



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

RAFAELLY MARIA PINHEIRO SIQUEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA PENTOXIFILINA EM
MODELOS DE CONVULSÃO INDUZIDOS POR PILOCARPINA E
PENTILENOTETRAZOL EM RATOS**

OUTUBRO

2011

RAFAELLY MARIA PINHEIRO SIQUEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA PENTOXIFILINA EM
MODELOS DE CONVULSÃO INDUZIDOS POR PILOCARPINA E
PENTILENOTETRAZOL EM RATOS**

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

Orientador (a): Prof^ª. Dra. Glauce Socorro Barros Viana

OUTUBRO

2011

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

-
- S632a Siqueira, Rafaelly Maria Pinheiro.
Avaliação do efeito neuroprotetor da pentoxifilina em modelos de convulsão induzidos por pilocarpina e pentilenotetrazol em ratos / Rafaelly Maria Pinheiro Siqueira. – 2011.
174 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2011.
Área de concentração: Ciência Biológicas - Farmacologia
Orientação: Profa. Dra. Glauce Socorro Barros Viana
1. Pentoxifilina. 2. Epilepsia. 3. Pilocarpina 4. Pentilenotetrazol I. Título.

RAFAELLY MARIA PINHEIRO SIQUEIRA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO NEUROPROTETOR DA PENTOXIFILINA EM
MODELOS DE CONVULSÃO INDUZIDOS POR PILOCARPINA E
PENTILENOTETRAZOL EM RATOS**

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

Aprovada em: / /

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará-UFC

Profa. Dra. Danielle Silveira Macêdo
Universidade Federal do Ceará-UFC

Dedico este trabalho à minha querida mãe Fátima Pinheiro (mãezinha), meu maior exemplo de força, garra, perseverança, determinação, otimismo e alegria.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Glauce Socorro Barros Viana pela orientação e atenção dispensadas a mim, imprescindíveis para a realização deste trabalho. Professora, à senhora, minha eterna admiração e gratidão.

Ao Prof. Dr. Jairo Diniz Filho e à Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos por terem aceitado participar da minha banca de qualificação.

À Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar Profa. Dra. Danielle Silveira Macêdo por aceitarem participar da minha banca de dissertação.

À Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito, Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade e ao Prof. Dr. Reinaldo Barreto Oriá pela grande contribuição na realização do estudo histopatológico deste trabalho.

Aos meus pais Francisco de Assis pelo constante incentivo em meus estudos e por todo o amor, carinho e zelo doados a mim em todos esses anos.

À “MÃEZINHA”, minha querida mãe, Maria de Fátima por toda sua dedicação na minha formação, incentivando, apoiando e celebrando cada conquista minha. Por todo o seu esforço, dedicação, cuidado, carinho, proteção, estímulo, renúncia, valores, sabedoria e amor prestados a mim durante toda minha vida. ❀

A todos os inesquecíveis professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, pela inspiradora sabedoria.

Às minhas grandes amigas Jozy Malkomes (Jozynha), Lorena Monteiro (Lôra), Alinne Borges (Nina), Marília Schaumman (Pekena), Janaína Gurgel (Jana), Ramille Lima, Susy Cabral, Teresinha Sérvio (Tetê), Celina Keppeler, e Fernanda Vieira (Nandinha) pela convivência, mesmo que à distância, pelas lágrimas divididas, conversas e abraços sinceros e fortalecedores, momentos de alegria, risos e gargalhadas compartilhados por todos esses treze anos de profunda amizade. ❀

Ao meu namorado André Cavalcante, pela grandiosa ajuda na realização dos experimentos, pelo apoio constante durante a realização deste trabalho, pelas trocas de idéias engrandecedoras, por deixar meus dias mais leves e transbordar de alegria a minha vida.

Aos meus grandes amigos Tiago Olinda (Titi) e Danilo Gonçalves (Dandan), que considero como irmãos, por participarem de momentos tão importantes em minha vida, pelo apoio na realização dos experimentos, pelo apoio e incentivo na realização deste trabalho, pelos maravilhosos momentos de descontração, felicidade, alegria, risos e gargalhadas, pelas palavras verdadeiramente sinceras. Que nossa amizade se fortaleça a cada dia.

A minha querida Kelly Rose, amiga de todas as horas, pela grandiosa ajuda nos experimentos e apoio na realização deste trabalho, pelo convívio, pelos ricos ensinamentos, pelas risadas e pelo eterno companheirismo.

