto aprendi com vocês!

À querida amiga Camilla Naiane, pela amizade, pelos ensinamentos e pela força! Você sabe o quanto lhe admiro!

A querida amiga Mariana, pela dedicação aos meus experimentos, por sempre me acompanhar, me ajudar, me ensinar, me incentivar e por toda sua disponibilidade sempre que eu precisei!

Ao amigo Emiliano, por todo ensinamento e paciência. Por sempre estar disponível para me ajudar!

Ao amigo Adriano, pela sua amizade, sugestões, ensinamentos e alegria!

A amiga Edith, pela sua amizade, inspiração e por ter aceito fazer parte da banca examinadora.

Aos amigos João Victor e Dênia, pela amizade, força, dedicação e amor a esse trabalho. Fiquei muito feliz com a chegada de vocês!

A amiga Livia, pela amizade, parceria e dedicação aos experimentos!

Ao amigo Pedro Everson, pela amizade, troca de conhecimentos e parceria!

Ao amigo Italo Rigoberto, pela amizade, pelo incentivo e pelos ensinamentos!

A todos meus amigos, que me apoiaram, me deram força e acreditaram em mim! Sou muito grata a Deus por vocês existirem e fazerem parte da minha vida!

A querida Professora Dra. Marta Maria de França Fonteles, pela sua grande amizade, por acreditar em mim e ter me dado seu voto de confiança, pela oportunidade de participar de seu grupo e por todos os seus ensinamentos. Graças a Deus que existe nesse mundo pessoas bondosas e generosas como você!

À Profa. Dra. Alice pela sua parceria, pelas relevantes considerações, por permitir que parte dos experimentos fossem realizados em seu laboratório e por aceitar fazer parte da banca examinadora.

À Profa. Dra. Darcielle pela sua colaboração e relevantes considerações a minha dissertação.

A todos os professores da pós-graduação o meu agradecimento pela grande contribuição em minha vida através de seus ensinamentos.

A todos os colegas do Laboratório de Neurofarmacologia pela amizade, colaboração e convivência agradável.

Às técnica do Laboratório de Neurofarmacologia muito queridas: Lena e Vilani, pela amizade, paciência, boa convivência e enorme contribuição.

A todos os funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

Aos animais que sempre são de extrema importância no nosso trabalho. Que muito contribuem para a qualidade de vida dos seres humanos.

A FUNCAP pelo apoio financeiro.

Por fim, a todos que de alguma forma contribuem com meu crescimento e fazem a minha caminhada mais feliz!

Muito Obrigada!

*“Somos feitos da mesma matéria que
nossos sonhos.”*

William Shakespeare

RESUMO

Convulsões consistem em alterações transitórias do comportamento decorrente das deflagrações rítmicas, sincrônicas e desordenadas de populações de neurônios cerebrais. Sildenafil é um inibidor seletivo da PDE5 que potencializa a função erétil devido ao aumento dos níveis citoplasmáticos de GMPc. Alguns estudos experimentais e relatos de caso apontam que o sildenafil pode exercer uma atividade pró-convulsiva. Esse trabalho teve como objetivo estudar os efeitos do sildenafil em modelo de convulsão induzida por pilocarpina em camundongos e sobre a viabilidade de astrócitos *in vitro* diante do estresse colinérgico. Camundongos Swiss machos (25-34g) foram pré-tratados com o sildenafil (2,5; 5; 10 ou 20mg/kg, ip., n= 8) em tratamento agudo e por 7 dias. Meia hora após a última dose de sildenafil foi induzida a convulsão em todos os animais através da administração de pilocarpina 400 mg/kg, ip. (P400). Na análise comportamental, foram registrados os tempos para ocorrência da primeira convulsão e morte e, após os testes, foram dissecadas três áreas cerebrais (córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado) para determinar a atividade da acetilcolinesterase, o grau de peroxidação lipídica, pela mensuração da concentração de malondialdeído (MDA), a concentração de nitrito e também a participação da defesa antioxidante glutathione redutase (GSH). No ensaio *in vitro*, foi determinada a viabilidade celular de astrócitos corticais após o tratamento com diferentes concentrações de sildenafil+pilocarpina. Os dados foram analisados por ANOVA e Student-Newman-Keuls como pós-teste, para os ensaios *in vivo*, e ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni, para as experimentações *in vitro*. Foi observado que o sildenafil reduziu a latência de convulsão e de morte nas doses de 10 e 20 mg/kg tanto no pré-tratamento agudo como por 7 dias. Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo e defesa antioxidante, houve aumento dos níveis de MDA em todas as áreas nas doses de 10 e 20 mg/kg no pré-tratamento agudo, enquanto que no pré-tratamento por 7 dias houve aumento dos níveis de MDA no córtex pré-frontal na dose de 20 mg/kg e no hipocampo nas doses de 10 e 20 mg/kg. A concentração de nitrito foi aumentada nas doses de 10 e 20 mg/kg no córtex pré-frontal e hipocampo nas doses de 10 e 20 mg/kg e no corpo estriado na dose de 20 mg/kg no pré-tratamento por 7 dias e no pré-tratamento agudo houve aumento no córtex pré frontal na dose de 20 mg/kg e no corpo estriado na dose de 10mg/kg. Em relação a glutathione reduzida, não houve alteração nos grupos pré-tratados com sildenafil+P400 em relação ao grupo P400. O tratamento combinado entre sildenafil (1000, 500, 250, 125, 75, 37 µg/mL) e pilocarpina (IC 50 - índice de citotoxicidade para 50% da população celular em estudo que correspondente a 31,83 mM) causou redução da viabilidade das células apenas na concentração de 1000 µg/mL, sugerindo que os astrócitos podem estar envolvidos na possível neurotoxicidade do sildenafil no processo convulsivo, sendo necessário mais estudos. Nossos achados sugerem que o sildenafil possui uma atividade pró-convulsivante relacionado a mecanismos colinérgicos e que apresentou ação oxidante nas doses mais altas estudadas.

Palavras-chave: Sildenafil. Convulsão. Estresse Oxidativo. Astrócitos.

EFFECT OF SILDENAFIL IN CONVULSION CHOLINERGIC MODEL IN MICE AND STRESS IN VITRO: BEHAVIORAL APPROACH AND NEUROCHEMISTRY

ABSTRACT

Seizures are the transient behavior changes resulting from rhythmic outbreaks, synchronic and disordered populations of brain neurons. Sildenafil is a selective inhibitor of PDE5 which enhances erectile function due to increased cytoplasmic levels of cGMP. Some experimental studies and case reports suggest that sildenafil may exert pro convulsive activity. This work aimed to study the effects of sildenafil on seizure pilocarpine model in mice and on the viability of astrocytes in vitro before the cholinergic stress. Swiss male mice (25-34g) were pre-treated with sildenafil (2.5, 5, 10 or 20mg / kg, ip, n = 8) and in acute treatment for 7 days. Half an hour after the last dose of sildenafil convulsion was induced in all animals by the administration of pilocarpine 400 mg / kg, ip. (P400). In behavioral analysis, the time to occurrence of the first seizure and death after the tests were dissected three brain areas were recorded (pre-frontal cortex, hippocampus and striatum) to determine the activity of acetylcholinesterase, the degree of lipid peroxidation, by measuring the concentration of malondialdehyde (MDA), the concentration of nitrite and also the participation of glutathione reductase antioxidant defense (GSH). In vitro assay, cell viability was determined cortical astrocytes after treatment with different concentrations of Sildenafil + pilocarpine. Data were analyzed by ANOVA and Student-Newman-Keuls test and post-test, for in vivo tests and ANOVA followed by Bonferroni post-test, for in vitro experiments. It was observed that sildenafil reduced the latency of convulsions and death at doses of 10 and 20 mg / kg in both acute pretreatment such as 7 days. Regarding the parameters of oxidative stress and antioxidant defense, an increase of MDA levels in all areas at doses of 10 and 20 mg / kg in the acute pretreatment, whereas in pretreatment for 7 days there were increasing levels of MDA in the prefrontal cortex at the dose of 20 mg / kg and the hippocampus in the dose of 10 and 20 mg / kg. The nitrite concentration was increased at doses of 10 and 20 mg / kg in the prefrontal cortex and hippocampus in doses of 10 and 20 mg / kg and in the striatum at a dose of 20 mg / kg pre-treatment for 7 days, and in acute pretreatment was increased in the frontal cortex pre dose of 20 mg / kg and in the striatum at a dose of 10mg / kg. Regarding the reduced glutathione did not change in group pretreated with sildenafil compared to P400 + P400 group. The combined treatment of sildenafil (1000, 500, 250, 125, 75, 37 ug / ml) and pilocarpine (IC 50 - Cytotoxicity index to 50% of the cell population study corresponding to 31.83 mM) caused a reduction in viability cells only in the concentration of 1000 ug / mL, suggesting that astrocytes can be involved in the possible neurotoxicity of sildenafil in the convulsive process, requiring further studies.. Our findings suggest sildenafil has a proconvulsivant activity related to cholinergic mechanisms and demonstre oxidizing action in the highest doses studied.

Keywords: Sildenafil. Seizures. Oxidative stress. Astrocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.- Sistema de neurotransmissão colinérgica	19
Figura 2- Estrutura química do sildenafil	28
Figura 3 – Esquema do teste convulsão induzida por pilocarpina	35
Figura 4- Esquema tratamento dos grupos que não foram submetidos a convulsão	35
Figura 5 - Esquema determinação da atividade da AChE.	39
Figura 6 - Esquema determinação da concentração de nitrito	41
Figura 7 - Esquema determinação da peroxidação lipídica (TBARS)	42
Figura 8 - Determinação da Concentração de glutathiona reduzida (GSH)	43
Figura 9 - Esquema das etapas de tratamento dos astrócitos em Placa de Elisa para obtenção da viabilidade celular	45
Figura 10 - Efeito da administração aguda do sildenafil (2,5, 5mg, 10mg ou 20mg/kg) sobre a latência de convulsão induzida por pilocarpina (P400) em camundongos.	46
Figura 11. Efeito da administração aguda do sildenafil (2,5, 5mg, 10mg ou 20mg/kg) sobre a latência de morte induzida por pilocarpina (P400) em camundongos.	47
Figura 12. Efeito da administração por 7 dias do sildenafil (2,5, 5mg, 10mg ou 20mg/kg) sobre a latência de convulsão induzida por pilocarpina (P400) em camundongos.	48
Figura 13. Efeito da administração por 7 dias do sildenafil (2,5, 5mg, 10mg ou 20mg/kg) sobre a latência de morte induzida por pilocarpina (P400) em camundongos.	49
Figura 14. Efeitos do pré-tratamento agudo sildenafil sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em córtex pré-frontal de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.	51
Figura 15. Efeitos do pré-tratamento agudo sildenafil sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em hipocampo de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.	52
Figura 16. Efeitos do pré-tratamento agudo sildenafil sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no corpo estriado de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.	53
Figura 17. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre a atividade da	<u>55</u>

acetilcolinesterase (AChE) em Córtex pré-frontal de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.

Figura 18 . Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em Hipocampo de camundongos durante as convulsões induzidas por P400. 56

Figura 19. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em Corpo Estriado de camundongos durante as convulsões induzidas por P400. 57

Figura 20. Efeitos do pré-tratamento agudo com sildenafil sobre os níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) em córtex pré-frontal de camundongos durante as convulsões induzidas por P400. 59

Figura 21. Efeitos do pré-tratamento agudo com sildenafil sobre os níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) em hipocampo de camundongos durante as convulsões induzidas por P400. 60

Figura 22. Efeitos do pré-tratamento agudo com sildenafil sobre os níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) em corpo estriado de camundongos durante as convulsões induzidas por P400. 61

Figura 23. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre os níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) em córtex pré-frontal de camundongos durante as convulsões induzidas por P400. 62

Figura 24. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre os níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) em hipocampo de camundongos durante as convulsões induzidas por P400. 63

Figura 25. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre os níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) em corpo estriado de camundongos durante as convulsões induzidas por P400. 64

Figura 26. Efeitos do pré-tratamento agudo sildenafil sobre o conteúdo de nitrito em Córtex pré-frontal de camundongos durante as convulsões induzidas por P400. 66

Figura 27. Efeitos do pré-tratamento agudo sildenafil sobre o conteúdo de nitrito em hipocampo de camundongos durante as convulsões induzidas por P400. 67

Figura 28. Efeitos do pré-tratamento agudo com sildenafil sobre o conteúdo de nitrito em corpo estriado de camundongos durante as convulsões induzidas por P400. 68

Figura 29. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre o conteúdo de nitrito em Córtex pré-frontal de camundongos durante as convulsões induzidas por P400. 69

Figura 30. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre o conteúdo de 70

nitrito em hipocampo de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.

Figura 31. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre o conteúdo de nitrito em corpo estriado de camundongos durante as convulsões induzidas por P400. 71

Figura 32: Efeito do pré-tratamento agudo de sildenafil sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) em córtex pré-frontal de camundongos tratados com P400. 73

Figura 33: Efeito do pré-tratamento agudo de sildenafil sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) em hipocampo de camundongos tratados com P400. 74

Figura 34: Efeito do pré-tratamento agudo de sildenafil sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) em corpo estriado de camundongos tratados com P400. 75

Figura 35. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal de camundongos durante as convulsões induzidas por P400. 76

Figura 36. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo de camundongos durante as convulsões induzidas por P400. 77

Figura 37. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) no corpo estriado de camundongos durante as convulsões induzidas por P400. 78

Figura 38: Percentual de viabilidade celular de astrocitos corticais expostos a diferentes concentrações da combinação de Sildenafil + pilocarpina IC 50. 79

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

i.p	Via intraperitoneal
vs	Versus
dL	Decilitro
ANOVA	Análise de variância
E.P.M.	Erro padrão da média
<i>et al.</i>	...E colaboradores
g	Gramas
GAD	Enzima glutamato descarboxilase
ACh	Acetilcolina
mg	Miligrama
mL	Mililitro
p	Nível de significância
P400	Pilocarpina 400 mg/kg
SNC	Sistema nervoso central
SIL	Sildenafil
N	Número de animais por grupo experimental
PDE	Fosfodiesterase
NOS	Oxido nítrico sintase
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
GSH	Glutathione reduzida
GPx	Glutathione peroxidase
SOD	Superóxido dismutase
5-HT	5-hidroxitriptamina
GABA	Ácido gama amino butírico
NMDA	N-metil-d-aspartato
WHO	Organização mundial de saúde
ESBL	Betalactamases de espectro amplificado
DHP-1	Diidropeptidase-1
VPA	Ácido valproico
RAM	Reações adversas a medicamentos
CPF	Córtex pré-frontal
CE	Corpo estriado
HC	Hipocampo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Drogas utilizadas no tratamento dos animais, preparo e via de administração

Tabela 2- Grupos experimentais

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1	Convulsão	19
1.2.	Neurotransmissão colinérgica e o processo convulsivo	20
1.2.1.	Receptores e funções da acetilcolina	22
1.2.2	Convulsões induzidas por pilocarpina	23
1.3.	Oxido Nítrico	23
1.4.	EROS (espécies reativas de oxigênio); ERN (espécies reativas de nitrogênio) e estresse oxidativo	25
1.5.	Defesas antioxidantes	27
1.6.	Astrócitos e convulsão	29
1.7.	Sildenafil	31
1.5.2.	Sildenafil e convulsões	33
1.8.	Relevância e justificativa	35

2. OBJETIVOS

2.1.	Objetivo Geral	36
2.2.	Objetivos específicos	36

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1.	Animaís	37
3.2.	Tratamento dos grupos experimentais	37
3.3.	Drogas utilizadas	38
3.4.	Equipamentos utilizados nos experimentos	39
3.5.	Teste de convulsão indizado por pilocarpina	40
3.6.	Dissecação das áreas cerebrais	41
3.7.	Determinação da Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)	42
3.8	Dosagem de Proteína	44
3.9.	Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)	45
3.10	Determinação de Nitrito	46
3.11.	Determinação da Concentração de glutathiona reduzida (GSH)	47
3.12.	Análise da atividade do sildenafil sobre astrócitos <i>in vitro</i>	48
3.12.1	Linhagem celular	49
3.12.2.	Cultivo da linhagem celular utilizada	49
3.12.3.	Estudos de viabilidade celular em cultura de astrócitos	49
3.12.3.1.	Determinação da viabilidade celular após tratamento com o sildenafil e com pilocarpina	49
3.13.	Aspectos éticos	50
3.14.	Análise estatística	50

4. RESULTADOS

4.1	Estudo comportamental	51
4.1.1	Efeito da administração aguda do sildenafil sobre as convulsões induzidas por pilocarpina	52
4.1.2	Efeito da administração por 7 dias do sildenafil sobre as convulsões induzidas por pilocarpina	55
4.2.	Análise neuroquímica	
4.2.1.	Determinação da atividade acetilcolinesterásica (AChE)	56

4.2.1.1. Efeitos do pré-tratamento agudo do sildenafil sobre a atividade da acetilcolinesterase em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos após indução de convulsão e morte por P400	58
4.2.1.2. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias do sildenafil sobre a atividade da acetilcolinesterase em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos após indução de convulsão e morte por P400	61
4.2.2. Método da Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)	64
4.2.2.1. Nivel de Peroxidação Lipídica (TBARS) em modelo de convulsão induzido por pilocarpina após pré-tratamento agudo com sildenafil em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos após indução de convulsão e morte por P400	65
4.2.2.2. Nivel de Peroxidação Lipídica (TBARS) em modelo de convulsão induzido por pilocarpina após pré-tratamento por 7 dias com sildenafil em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos após indução de convulsão e morte por P400	67
4.2.3.1 Efeito do pré-tratamento agudo com sildenafil sobre a determinação do conteúdo de nitrito em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em camundongos em modelo de convulsão induzido por P400	70
4.2.3.2 Efeito do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre a determinação do conteúdo de nitrito em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em camundongos em modelo de convulsão induzido por P400	73
4.2.4. Dosagem da glutathiona reduzida (GSH) nas áreas cerebrais estudadas	77
4.2.4.1 Efeito do pré-tratamento agudo de sildenafil sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em modelo de convulsão induzido com P400.	79
4.2.4.2. Efeito do pré-tratamento por 7 dias de sildenafil sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado em camundongos tratados com P400	81
4.3. Determinação da viabilidade celular após tratamento com o sildenafil e com pilocarpina	84
5.DISCUSSÃO	85
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	92
7. CONCLUSÃO	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

*“Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos de que as
grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível”.*

Charles Chaplin

1 INTRODUÇÃO

1.1. Convulsão

Convulsão consiste na alteração transitória do comportamento decorrente das deflagrações rítmicas, sincrônicas e desordenadas de populações de neurônios cerebrais (GOODMAN & GILMAN, 2012). Epilepsia é uma doença neurológica que se caracteriza pela ocorrência periódica de crises espontâneas, que pode ser convulsiva ou não convulsivas dependendo da natureza e do tipo de epilepsia (NOEBELS *et.al*, 2012). Esse distúrbio neurológico pode originar-se de insultos às estruturas cerebrais, tais como traumas, tumores, acidentes vasculares cerebrais ou infecções, ou ainda pode desenvolver-se devido a mutações genéticas em um ou mais genes relacionados a canais iônicos ou neurotransmissores que controlam a excitabilidade neuronal (BIALER e WHITE, 2010).

As convulsões podem ser classificadas clinicamente em duas categorias: parciais e generalizadas. As crises do tipo parcial são originadas em um grupo pequeno de neurônios que constituem o foco da convulsão. Logo, a sintomatologia depende da localização do foco no cérebro. Estas crises podem ser do tipo parcial simples (sem alterações na consciência) ou parcial complexa (com alterações na consciência). As crises podem ter início focal e depois generalizarem (envolverem o cérebro como um todo), sendo nestes casos chamadas crises parciais complexas. As crises generalizadas são aquelas em que há o envolvimento, desde o início, de ambos os hemisférios cerebrais (ENGEL, 2001).

As crises convulsivas podem se desenvolver com graus diferentes de envolvimento muscular. O evento motor consiste em aumento ou redução da contração muscular. O aumento da contração muscular pode ser do tipo tônico (significando contração muscular mantida durante segundos ou minutos), clônico (contrações musculares, seguidas de relaxamento gerando abalos musculares sucessivos) ou mioclônicos (contrações musculares muito breves, semelhantes a choques). A diminuição da contração muscular caracteriza as mioclonias negativas ou crises atônicas (ENGEL, 2001).

Aproximadamente 10% da população tem possibilidade de ser acometida por uma crise epiléptica em algum momento da vida. Desses, metade ocorrerá durante a infância e a adolescência (SILVA *et al.*, 2013).

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

1.2 Neurotransmissão colinérgica e o processo convulsivo

1.2.1 Receptores e funções da acetilcolina

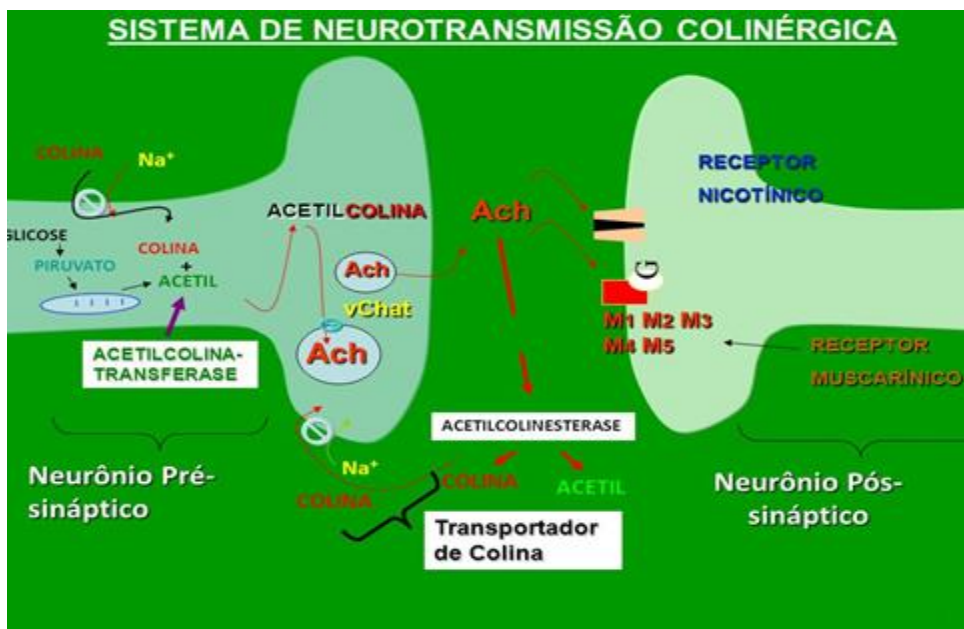
O sistema colinérgico tem como neurotransmissor a acetilcolina (ACh) que é um importante neurotransmissor excitatório no cérebro, junto com seus receptores e o aparato enzimático responsável por sua síntese e degradação constituem o sistema de neurotransmissão colinérgica (BRUNEAU, AKAABOUNE, 2006).

Os receptores muscarínicos são distribuídos amplamente por todo o corpo, exercendo inúmeras funções vitais no cérebro e no sistema nervoso autônomo. No cérebro os receptores muscarínicos são importantes na memória e na fisiopatologia das doenças afetivas e na esquizofrenia (FREITAS, 2006).

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

A estimulação cerebral induzida pela ACh ocorre através da ativação dos receptores colinérgicos cerebrais, onde cerca de 99% destes são muscarínicos, e 1% são nicotínicos (ELGOYHEN et al., 2000; PEPEU, 1983). Assim, a maioria dos efeitos de ativação colinérgica no cérebro é provavelmente devido à estimulação dos receptores colinérgicos muscarínicos (RCM) (LIMA, 2011)

Figura 1: Sistema de neurotransmissão colinérgica – Síntese e liberação da acetilcolina (ACh) pelo neurônio pré-sináptico. Ligação da ACh aos receptores nicotínicos e muscarínicos (M1, M2, M3, M4 ou M5) no neurônio pós sináptico. Degradação da ACh pela enzima acetilcolinesterase na fenda sináptica.