Ao meu grande amigo Mateus Matos e à minha amiga Marina Guerra, pelo prazer do convívio diário em um momento tão importante da minha vida. Àqueles meses se eternizaram na minha memória e no meu coração.

Aos novos amigos, César Braga, Maira Alvarenga, Iana Bantin, Cerqueira e Ana Paula Fragoso, Moisés Maia, Rachel Pinho, Francisco Artur, Ingrid, pessoas queridas que sempre guardarei no coração.

Às queridas Vilani e Lena, técnicas do laboratório de neurofarmacologia da UFC pela inestimável ajuda. Sinceramente, Obrigado.

Ao Arnaldo Lima, técnico do laboratório de neurofarmacologia, por ajudar na execução das técnicas de coloração e HPLC.

A todos os meus amigos da faculdade de Farmácia, Vanessa Fernandes Vieira, Cinthia Araújo, Aline Rosa, Éderson Sales, Suzana Bezerra, Emanuelle Silva, Tarciliane Lima, saudosamente, obrigada pelo grandioso convívio.

À minha Dachshund “Lady Lú” e minha Pit Bull “Akira” (*in memorian*), bem como, aos Poodles “Kika” (André), “Babi” (Kelly Rose) e “Edie” (Danilo), “Amy” (Tiago) pelos momentos de alegria e descontração.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Aura, Márcia, Ana Paula, Alana, Cícera, Aroldo, Carlos e Jucilêudo pela boa vontade e prontidão ao me ajudar.

A FUNCAP pelo apoio financeiro.

*“... E ainda se vier noites traiçoeiras,
Se a cruz pesada for, Cristo estará comigo,
O mundo pode até me fazer chorar,
Mas Deus me quer sorrindo...”* 🎵

RESUMO

A Epilepsia é considerada um dos mais importantes distúrbios cerebrais em todo o mundo e apresenta uma taxa de prevalência de 5%. A Pilocarpina (P400) é um agonista colinérgico que se caracteriza por induzir convulsões que evoluem para *status epilepticus*, similar à epilepsia do lobo temporal humana. O Pentilenotetrazol (PTZ) é um antagonista de GABA que mimetiza convulsões do pequeno-mal (crise de ausência) e do tipo tônico-clônico em humanos. Neste presente trabalho avaliamos a possível ação neuroprotetora da Pentoxifilina (PTX), uma xantina, nas convulsões induzidas pela P400 (400mg/kg, i.p.) e PTZ (80mg/Kg, i.p.) em ratos Wistar machos adultos (180 - 220g), na presença ou ausência de PTX (25 e 50mg/kg) administrada por via oral uma única vez 1 h antes da indução da convulsão. Após a aplicação do PTZ80 foi observada a presença de convulsões tônico-clônica. Após a injeção de P400 foram observados os sinais colinérgicos periféricos, as latências de 1° convulsão e taxa de sobrevivência em 24 h. Foram determinadas as concentrações de aminoácidos no córtex frontal, temporal, hipocampo e corpo estriado e as concentrações de aminas no corpo estriado através de HPLC com detecção eletroquímica e as alterações glicêmicas na fase aguda do processo convulsivo. Os resultados mostraram que a pentoxifilina não alterou os sinais colinérgicos periféricos, contudo na dose de 25mg/Kg aumentou a latência decorrida para a primeira convulsão em 18% quando comparada ao grupo P400 e aumentou a latência decorrida para a primeira convulsão (151,8% e 273,5%) nas doses de 25 e 50mg/Kg respectivamente em relação ao grupo PTZ80. A taxa de sobrevivência aumentou em 32% em ambas as doses de PTX quando comparado ao grupo controle P400 e em 36% e 71%, respectivamente, quando comparada ao grupo controle PTZ80. No córtex frontal, houve uma redução significativa nos níveis de glutamato nos grupos pré-tratados com pentoxifilina. Redução de 86,4% e 76,2% (25 e 50mg/Kg de PTX) em relação ao grupo P400. Os níveis de GABA reduziram 33,3% e 21,8%. No córtex temporal houve redução de 56,6% e 54,8% nos níveis de aspartato nos grupos tratados com PTX (25 e 50mg/Kg respectivamente). Os níveis de glutamato reduziram 78,2% e 59,2% nas doses testadas respectivamente. Os níveis de GABA aumentaram 28% na dose de 50mg/Kg de PTX. No hipocampo, os níveis de aspartato aumentaram 199,6% na dose de 25mg/Kg. Os níveis de GABA aumentaram 511% e 180,9% nos grupos tratados com PTX (25 e 50mg/Kg respectivamente). No corpo estriado, os níveis de glutamato reduziram 74,3% e 79,4% nos grupos tratados (PTX 25 e 50mg/Kg respectivamente). Os níveis de GABA reduziram 65,6% e 74%. No corpo estriado, os níveis de dopamina aumentaram 416,5% no grupo pré-tratado com pentoxifilina na dose de 25mg/Kg. Os níveis de DOPAC reduziram 48% no PTX 25mg/Kg. Os níveis de serotonina aumentaram 229,5% no PTX 25mg/Kg. Todos os aminoácidos e aminas foram quantificados no modelo de convulsão por pilocarpina. Houve um acentuado aumento nos níveis glicêmicos em 274,9% no grupo P400, em relação ao grupo Normal e os grupos pré-tratados com pentoxifilina que em ambas as doses mantiveram os níveis glicêmicos próximos do grupo normal. Em conclusão, mostramos que a pentoxifilina aumentou significativamente a latência de convulsões em ambos os modelos de indução utilizados. A neuroproteção da pentoxifilina pode estar relacionada com redução dos níveis de aminoácidos excitatórios e aumento de aminoácidos inibitórios em diferentes áreas cerebrais envolvidas com início, propagação e manutenção da epilepsia. A manutenção dos níveis glicêmicos próximos dos normais pode estar possivelmente relacionada com efeitos neuroprotetores da pentoxifilina.