Fonte: disponível em: <http://slideplayer.com.br/slide/335793/>

1.2.2 Convulsões induzidas por pilocarpina

A administração periférica de altas doses do agonista muscarínico colinérgico pilocarpina produz convulsões em roedores (MARINHO *et al.*, 1997). O início dessas convulsões pode ser bloqueado pela atropina e atenuado pela inibição da atividade colinérgica endógena (JOPE *et al.*, 1986; 1992; MORRISETT *et al.*, 1987a; MARINHO *et al.*, 1997).

No modelo de convulsão induzido por alta dose de pilocarpina, pode-se observar perda neuronal de algumas áreas cerebrais: hipocampo, corpo estriado, amígdala, córtex piriforme, córtex entorrinal, septum lateral, tálamo e substância nigra, sugerindo o envolvimento dessas diferentes áreas durante o estabelecimento do processo epiléptico. (HONCHAR *et al.*, 1983; CLIFFORD *et al.*, 1987; MARINHO *et al.*, 1997; BORELLI & BOZZI, 2002).

Entre as áreas em que ocorre dano neuronal, o hipocampo, o corpo estriado e o córtex fronto-parietal, além de serem as áreas mais acometidas, podem estar relacionadas de forma importante com os mecanismos de instalação, da propagação e/ou manutenção (epileptogênese) das convulsões límbicas (MARINHO *et al.*, 1998).

Em geral, as convulsões induzidas por pilocarpina parecem depender da ativação do receptor muscarínico, da alteração da atividade enzimática de alguns sistemas, entre eles os sistemas de defesa antioxidante, do metabolismo dos fosfoinosítídeos (MARINHO *et al.*, 1998), como também da participação de outros sistemas de neurotransmissão noradrenérgico (CAVALHEIRO *et al.*, 1994), dopaminérgico, serotoninérgico (CAVALHEIRO *et al.*, 1995), GABAérgico e glutamatérgico. Dentre as inúmeras mudanças neuroquímicas vistas durante a fase aguda do processo convulsivo tem sido verificada expressivas alterações na produção de lipídio peróxidos, no conteúdo do nitrato e nitrito, na concentração da glutatona reduzida (GSH), nas atividades enzimáticas da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (FREITAS, 2006).

Os radicais livres têm sido implicados na toxicidade de numerosos agentes químicos e na patogênese de muitas doenças, tais como: doenças inflamatórias e patologias do SNC (Parkinson, Alzheimer, demência e epilepsia). A lista dessas

doenças é cada vez maior e isso se deve, pelo menos em parte, ao fato de que essas moléculas reativas podem produzir a maioria das alterações teciduais, que têm sido identificadas em uma grande variedade de processos danosos. Muitas dessas alterações, porém, podem ser uma consequência e não a causa do dano (KEHRER, 1993).

1.3 Óxido Nítrico

O NO é um radical livre, com potente ação vasodilatadora, sintetizado por uma família de enzimas, as NO sintases (NOS) (FARIA, 2013). Constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares. Este radical é produzido a partir da L-arginina, por uma reação mediada pela enzima NO-sintase constitutiva (c-NOS), na qual existem duas isoformas (NOS endotelial e NOS neuronal), que sintetiza o NO em condições fisiológicas e a induzível (NOSi) que é produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas durante o processo inflamatório (DUSSE, 2003). Em níveis elevados, ativa a guanilil-ciclase (GC) para produzir o segundo mensageiro intracelular, GMPc (UTHAYATHAS *et al*, 2007). Os efeitos do GMPc são finalizados pelas enzimas fosfodiesterases (PDE) (FARIA, 2013).

Esta molécula apresenta um papel dúbio, às vezes benéfico, outras vezes prejudicial ao organismo, dependendo do tipo de NOS na qual é produzida. Quando sua produção ocorre pela NOSi, libera quantidades maiores de NO que a NOSc e a produção deste continua indefinidamente até que a L-arginina ou os co-fatores necessários para sua síntese sejam depletados ou ocorra a morte celular (DUSSE, 2003).

O NO está envolvido no relaxamento vascular e tem um papel de grande importância na proteção do vaso sanguíneo. Constitui um importante mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais. Possui, ainda, um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto o NO é potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante. (DUSSE, 2003).

No sistema reprodutor, o NO controla o relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso peniano e seus vasos sanguíneos aferentes. Esse relaxamento muscular e vascular leva à tumescência vascular necessária à ereção (ADAMS, 1996).

NO também é um neurotransmissor, sintetizado por NO sintase neuronal (NOSn). Porém, também a NOSe e a NOSi estão presentes e são importantes nas funções fisiológicas e estão envolvidas em várias patologias do SNC (FLORA FILHO *et al*, 2000). Devido as suas características de alta difusibilidade, o NO é capaz de penetrar no citoplasma celular diretamente, sem necessidade de receptores de membrana, levando a respostas rápidas e precisas (QUEIROZ E BATISTA, 1999). Segundo vários estudos, dentre suas várias funções no SNC, está relacionado com o processo de memória e aprendizagem (FARIA, 2013).

No SNC sua produção é iniciada quando o glutamato é liberado pelo neurônio pré-sináptico, ligando-se ao receptor NMDA (N-metil d-aspartato) no neurônio pós-sináptico, provocando a abertura de canais de cálcio, proporcionando o influxo de cálcio e sua ligação com a calmodulina. O complexo cálcio/calmodilina liga-se então a forma NOS neuronal, ativando a produção de NO e GMPc, que atua como mensageiro retrógrado, desencadeando mais liberação de glutamato (QUEIROZ E BATISTA, 1999).

Várias linhas de evidência experimental e clínica têm demonstrado que a ativação de vias inflamatórias, incluindo a via do óxido nítrico (NO), está envolvida na patogênese de convulsões associadas a várias formas de epilepsia, com diferentes etiologias. As crises epiléticas podem induzir um aumento significativo na produção de NO, e este aumento pode está envolvido na neurodegeneração induzida pela convulsão (RIOS *et al*, 2013).

1.4 EROS (espécies reativas de oxigênio); ERN (espécies reativas de nitrogênio) e estresse oxidativo

Radicais livres, espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas. As EROs e as ERN têm importante função biológica (NASCIMENTO *et. al*, 2010). No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (BARREIRAS *et. al*, 2006).

Radical livre compreende toda estrutura química capaz de apresentar orbitais contendo um ou mais elétrons desemparelhados, os quais conferem ao radical livre uma grande capacidade de reagir com moléculas alvo (JARDIM, 2005).

A expressão “espécies reativas de oxigênio” (EROs) é utilizada para definir os agentes potencialmente patogênicos derivados do metabolismo do oxigênio (O_2): radicais livres e moléculas, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO) e outras, que apesar de terem grupos funcionais contendo oxigênio quimicamente reativo, não possuem elétrons desemparelhados e, por isso, não são radicais (FERREIRA & MATSUDA, 1997).

Dentre as ERN “Espécies Reativas de Nitrogênio” estão os produtos provenientes do metabolismo do óxido nítrico, que quando em presença do radical superóxido (O_2^-) converte-se em peroxinitrito ($ONOO^-$), que promove diversos danos aos sistemas biológicos (NASCIMENTO *et. al*, 2010; SILVA *et. al*, 2010).

Devido a sua alta reatividade química, as EROs podem reagir com moléculas biológicas como lipídeos de membrana, ácidos graxos e fosfolipídeos, podendo iniciar um processo muito nocivo para a célula (CASTAGNE *et al.*, 1999; EVANS, 2000). Quando essas moléculas biológicas são provenientes da membrana lipídica, pode haver uma peroxidação dos lipídeos de membrana e oxidação de algumas enzimas, levando a uma intensa oxidação de proteínas até sua degradação (MATES, 2000).

Estresse oxidativo pode ser visto como consequência de uma diferença entre a produção de ERO e a habilidade da célula de se defender contra esses radicais, o que pode levar a morte celular (CASTAGNE *et al.*, 1999; EVANS, 2000). No sistema nervoso central, o estresse oxidativo está envolvido em muitas patologias agudas como isquemia, trauma encefálico, excitotoxicidade e várias doenças degenerativas (TAKUMA *et al.*, 2004).

O grau de peroxidação dos fosfolipídios é determinado pelas concentrações de malondialdeído (MDA) e o método comumente aplicado de mensuração é o de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ESTERBAUER, 1993).

Os radicais superóxido e hidroxila, quando associados com o aumento dos processos peroxidativos e ligados a baixas concentrações de antioxidantes, estão envolvidos em um grande número de doenças degenerativas (MATES, 2000).

Devido o cérebro conter uma grande quantidade de lipídeos e metais oxidáveis e, em relação aos outros tecidos, ter uma menor quantidade de defesas antioxidantes, é mais vulnerável ao estresse oxidativo. Podendo ocorrer muitas alterações das funções celulares e modificar a liberação e/ou síntese de outros compostos que podem estar relacionados com a morte neuronal (FREITAS, 2006).

Vários estudos relacionam o envolvimento do estresse oxidativo ao processo convulsivo. Alguns trabalhos demonstraram um aumento em diversos marcadores de formação de espécies reativas, como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BASHATOVA *et al.*, 2003; PATSOUKIS *et al.*, 2004).

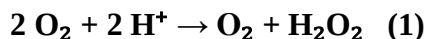
1.5 Defesas antioxidantes

Para manter a produção de radicais livres em níveis que não tragam prejuízo para a homeostasia celular, o organismo possui alguns sistemas de defesa, os antioxidantes. O aumento da peroxidação de lipídeos associado a baixa proteção antioxidante pode levar a citotoxicidade, alergia, mutagenicidade e/ou carcinogênese. (MATES, 2000). Por isso a prevenção do estresse oxidativo é essencial, já que pode causar danos ao DNA. (JARDIM, 2005).

A citoproteção contra radicais livres é promovida por um sistema de defesa que compreende antioxidantes enzimáticos, que são a SOD (superóxido dismutase), catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px) e não enzimáticos, como o ácido ascórbico (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno e vitamina A (JARDIM, 2005).

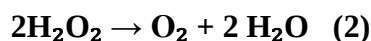
A SOD existe sob a forma de três isoenzimas nas células humanas: SOD citosólica e SOD extracelular ambas contendo íons sódio e zinco e SOD mitocondrial contendo íons manganês. Ela age removendo, por reação de dismutação, o radical superóxido convertendo em peróxido de hidrogênio (1).

SOD



As catalases são enzimas encontradas nos peroxissomos da maioria dos tecidos, como no cérebro, sangue, medula óssea, mucosas, rins e fígado. Sua atividade é dependente da NADPH. Removem o peróxido de hidrogênio catalizando sua redução em água e oxigênio molecular (2) (FREITAS, 2006).

Catalase



A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra lesão resultante da exposição dos agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta (FERREIRA & MATSUBA, 1997).

A glutathione, um tripeptídeo (g-L-glutamil-cisteinil-glicina), permanece no organismo em formas reduzidas (GSH) e oxidada (GSSG), agindo diretamente em processos biológicos importantes, incluindo metabolismo e proteção celular. Em particular, problemas na síntese de glutathione estão agregados a determinadas doenças, nas quais os níveis de glutathione e enzimas que atuam no seu metabolismo podem ser expressivos na avaliação do estresse oxidativo. Alterações na concentração deste tripeptídeo podem ser consideradas um indicador favorável em determinadas desordens fisiológicas, como alterações dos estados antioxidantes (MENEZES, 2012).

Glutathione peroxidases (GPx) são as principais enzimas responsáveis pela remoção de peróxido de hidrogênio gerado pelas SOD no citosol e mitocôndria e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois às custas da conversão de GSH a GSSG (3) (FERREIRA & MATSUBA, 1997).

GPx



1.6. Astrócitos e convulsão

O SNC é composto por dois tipos celulares: neurônios e células da glia. As células da glia foram descobertas Rudolph Virchow, um anatomista alemão, em meados do século XIX (CLASADONE e HAYDON, 2012). O termo glia refere-se a cinco tipos celulares: oligodendrócitos, astrócitos, células de Schwann, células epidimárias e micróglia, que juntas correspondem a cerca de 85% das células presentes no SNC (TEIXEIRA, 2012).

Os astrócitos são as células gliais encontradas em maior quantidade no SNC, tendo importância no suporte trófico, metabólico e estrutural dos neurônios (Ricci et al., 2009). São caracterizadas morfológicamente por apresentarem prolongamentos a partir do seu corpo celular, daí então a origem de sua denominação (astro= estrela e cito=célula (HALASSA, 2007).

Os astrócitos, ao contrário dos neurônios, não são células eletricamente excitáveis, isto é, não geram impulsos elétricos. Essas células exibem uma forma de excitabilidade que é baseada na variação da concentração intracelular de Ca^{2+} , uma vez que a ativação de seus receptores para neurotransmissores leva a um aumento na concentração intracelular de Ca^{2+} , estímulo esse que pode propagar-se para as células vizinhas como uma espécie de onda intracelular de Ca^{2+} (CORNELL-BELL *et al.*, 1990; SCAMES & GIAUME, 2006). Esse aumento do Ca^{2+} intracelular promove a liberação dos denominados gliotransmissores, os quais são substâncias neuroativas capazes de controlar diversos processos cerebrais, tais como tônus vascular e atividade neuronal (HAYDON & CARMIGNOTO, 2006).

Dentre das muitas funções dos astrócitos estão a sustentação, nutrição e controle da atividade sináptica de neurônios. Seus numerosos prolongamentos celulares podem entrar em contato com milhares de sinapses, dendritos e também à microvasculatura cerebral, e, deste modo, tem sido proposto que essas células proporcionam suporte metabólico aos neurônios. Os astrócitos também são capazes de realizar a modulação das vias de sinalização de transmissores, incluindo glutamato, GABA e adenosina, por consequência, apresentam potencial para modular a transmissão sináptica e excitabilidade neuronal (HALASSA *et al.*, 2007; CLASADONTE e HAYDON, 2010).

Cruneli et. al (2015) relatou que os astrócitos contribuem para a regulação da excitabilidade neuronal e da transmissão sináptica através da liberação de diferentes gliotransmissores, tendo importante papel na sincronia neuronal. Portanto, segundo o autor, a disfunção dos astrócitos pode contribuir para a epileptogênese, já que estas células estão envolvidas no controle da regulação da homeostase das concentrações de K^+ , Ca^{++} , Cl^- , regulação de citocinas e de neurotransmissores como GABA e glutamato. Sugerindo que a epilepsia seja considerada um distúrbio da sinalização de neurônios e astrócitos em vez de doença neuronal.

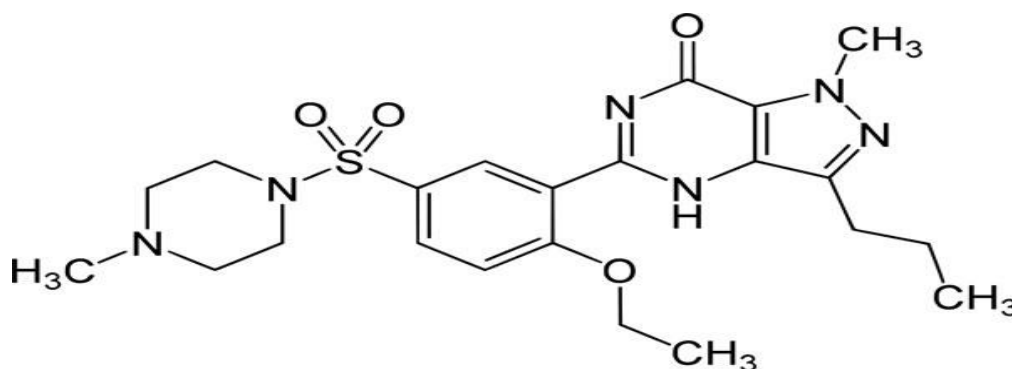
Estes novos alvos baseados em astrócitos devem abrir caminho a um programa de descoberta para o desenvolvimento da quarta geração de drogas antiepilépticas com maior eficácia para a melhoria clínica do tratamento (CRUNELI *et. al*, 2015).

1.7. Sildenafil

Sildenafil é importante fármaco inibidor seletivo da fosfodiesterase tipo V. Inibindo a atividade dessa enzima, a degradação de GMPc é combatida e, dessa forma, a função erétil é potencializada devido ao aumento dos níveis citoplasmáticos de GMPc. (NIEOCZYM *et. al.*, 2010). Inicialmente foi sintetizado para tratar hipertensão e angina. Posteriormente, tornou-se a primeira linha de tratamento da disfunção erétil e atualmente também sendo utilizado para o tratamento da hipertensão pulmonar (SARAIVA, 2010).

No Brasil, o sildenafil é comercializado nas dosagens de 25, 50 e 100 mg, atinge concentrações plasmáticas máximas (Tmax) em até uma hora e tem uma meia-vida (T1/2) de três a cinco horas. Clinicamente, isto se reflete em início de ação da atividade erétil a partir de 12 minutos, podendo ter efeito por até 12 horas (EARDLEY, 2002).

Figura 2. Estrutura química do sildenafil



Fonte: disponível em <http://www.qca.ibilce.unesp.br/BNR/BNR04-2003.html>

As PDEs (fosfodiesterases) compreendem 11 famílias distintas de enzimas (PDE1-PDE11) que inibem a atividade dos segundos mensageiros nas células por hidrolisarem a ligação fosfodiéster do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) e do monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) (SARAIVA, 2010).

A PDE-5 é uma isoforma responsável por diminuir os níveis citoplasmáticos de GMPc nas células musculares lisas de arteríolas do pênis, transformando o GMPc em GMP. Devido à inativação de um dos principais mediadores do relaxamento da musculatura lisa vascular, observa-se que a PDE5 tem ação contrária à função erétil. (RANG & DALE, 2011).

A enzima é expressa em muitos tecidos (vascularização periférica, vascularização pulmonar, mucosa nasal, músculos traqueobrônquicos), além dos sinusóides do corpo cavernoso peniano (MAHLER, 2005).

1.5.2. Sildenafil e convulsões

Os efeitos adversos relacionados ao sildenafil com maior frequência são: cefaleia (16%), rubor (10%), dispepsia (7%) congestão nasal e alterações da visão, incluindo sensibilidade à luz e presença de tons azuis na visão, ocorrem em cerca de 3% dos pacientes, particularmente naqueles que recebem doses de 100 mg. Apesar de que a maioria dos efeitos adversos relatados parecem ser benignos, há relatos de efeitos mais relevantes, como convulsões, enxaqueca e outras alterações neurológicas (SMITH, 2013).

A capacidade de sildenafil para atravessar a barreira hemato-encefálica e a presença de PDE5 e outros componentes da via NO / GMPc no cérebro (MILMAN & ARNOLD, 2002) predispõe esta droga a exercer alguns efeitos no sistema nervoso central (SNC). Foi relatado que o sildenafil aumenta a neurogênese (ZHANG *et al*, 2006), o que pode ser benéfico para o tratamento de acidente vascular cerebral. Sua influência sobre os processos de aprendizagem e consolidação de memória foi extensivamente estudado em modelos animais e os resultados sugerem que este inibidor da PDE5 pode ser útil como uma nova terapia para deficiências de memória (DEVAN *et al*, 2007; PATIL *et al*, 2006; KURT *et al*, 2004; PRICKAERTS *et al*, 2004; PUZZO *et al*, 2009). Como também foi relatada a atividade antinociceptiva de sildenafil em modelos experimentais (HUANG *et al*, 2010; PARK *et al*, 2011). No entanto, alguns estudos com animais também documentaram um potencial de sildenafil para aumentar os níveis de ansiedade (KURT *et al*, 2004; VOLKE *et al*, 2003). Os homens que usam

sildenafil também reclamaram de alguns efeitos colaterais comuns, como tontura, dor de cabeça, alterações visuais, nervosismo, insônia e sonhos anormais (MOREIRA *et al*, 2000). A Atividade ansiogênica e pro agressiva, a melhoria cognitiva e a indução da insônia podem ter um mecanismo de ação comum, ou seja, a atividade excitatória em certas estruturas do SNC. Tal ativação pode também resultar em atividade proconvulsiva. Um número cada vez maior de estudos indicam que o sildenafil exibe atividade proconvulsiva tanto em camundongos (RIAZI *et al*, 2006; AKULA *et al*, 2008) como em seres humanos (STRIANO *et. al*, 2006; GILAD *et al*, 2002).

A atividade potencial proconvulsiva de sildenafil foi inicialmente descrita em uso clínico, existem relatos de casos de homens saudáveis que sofreram ataques convulsivos após uso de inibidores das fosfodiesterase 5 (PDE5). (STRIANO *et. al*, 2006; GILAD *et al*, 2002).

Gilad *et al.* (2002) relatou a ocorrência de ataques convulsivos em dois homens saudáveis após o uso de sildenafil. O primeiro caso era de um homem de 63 anos, saudável, que nunca havia convulsionado e que foi internado devido um primeiro episódio de convulsões tônico clônicas generalizada (TCG), três horas após a administração de 50mg de sildenafil. Três meses depois, experimentou a droga novamente, e quatro horas depois, teve outra convulsão tônico clônica. O segundo caso foi de um homem de 54 anos também saudável, que cerca de 4 horas e meia após administração de 50mg de sildenafil teve o primeiro episódio de convulsão tônico clônica.

Striano *et. al*, (2006), relata o caso de um homem também saudável de 60 anos, no qual foi prescrito Vardenafil de 10mg e, por conta própria, aumentou a dose para 40mg. Após três horas, apresentou um quadro de convulsão tônico-clônica, constatada por admissão em hospital, onde foi realizados exames neurológicos que se apresentaram normais. Foi orientado a parar de usar vardenafil, porém, dois meses depois, o homem tomou 30mg de vardenafil e teve uma nova crise tônico-clônicas, quatro horas após a administração. Após a crise convulsiva, foi acompanhado durante oito meses e não apresentou mais crises.

Em estudos experimentais in vivo, em modelo experimental de convulsão por pentilenotetrazol (PTZ) (RIAZI *et al* 2006; NIEOCZYM *et al.* 2010b; MONTASER-

KOUHSARI *et al.*, 2011) e em modelo por bicuculina em roedores (RIAZI *et al.*, 2006), sildenafil demonstrou ter atividade próconvulsivante dose dependente. Foi relatado também que sildenafil reverte a atividade anticonvulsivante de diazepam (GHOLIPOUR *et al.* 2009) e do cloreto de lítio (BAHREMAND *et al.* 2010) em convulsões clônicas induzidas por PTZ. Por outro lado, Nieoczym *et al.* 2010a, mostrou que o sildenafil aumentou o limiar para eletroconvulsões de uma forma dependente da dose e intensificado a atividade anticonvulsivante carbamazepina (CBZ), valproato (APV) e topiramato (TPM) em teste de convulsão por eletrochoque máximo em camundongos. Outro estudo mostrou que o sildenafil não altera o limiar de convulsão, mas limita o tempo das convulsões comportamentais na amígdala (kidling) em ratos (Nieoczym *et al.* 2010b). Além disso, o sildenafil não causou influência nas convulsões induzidas por cocaína (NIEOCZYM *et al.* 2009).

Estudos relatam evidência de que o NO desempenha um papel importante na regulação do limiar de convulsão, mas a direção dos seus efeitos pode depender do tipo de convulsão, da fonte de NO e de outros sistemas de neurotransmissores envolvidos (DE SARRO *et al.* , 1991; OSONOE *et al.* , 1994; VAN LEEUWEN *et al.* , 1995; NIDHI *et al.* , 1999; RIOS *et al.*, 2013).

Segundo Nieoczym *et al.*, (2013), a atividade do sildenafil na convulsão é semelhante aos efeitos induzidos pelo óxido nítrico, pode se comportar como pró (ŁUSZCZKI *et al.*, 2006; RIOS *et al.*, 2013) ou anticonvulsivante (ALEXANDER *et al.*, 1998;. NIDHI *et al.*, 1999), isso depende do modelo experimental de convulsão, a espécie animal e da dose administrada de sildenafil.

1.8 Relevância e justificativa

O Sildenafil é um inibidor da enzima fosfodiesterase V, amplamente utilizado na atualidade por homens jovens e idosos, muitas vezes, de forma excessiva e sem indicação médica, com o propósito de melhorar o desempenho sexual e não tratar a disfunção erétil, já que esse fármaco pode ser adquirido sem a necessidade de prescrição médica, facilitando o acesso de qualquer pessoa ao mesmo.

Alguns estudos experimentais e relatos de caso apontam que o sildenafil pode causar convulsões e outras alterações neurológicas (NTCEBRIM, 2013). Portanto, é necessário determinar se a evidência suporta esta percepção e limita as opções para o uso deste medicamento de forma segura, principalmente, por ser uma droga utilizada em larga escala. Logo, o estudo desse medicamento no que se refere aos estudos de segurança e eficácia apresenta-se como componente base para a escolha do seu uso adequado.

Devido à literatura já ter descrito trabalhos demonstrando o potencial próconvulsivante do sildenafil por via gabaérgica, resolvemos investigar seu potencial próconvulsivante pela via colinérgica, como também, realizar o estudo da participação do estresse oxidativo, de defesas antioxidantes comparando com estudo *in vitro* em astrócitos. Nesse contexto, o presente trabalho investigou os efeitos comportamentais e neuroquímicos do sildenafil em modelo de convulsão por pilocarpina, bem como os efeitos em astrócitos *in vitro*, a fim de contribuir com informações que auxiliem no conhecimento para o processo de decisão da escolha terapêutica mais segura e adequada desse medicamento para os pacientes, fazendo-se, então, uma avaliação de risco - benefício.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Estudar os efeitos comportamentais e neuroquímicos do Sildenafil em animais submetidos ao modelo de convulsões induzidas por pilocarpina, como em astrócitos *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos:

- ✓ Avaliar as alterações comportamentais induzidas pelo sildenafil em animais submetidos ao modelo de convulsões induzidas por pilocarpina;
- ✓ Realizar a determinação da atividade da acetilcolinesterase nas áreas cerebrais estudadas;
- ✓ Investigar alterações oxidativas como o índice de peroxidação lipídica (TBARS), quantidade de nitrito e glutatona reduzida (GSH) nas áreas cerebrais, após o processo convulsivo, dos animais pré-tratados com sildenafil;
- ✓ Determinar a viabilidade celular após tratamento com sildenafil ou sildenafil+pilocarpina em astrócitos *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos swiss (25-34g), adultos, do sexo masculino, pesando entre 25-34g, provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, acondicionados em caixas de propileno $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclos claro/escuro de 12 em 12 horas, recebendo ração padrão (Purina Chow) e água “*ad libitum*”. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará, sob o protocolo número 6614.

3.2 Drogas utilizadas

Tabela 1 – Drogas utilizadas no tratamento dos animais, preparo e via de administração

Droga	Preparo	Via de administração
Citrato de Sildenafil (Viagra®)	dissolvidos em solução salina a 0,9% nas doses de 2,5; 5; 10 e 20mg/kg	via intraperitoneal
Pilocarpina / Cloridrato de pilocarpina (Sigma Chemical Co,USA)	dissolvida em solução salina a 0.9% (400mg/kg)	via intraperitoneal

Fonte: próprio autor

3.3 Tratamento dos grupos experimentais

Os animais foram pré-tratados com sildenafil nas doses de 2,5, 5, 10 ou 20 mg/kg de forma aguda ou por 7 dias, 30 minutos após o pré-tratamento agudo ou 30 minutos após a última administração (sétimo dia) do pré-tratamento com doses sequenciais, foi administrado pilocarpina 400mg/kg (P400) e observado os animais durante 60 minutos (figura 3; tabela 2). Foi realizada conversão de doses para camundongos equivalentes com as doses disponíveis na clínica para seres humanos, a dose de 20mg/kg corresponde a de 100mg (humanos); a de 10mg/kg corresponde a de 50mg (humanos) 5mg/kg corresponde a de 25mg (humanos), considerando o peso de

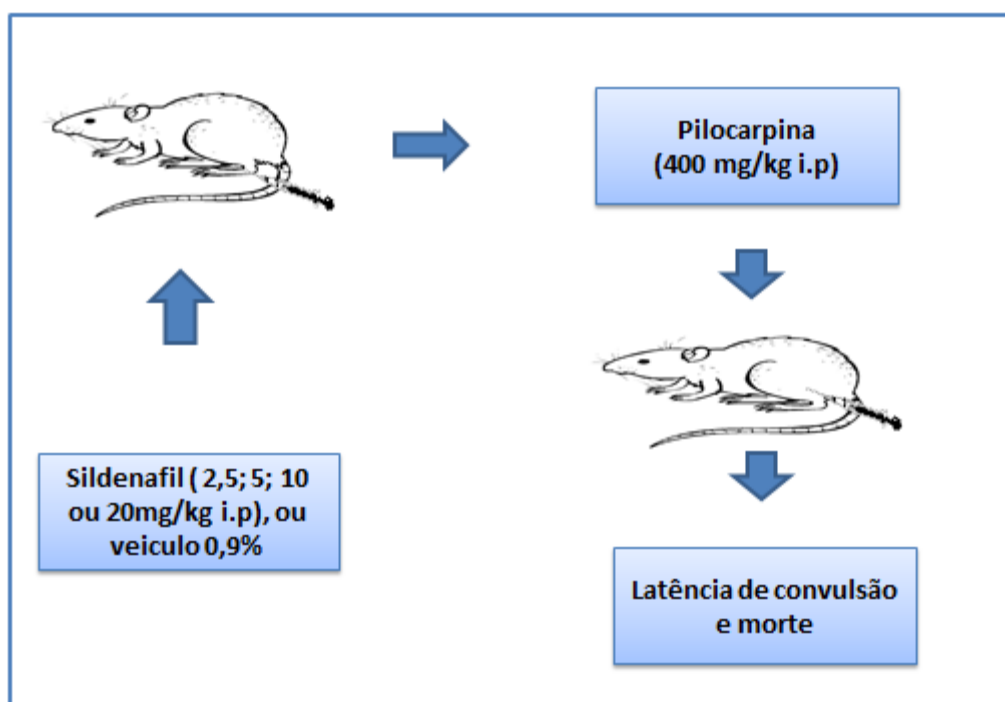
um homem adulto com 70kg. Apenas a dose de 2,5mg/kg é considerada uma dose menor do que as utilizadas na clínica (12,5 mg em humanos) (Reagan-Shaw Et Al, 2007). Foi também realizado tratamento em grupo (n=8) apenas com sildenafil nas doses de 10 e 20mg/kg (melhores doses) de forma aguda ou em doses sequenciais (7 dias) e posteriormente os animais foram sacrificados e seu cérebro dissecado, com o objetivo de avaliar nos testes neuroquímicos o efeito do sildenafil em animais que não sofreram convulsão por pilocarpina (figura 4; tabela 2).

Tabela 2- Grupos experimentais

Grupos experimentais (n=8)	Drogas utilizadas
Veiculo	(NaCl 0,9%)
Veiculo (P400)	(NaCl 0,9%)+ pilocarpina 400mg/g
Sil (2,5, 5, 10 ou 20mg/kg) + P400	Sildenafil 2,5, 5, 10, 20mg/kg+ Pilocarpina 400mg/kg
Sil (10 ou 20mg/kg)	Sildenafil 10 e 20mg/kg

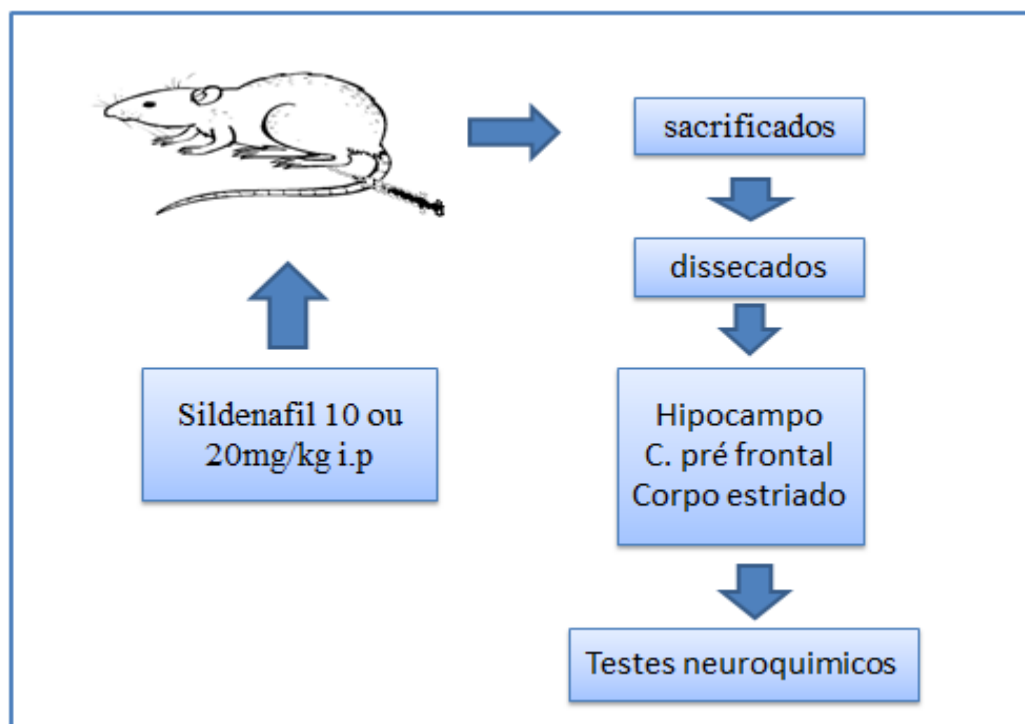
Fonte: próprio autor

Figura 3 – Esquema do teste convulsão induzida por pilocarpina



Fonte: próprio autor

Figura 4 - Esquema tratamento dos grupos que não foram submetidos a convulsão



Fonte: próprio autor

3.4. Teste de convulsão induzido por pilocarpina

Os animais receberam injeções intraperitoneal de sildenafil (SIL), nas concentrações de 20, 10, 5 ou 2,5mg/kg ou, ainda, do veículo de dissolução dessas drogas (solução salina – NaCl 0,9%). Após 30 minutos da última injeção das drogas ou veículo foi administrado Pilocarpina 400mg/Kg (P400) por via intraperitoneal (TURSKEI et al., 1983). O ácido valpróico (200 mg/Kg , i.p.) foi usado como padrão positivo. Logo após a administração de P400, os animais foram colocados em gaiolas individuais e observados por um período de 60 minutos (n= 8). Os parâmetros analisados foram: latência da convulsão (tempo entre a administração do P400 até a primeira convulsão clônica ou tônico-clônica) e a latência de morte dos animais (tempo decorrido da administração do P400 e morte dos animais). Tempo em segundos.

3.5. Equipamentos utilizados nos experimentos

- Balança Analítica - Modelo H5, Mettler, Suíça
- Balança para animais - Filizola, Brasil
- Cronômetro - Incoterm, Brasil
- Deionizador - USE, Elga, USA
- Freezer a -70°C - Modelo ULT 2586-3D14, Revco Scientific, Inc. Asheville, N.C., USA
- Medidor de pH, modelo B374 -(Sarstedt, Alemanha Oriental);
- Cubetas para leitura em espectrofotômetro - (Sarstedt, Alemanha Oriental);
- Pipetas Automáticas - H.E., Dinamarca
- Homogeneizadores manuais - H.E., Dinamarca
- Sonicador - Modelo PT 10-35. Brinkmann Instruments Inc., USA
- Vidrarias - Pirex, Brasil
- Centrífuga refrigerada - Pirex, Brasil
- Espectrofotômetro (Modelo Beckman DU, Fullerton, CA, USA) com medidor de absorbância digital e outros acessórios (acoplado ao sistema de modernização Gilford, Oberlin, Ohio, USA);
- Cubetas de vidro para espectrofotômetro (Sarstedt, Alemanha Oriental)

3.6 Dissecação das áreas cerebrais

Depois da morte dos animais, os encéfalos foram retirados e rapidamente colocados sobre papel alumínio em uma placa de Petri com gelo. Para a retirada do Córtex pré-frontal (CPF), a porção anterior dos lobos frontais (em torno de 1,5mm a partir do bulbo olfatório) foi removida e feita uma secção bilateral com o auxílio de uma tesoura de microdissecção (MACHADO, 1985).

Como as áreas corticais dos camundongos são geralmente menos evoluídas, menos diferenciadas e menos segregadas que o córtex cerebral de primatas existia uma controvérsia na literatura se roedores, realmente, possuíam córtex pré-frontal. A conclusão (UYLINGS *et al.*, 2003) é que estes animais possuem um córtex frontal que pode ser definido anatomicamente e funcionalmente como córtex pré-frontal, o qual é subdividido em uma região orbital-símile e outra região que pode incluir as estruturas dorsolateral e anterior cingulado-símile.

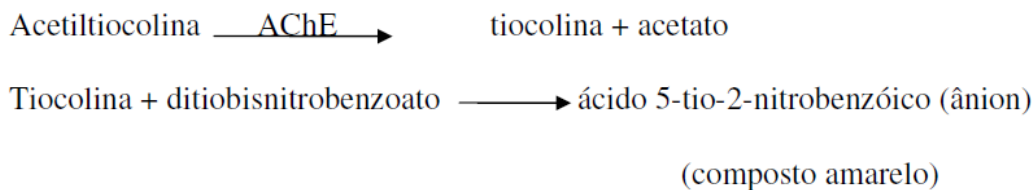
Após a retirada do CPF, acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi rebatida das leptomeninges com o auxílio de uma pinça reta de microdissecção, a qual, progredindo delicada e tangencialmente aos ventrículos laterais, divulsionou o córtex em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex já divulsionado foi rebatido para os lados, expondo região hipocampal (HC) e parte do corpo estriado (CE). O hipocampo e o corpo estriado (caudado, putamen e núcleo acumbens) foram isolados das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecção, sendo a retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex.

Terminada a dissecação, cada área cerebral (córtex pré-frontal, hipocampo, corpo estriado) foi acondicionada em papel alumínio devidamente identificado, pesado e conservado a -70 °C para uso posterior. Quando necessária a estocagem por um determinado período de tempo (no máximo 6 meses a -70 °C) os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação que os ensaiados imediatamente ou 24 h após a dissecação (BURKE GREENBAUN, 1987).

3.7 Determinação da Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

A atividade acetilcolinesterásica (AChE) foi determinada a 25 °C e pH 8,0, de acordo com o método de Ellman *et al.*, (1961), que tem como princípio a medida da velocidade de produção da tiocolina à proporção que a acetiltiocolina (ATC), utilizada como substrato, é hidrolisada. Isto é acompanhado pela reação contínua do tiol com o íon 5:5'-ditio-bis-2 nitrobenzoato (I) para produzir o ânion amarelo do ácido 5-tio-2 nitrobenzóico (II).

A atividade enzimática foi 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). As leituras das absorbâncias foram feitas no comprimento de onda de 412 nm, através de um espectrofotômetro (*Beckman* DU acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA ou *Beckman*, modelo DU 640B, CA, USA) que permitiu leituras automáticas em sistema digital e forneceu maior sensibilidade (leitura em décimos de milésimos de absorbância). A atividade específica foi expressa em nmoles de ATC hidrolisados por miligrama de proteína por minuto.



As soluções utilizadas neste teste:

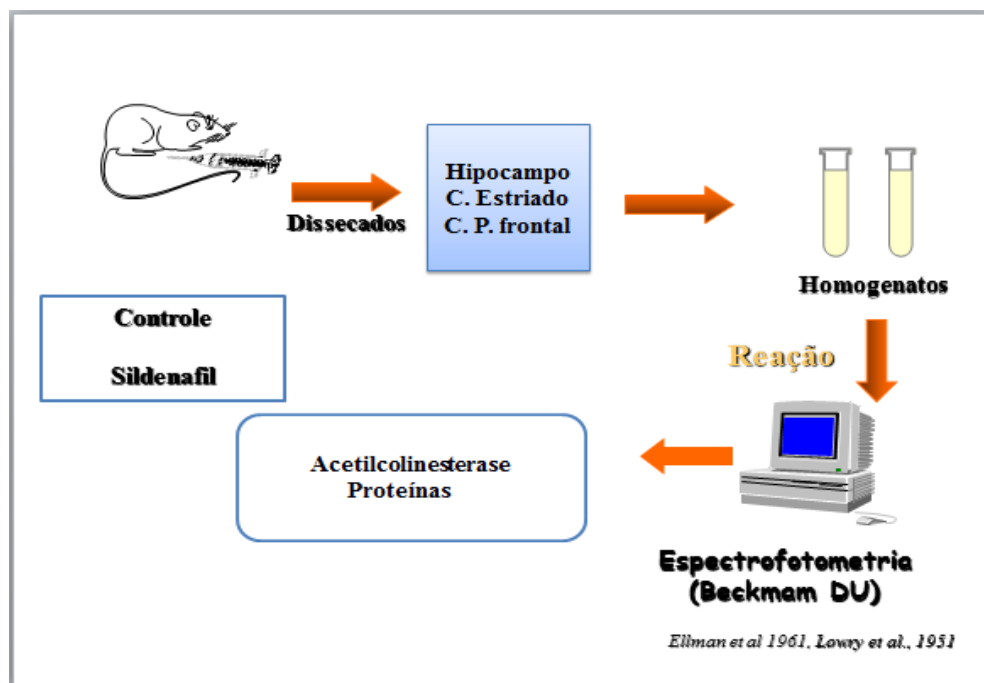
- Solução de ácido 5:5'-dito- bis-2 nitrobenzoato, DTNB (Sigma, St. Louis, MO, USA) 10 mM em tampão de sódio;
- Solução de iodeto de acetilcolina, ATC (Sigma, Sr. Louis, MO, USA) 75 mM em água bidestilada; Tampão de Fosfato de Sódio: $\text{NaH}_2\text{OPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,1 mM em água bidestilada, pH 7.0.

Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato 10% e o homogenato (5 µL) foi adicionado a uma cubeta contendo 500 µL do tampão, 895 µL de água destilada e 50 µL de ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB) 0,01M e a absorbância zerada.

Após a absorbância ser deixada em zero, a cubeta é retirada e acrescentado 50µL de iodeto de acetiotiocolina (ATC) (QUADRO 3). Absorbância foi registrada por 3 min, em 412 nM. A atividade da enzima foi calculada como modificações na absorbância do

minuto 3 para o minuto 0, relativo ao conteúdo de proteína contido no homogenato (LOWRY *et al.*, 1951).

Figura 5 - Esquema determinação da atividade da AChE.



Fonte: próprio autor

3.8 Dosagem de Proteína

O método é baseado na interação do corante *Coomassie Blue* G250 (BG250) e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica que absorve fortemente em 595nm.

A Solução Mãe de *Coomassie Blue* G250 foi diluída 5x com H₂O destilada antes de ser usada e permaneceu na geladeira por, no máximo, uma semana (Ex.: 1mL da solução mãe + 4mL de água destilada) - SOLUÇÃO DE BRADFORD Adicionaram-se as soluções (albumina padrão, água destilada, tampão e amostras) aos poços.

Em cada poço foi adicionado 40µL de solução. Por exemplo, se no poço foram adicionados 2µL da amostra, também foram adicionados 38µL do tampão utilizado no preparo da amostra.

Albumina em concentrações crescentes (EM DUPLICATA para fazer a curva padrão) Amostras (tampão utilizado para o homogenato e em seguida foi acrescentado às amostras: o volume final deve ser de 40µL). Branco – 2 poços somente com o homogenato utilizado. Após preencher a placa, foram adicionados 200 µl da solução de bradford (diluída) em cada poço. A leitura foi realizada 5 minutos, em comprimento de onda de 595nm (BRADFORD, 1976).

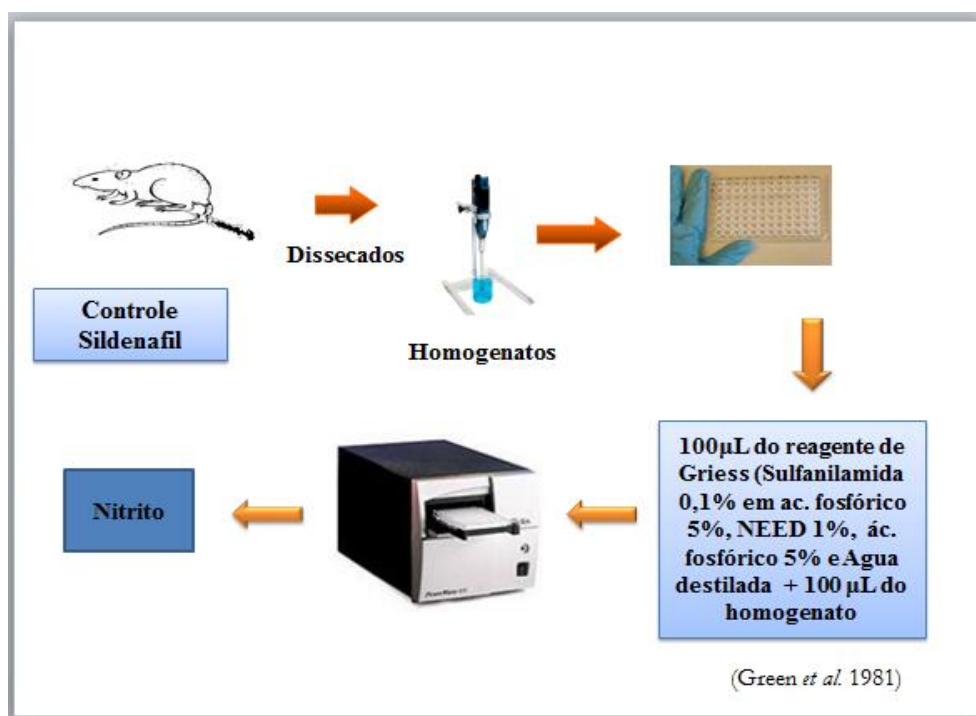
3.9 Determinação de Nitrito

- Preparação da Curva Padrão:

Foram pesados 7mg de NaNO_2 e dissolvidos em 10 mL de água destilada (estoque-10mM). Foram feitas as diluições em série, ficando 1mM, 100 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM , 0,625 μM , 0,312 μM . Foi realizada uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (GREEN *et al.*, 1982).

Foram preparados homogenatos das áreas cerebrais a 10% (w/v) em solução de cloreto de potássio (KCl) 1,15 %. Após a centrifugação (800xg, 10 min), os sobrenadantes foram coletados e a produção de NO determinada através da reação de Griess. Uma alíquota de 100 μL do sobrenadante foi incubada com 100 μL do reagente de Griess [sulfanilamida 1 % em H_3PO_4 1 %/N-(-1-naphthyl)-ethylenediamine 0,1 %/ H_3PO_4 1 % / diluído em água (1:1:1:1)] a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância é medida em espectrofotômetro a 540nm e foi expressa em nM de nitrito / g de tecido (QUADRO 5). A concentração de nitrito (μM) foi determinada a partir de uma curva padrão de NaNO_2 .