Palavras-chave: Pentoxifilina. Convulsão. Pilocarpina. Pentilenotetrazol.

ABSTRACT

Epilepsy is considered one of the most important brain diseases in all whole world and its prevalence reaches 5%. Pilocarpine (P400) is a cholinergic agonist which is characterized by its capacity to induce seizures that evolves to *status epilepticus* similar to human temporal lobe epilepsy. Pentylentetrazole is a GABA antagonist that imitates the absence seizures and tonic-clonic seizures in humans. In this study it was evaluated the neuroprotective properties of Pentoxifylline, a xantin, on the seizures induced by P400 (400mg/kg, i.p.) and PTZ (80 mg/Kg, i.p.) in male Wistar rats (180 – 200g) in the presence or absence of PTX (25 and 50 mg/kg) administered orally 1 h before seizures induction. After PTZ80 injection it was observed the presence of tonic-clonic seizures. After P400 injection we observed peripheral cholinergic signals, 1st seizure latency and survival index. It was also determined the levels of amino acids in the frontal cortex, temporal lobe, hippocampus and striatum as well as the levels of amines in the striatum through HPLC associated to electrochemical detection. The glicemic levels were determined during the acute phase of seizures process. The results show that pentoxifylline does not alter the peripheral cholinergic signals, nevertheless it increases the 1st seizure latency at the dose of 25 mg/kg in 18% when compared to P400 and increases the same parameter (151.8% and 273.5%) at the doses of 25 mg/kg and 50 mg/kg, respectively, when compared to PTZ80. The survival index increased 32% to both doses when compared to P400 and 36% and 71%, respectively when compared to PTZ80. In the frontal cortex it was observed a significative reduction of glutamate at the groups treated with pentoxifilin. Reduction of 86.4% and 76.2% (25 and 50mg/kg PTX) in relation to P400. The levels of GABA reduced 33.3% and 21.8%. In the temporal cortex reduction of 56.6% and 54.8% on the levels of aspartate PTX (25 and 50mg/kg, respectively). The levels of glutamate reduced 78.2% and 59.2% at the tested doses, respectively. The levels of GABA increased 28% at the dose of 50 mg/kg. On the hippocampus aspartate increased 199.6% at the dose of 25 mg/kg. The levels of GABA increased 511% and 180.9% PTX (25 e 50mg/Kg, respectively). In the striatum glutamate reduced with both tested doses 74.3% and 79.4%. GABA reduced 65.6% and 74%. In the striatum dopamine increased 416.5% at the dose of 25 mg/kg. The levels of DOPAC reduced 48% at the same dose. Serotonin increased 229.5%. All amino acids and amines were quantified in the model of pilocarpine induced seizures. It was observed a markedly increase at the glicemic levels at the groups P400 when compared to Normal group and PTX pretreated groups which have by the way kept glicemic levels similar to normal rats. In conclusion we showed that pentoxifilin significantly increases the 1st seizure latency at both tested models. Pentoxifylline neuroprotection may be related to reduction on the levels of excitatory amino acids and increase in the levels of inhibitory amino acids at different parts of the brain involved in the start, propagation and maintenance of epilepsy. Keeping the glicemic levels similar to the normal could be involved in the neuroprotection induced by pentoxifylline.