Figura 6 – Esquema determinação da concentração de nitrito

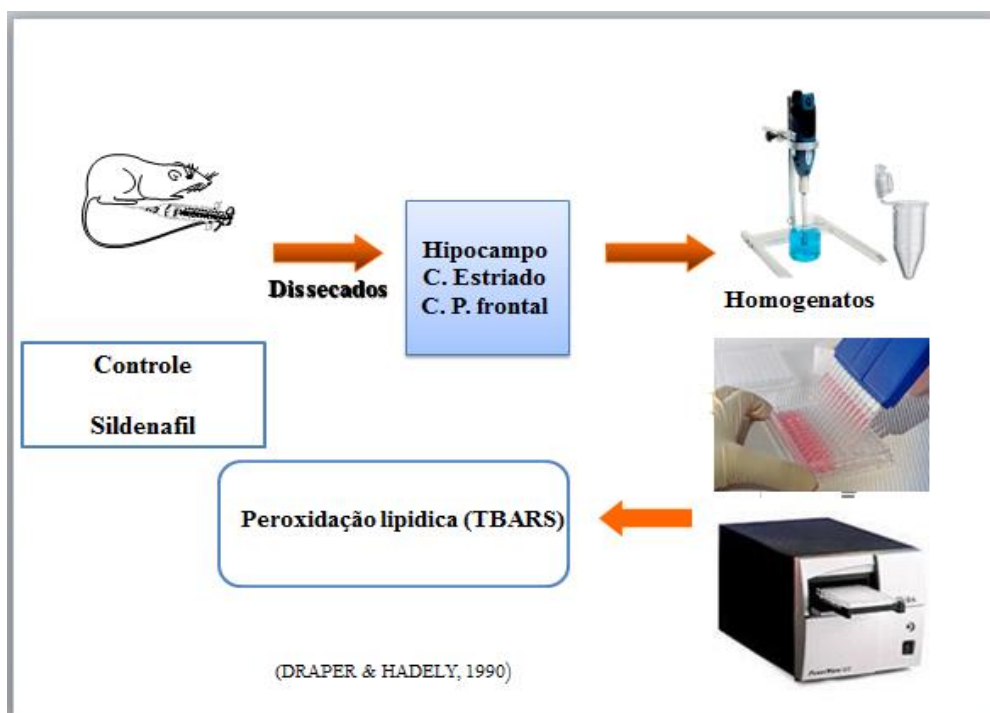


Fonte: próprio autor

3.10 Determinação da peroxidação lipídica (TBARS)

A peroxidação lipídica foi avaliada pela mensuração de substâncias tiobarbitúricas ácido-reativas (TBARS) nos homogenatos. As amostras foram homogenizadas a 10% com tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM pH 7,4, 63µL do homogenato foi misturado a 100 µL de ácido perclórico 35%, sendo estas centrifugadas (7000 rpm/15 min), no qual 150 µL do sobrenadante foram recuperados e misturado com 50 µL de ácido tiobarbitúrico 1,2%, e em seguida, estas amostras foram aquecidas em um banho de água fervente (95-100°C) por 30 min. Após o resfriamento, a peroxidação lipídica foi determinada em espectrofotômetro por absorbância 535nm e expressa como micrograma de MDA / g de tecido (QUADRO 4) (DRAPER & HADELY, 1990).

Figura 7 – Esquema determinação da peroxidação lipídica (TBARS)

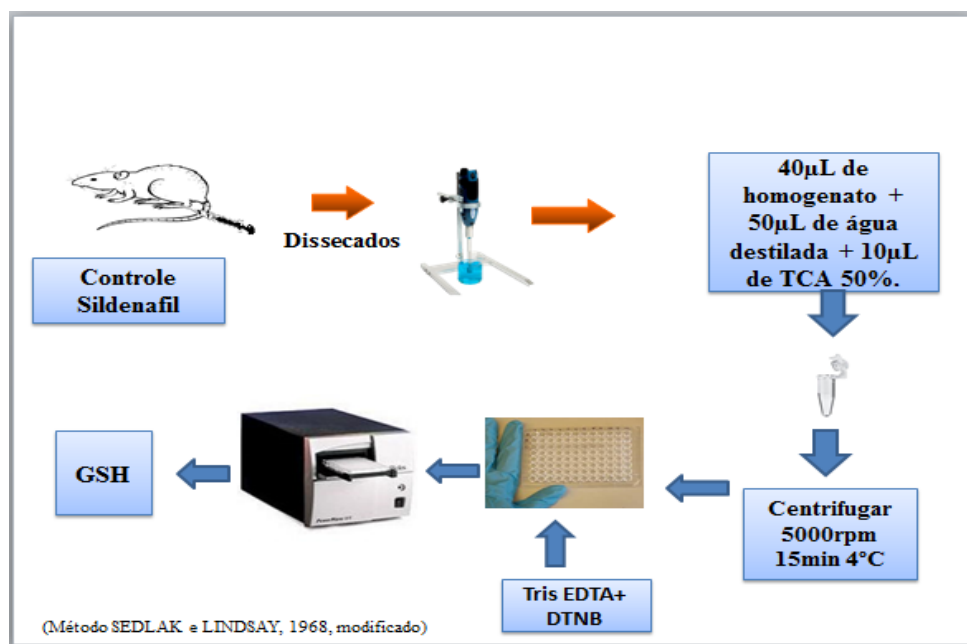


Fonte: próprio autor

3.11 Determinação da Concentração de glutathiona reduzida (GSH)

A determinação da concentração do GSH foi realizada na placa de ELISA (método SEDLAK e LINDSAY, 1968, modificado). Baseia-se na reação do reagente de Elleman, o 5,5'-ditiobios (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), com o tiol livre, originando um dissulfeto misto mais ácido-2-nitro-5-tiobenzóico. O preparo das amostras foi feito da seguinte forma: 40µL de cada amostra (homogenato do tecido a 10% em tampão fosfato) foi adicionada a um eppendorf + 50µL de água destilada e 10 µL de ATC (ácido tricloro acético) 50%. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, por 15 minutos, à temperatura de 4°C. Os sobrenadantes foram separados. Adicionaram-se 60µL dos sobrenadantes à placa de ELISA (mantidas resfriadas), assim como os brancos. O material permaneceu resfriado durante todo o ensaio. Imediatamente antes da leitura, foi adicionado o tampão fosfato pH 7,4 + 0,65 ml de DTNB 0,01 M metanol. Adicionaram-se 102 µL desta solução em cada poço da placa. Foi realizada leitura da absorbância a 412nm. A concentração da glutathiona reduzida foi expressa em µg de GSH por grama de tecido (QUADRO 6). A curva padrão foi obtida mediante a leitura de várias concentrações de GSH padrão (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25;100) e os resultados foram expressos em µg.

Figura 8 - Determinação da Concentração de glutathiona reduzida (GSH)



Fonte: próprio autor

3.12 Análise da atividade do sildenafil sobre astrócitos *in vitro*

3.12.1 Linhagem celular

A linhagem de astrócitos corticais imortalizados foi gentilmente concedida pela Profa. Dra. Soraya Soubhi Smaili (Laboratório de Sinalização de Cálcio e Morte Celular - Universidade Federal de São Paulo).

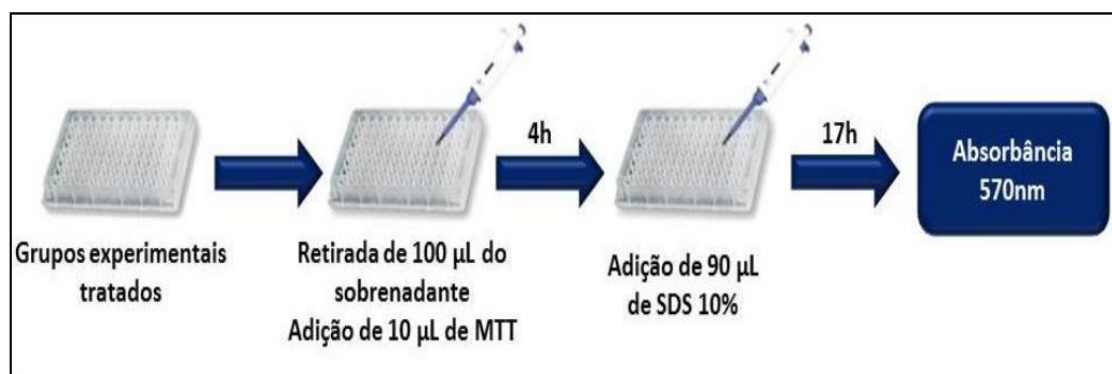
3.12.2 Cultivo da linhagem celular utilizada

Os astrócitos corticais foram cultivados em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com soro bovino fetal (10%) e antibióticos (100.000U/mL de penicilina, 10mg/mL estreptomicina). Foram incubadas em estufa a 37°C, atmosfera de 95% de umidade e 5% de CO₂. Durante o período de cultivo foram feitos repiques sucessivos de acordo com a necessidade das células.

3.12.3 Estudos de viabilidade celular em cultura de astrócitos em ensaio com MTT

A viabilidade celular foi determinada após tratamento com o sildenafil e com pilocarpina. Este método baseia-se na atividade metabólica de células viáveis, as quais são capazes de converter o MTT em sal de formazan, um produto colorido e insolúvel em água. As células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade celular de 1×10^5 cells/mL e tratadas com o sildenafil (100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 µg/mL), por 12 e 24 horas. Posteriormente, foi realizado tratamento com concentrações de sildenafil mais altas (1000, 500, 250, 125, 75 e 37 µg/mL) ou com uma combinação entre sildenafil e pilocarpina (31,83 mM) por 24 horas. Após o tratamento das células, o substrato da cultura foi retirado e então adicionado 10 µL de 3-(4,5-dimetilazil-2-il)-2,5 difenil- tetrazolico (MTT) dissolvido em PBS (500 µg/mL). Após incubação por 4 horas a 37°C em estufa com 5% de CO₂, o sobrenadante foi removido e adicionado SDS (10%) em HCL 0,01N para solubilizar os cristais de formazan. As placas foram incubadas por 17h e, em seguida, uma leitura espectrofotométrica foi realizada em um comprimento de onda de 570nm (QUADRO 7) (MOSMANN,1983).

Figura 9 – Esquema das etapas de tratamento dos astrócitos em Placa de Elisa para obtenção da viabilidade celular



Fonte: De Menezes, 2013.

3.13 Aspectos éticos

A pesquisa foi submetida e aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animais (CEPA) da Universidade Federal do Ceara.

3.14 Análise estatística

Os dados foram expressos como a media $\pm$ EPM. Na avaliação estatística dos ensaios *in vivo*, para determinação da latência para a primeira convulsão, latência de morte e parâmetros oxidativos foi realizada a análise de variancia (ANOVA) seguida pelo pos-teste Student-Newman-Keuls. Para análise estatística dos ensaios *in vitro*, foi realizada ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Para ambos os modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, os valores de probabilidade (P) menores do que 0,05 foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

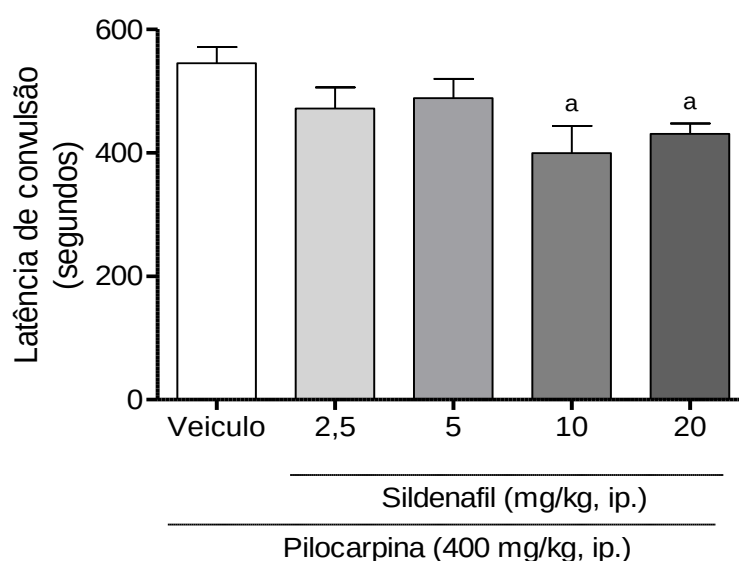
4.1 Estudo comportamental

4.1.1 Efeito da administração aguda do sildenafil sobre as convulsões induzidas por pilocarpina

Latência de convulsão

Nos grupos pré-tratados com sildenafil houve diminuição significativa da latência de convulsão nas doses: sil 10mg+P400 ($405,6 \pm 29,57$); sil 20mg + P400 ($436,9 \pm 27,64$) ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo veiculo $544,6 \pm 38,68$ (P400+salina 0,9%). Nas outras doses não houve diferença significativa em relação ao veiculo. Sil 2,5+P400 ($530,9 \pm 43,92$), 5mg+P400 ($479,3 \pm 47,40$) (figura 10).

Figura 10. Efeito da administração aguda do sildenafil (2,5, 5mg, 10mg ou 20mg/kg) sobre a latência de convulsão induzida por pilocarpina (P400) em camundongos.

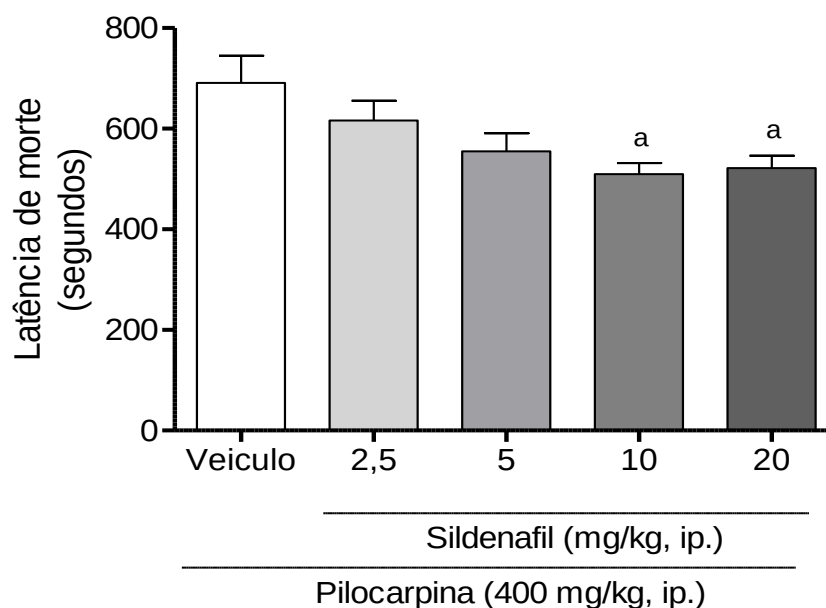


Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. a, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$).

Latência de morte

Na observação dos animais, verificou-se que a latência de morte diminuída foi significativa nos grupos que foram pré-tratados com sildenafil nas doses: sil 20mg/kg+ P400 ($535,7 \pm 32,86$); sil 10mg/kg+ P400 ($520,6 \pm 18,64$); ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo veiculo ($750,2 \pm 56,96$). Nas doses de Sil 5mg/kg+P400 ($612,2 \pm 54,87$); sil 2,5mg/kg+P400 ($834,0 \pm 68,28$) não houve diferença significativa em relação ao controle. (figura 11).

Figura 11. Efeito da administração aguda do sildenafil (2,5, 5mg, 10mg ou 20mg/kg) sobre a latência de morte induzida por pilocarpina (P400) em camundongos.



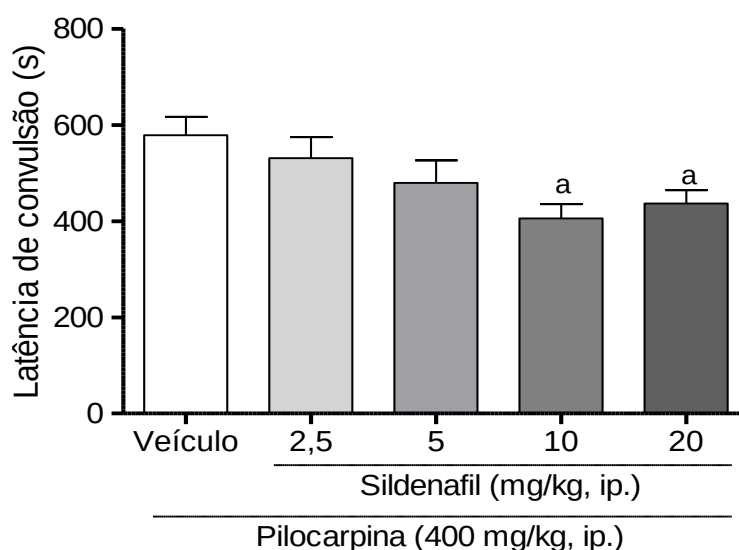
Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$).

4.1.2 Efeito da administração por 7 dias do sildenafil sobre as convulsões induzidas por pilocarpina.

Latência de convulsão

Nos grupos pré-tratados com sildenafil nas doses sil 10mg+P400 ($430,5 \pm 16,62$) e sil 20mg + P400 ($399,2 \pm 43,94$) houve diminuição significativa da latência de convulsão ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo veiculo P400 ($544,6 \pm 26,28$). Nos grupos tratados com sildenafil nas doses de sil 2,5mg/kg + P400 ($616,6 \pm 39,34$) e sil 5mg/kg + P400 ($555,2 \pm 35,68$) não houve diminuição significativa da latência de convulsão quando comparado ao grupo veiculo (P400) (figura 12).

Figura 12. Efeito da administração por 7 dias do sildenafil (2,5, 5mg, 10mg ou 20mg/kg) sobre a latência de convulsão induzida por pilocarpina (P400) em camundongos.

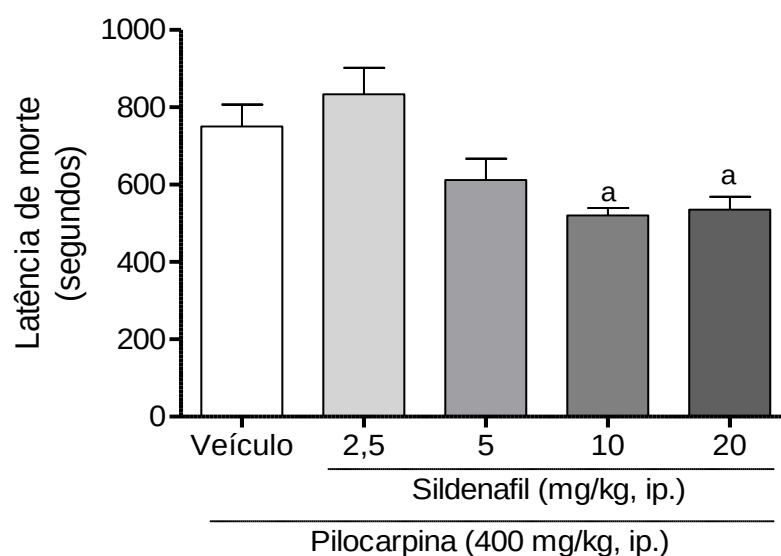


Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. a, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$).

Latência de morte

Na observação dos animais, verificou-se que a latência de morte diminuída foi significativa ($p < 0,05$) nos grupos que foram pré-tratados com sildenafil: sil 20mg/kg + P400 ($521,8 \pm 24,70$) e sil 10mg/kg + P400 ($509,5 \pm 22,16$); quando comparados ao grupo veículo P400 ($690,8 \pm 54,10$). No grupo pré-tratado com sildenafil na dosagem de 2,5mg/kg + P400 ($616,6 \pm 39,34$) e sil 5mg/kg + P400 ($555,2 \pm 35,68$) a alteração observada em relação ao controle não foi significativa (figura 13).

Figura 13. Efeito da administração por 7 dias do sildenafil (2,5, 5mg, 10mg ou 20mg/kg) sobre a latência de morte induzida por pilocarpina (P400) em camundongos.



Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$).

4.2. Análise neuroquímica

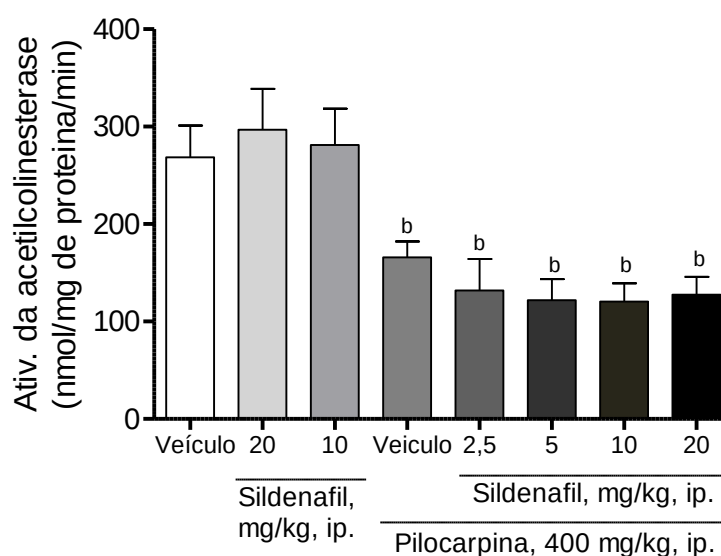
4.2.1. Efeitos do pré-tratamento agudo do sildenafil sobre a atividade da acetilcolinesterase em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos em modelo de convulsão induzido por P400.

A investigação da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) foi realizada em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos adultos, pertencentes aos seguintes grupos de tratamento agudo: sildenafil 2,5; 5; 10 ou 20mg/Kg, i.p. (SIL2,5+P400; SIL5+P400; SIL10+P400; SIL20+P400; SIL 20mg/g; SIL 10mg/kg) comparados com os grupos Pilocarpina 400mg/Kg, i.p (P400) (veículo) ou Salina 0,9% (veículo). Os grupos que foram tratados com sildenafil 10 ou 20mg/kg (SIL 10; SIL 20) foram comparados ao grupo salina 0,9% (veículo). Os resultados foram expressos em nmoles/mg de proteína/minuto.

Córtex pré-frontal:

Figura 14. Efeitos do pré-tratamento agudo sildenafil sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em córtex pré-frontal de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.

No córtex pré-frontal foi observado redução significativa dos níveis de acetilcolinesterase (AChE) em todos os grupos tratados com pilocarpina 400mg/kg, comparados ao veículo (salina 0,09%). Não houve diferença significativa ao comparar os grupos tratados com sildenafil + pilocarpina 400mg/kg com o grupo tratado com salina 0,09% + pilocarpina 400mg/g. (Veículo (salina): $791,0 \pm 75,20$; Sil 20+salina $716,1 \pm 79,76$; Sil 10+salina $726,9 \pm 114,0$; Veículo(P400) $510,0 \pm 58,43$; P400+ Sil 20 $183,0 \pm 27,96$; P400+Sil 10 $248,3 \pm 46,71$; P400+Sil 5 $326,1 \pm 58,46$; P400+Sil 2,5 $312,4 \pm 76,87$).

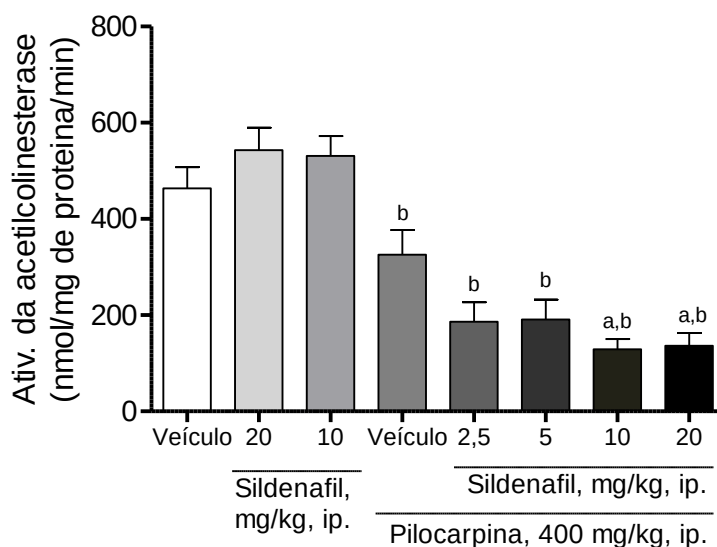


Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veículo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

Hipocampo:

Figura 15. Efeitos do pré-tratamento agudo sildenafil sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em hipocampo de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.

No hipocampo foi observado redução significativa dos níveis de acetilcolinesterase (AChE) em todos os grupos tratados com pilocarpina 400mg/kg, comparados ao veiculo (salina 0,09%). Houve diferença significativa ao comparar os grupos tratados com sildenafil + pilocarpina 400mg/kg nas dose de 20 e 10mg/kg comparando com o grupo tratado com salina 0,09% + pilocarpina 400mg/g. (Veiculo (salina): $942,5 \pm 95,17$; Sil 20+salina: $825,2 \pm 116,2$; Sil 10+salina: $856,2 \pm 105,7$; Veiculo(P400): $641,9 \pm 56,22$; P400+ Sil 20: $214,7 \pm 40,21$; P400+Sil 10: $229,8 \pm 41,58$; P400+Sil 5: $366,1 \pm 75,62$; P400+Sil 2,5: $404,4 \pm 74,25$).