Key-Words: Pentoxifylline. Seizures. Pilocarpine. Penyilenetrazole.

LISTA DE FIGURAS

- 01.** Latência de 1ª Convulsão após administração de pilocarpina (P400) em ratos Wistar machos pré-tratados com pentoxifilina (PTX25+P400 e PTX50+P400). 63
- 02.** Latência de 1ª Convulsão após administração de pentilenotetrazol (PTZ80) em ratos Wistar machos pré-tratados com pentoxifilina (PTX25+PTZ80 e PTX50+PTZ80). 67
- 03.** Efeitos da Pentoxifilina sobre as Concentrações de Aspartato (nmol/g de tecido) em córtex frontal de ratos no modelo de convulsão induzido por pilocarpina. 71
- 04.** Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Glutamato (nmol/g de tecido) em Córtex Frontal de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos. 73
- 05.** Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Glicina (nmol/g de tecido) em Córtex Frontal de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos. 75
- 06.** Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Taurina (nmol/g de tecido) em Córtex Frontal de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos. 77
- 07.** Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de GABA (nmol/g de tecido) em Córtex Frontal de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos. 79
- 08.** Efeitos da Pentoxifilina sobre as Concentrações de Aspartato (nmol/g de tecido) em córtex temporal de ratos no modelo de convulsão induzido por pilocarpina. 82
- 09.** Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Glutamato (nmol/g de tecido) em Córtex Temporal de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos. 84
- 10.** Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Glicina (nmol/g de tecido) em Córtex Temporal de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos. 86
- 11.** Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Taurina (nmol/g de tecido) em Córtex Temporal de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos. 88

12. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de GABA (nmol/g de tecido) em Córtex Temporal de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.	90
13. Efeitos da Pentoxifilina sobre as Concentrações de Aspartato (nmol/g de tecido) em Hipocampo de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina.	93
14. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Glutamato (nmol/g de tecido) em Hipocampo de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.	95
15. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Glicina (nmol/g de tecido) em Hipocampo de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.	97
16. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Taurina (nmol/g de tecido) em Hipocampo de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.	99
17. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de GABA (nmol/g de tecido) em Hipocampo de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.	101
18. Efeitos da Pentoxifilina sobre as Concentrações de Aspartato (nmol/g de tecido) em Corpo Estriado de ratos no modelo de convulsão induzido por pilocarpina	104
19. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Glutamato (nmol/g de tecido) em Corpo Estriado de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.	106
20. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Glicina (nmol/g de tecido) em Corpo Estriado de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.	108
21. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Taurina (nmol/g de tecido) em Corpo Estriado de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.	110

- 22.** Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de GABA (nmol/g de tecido) em Corpo Estriado de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos. 112
- 23.** Efeitos da Pentoxifilina sobre as Concentrações de Dopamina (ng/mg de tecido) em Corpo Estriado de ratos no modelo de convulsão induzido por pilocarpina. 115
- 24.** Efeitos da Pentoxifilina sobre as Concentrações de DOPAC (ng/mg de tecido) em Corpo Estriado de ratos no modelo de convulsão induzido por pilocarpina. 117
- 25.** Efeitos da Pentoxifilina sobre as Concentrações de Serotonina (ng/mg de tecido) em Corpo Estriado de ratos no modelo de convulsão induzido por pilocarpina. 119
- 26.** Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Glicose (mg/dL) em plasma de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina. 122
- 27.** Região CA3 do Hipocampo nos Diferentes Grupos Estudados por Coloração Cresil Violeta. 124
- 28.** Imunohistoquímica para TNF-alfa na Região CA3 do Hipocampo nos Diferentes Grupos Estudados. 126