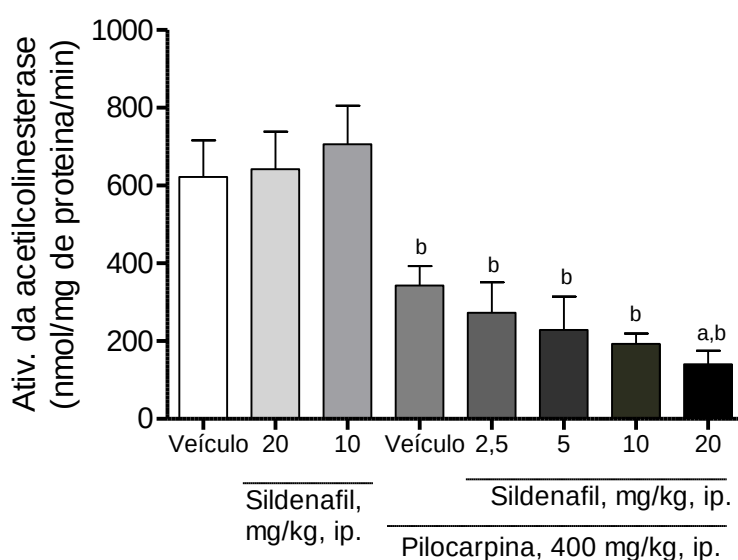


Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veiculo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

Corpo Estriado:

No corpo estriado foi observado redução significativa dos níveis de acetilcolinesterase (AChE) em todos os grupos tratados com pilocarpina 400mg/kg, comparados ao veículo (salina 0,09%). Houve diferença significativa no grupo pilocarpina 400mg/kg + sildenafil 20mg/kg ao comparar os grupos tratados com pilocarpina 400mg/kg + salina 0,09% (veículo). (Veículo (salina): $836,4 \pm 61,66$; Sil 20+salina: $807,9 \pm 90,39$; Sil 10+salina: $821,2 \pm 113,7$; Veículo(P400): $626,7 \pm 37,55$; P400+ Sil 20: $297,4 \pm 42,71$; P400+Sil 10: $191,4 \pm 50,83$; P400+Sil 5: $358,9 \pm 70,55$; P400+Sil 2,5: $541,1 \pm 88,84$).

Figura 16. Efeitos do pré-tratamento agudo sildenafil sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) no corpo estriado de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.



Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veículo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

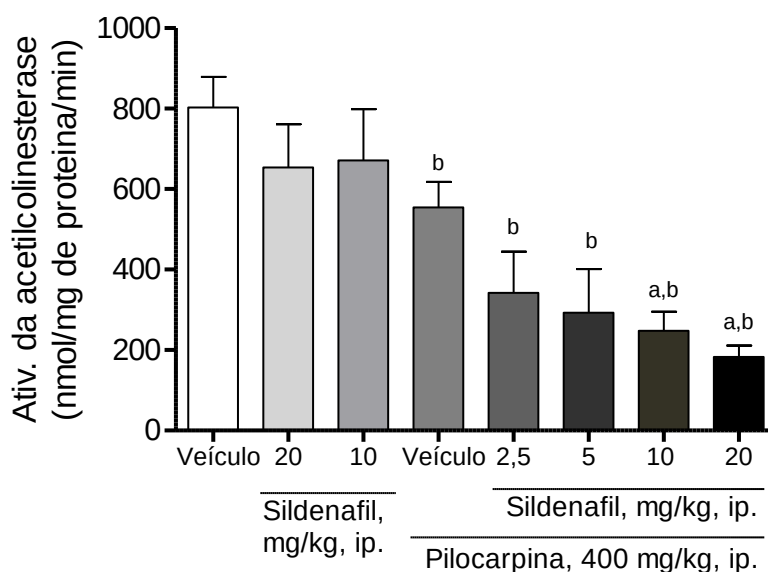
4.2.1.2. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre a atividade da acetilcolinesterase em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos em modelo de convulsão induzido por P400.

A investigação da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) foi realizada em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos adultos pré-tratados durante 7 dias com sildenafil ou salina (0,9%) nos seguintes grupos de tratamento: sildenafil 2,5; 5; 10 ou 20mg/Kg, i.p. (SIL2,5+P400; SIL5+P400; SIL10+P400; SIL20+P400; Salina+P400; SIL 20mg/g; SIL 10mg/kg); e Salina 0,9% (veículo). Os grupos que foram tratados com sildenafil 10 ou 20mg/kg (SIL 10; SIL 20) foram comparados ao grupo salina 0,9% (veículo). Os resultados foram expressos em nmoles/mg de proteína/minuto.

Córtex Pré-frontal:

Figura 17. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em Córtex pré-frontal de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.

No Córtex Pré-frontal foi observado redução significativa dos níveis de acetilcolinesterase (AChE) nos grupos sildenafil 10 e 20mg/kg + pilocarpina 400mg/kg ao se comparar com o veiculo (pilocarpina 400mg/kg + salina 0,09%) e veiculo (salina 0,09%). Nos demais grupos tratados com pilocarpina 400mg/kg houve redução significativa ao se comparar com o veiculo (salina 0,09%). (Veiculo (salina): $268,5 \pm 32,58$; Sil 20+salina: $296,8 \pm 41,88$; Sil 10+salina: $281,2 \pm 37,30$; Veiculo(P400): $166,0 \pm 16,17$; P400+ Sil 20: $127,6 \pm 18,14$; P400+Sil 10: $120,6 \pm 18,73$; P400+Sil 5: $121,9 \pm 21,41$; P400+Sil 2,5: $131,8 \pm 32,52$).

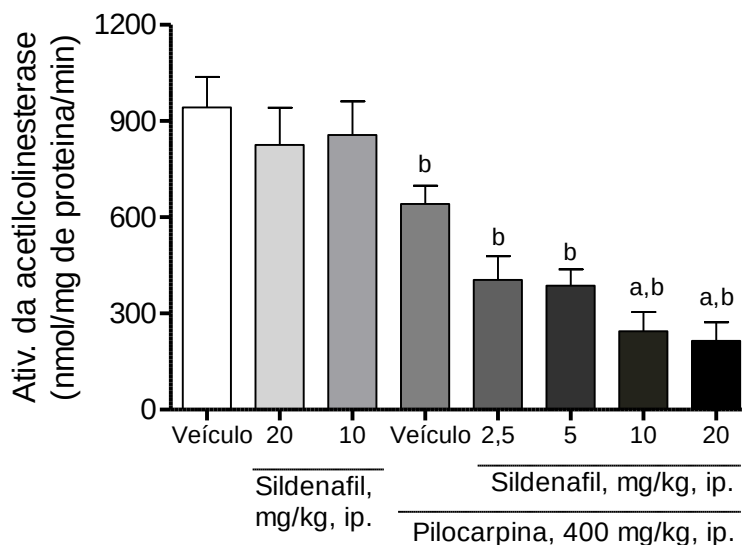


Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veiculo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veiculo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

Hipocampo:

No hipocampo foi observada redução significativa dos níveis de acetilcolinesterase (AChE) nos grupos 10 e 20 mg/kg sildenafil + pilocarpina 400mg/kg ao se comparar com o veículo (pilocarpina 400mg/kg + salina 0,09%) e veículo (salina 0,09%). Houve redução significativa também em todos os grupos tratados com pilocarpina 400mg/kg em relação ao grupo veículo (salina 0,09%). (Veículo (salina): $463,5 \pm 44,42$; Sil 20+salina: $543,0 \pm 46,73$; Sil 10+salina: $531,3 \pm 41,13$; Veículo(P400): $325,4 \pm 45,63$; P400+ Sil 20: $136,0 \pm 27,03$; P400+Sil 10: $129,2 \pm 20,89$; P400+Sil 5: $190,8 \pm 41,46$; P400+Sil 2,5: $186,1 \pm 31,10$).

Figura 18 . Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em Hipocampo de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.

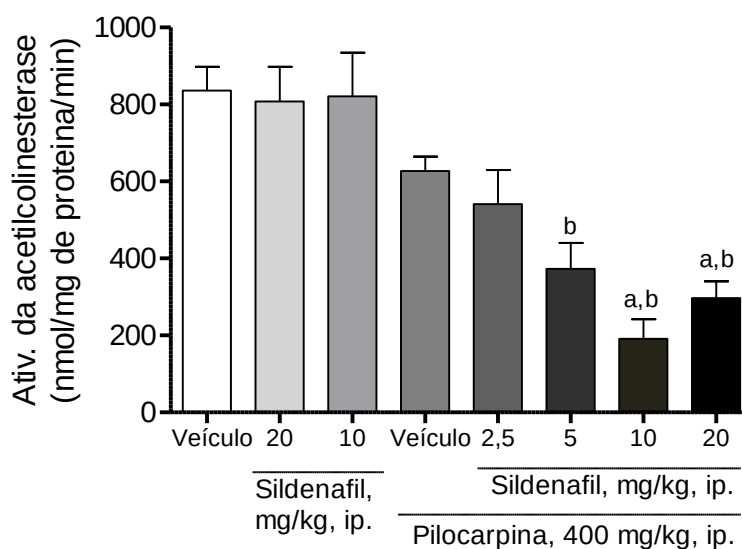


Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veículo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

Corpo Estriado:

No Corpo estriado foi observado redução significativa dos níveis de acetilcolinesterase (AChE) nos grupos sildenafil 10 e 20mg/kg + pilocarpina 400mg/kg ao se comparar com o veiculo (pilocarpina 400mg/kg) e veículo (salina 0,09%). (Veiculo (salina): $622,1 \pm 94,02$; Sil 20+salina: $642,4 \pm 96,25$; Sil 10+salina: $706,2 \pm 98,88$; Veiculo(P400): $342,6 \pm 50,60$; P400+ Sil 20: $140,7 \pm 35,04$; P400+Sil 10: $192,9 \pm 27,05$; P400+Sil 5: $192,9 \pm 27,05$; P400+Sil 2,5: $273,3 \pm 50,12$).

Figura 19. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em Corpo Estriado de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.



Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veiculo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

4.2.2. Determinação da Peroxidação Lipídica (TBARS)

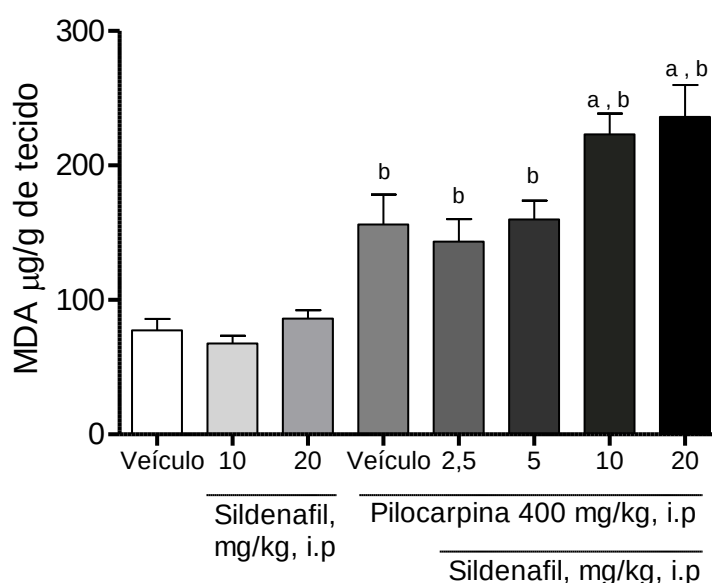
A investigação dos níveis de peroxidação lipídica foi realizada em córtex pré-frontal, hipocampo e corpo estriado de camundongos adultos, pertencentes aos seguintes grupos de pré-tratamento com sildenafil agudo e por 7 dias: sildenafil 2,5; 5; 10 ou 20mg/Kg, i.p. (SIL2,5+P400; SIL5+P400; SIL10+P400; SIL20+P400; SIL 20mg/g; SIL 10mg/kg) comparados com os grupos Pilocarpina 400mg/Kg, i.p (P400) (veículo) ou Salina 0,9% (veículo). Os grupos que foram tratados com sildenafil 10 ou 20mg/kg (SIL 10; SIL 20) foram comparados ao grupo salina 0,9% (veículo).

4.2.2.1 Efeito do pré tratamento agudo do sildenafil sobre o nível de Peroxidação Lipídica (TBARS) em modelo de convulsão induzido por P400.

Córtex pré-frontal

Foi observado que no córtex pré-frontal houve um aumento significativo dos níveis de MDA no grupo pré- tratado com sildenafil na dose de 20 e 10mg/kg comparado ao grupo veiculo (pilocarpina 400 mg/kg) e ao veiculo tratado apenas com salina (0,09%). O grupos que foram pré-tratados com sildenafil nas doses de 5mg/kg e 2,5mg/kg e com pilocarpina 400mg/kg+salina 0,09% também houve aumento significativo dos níveis de MDA, quando comparados ao grupo veiculo tratado apenas com salina (0,09%). (Veiculo (salina): $77,50 \pm 8,295$; Sil 20+salina: $86,21 \pm 6,136$; Sil 10+salina: $67,71 \pm 5,592$; Veiculo (P400): $156,2 \pm 22,19$; P400+ Sil 20: $236,2 \pm 23,60$; P400+Sil 10: $223,2 \pm 15,53$; P400+Sil 5: $159,8 \pm 14,09$; P400+Sil 2,5: $143,3 \pm 16,97$).

Figura 20. Efeitos do pré-tratamento agudo com sildenafil sobre os níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) em córtex pré-frontal de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.

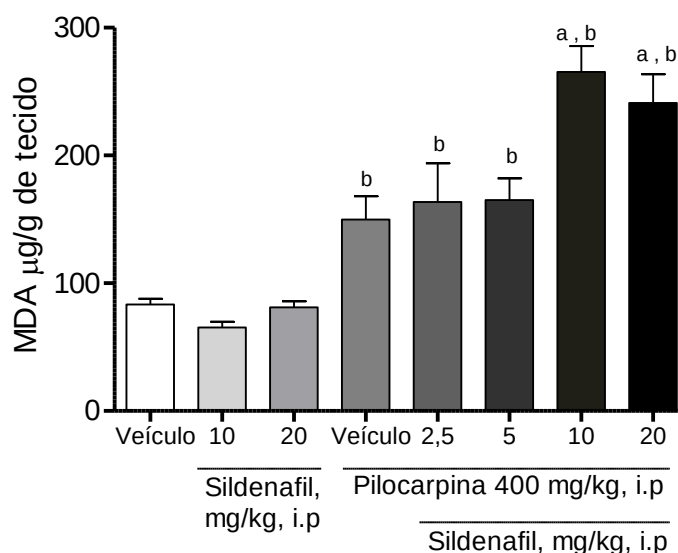


Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veiculo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

Hipocampo

Foi observado que no hipocampo houve um aumento significativo dos níveis de MDA no grupo pré- tratado com sildenafil na dose de 20 e 10mg/kg comparado ao grupo veiculo (pilocarpina 400 mg/kg) e ao veiculo tratado apenas com salina (0,09%). O grupos que foram pré-tratados com sildenafil nas doses de 5mg/kg e 2,5mg/kg e com pilocarpina 400mg/kg+salina 0,09% também houve aumento sinificativo dos níveis de MDA, quando comparados ao grupo veiculo tratado apenas com salina (0,09%). (Veiculo (salina): $83,39 \pm 4,452$; Sil 20+salina: $65,42 \pm 4,463$; Sil 10+salina: $81,02 \pm 4,750$; Veiculo (P400): $163,5 \pm 34,21$; P400+ Sil 20: $258,7 \pm 27,67$; P400+Sil 10: $258,4 \pm 20,20$; P400+Sil 5: $164,5 \pm 22,89$; P400+Sil 2,5: $157,3 \pm 24,68$).

Figura 21. Efeitos do pré-tratamento agudo com sildenafil sobre os níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) em hipocampo de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.

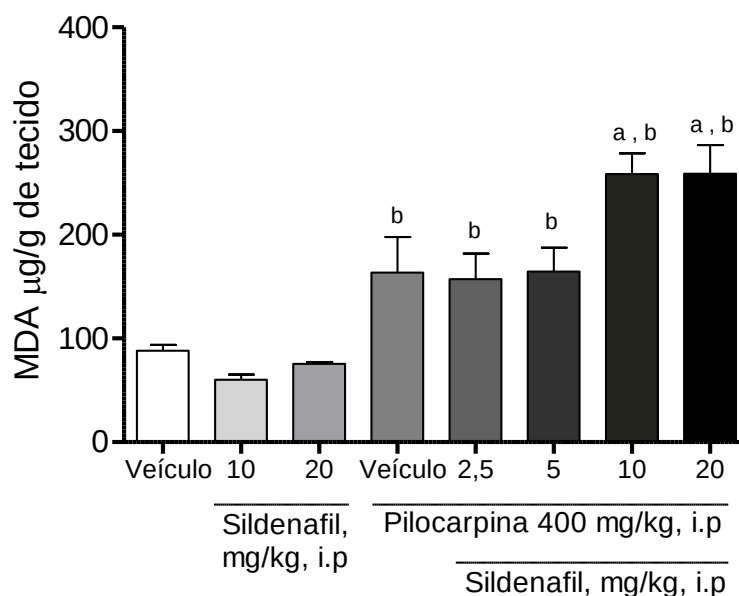


Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veículo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

Corpo Estriado

Foi observado que no corpo estriado houve um aumento significativo dos níveis de MDA nos grupos pré-tratados com sildenafil nas doses de 20 e 10mg/kg comparados ao grupo veiculo (pilocarpina 400 mg/kg) e ao grupo veiculo tratado apenas com salina (0,09%). Nos demais grupos tratados com pilocarpina+sildenafil houve alteração significativa em relação ao grupo veiculo (salina 0,09%). (Veiculo (salina): $88,27 \pm 5,521$; Sil 20+salina: $60,09 \pm 5,201$; Sil 10+salina: $75,38 \pm 1,731$; Veiculo (P400): $163,5 \pm 34,21$; P400+ Sil 20: $258,7 \pm 27,67$; P400+Sil 10: $258,4 \pm 20,20$; P400+Sil 5: $164,5 \pm 22,89$; P400+Sil 2,5: $157,3 \pm 24,68$).

Figura 22. Efeitos do pré-tratamento agudo com sildenafil sobre os níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) em corpo estriado de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.



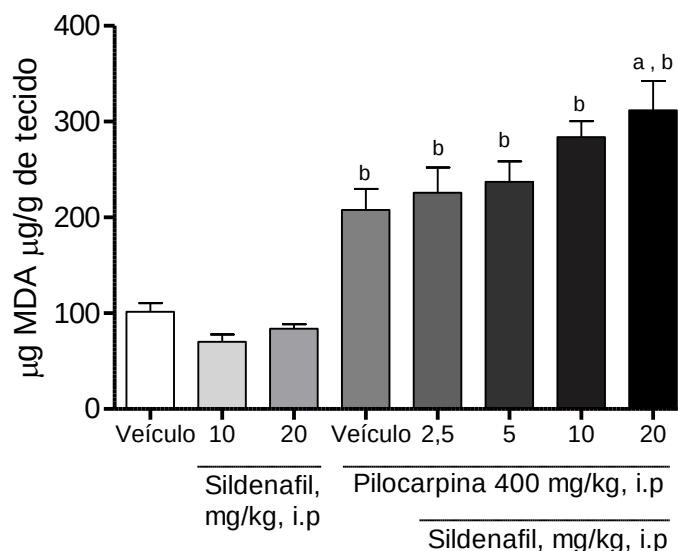
Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veiculo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veiculo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

4.2.2.2. Efeito do pré tratamento por 7 dias do sildenafil sobre o nível de Peroxidação Lipídica (TBARS) em modelo de convulsão induzido por P400.

Córtex pré-frontal:

Foi observado que no córtex pré-frontal houve um aumento significativo dos níveis de MDA no grupo pré- tratado com sildenafil na dose de 20mg/kg comparado ao grupo veiculo (pilocarpina 400mg/kg + salina 0,09%) e ao veiculo tratado apenas com salina (0,09%). Os demais grupos que foram pré-tratados com sildenafil + pilocarpina (400mg/kg) e o grupo veiculo tratado com pilocarpina (400mg/kg) salina (0,09%), também houve aumento significativo dos níveis de MDA, quando comparados ao grupo veiculo tratado apenas com salina (0,09%). (Veiculo (salina): $101,5 \pm 9,120$; Sil 20+salina: $70,09 \pm 7,724$; Sil 10+salina: $83,71 \pm 83,71$; Veiculo(P400): $207,9 \pm 22,01$; P400+ Sil 20: $312,0 \pm 30,53$; P400+Sil 10: $283,7 \pm 16,62$; P400+Sil 5: $237,0 \pm 21,52$; P400+Sil 2,5: $225,9 \pm 26,27$).

Figura 23. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre os níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) em córtex pré-frontal de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.

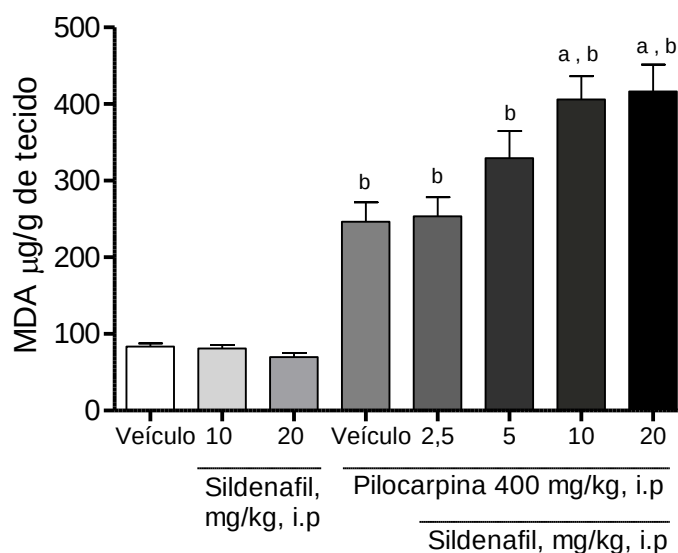


Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veiculo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

Hipocampo

No hipocampo observou-se que houve um aumento significativo dos níveis de MDA nos grupos pré- tratados com sildenafil na dose de 20 e 10mg/kg comparado ao grupo veiculo (pilocarpina 400 mg/kg) e ao veiculo tratado apenas com salina (0,09%). Os demais grupos que foram pré-tratados com sildenafil + pilocarpina (400mg/kg) e o grupo veiculo tratado com salina (0,09%) + pilocarpina (400mg/kg), também houve aumento significativo dos níveis de MDA, quando comparados ao grupo veiculo tratado apenas com salina (0,09%). (Veiculo (salina): $83,39 \pm 4,452$; Sil 20+salina: $81,02 \pm 4,750$; Sil 10+salina: $69,90 \pm 5,240$; Veiculo (P400): $246,6 \pm 25,40$; P400+ Sil 20: $416,4 \pm 34,87$; P400+Sil 10: $406,1 \pm 30,28$; P400+Sil 5: $329,4 \pm 35,39$; P400+Sil 2,5: $253,6 \pm 24,96$).

Figura 24. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre os níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) em hipocampo de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.

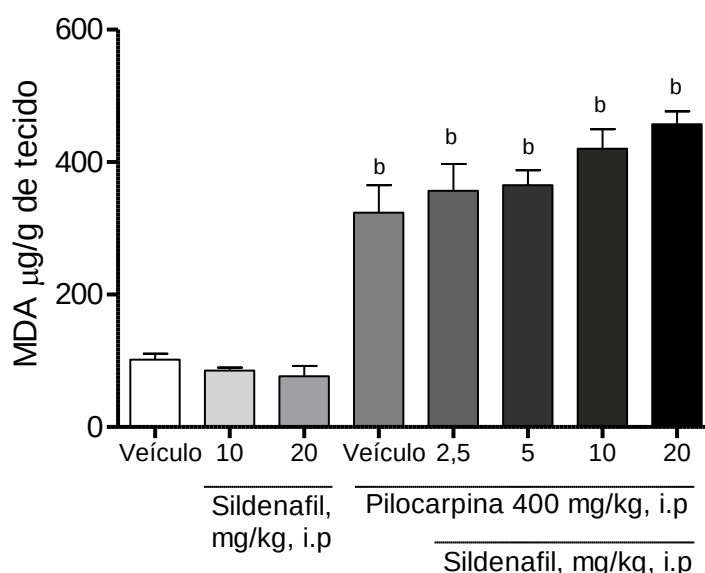


Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veiculo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veiculo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

Corpo Estriado

No corpo estriado observou-se que houve um aumento significativo dos níveis de MDA em todos os grupos pré-tratados com sildenafil + pilocarpina (400mg/kg) e no grupo veiculo tratado com salina (0,09%) + pilocarpina (400mg/kg) quando comparados ao grupo veiculo tratado apenas com salina (0,09%). Observou-se também que no grupo que foi tratado apenas com sildenafil (20mg/kg) houve uma redução significativa dos níveis de MDA ao comparar com o grupo veiculo (salina 0,9%). (Veiculo (salina): $101,5 \pm 9,120$; Sil 20+salina: $85,38 \pm 4,356$; Sil 10+salina: $76,75 \pm 15,25$; Veiculo (P400): $323,8 \pm 41,42$; P400+ Sil 20: $420,0 \pm 29,54$; P400+Sil 10: $457,4 \pm 19,49$; P400+Sil 5: $365,1 \pm 22,72$; P400+Sil 2,5: $356,7 \pm 40,55$).

Figura 25. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre os níveis de Peroxidação Lipídica (TBARS) em corpo estriado de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.



Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veículo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

4.2.3. Determinação de Nitrito

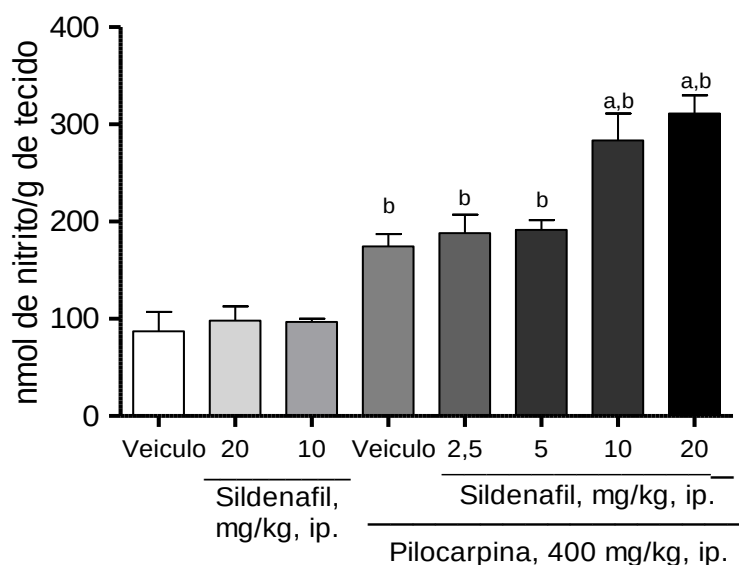
Foi realizada análise dos níveis de nitrito em camundongos pré-tratados com sildenafil em modelo de convulsão induzido por pilocarpina, pertencentes aos seguintes grupos de pré-tratamento com sildenafil por 7 dias e agudo: sildenafil 2,5; 5; 10 ou 20mg/Kg, i.p. (SIL2,5+P400; SIL5+P400; SIL10+P400; SIL20+P400; SIL 20mg/g; SIL 10mg/kg) comparados aos grupos veiculo (P400 + salina 0,9%) e veiculo (salina 0,9%) i.p. Os grupos que foram tratados com sildenafil 10 ou 20mg/kg (SIL 10; SIL 20) foram comparados ao grupo salina 0,9% (veiculo).

4.2.3.1 Efeito do pré-tratamento agudo com sildenafil sobre a determinação do conteúdo de nitrito em camundongos em modelo de convulsão induzido por P400.

Córtex pré-frontal:

No córtex pré-frontal foi observado que houve um aumento significativo dos níveis de nitrito nos grupos tratados com sildenafil 10 e 20mg/kg + pilocarpina 400mg/kg ao comparar com o grupo veiculo (pilocarpina 400mg/kg + salina 0,09%) e veiculo (salina 0,09%). Nos demais grupos tratados com sildenafil+pilocarpina e pilocarpina+ salina 0,09%, houve aumento significativo em relação ao veiculo (salina 0,09%).(Veiculo (salina): $87,14 \pm 19,97$; Sil 20+salina: $98,08 \pm 14,74$; Sil 10+salina: $96,76 \pm 3,329$; Veiculo (P400): $174,3 \pm 12,84$; P400+ Sil 20: $311,1 \pm 18,73$; P400+Sil 10: $283,4 \pm 27,97$; P400+Sil 5: $191,5 \pm 10,11$; P400+Sil 2,5: $188,1 \pm 19,17$).

Figura 26. Efeitos do pré-tratamento agudo sildenafil sobre o conteúdo de nitrito em Córtex pré-frontal de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.

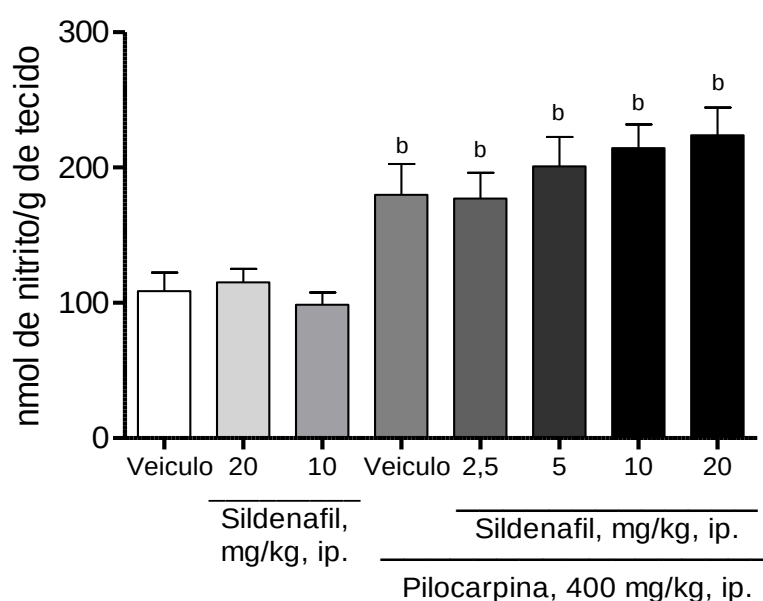


Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veiculo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veiculo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

Hipocampo:

No hipocampo foi observado que houve um aumento significativo dos níveis de nitrito em todos os grupos tratados com sildenafil + pilocarpina 400mg/kg e pilocarpina + salina 0,09% ao comparar com o grupo veiculo (salina 0,09%). Veiculo (salina): $108,5 \pm 13,88$; Sil 20+salina: $115,0 \pm 10,09$; Sil 10+salina: $98,73 \pm 8,829$; Veiculo (P400): $179,9 \pm 22,70$; P400+ Sil 20: $223,9 \pm 20,45$; P400+Sil 10: $214,3 \pm 17,63$; P400+Sil 5: $200,9 \pm 21,72$; P400+Sil 2,5: $177,0 \pm 19,05$.

Figura 27. Efeitos do pré-tratamento agudo sildenafil sobre o conteúdo de nitrito em hipocampo de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.

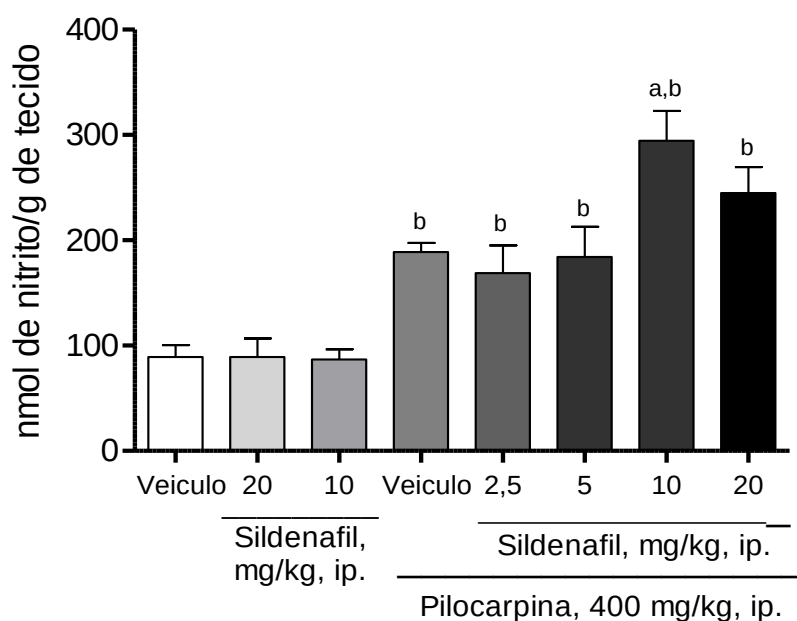


Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veículo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

Figura 28. Efeitos do pré-tratamento agudo com sildenafil sobre o conteúdo de nitrito em corpo estriado de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.

Corpo Estriado:

No corpo estriado foi observado que houve um aumento significativo dos níveis de nitrito em todos os grupos tratados com sildenafil + pilocarpina 400mg/kg e pilocarpina 400mg/kg + salina 0,09% ao comparar com o grupo veiculo (salina 0,09%). Houve aumento significativo dos níveis de nitrito e nitrato no grupo sildenafil 10mg/kg + pilocarpina 400mg/kg ao comparar com o grupo veiculo (pilocarpina 400mg/kg + salina 0,09%). Veiculo (salina): $89,12 \pm 11,33$; Sil 20+salina: $89,13 \pm 17,81$; Sil 10+salina: $86,82 \pm 9,792$; Veiculo (P400): $86,82 \pm 9,792$; P400+ Sil 20: $169,0 \pm 16,90$; P400+Sil 10: $294,4 \pm 28,32$; P400+Sil 5: $184,0 \pm 28,80$; P400+Sil 2,5: $244,7 \pm 24,72$.



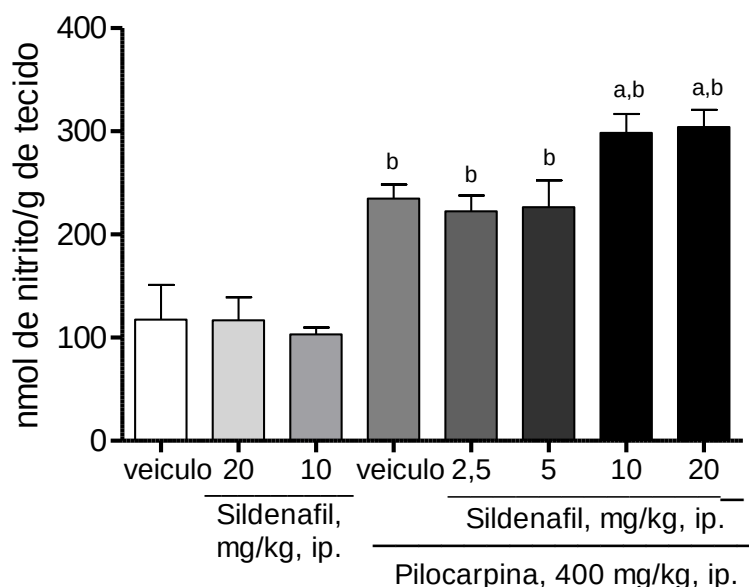
Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veículo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

4.2.3.2 Efeito do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre a determinação do conteúdo de nitrito em camundongos em modelo de convulsão induzido por P400.

Córtex pré-frontal:

No córtex pré-frontal foi observado que houve um aumento significativo dos níveis de nitrito e nitrato nos grupos tratados com sildenafil 10 e 20mg/kg + pilocarpina 400mg/kg ao comparar com o grupo veiculo (pilocarpina 400mg/kg + salina 0,09%) e veiculo (salina 0,09%). Houve também aumento significativo dos níveis de nitrito em todos os grupos sildenafil + pilocarpina 400mg/kg e pilocarpina 400mg/kg + salina 0,09%. Veiculo (salina): $77,50 \pm 8,295$; Sil 20+salina: $67,71 \pm 5,592$; Sil 10+salina: $86,21 \pm 6,136$; Veiculo (P400): $156,2 \pm 22,19$; P400+ Sil 20: $236,2 \pm 23,60$; P400+Sil 10: $223,2 \pm 15,53$; P400+Sil 5: $159,8 \pm 14,09$; P400+Sil 2,5: $143,3 \pm 16,97$.

Figura 29. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre o conteúdo de nitrito em Córtex pré-frontal de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.

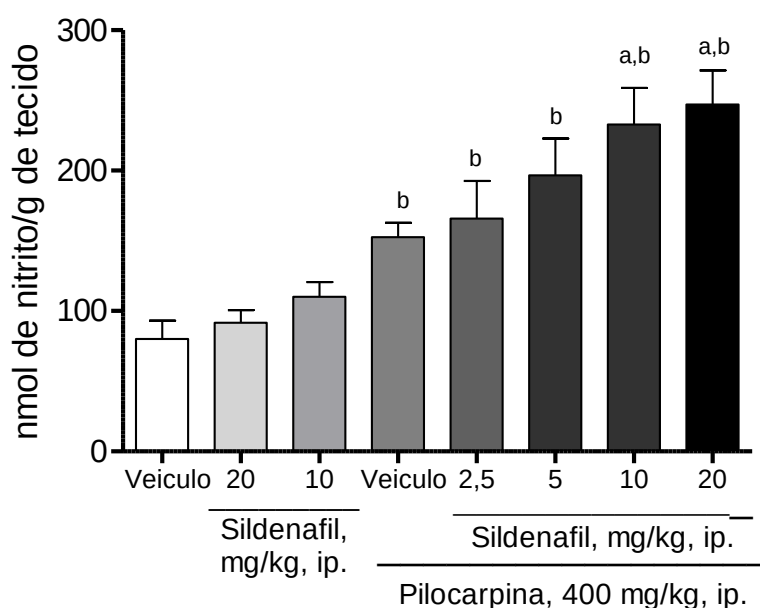


Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veículo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

Hipocampo:

No hipocampo foi observado que houve um aumento significativo dos níveis de nitrito nos grupos tratados com sildenafil 10 e 20mg/kg + pilocarpina 400mg/kg ao comparar com o grupo veiculo (pilocarpina 400mg/kg + salina 0,09%) e veiculo (salina 0,09%). Houve também aumento significativo dos níveis de nitrito e nitrato em todos os grupos sildenafil + pilocarpina 400mg/kg e pilocarpina 400mg/kg + salina 0,09% em relação ao grupo salina 0,09%. Veiculo (salina): $80,15 \pm 12,92$; Sil 20+salina: $91,52 \pm 9,206$; Sil 10+salina: $110,2 \pm 10,39$; Veiculo (P400): $152,6 \pm 10,23$; P400+ Sil 20: $165,9 \pm 26,74$; P400+Sil 10: $196,6 \pm 26,23$; P400+Sil 5: $232,9 \pm 25,89$; P400+Sil 2,5: $247,2 \pm 24,16$.

Figura 30. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre o conteúdo de nitrito em hipocampo de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.

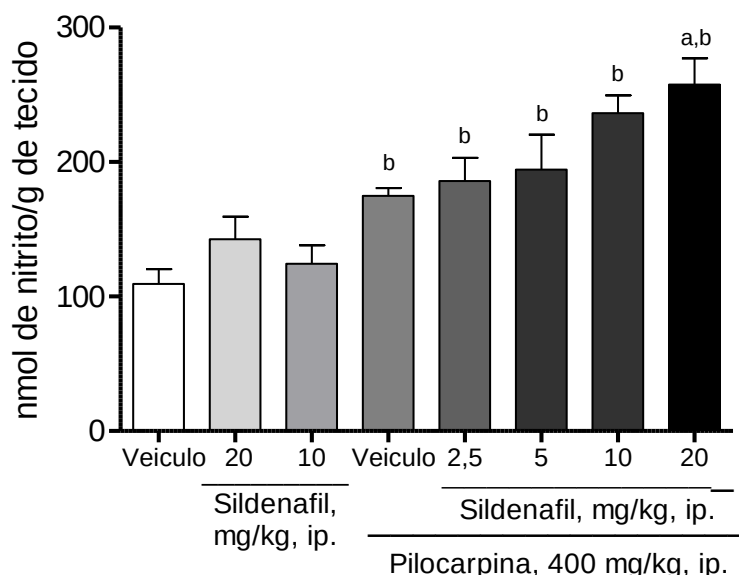


Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veiculo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

Corpo Estriado:

No corpo estriado foi observado que houve um aumento significativo dos níveis de nitrito nos grupo tratado com sildenafil 20mg/kg + pilocarpina 400mg/kg ao comparar com o grupo veiculo (pilocarpina 400mg/kg + salina 0,09%) e veiculo (salina 0,09%). Houve também aumento significativo dos níveis de nitrito e nitrato em todos os grupos sildenafil + pilocarpina 400mg/kg e pilocarpina 400mg/kg + salina 0,09% em relação ao grupo salina 0,09%. Veiculo (salina): $109,3 \pm 11,02$; Sil 20+salina: $142,6 \pm 16,79$; Sil 10+salina: $124,3 \pm 13,88$; Veiculo (P400): $175,0 \pm 5,759$; P400+ Sil 20: $257,6 \pm 19,42$; P400+Sil 10: $236,4 \pm 13,25$; P400+Sil 5: $194,3 \pm 26,03$; P400+Sil 2,5: $185,9 \pm 17,27$.

Figura 31. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre o conteúdo de nitrito em corpo estriado de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.



Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veículo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

4.2.4. Dosagem da glutathiona reduzida (GSH) nas áreas cerebrais estudadas.

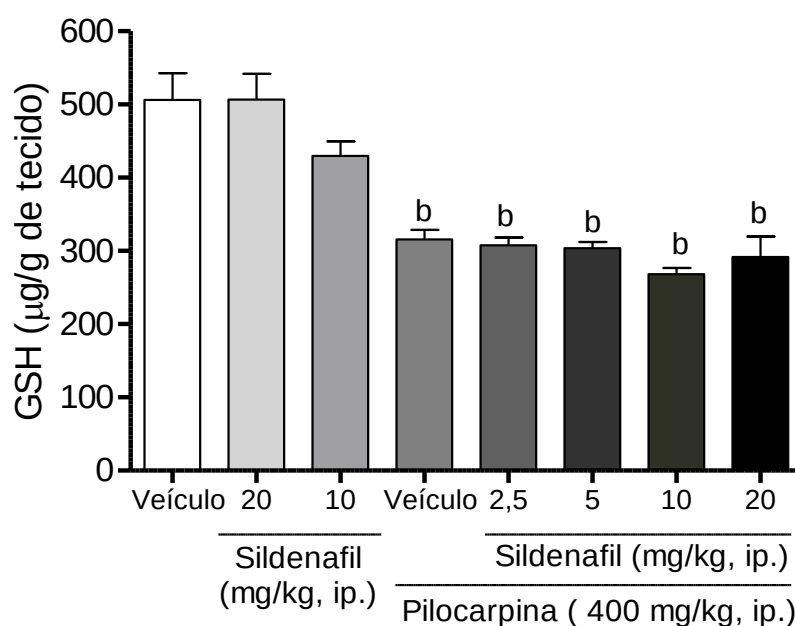
Foi realizado análise dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em camundongos pré-tratados com sildenafil em modelo de convulsão induzido por pilocarpina, pertencentes aos seguintes grupos de tratamento por 7 dias e agudo: sildenafil 2,5; 5; 10 ou 20mg/Kg, i.p. (SIL2,5+P400; SIL5+P400; SIL10+P400; SIL20+P400; SIL 20mg/g; SIL 10mg/kg); e grupo controle (P400 + salina 0,9%) e grupo veículo (salina 0,9%) i.p. Foi realizado comparação do grupo veículo (salina), com os demais grupos; comparado os grupos tratados com sildenafil + pilocarpina 400mg/kg com o grupo veículo tratado com pilocarpina 400mg/kg + salina (0,09%). Os grupos que foram tratados com sildenafil 10 ou 20mg/kg (SIL 10; SIL 20) foram comparados ao grupo salina 0,9% (veículo).

4.2.4.1 Efeito do pré-tratamento agudo de sildenafil sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) em camundongos tratados com P400.

Córtex pré-frontal:

Figura 32: Efeito do pré-tratamento agudo de sildenafil sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) em córtex pré-frontal de camundongos tratados com P400.

No córtex pré-frontal houve uma redução significativa dos níveis de GSH nos grupos pré-tratados com sildenafil (20, 10, 5 ou 2,5mg/kg + pilocarpina 400mg/kg) e veículo (pilocarpina 400mg/kg + salina 0,09%) quando comparados com o veículo (salina 0,09%). Veículo (salina): 506,3±36,34; Sil 20+salina: 506,9±34,64; Sil 10+salina: 429,7±19,97; Veículo (P400): 316,0±12,64 ; P400+ Sil 20: 291,7±27,98; P400+Sil 10: 268,1±8,482; P400+Sil 5: 304,0±8,457; P400+Sil 2,5: 307,7±10,55.

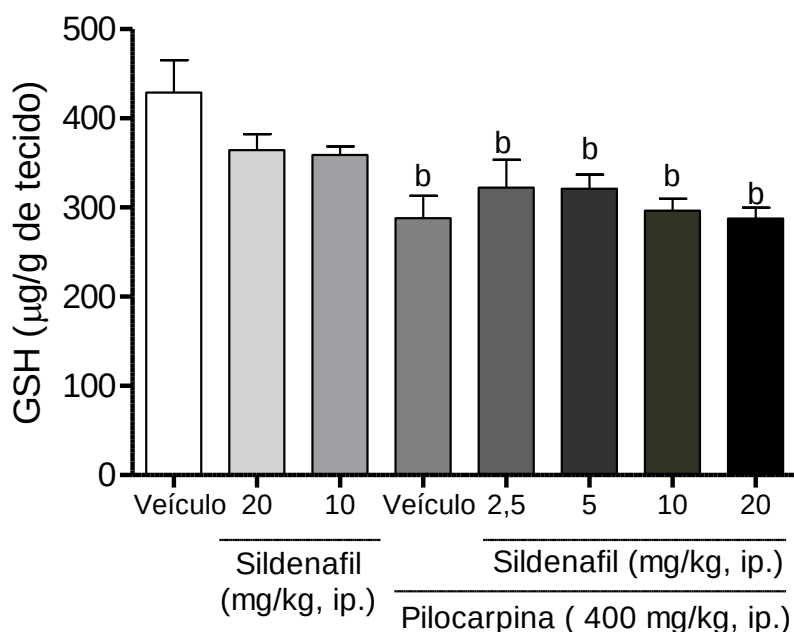


Resultados representados como média ± E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veículo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

Hipocampo:

Figura 33: Efeito do pré-tratamento agudo de sildenafil sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) em hipocampo de camundongos tratados com P400.

No hipocampo houve uma redução significativa dos níveis de GSH nos grupos pré-tratados com sildenafil (20, 10, 5 ou 2,5mg/kg + pilocarpina 400mg/kg) e veiculo (pilocarpina 400mg/kg + salina 0,09%) quando comparados com o veiculo (salina 0,09%). Veiculo (salina): $428,9 \pm 36,33$; Sil 20+salina: $364,5 \pm 17,98$; Sil 10+salina: $358,9 \pm 9,661$; Veiculo (P400): $288,0 \pm 25,17$; P400+ Sil 20: $287,7 \pm 12,28$; P400+Sil 10: $296,6 \pm 13,27$; P400+Sil 5: $320,9 \pm 15,80$; P400+Sil 2,5: $322,2 \pm 31,37$.

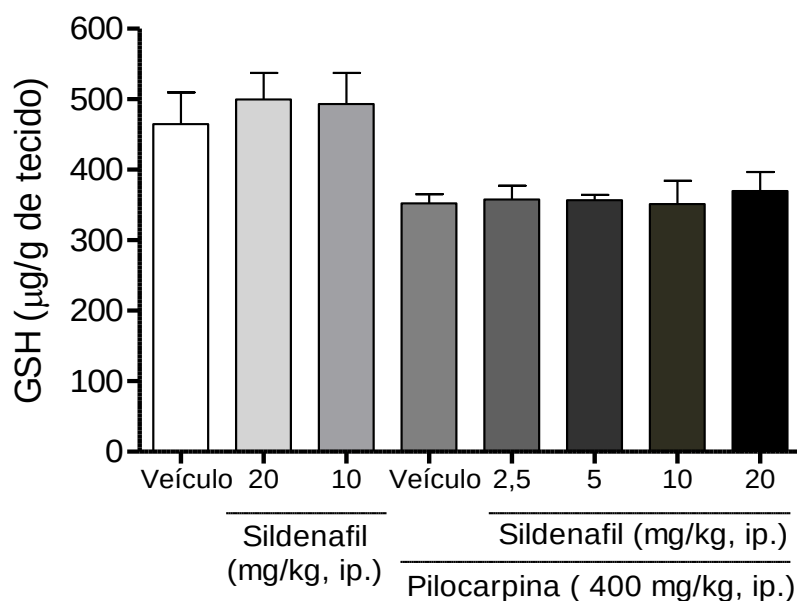


Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veiculo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veiculo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

Corpo Estriado:

No corpo estriado não houve alteração significativa dos níveis de GSH dos animais pré-tratados com sildenafil e indizados a convulsão por pilocarpina 400mg/kg em comparação com o grupo veiculo (pilocarpina 400mg/kg + salina 0,09%) e com o veículo (salina 0,09%). Veículo (salina): 464,7±45,19; Sil 20+salina: 499,5±37,76; Sil 10+salina: 493,3±43,81; Veículo (P400): 352,1±13,37; P400+ Sil 20: 358,0±19,46; P400+Sil 10: 351,5±32,97; P400+Sil 5: 370,0±26,91; P400+Sil 2,5: 370,0±26,91 .

Figura 34: Efeito do pré-tratamento agudo de sildenafil sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) em corpo estriado de camundongos tratados com P400.



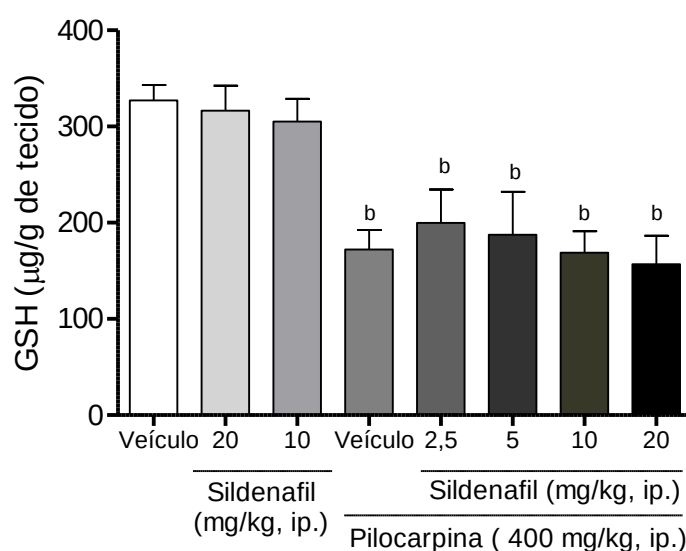
Resultados representados como média ± E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veículo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

4.2.4.2. Efeito do pré-tratamento por 7 dias de sildenafil sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) em camundongos tratados com P400.

Córtex pré-frontal:

No córtex pré-frontal houve uma redução significativa dos níveis de GSH nos grupos pré-tratados com sildenafil (20 e 10mg/kg + pilocarpina 400mg/kg) e veiculo (pilocarpina 400mg/kg + salina 0,09%) quando comparados com o veiculo (salina 0,09%). Veiculo (salina): $327,3 \pm 5,79$; Sil 20+salina: $316,5 \pm 25,90$; Sil 10+salina: $305,2 \pm 23,42$; Veiculo (P400): $172,3 \pm 20,29$; P400+ Sil 20: $156,8 \pm 29,77$; P400+Sil 10: $168,9 \pm 22,15$; P400+Sil 5: $187,7 \pm 44,42$; P400+Sil 2,5: $200,0 \pm 34,55$.

Figura 35. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) no córtex pré-frontal de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.

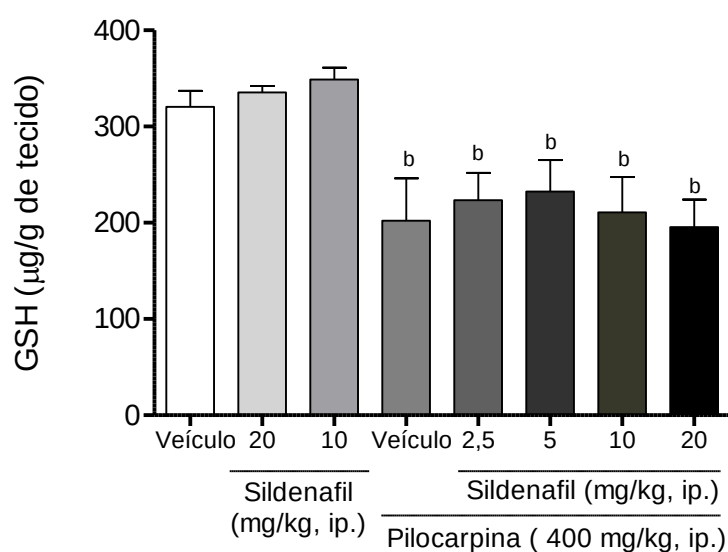


Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veiculo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veiculo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

Hipocampo:

No hipocampo não houve alteração significativa dos níveis de GSH dos animais pré-tratados com sildenafil e induzidos a convulsão por pilocarpina 400mg/kg em comparação com o grupo veiculo (pilocarpina 400mg/kg + salina 0,09%) e com o veículo (salina 0,09%). Veiculo (salina): $320,6 \pm 16,73$; Sil 20+salina: $355,5 \pm 6,481$; Sil 10+salina: $348,9 \pm 12,24$; Veiculo (P400): $202,1 \pm 44,13$; P400+ Sil 20: $195,4 \pm 28,89$; P400+Sil 10: $210,6 \pm 32,70$; P400+Sil 5: $232,6 \pm 28,41$; P400+Sil 2,5: $223,6 \pm 28,41$.

Figura 36. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.

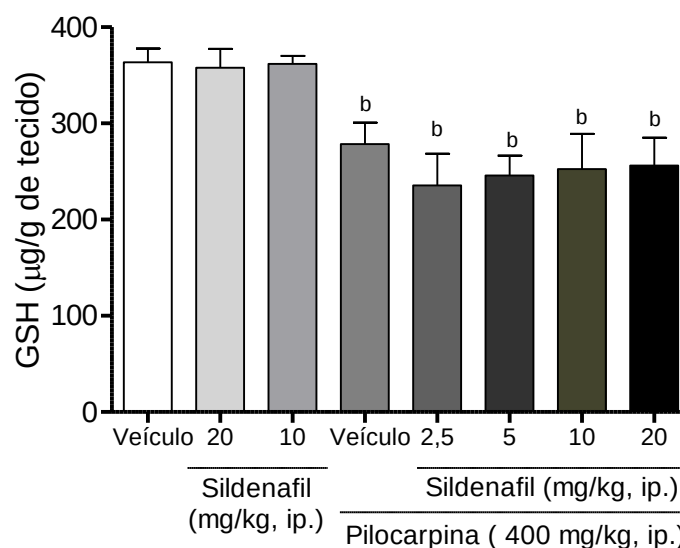


Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veículo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

Corpo Estriado:

No corpo estriado, não houve alteração significativa dos níveis de GSH dos animais pré-tratados com sildenafil e indizados a convulsão por pilocarpina 400mg/kg em comparação com o grupo veiculo (pilocarpina 400mg/kg + salina 0,09%) e com o veículo (salina 0,09%). Veiculo (salina): $363,5 \pm 14,22$; Sil 20+salina: $358,0 \pm 19,46$; Sil 10+salina: $361,9 \pm 8,288$; Veiculo (P400): $278,4 \pm 22,55$; P400+ Sil 20: $256,3 \pm 28,80$; P400+Sil 10: $252,4 \pm 36,75$; P400+Sil 5: $245,8 \pm 20,60$; P400+Sil 2,5: $235,5 \pm 32,85$.

Figura 37. Efeitos do pré-tratamento por 7 dias com sildenafil sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) no corpo estriado de camundongos durante as convulsões induzidas por P400.

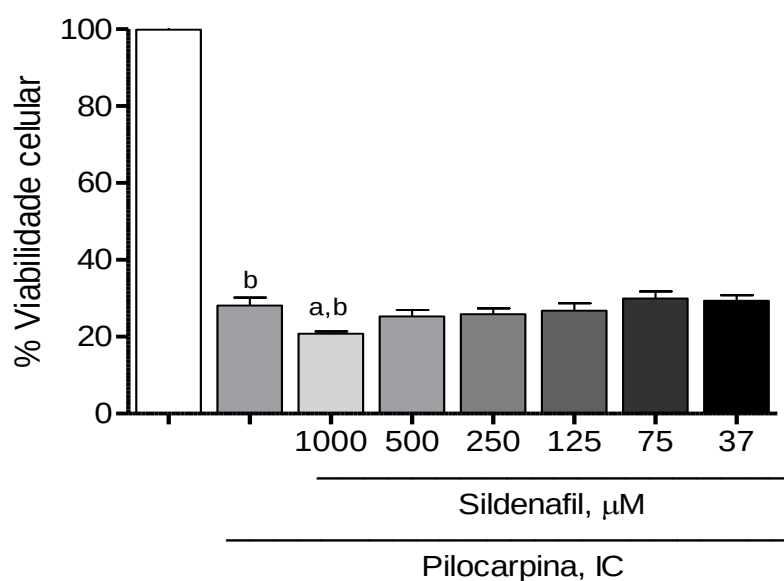


Resultados representados como média $\pm$ E.P.M. Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*. **a**, quando comparado ao veículo ($p < 0,05$), **b** quando comparado ao veiculo (salina 0,9%). ($p < 0,05$).

4.3. Determinação da viabilidade celular após tratamento com o sildenafil e com pilocarpina

Os resultados referentes a exposição de astrocitos corticais a diferentes concentrações do sildenafil (1000, 500, 250, 125, 75 e 37 $\mu\text{g/mL}$) nos mostram que este é capaz de exercer, estatisticamente, efeito sobre a viabilidade astrócitos na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 38: Percentual de viabilidade celular de astrocitos corticais expostos a diferentes concentrações da combinação de Sildenafil + pilocarpina IC 50.



Resultados expressos como media $\pm$ EPM. Para análise estatística utilizou-se ANOVA seguida pelo post-teste de Bonferroni. b ($p < 0,05$) comparado com o grupo controle não tratado, a ($p < 0,05$) comparado com o grupo controle Pilocarpina IC 50.

5 DISCUSSÃO

Existem muitos estudos sobre o papel do sildenafil na convulsão. Sua atividade pró-convulsiva foi observada em modelos de convulsões por antagonistas ácido C-aminobutírico (GABA), como PTZ (RIAZI *et al* 2006; GHOLIPOUR *et al.* 2009; MONTASER-KOUHSARI *et al.* 2011), e bicuculina (RIAZI *et al.*, 2006). Estudos em modelos de convulsões clônicas induzidas por PTZ também demonstraram que sildenafil reverteu a atividade anticonvulsivante do diazepam (GHOLIPOUR *et al.* 2009), como também reduziu o limiar de convulsões quando associado com baixa dose de morfina (7,5 mg / kg) (KOUHSARI *et al.*, 2011).

Em contrapartida, também foi relatado em estudos anteriores, que o sildenafil teria efeito anticonvulsivante contra convulsões induzidas por estimulação elétrica, como eletrochoque em camundongos (NIEOCZYM *et al.*, 2010a), *kindling* (abrasamento) em amígdala em ratos (NIEOCZYM *et al.* 2010b) e em modelos de convulsão psicomotor 6Hz (NIEOCZYM *et al.*, 2013).

Em estudo de convulsões induzidas pela cocaína, foi demonstrado que sildenafil não influenciou na latência das convulsões (NIEOCZYM *et al.* 2009). Provavelmente devido às convulsões induzidas por cocaína serem mediados principalmente pelo aumento de neurotransmissores monoaminérgicos e a atividade proconvulsiva de sildenafil foi relatada anteriormente apenas em modelos de convulsões induzidas por antagonistas de GABA, isto é, PTZ e bicuculina (NIEOCZYM *et al.* 2009).

Essas descobertas anteriores indicam que é muito importante continuar estudando a atividade pró-convulsivante do sildenafil, bem como investigar os mecanismos dessa atividade. No presente estudo, demonstramos que o sildenafil, um inibidor seletivo de PDE5, nas doses de 10 e 20mg/kg, causou uma diminuição do limiar de convulsões tônico-clônicas e da latência de morte produzidos por uma administração ip de pilocarpina 400mg/kg (P400) em camundongos.

Os resultados deste estudo mostram que as convulsões dos animais pré-tratados com sildenafil tanto por sete dias, quanto com o pré-tratamento agudo, foram potencializadas, sendo observada a redução do tempo para o início da primeira convulsão e para a morte após a administração de P400, quando comparados aos

animais tratados apenas com P400. A redução desses dois parâmetros indica que o sildenafil nas doses de 10 e 20mg/kg, apresenta possível ação pró-convulsivante também induzido pela via colinérgica ou capacidade de potencializar a ação da pilocarpina e por isso, reduzir a latência de convulsão e morte. Foi demonstrado também que independente do tipo de pré-tratamento (sete dias ou agudo), o tempo de latência de convulsão e de morte foram estatisticamente os mesmos. Portanto, o tempo de exposição com o sildenafil não interferiu no resultado.

A investigação do mecanismo via colinérgica, foi feita através do modelo da pilocarpina, um agonista muscarínico, que em doses elevadas induz alterações comportamentais, tais como convulsões e lesões cerebrais em roedores via superestimulação cortical (FREITAS *et al* , 2006). As análises comportamentais para a latência de convulsão e morte nos permitem sugerir que o sildenafil possui um mecanismo via colinérgica.

A ativação colinérgica é essencial para o início do processo convulsivo em modelos de epilepsia do lobo temporal, visto que estas convulsões podem ser bloqueadas pelo pré-tratamento com o antagonista muscarínico atropina (MARINHO *et al.*, 1998; DE BRUIN *et al.*, 2000). A pilocarpina exacerba a atividade colinérgica, provavelmente por influência direta, aumentando a ação da ACh circulante, modificando o *binding* dos receptores muscarínicos (HRUSKA *et al.*, 1984) e diminuindo a atividade acetilcolinesterásica (IMPERATO *et al.*, 1998).

Acredita-se que a diminuição do metabolismo da acetilcolina, pela redução ou bloqueio da atividade da acetilcolinesterase (AChE), pode facilitar a instalação da atividade epiléptica, em virtude do aumento da concentração da acetilcolina endógena, que pode ativar diretamente o sistema colinérgico e, de forma direta ou indireta, induzir mudanças neuroquímicas em outros sistemas de neurotransmissão, dentre eles, o dopaminérgico, serotoninérgico, glutamatérgico e GABAérgico, uma vez que estes podem estar implicados durante o estabelecimento e desenvolvimento das convulsões límbicas (IMPERATO *et al.*, 1998). A inibição da atividade da AChE, induzida pela administração de pilocarpina, em modelo de convulsões, já foi previamente reportada (FREITAS *et al*, 2006; SALES *et al*, 2010).

No presente estudo, em acordo com os achados da literatura, P400 induziu uma redução na atividade da enzima. Em relação ao pré-tratamento agudo do sildenafil, foi observado que no hipocampo houve redução significativa da AChE nos grupos pré-tratados com sildenafil nas doses de 10 e 20mg/kg + P400 quando comparados ao veículo (P400) e veículo (salina) e no corpo estriado essa redução significativa ocorreu apenas no grupo da dose de 20mg/kg.

No caso do grupo em que foi realizado pré-tratamento de 7 dias com sildenafil a redução dos níveis de acetilcolinesterase foi significativa nos grupos pré-tratados com sildenafil nas doses de 10 e 20mg/kg em todas as áreas estudadas. Resultados que sugerem um efeito modulador exercido pelo sildenafil sobre o funcionamento do sistema colinérgico muscarínico em nível central como mecanismo alternativo para potencialização das convulsões no modelo de P400, demonstrando um possível mecanismo colinérgico envolvido, visto que o fármaco reduziu a atividade da acetilcolinesterase.

Acredita-se que a diminuição do metabolismo da acetilcolina, pela redução ou bloqueio da atividade da AChE, pode facilitar a instalação da atividade epiléptica, em virtude do aumento da concentração da acetilcolina endógena, que pode ativar diretamente o sistema colinérgico e, de forma direta ou indireta, induzir mudanças neuroquímicas em outros sistemas de neurotransmissão, dentre eles, glutamatérgico e GABAérgico, uma vez que estes podem estar implicados durante o estabelecimento e desenvolvimento das convulsões límbicas (IMPERATO *et al.*, 1998).

A ideia aceita é de que o sistema colinérgico seja responsável pela ativação inicial de neurônios excitatórios glutamatérgicos, o que daria início a atividade convulsiva. A liberação excessiva de glutamato durante a convulsão manteria as células despolarizadas, produzindo liberação contínua de cálcio dos estoques intracelulares, culminando em lesão de membranas celulares e de outras organelas, provocando a morte celular por excitotoxicidade (SCORZA, 2006).

Devido o sildenafil ser um inibidor da fosfodiesterase 5, favorece que os níveis de GMPc se mantenham altos, portanto, provavelmente ajudando na manutenção ou aumento da excitabilidade neuronal durante a convulsão induzida por pilocarpina. Já que, níveis altos de GMPc proporcionam maior liberação de glutamato pelo neurônio pré-sináptico. Rios e colaboradores (2013), demonstram em estudo experimental em camundongos que a via NO/GMPc está envolvida no efeito da ação pró-convulsiva da pilocarpina. Resultado que corrobora com nossos achados, já que, a ação do sildenafil é manter os níveis altos de GMPc, devido a inibição da PDE5.

A produção de radicais lipídicos é uma reação tóxica que pode ser iniciada pela formação de lipídios peróxidos que culminam na destruição parcial ou completa da membrana celular pela lipoperoxidação em diferentes tecidos (UEDA *et al.*, 1997). A peroxidação lipídica pode ser produzida por danos na membrana celular e mitocondrial de diferentes células, inclusive neuronais (PATEL & LIANG; 2004; SIESJO & WIELOCH, 1986;) e ainda, pode ser capaz de produzir outras alterações moleculares através da inibição da enzima ATPase que está implicada no mecanismo dos receptores GABAérgicos e que pode ser importante no processo convulsivo (LEES, 1991).

Freitas e colaboradores (2006a) identificaram níveis aumentados de peroxidação lipídica durante o período agudo das convulsões induzidas por pilocarpina, em várias áreas cerebrais de ratos. Tejada e colaboradores (2006) identificaram o aumento da peroxidação lipídica, induzida por pilocarpina, no hipocampo e córtex de ratos. Níveis elevados de lipoperoxidação também foram relatados em hipocampo de ratos, nas fases aguda e crônica de convulsões induzidas por pilocarpina ou ácido cáínico, e na epilepsia induzida por *kindling* (abrasamento) (DAL-PIZZOL *et al.*, 2000; FRANTSEVA *et al.*, 2000a).

Os resultados da verificação da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo, corpo estriado e córtex frontal no presente estudo demonstrou que nos grupos que receberam pré-tratamento agudo com sildenafil nas doses de 10 e 20mg/kg e posteriormente submetidos a convulsão por pilocarpina 400mg/kg tiveram um aumento significativo dos níveis de MDA (malonildialdeído) em todas as áreas estudadas em relação ao veículo (P400 +salina 0,09%) e veículo (salina 0,09%). Nos grupos que receberam pré-tratamento com sildenafil por 7 dias e também, posteriormente, foram submetidos a convulsão por P400 tiveram um aumento

significativo dos níveis de MDA no córtex pré-frontal e hipocampo também nas doses de 20 e 10mg/kg em relação ao veículo (P400 +salina 0,09%) e veículo (salina 0,09%). Demonstrando que o sildenafil nas doses de 10mg/kg e 20mg/kg foi capaz de contribuir com o aumento dos níveis de MDA nas áreas estudadas.

É provável que o sildenafil, por ter seu mecanismo via NO/GMPc possa ter efeito dual, dose dependente, no sistema nervoso central. Já que em doses mais altas ele se comporta como oxidante, porém em doses mais baixas pode se comportar como antioxidante, como descreveu (TOMÁZ *et. al*, 2014), que em estudo com modelo experimental de depressão por LPS em camundongos, sildenafil na dose de 5mg/kg foi capaz de reduzir significativamente os níveis de MDA e de aumentar significativamente os níveis de GSH.

Danos na membrana celular e mitocondrial, incluindo a peroxidação lipídica, podem contribuir de forma significativa para alterações paroxísticas nessas membranas e seu mau funcionamento durante a epileptogênese. Dados na literatura demonstram que o aumento na produção de radicais livres e dano lipídico por peroxidação ocorrem durante as convulsões e na injúria neuronal mediada pelo processo convulsivo (FRANTSEVA *et al.*, 2000b; PATEL *et al.*, 2004). Outras alterações moleculares, como a inibição da enzima ATPase e modificação dos mecanismos de receptores GABAérgicos também podem ser importantes no processo convulsivo (LEES, 1991).

No modelo de pilocarpina em alta dose, pode ocorrer uma grande participação de dano neuronal excitotóxico em diferentes estruturas cerebrais (BONAN *et al.*, 2000; CAVALHEIRO *et al.*, 1991; Mccarron *et al.*, 2003; JOVANOVIC *et al.*, 2003). O estresse oxidativo pode ser um dos indutores desse dano neuronal e tem sido implicado em uma variedade de condições neurológicas agudas e crônicas, incluindo a epilepsia (BONFOCO *et al.*, 1995; HAMED *et al.*, 2004).

No presente estudo, os resultados revelaram que nos dois experimentos comportamentais, tanto com o pré-tratamento agudo como no de 7 dias houve aumento dos níveis de nitrito, em alguns grupos, de todas as áreas que foram induzidos a convulsão por pilocarpina. No pré-tratamento agudo com sildenafil observou-se que no hipocampo houve um aumento significativo dos níveis de nitrito nos grupos tratados

com pilocarpina, quando comparados com o grupo sadio (salina). No corpo estriado houve aumento significativo no grupo SIL 10mg/kg + P400, em relação ao grupo veiculo (P400+salina).

No pré tratamento por 7 dias com sildenafil, houve aumento significativo dos níveis de nitrito no hipocampo: nos grupos tratados com pilocarpina e SIL 10mg/kg e 20mg/kg quando comparados com os grupos controle (pilocarpina 400mg/kg) e sadio (salina) e no corpo estriado houve aumento significativo na dose de 20mg/kg. Esses resultados podem demonstrar que o sildenafil nas concentrações de 10mg/kg e 20mg/kg foi capaz de aumentar os níveis de nitrito no hipocampo e corpo estriado de camundongos submetidos a convulsão por pilocarpina.

A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, independente do tecido é encontrada nas mesmas concentrações em diferentes áreas cerebrais e demais órgãos, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes, como os íons ferro (HUBER *et al*, 2008; GALLEANO & PUNTARULO, 1995), o oxigênio, as radiações ionizantes, a luz ultravioleta (DENEKE & FANBURG, 1989) e de compostos químicos como, por exemplo, a pilocarpina e o ácido cáínico (FREITAS *et al.*, 2006a). Da mesma forma, diminui a susceptibilidade às lesões, atuando como transportadora e reservatório da cisteína e ainda, participa da desintoxicação de diversos agentes químicos e da eliminação de produtos de lipoperoxidação. Pode ainda, ser requerida para a síntese de DNA, de proteínas e de algumas prostaglandinas fisiologicamente (HUBER *et al*, 2008; DENEKE & FANBURG, 1989).

Nossos resultados mostraram uma redução significativa nos níveis de GSH em todas as áreas nos grupos de animais que foram submetidos a convulsão por pilocarpina em relação ao grupo veiculo (salina a 0,09%). Não houve diferença significativa entre os grupos pré-tratados com sildenafil + pilocarpina 400mg/kg e o grupo tratado com P400 + salina 0,09%. Demonstrando que o sildenafil, neste experimento, não influenciou os níveis de GSH.

Em relação ao estudo *in vitro*, verificamos o efeito da pilocarpina sobre a viabilidade da linhagem celular de astrócitos e observamos que ela foi citotóxica a essas

células apresentando uma IC 50 (índice de citotoxicidade para 50% da população celular em estudo) correspondente a 31,83 mM.

De posse do conhecimento gerado sobre a citotoxicidade da pilocarpina, e conhecendo sua IC 50, então decidimos analisar se o pré-tratamento com sildenafil (1000, 500, 250, 125, 75 e 37 µg/mL) era capaz de exercer alguma influencia sobre uma cultura de astrócitos exposta à concentração de pilocarpina capaz de reduzir a viabilidade dessas células à metade. Como resultado, observamos que apenas a concentração maior foi capaz de exercer influência. Concluindo que o sildenafil em concentrações muito altas pode ter efeito citotóxico sobre os astrócitos *in vitro*.

Diante do exposto, sugerimos que provavelmente os astrócitos podem estar envolvidos na neurotoxicidade demonstrada *in vivo*. Porém, sendo necessário novos estudos para elucidar melhor o envolvimento dos astrócitos na atividade pró-convulsivante do sildenafil.

Os astrócitos são células consideradas elementos integrantes no circuito da plasticidade sináptica e desempenham funções fisiológicas importantes no SNC (CRUNELI *et al*, 2015; HALASSA *et al.*, 2007), principalmente no que diz respeito a seu suporte aos neurônios de variadas maneiras: orientação durante a embriogênese, homeostase iônica, fornecimento de precursores para a síntese de neurotransmissores, dentre muitas outras (CRUNELI *et al*, 2015). Essas atribuições desempenhadas por essas células são essenciais para a sobrevivência neuronal e, conseqüentemente, à vida do organismo. Sendo assim, esse dado referente a atividade do sildenafil sobre astrócitos, pode ser bastante importante, uma vez que um composto que possa influenciar negativamente na viabilidade dessas células poderia vir a comprometer indiretamente o funcionamento normal da rede neuronal.

Portanto, novos estudos são necessários para investigar melhor a atividade do sildenafil sobre os astrócitos, como também, diante dos demais resultados sugerimos que novos estudos a respeito da ação pró-convulsivante do sildenafil também sejam realizados, afim de elucidar melhor seus mecanismos envolvidos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise dos resultados apresentados neste trabalho permitiu as seguintes considerações:

- ✓ O sildenafil possui uma atividade pró-convulsivante relacionado a mecanismos colinérgicos tanto no pré-tratamento agudo quanto no pré-tratamento por 7 dias.
- ✓ O pré-tratamento agudo com Sildenafil foi capaz de reduzir de forma significativa o nível de atividade da enzima AchE no hipocampo e no corpo estriado.
- ✓ O pré-tratamento por 7 dias com Sildenafil foi capaz de reduzir de forma significativa o nível de atividade da enzima AchE em todas as áreas estudadas.
- ✓ Sildenafil tanto no pré-tratamento agudo como no pré-tratamento por 7 dias favoreceu o aumento significativo da lipoperoxidação lipídica em todas as áreas estudadas.
- ✓ Sildenafil, no pré-tratamento agudo, foi capaz de aumentar significativamente os níveis de nitrito no córtex pré-frontal e corpo estriado.
- ✓ Sildenafil aumentou de forma significativa os níveis de nitrito no pré-tratamento por 7 dias em todas as áreas estudadas.
- ✓ Em relação a dosagem de glutathione redutase (GSH), sildenafil não foi capaz de causar alteração dessa enzima nas áreas estudadas.
- ✓ O tratamento associado entre o sildenafil e a dose corresponde a IC 50 de pilocarpina foi capaz de causar redução da viabilidade celular de uma cultura de astrócitos corticais apenas em uma concentração muito alta.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que o sildenafil possui uma atividade pró-convulsivante relacionada a mecanismos colinérgicos. Como também, ação oxidante nas doses mais altas estudadas. Sugere-se que o sildenafil possua um efeito modulador sobre o funcionamento do sistema colinérgico muscarínico, em nível central, como mecanismo alternativo para potencialização das convulsões no modelo de P400, propondo um possível mecanismo colinérgico envolvido, visto que o fármaco reduziu a atividade da acetilcolinesterase. Para tanto, devem ser realizados experimentos adicionais para o melhor esclarecimento dos mecanismos de ação envolvidos na atividade pró-convulsivante do sildenafil.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDO N.C, BERTERO E.B, FARIA G.E, TORRES L.O, GLINA S. Disfunção erétil: tratamento com drogas Inibidoras da fosfodiesterase tipo 5. **Rev Assoc Med Bras**; 53(2): 95-107, 2007 Disponível em: http://projotodiretrizes.org.br/5_volume/16-Disfun5.pdf. Acessado em: 30/04/2016.

AHERN GP, KLYACHKO VA, JACKSON MB. GMPc and Snitrosylation: two routes for modulation of neuronal excitability by NO. **Trends Neurosci**. 25, 510–517, 2002.

AMBRIZ-TUTUTI M, VELÁZQUEZ-ZAMORA DA, URQUIZA-MARÍN H, GRANADOS-SOTO V. Analysis of the mechanism underlying the peripheral antinociceptive action of sildenafil in the formalin test. **Eur J Pharmacol**, 512, 121–127, 2005.

BAHREMAND A, Nasrabad SE, Ziai P, Rahimian R, Hedayat T, Payandemehr B, Dehpour AR. Involvement of nitric oxide–cGMP pathway in the anticonvulsant effects of lithium chloride on PTZ-induced seizure in mice. **Epilepsy Res** 89:295–302, 2010.

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

BEN-ARI, Y. *et al.* Eletrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculdeoxyglucose or pentylene tetrazole: metabolite mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. **Neuroscience**, v. 6, p. 1361-91, 1981.

BERG AT. Defining intractable epilepsy. **Adv Neurol.**;97:5-10, 2006.

BIALER, M.; WHITE, H.S. Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. **Nature rev. drug discov.**, v. 9, n. 1, p. 68-82, 2010.

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

BONAN, C.D., WALZ, R., PEREIRA, G.S., WORM, P.V., BATTASTINI, A.M.O., CAVALHEIRO, E.A., IZQUIERDO, I., SARKIS, J.J.F. Changes in synaptosomal ectonucleotidase activities after status epilepticus induced by pilocarpine and kainic acid. **Epilepsy Res.**, v. 9, p. 229-238, 2000.

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

BRUNEAU, E.G.; AKAABOUNE, M. Running to stand still: ionotropic receptor dynamics at central and peripheral synapses. **Mol Neurobiol.** v. 34, p.137-51, 2006.

BRUNTON, L.L. GOODMAN & GILMAN: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 12^a ed. **McGraw-Hill**,. Cap. 21 pags. 582-607. Rio de Janeiro, 2012

CASTAGNE, V.; GAUTSCHI, M. ; LEFEVRE, K. ; POSADA, A.; CLARKE, P. G. H. Relationships Between Neuronal death and The Cellular Redox Status Focus on The Developing Nervous system. **Progress in Neurobiology** 59: 397 - 423, 1999.

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

CAVALHEIRO, E.A. *et al.* Spontaneous recurrent seizures in rats: amino acid and monoamine determination in the hippocampus. **Epilepsia**, v. 35, p. 1-11, 1994.

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

COSTA-LOTUFO, L.V. *et al.* Attenuating effects of melatonin on pilocarpine-induced seizures in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**. v. 131, p. 521-529, 2002.

CRUNELLI V, CARMIGNOTO G, STEINHÄUSER C. Novel astrocyte targets: new avenues for the therapeutic treatment of epilepsy. **Neuroscientist**. V. 21(1). p. 62-83. 2015.

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

DEVAN BD, PISTELL PJ, DAFFIN LW, JR., NELSON CM, DUFFY KB, BOWKER JL, BHARATI IS ET AL. Sildenafil citrate attenuates a complex maze impairment induced by intracerebroventricular infusion of the NOS inhibitor *N*-nitro- α -arginine methyl ester. **Eur J Pharmacol**, 563, 134–140, 2007.

DE BRUIN, V. M. S.; MARINHO, M. M. F.; DE SOUSA, F. C. F.; VIANA, G. S. B. Behavioural and neurochemical alterations after lithium-pilocarpine administration in Young and adult rats: a comparative study. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v. 65, p. 547-551, 2000.

DUSSE L.M.S, VIEIRA L.M, CARVALHO M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, 2003.

Eardley I, Ellis P, Boolell M Wulff M. Onset and duration of action of sildenafil for the treatment of erectile dysfunction. **Br J Clin Pharmacol**.;53(Suppl 1):61S-5S, 2002.

ENGEL, J.J.R. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. **Epilepsia**. v. 42, n. 6, p. 796-800, 2001.

EVANS, W. J. Vitamin E, vitamin C, and exercise. **American Journal of Clinical Nutrition** 72: 647s – 652s, 2000.

FARIA L.O.M. Participação da sintase neuronal de óxido nítrico (nNOS) na consolidação e reconsolidação da memória do Condicionamento clássico aversivo em pombos (*columba livia*). Dissertação de mestrado. Instituto De Biologia. Universidade Estadual De Campinas. Campinas, 2013

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Brasil**, v. 4, n. 1, p. 61-68, 1997.

FLORA FILHO R., ZILBERSTEIN B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. **Rev. Assoc. Med. Bras.** vol.46 n.3 São Paulo July/Sept. 2000.

FRANTSEVA, M.V., PEREZ VELAZQUEZ, J.L., HWANG, P.A., CARLEN, P.L. Free radical production correlates with cell death in an in vitro model of experimental epilepsy. **Epilepsy Res.**, v. 9, p. 6-71, 2000.

FREITAS, R.M., NASCIMENTO, V.S., SOUSA, F.C.F., VASCONCELOS, S.M.M., VIANA, G.S.B., FONTELES, M.M.F. Catalase activity in cerebellum, hippocampus, frontal cortex and striatum after status epilepticus induced by pilocarpine in Wistar rats. **Neurosci. Lett.**, v. 365, n. 2, p. 102-105, 2004.

FREITAS, R. M. Estudo Farmacológico e Neuroquímico da Fase Aguda do Processo Convulsivo Induzido Por Pilocarpina em Áreas Cerebrais de Ratos Adultos. Tese. Departamento de Fisiologia e Farmacologia. Faculdade de Medicina. Universidade Federal do Ceará, 2006.

FREITAS, R. M.; SOUSA, F. C.; VIANA, G. S.; FONTELES, M. M. Acetylcholinesterase activities in hippocampus, frontal cortex and striatum of Wistar rats after pilocarpine-induced status epilepticus. **Neurosci. Lett.** v. 399, p. 76-79, 2006a.

FREITAS, R. M.; VASCONCELOS, S.M; Sousa, F. C, VIANA, G.S; FONTELES, M. M. Pharmacological studies of the opioids, mood stabilizer and dopaminergic drugs on pilocarpine-induced seizures and status epilepticus. **Neurosci Lett.** v.408, p. 84–8, 2006b.

GALLEANO, M., PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1271, p. 321-326, 1995.

GHOLIPOUR T, RASOULI A, JABBARZADEH A, NEZAMI BG, RIAZI K, SHARIFZADEH M, ET AL. The interaction of sildenafil with the anticonvulsant effect of diazepam. **Eur J Pharmacol**, 617:79–83, 2009.

GILAD R, LAMPL Y, ESHEL Y, SADEH M. Tonic-clonic seizures in patients taking sildenafil. **BMJ**; 325:869. 2002

HALASSA, M.M.; FELLIN, T.; HAYDON, P.G. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. **Trends in molecular medicine**, v. 13, n. 2, p. 54-63, 2007.

HUBER P.C; ALMEIDA W.P; FATIMA A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Quim. Nova**, Vol. 31, No. 5, 1170-1179, 2008.

HRUSKA, R.E., LUDMER, L.M., PERT, A., PETER, J.R., BUNNEY, W.E. Effects of lithium on [3H] quinuclidinyl benzilate binding to rat brain muscarinic cholinergic receptors. **J Neurosci Res.**, v. 11, p. 171-180, 1984.

IMPERATO, A., DAZZI, L., CARTA, G., COLOMBO, G., BIGGION, G. Rapid increase in basal acetylcholine release in the hippocampus of freely moving rats induced by withdrawal from long-term ethanol intoxication. **Brain Res.**, v. 784, p. 347-350, 1998.

JARDIM, F.M.A. Efeito da Ingestão Crônica de Cafeína na Atividade de Enzimas Antioxidantes, Peroxidação Lipídica e na Produção de Radicais Livres em diferentes Regiões do Sistema Nervoso Central em Ratos Adultos. Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005.

JOVANOVIĆ, M., SCLAKOVIĆ, V., VASILJEVIĆ, I., RADENOVIĆ, L. 7-nitroindazole reduces nitrite concentration in rat brain after intrahippocampal kainate-induced seizure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, v. 135, p. 443-450, July 2003.

KURT M, BILGE SS, AKSOZ E, KUKULA O, CELIK S, KESIM Y. Effect of sildenafil on anxiety in the plus-maze test in mice. **Pol J Pharmacol**, 56, 353–357. 2004

KOUHSARI L.M., PAYANDEMEHR B, GHOLIPOUR T, ZIAI P., NABAVIZADEH P, GHASEMI A, ARASH A. DEHPOUR A.R. A role for opioid system in the proconvulsant effects of sildenafil on the pentylenetetrazole-induced clonic seizure in mice. **Seizure**. Volume 20, Issue 5, Pages 409–413. June, 2011.

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

LIMA C.N.C. Potencial convulsivante de carbapenêmicos em diferentes modelos experimentais de convulsão: avaliação comparativa, comportamental e neuroquímica. Dissertação de mestrado. Pós graduação em Fisiologia e Farmacologia. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2011.

ŁUSZCZKI JJ, SACHARUK A, WOJCIECHOWSKA A, ANDRES-MACH MM, DUDRA-JASTRZEBSKA M, MOHAMED ML. 7-Nitroindazole enhances dose-dependently the anticonvulsant activities of conventional antiepileptic drugs in the mouse maximal electroshock-induced seizure model. **Pharmacol Rep**; 58:660–71. 2006

MAHLER F, BAUMGARTNER I. More Potential for Sildenafil Than Potency. **Circulation**; 112:2894-2895. 2005.

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

MARINHO, M.M.F. et al. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. **Neurochemistry International**, v. 33, p. 299-306, 1998.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant anzymes in the molecular control of reactive species toxicology. **Toxicology** 153: 83 – 104, 2000.

MENEZES A.P.F. Efeitos da Cúrcuma e do Resveratrol em ratos com Parkinsonismo Experimental Induzido Por 6-Hidroxidopamina: um estudo Comportamental e Neuroquímico. Dissertação de mestrado. Pós graduação em Ciências médicas. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2012.

MILMAN HA, ARNOLD SB. Neurologic, psychological, and aggressive disturbances with sildenafil. **Ann Pharmacother**, 36, 1129–1134. 2002.

MIXCOATL-ZECUATL T, AGUIRRE-BANUELOS P, GRANADOS-SOTO V. Sildenafil produces antinociception and increases morphine antinociception in the formalin test. **Eur J Pharmacol**, 400, 81–87, 2000.

MONTASER-KOUHSARI L, PAYANDEMEHR B, GHOLIPOUR T, ZIAI P, NABAVIZADEH P, GHASEMI A, ET AL. A role for opioid system in the proconvulsant effects of sildenafil on the pentylentetrazole-induced clonic seizure in mice. **Seizure** ;20:409–13. 2011.

MOREIRA SG, JR., BRANNIGAN RE, SPITZ A, OREJUELA FJ, LIPSHULTZ LI, KIM ED. Side-effect profile of sildenafil citrate (Viagra) in clinical practice. **Urology**, , 56, 474–476. 2000.

NASCIMENTO J.L, FREITAS R.M, PIRES L.F. Determinação dos níveis de malonaldeído e nitrito em indivíduos portadores de traço falciforme. **Rev. Ciênc. Méd. Biol.**, Salvador, v.12, n.1, p.65-69, jan./abr. 2013.

NIEOCZYM D, SOCAŁA K, WLAŹ P. Lack of effect of sildenafil on cocaine-induced convulsions in mice. **Pharmacol Rep**;61:930–4. 2009.

NIEOCZYM D, ŁUSZCZKI JJ, CZUCZWAR SJ, WLAŹ P. Effect of sildenafil on the anticonvulsant action of classical and second-generation antiepileptic drugs in maximal electroshockinduced seizures in mice. **Epilepsia** ;51:1552–9. 2010a.

NIEOCZYM D., SOCOLA K., RUNDFELDT C., WLAZ P. Effects of sildenafil on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice and amygdala-kindled seizures in rats. **Pharmacological Reports**. V. 62. P. 383-391, 2010b.

NIEOCZYM D, SOCAŁA K, ŁUSZCZKI JJ, CZUCZWAR SJ, WLAŹ P. Influence of sildenafil on the anticonvulsant action of selected antiepileptic drugs against pentylenetetrazole-induced clonic seizures in mice. **J Neural Transm.** 119:923–31. 2012a.

NIEOCZYM D, SOCAŁA K, ŁUSZCZKI JJ, CZUCZWAR SJ, WLAŹ P. Sildenafil influences the anticonvulsant activity of vigabatrin and gabapentin in the timed pentylenetetrazole infusion test in mice. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry** ;39:129–35. 2012b.

NIEOCZYM D, SOCAŁA K, Jedziniak P, Olejnik M, Wlaź P. Effect of sildenafil, a selective phosphodiesterase 5 inhibitor, on the anticonvulsant action of some antiepileptic drugs in the mouse 6-Hz psychomotor seizure model. **Prog. in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**; 47; 104–110. 2013.

NOEBELS JL, AVOLI M, ROGAWSKI MA, OLSEN RW, DELGADO-ESCUETA AV. Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies. 4th ed. Oxford: Oxford University Press. 2012.

NTCEBRIM/CFF N° 02/2013: Uso recreacional dos inibidores da fosfodiesterase-5 (sildenafil, tadalafila, vardenafila e lodenafila): um novo problema para a saúde pública? Centro Brasileiro de Informação sobre Medicamentos **Cebrim/CFF**, 2013. Disponível em: http://www.cff.org.br/userfiles/nota%20tecnica%2010_2013.pdf. Acessado em: 06/03/2016.

PATEL, M., Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 15, p. 1951-1962, 2004.

PATIL CS, SINGH VP, KULKARNI SK. Modulatory effect of sildenafil in diabetes and electroconvulsive shockinduced cognitive dysfunction in rats. **Pharmacol Rep**, 58, 373–380. 2006.

PAVONE, A.; CARDILE, V. An In Vitro Study of New Antiepileptic Drugs and Astrocytes. **Epilepsia**, v. 44, n. 10, p. 34–39, 2003.

PRAST H, PHILIPPU A. Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Prog Neurobiol*, 64, 51–68. 2001.

PRICKAERTS J, 'IK A, VAN STAVEREN WC, KOOPMANS G, STEINBUSCH HW, VANDER STAAY FJ, DE VENTE J, BLOKLAND A: Phosphodiesterase type 5 inhibition improves early memory consolidation of object information. *Neurochem Int*, 45, 915–928. 2004.

QU, H.; ELOQAYLI, H.; SONNEWALD, U. Pentylentetrazole Affects Metabolism of Astrocytes in Culture. *J. neurosci. res.*, v. 79, p. 48-54, 2005.

QUEIROZ S.L, VIEIRA L.M, CARVALHO M.G. Funções biológicas do óxido nítrico. Universidade Federal de São Carlos. *Revista Química Nova*. vol.22. n.4. São Paulo Julho/Agosto, 1999. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421999000400017. Acessado em: 31/03/2016.

PAUL V, EKAMBARAM P. Effects of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on γ -aminobutyric acid concentration in the brain and on picrotoxin-induced convulsions in combination with phenobarbitone in rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 80, 363–370. 2005.

RAJASEKARAN K, JAYAKUMAR R, VENKATACHALAM K. Increased neuronal nitric oxide synthase (nNOS) activity triggers picrotoxin-induced seizures in rats and evidence for participation of nNOS mechanism in the action of antiepileptic drugs. *Brain Res*, 979, 85–97. 2003.

RANG & DALE. Farmacologia. Tradução de: **Pharmacology**, 7th ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

REAGAN-SHAW S, NIHAL M, AHMAD M. Dose translation from animal to human studies revisited. University of Wisconsin, Madison, Wisconsin, USA. *The FASEB Journal*. Vol. 22. Março, 2007.

RIAZI K, ROSHANPOUR M, RAFIEI-TABATABAEI N, HOMAYOUN H, EBRAHIMI F, DEHPOUR AR. The proconvulsant effect of sildenafil in mice: role of nitric oxide-cGMP pathway. *Br J Pharmacol*, 147:935–43. 2006.

RIOS E.R.V, ROCHA N.F.M, CARVALHO A.M.R, FREIRE V.L, LEITE D.M, DE LIMA C.N.L, FONTELES M.M.F. Involvement of the nitric oxide/cyclic guanylate monophosphate pathway in the pilocarpine-induced seizure model in mice. *Pharmacology*; 91:131–4. 2013.

RUNDFELDT C, KOCH R, RICHTER A, MEVISSSEN M, GERECKE U, LÖSCHER W. Dose-dependent anticonvulsant and proconvulsant effects of nitric oxide synthase inhibitors on seizure threshold in a cortical stimulation model in rats. *Eur J Pharmacol*, 274, 73–81. 1995.

SARAIVA, K. L. A. Avaliação dos efeitos do inibidor de fosfodiesterase-5 (sildenafil) sobre células de leydig e espermatozóides de Camundongos. Tese. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2010.

SIESJO, B.K., WIELOCH, T. Epileptic brain damage: pathophysiology and neurochemical pathology. **Adv. Neurol.**, v. 44, p. 813-847, 1986.

SCORZA C. Expressão da proteína nestina no cérebro de ratos submetidos ao status epilepticus induzido pela pilocarpina: avaliação do período pós-natal ao envelhecimento. Tese. São Paulo: Departamento de Neurologia e Neurocirurgia, Universidade Federal de São Paulo, 2006.

SILVA C.R.A, CARDOSO I.S.Z.O, MACHADO N.R. Considerações sobre epilepsia. Artigo de revisão. **Boletim Científico de Pediatria**. V.2, N.3, 2013.

SMITH WB, MCCASLIN IR, GOKCE A, MANDAVA SH, TROST L, HELLSTROM WJ. PDE5 inhibitors: considerations for preference and long-term adherence. **Int J Clin Pract**; 67(8): 768-780. 2013.

TAKUMA, K.; BABA, A.; MATSUDA, T. Astrocyte apoptosis: implications for neuroprotection. **Progress in neurobiology** 72: 111 – 127, 2004.

TOMÁZ V.S, CORDEIRO R.C, COSTA A.M.N, LUCENA D.F, NOBRE JUNIOR H.V, SOUSA F.C.F, VASCONCELOS S.M.M. VALE M.L, QUEVEDO J, MACÊDO D. Antidepressant-like effect of nitric oxide synthase inhibitors and sildenafil against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice. **Neuroscience**. Vol 268. Pag. 236-246, 2014.

TURSKI, L. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: a behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behavior Brain Research**. v. 9, p. 315-335, 1983.

UTHAYATHAS S, KARUPPAGOUNDER SS, THRASH BM, PARAMESHWARAN K, SUPPIRAMANIAM V, DHANASEKARAN M. Versatile effects of sildenafil: recent pharmacological. **Applications.Pharmacol Rep**, 59, 150–163. 2007.

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

URSO, M. L.; CLARKSON, P.M. Oxidative Stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology** 189: 41 – 54, 2003.

VOLKE V, WEGENER G, VASAR E: Augmentation of the NOcGMP cascade induces anxiogenic-like effect in mice. **J Physiol Pharmacol**, 54, 653–660. 2003.

ZHANG R, WANG Y, ZHANG L, ZHANG Z, TSANG W, LU M, ZHANG L, CHOPP M: Sildenafil (Viagra) induces neurogenesis and promotes functional recovery after stroke in rats. **Stroke**, 33, 2675–2680. 2002.

ZHANG RL, ZHANG Z, ZHANG L, WANG Y, ZHANG C, CHOPP M: Delayed treatment with sildenafil enhances neurogenesis and improves functional recovery in aged rats after focal cerebral ischemia. **J Neurosci Res**, 83,1213–1219. 2006.