LISTA DE QUADROS

1. Classificação Internacional dos diferentes tipos de crises epiléticas.	26
2. Modelos experimentais e sua relação com as diferentes formas das epilepsias no ser humano.	43
3. Mecanismos de ação dos fármacos antiepiléticos.	45
4. Droga utilizada e via de administração.	51
5. Grupos Experimentais.	51
6. Parâmetros Comportamentais.	52
7. Procedimento para Coloração Cresil Violeta	59

LISTA DE TABELAS

- 1.** Porcentagem de alterações comportamentais induzida por Pilocarpina (P400) em ratos Wistar machos pré-tratados com Pentoxifilina (PTX25+P400 e PTX50+P400) e Ácido Valpóico (Ác. Valpróico 100 + P400). 62
- 2.** Número de Mortes e porcentagem de sobrevivência, após administração de pilocarpina, na presença ou ausência de pentoxifilina, em ratos 66
- 3.** Número de Mortes e porcentagem de sobrevivência, após administração de pentilenotetrazol, na presença ou ausência de pentoxifilina, em ratos. 70
- 4.** Efeitos do pré-tratamento com pentoxifilina (25 e 50mg/kg) sobre as concentrações de aminoácidos em Córtex Frontal de ratos submetidos a convulsões induzidas por pilocarpina 400 mg/kg (P400). 81
- 5.** Efeitos do pré-tratamento com pentoxifilina (25 e 50mg/kg) sobre as concentrações de aminoácidos em Córtex Temporal de ratos submetidos a convulsões induzidas por pilocarpina 400 mg/kg (P400). 92
- 6.** Efeitos do pré-tratamento com pentoxifilina (25 e 50mg/kg) sobre as concentrações de aminoácidos em Hipocampo de ratos submetidos a convulsões induzidas por pilocarpina 400 mg/kg (P400). 103
- 7.** Efeitos do pré-tratamento com pentoxifilina (25 e 50mg/kg) sobre as concentrações de aminoácidos em Corpo Estriado de ratos submetidos a convulsões induzidas por pilocarpina 400 mg/kg (P400). 114
- 8.** Efeitos do pré-tratamento com pentoxifilina (25 e 50mg/kg) sobre as concentrações de amins em Corpo Estriado de ratos submetidos a convulsões induzidas por pilocarpina 400 mg/kg (P400). 121

LISTA DE SIGLAS

±	mais ou menos
%	Porcentagem
®	Marca registrada
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
μL	Microlitro
μg	Micrograma
v.o	Via oral
vs	Versus
dL	Decilitro
ANOVA	Análise de variância
E.P.M.	Erro padrão da média
<i>et al.</i>	...e colaboradores
g	Gramas
IL	Interleucina
INF	Interferon
mg	Miligrama
mL	Mililitro
p	Nível de significância
TNF	Fator de necrose tumoral
NO	Óxido nítrico
PTX	Pentoxifilina
P400	Pilocarpina 400 mg/Kg
SNC	Sistema Nervoso Central
PTZ	Pentilenotetrazol
HPLC	High Performance Liquid Cromatography
DA	Dopamina
5-HT	5-Hidroxitriptamina
GABA	Ácido Gama Amino Butírico
DOPAC	Ácido 3,4 Dihidroxfenilacético
WHO	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 HISTÓRIA DA EPILEPSIA	19
1.2 EPIDEMIOLOGIA	21
1.3 DEFINIÇÕES & CLASSIFICAÇÃO DAS EPILEPSIAS	23
1.4 REFRATARIEDADE AO TRATAMENTO	27
1.5 NEUROTRANSMISSORES E EPILEPSIA	28
Sistema Colinérgico	28
Sistema Glutamatérgico	30
Sistema GABAérgico	32
Sistema Dopamonérgico	32
Sistema Serotonérgico	34
1.6 FISIOPATOLOGIA DA EPILEPSIA	35
1.7 INFLAMAÇÃO E EPILEPSIA	36
1.8 MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA INDUZIDO POR PILOCARPINA	40
1.9 FÁRMACOS ANTIEPILEPTICOS	44
1.10 PENTOXIFILINA	45
2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	47
3. OBJETIVOS	49
3.1 Objetivo geral	49
3.2 Objetivos específicos	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1 Animais	50
4.2 Drogas e Materiais utilizados	50
4.3 Tratamento dos Grupos Experimentais	50
4.4 Estudo Comportamental	51
4.5 Dissecção de áreas cerebrais	52
4.6 Material utilizado nos Experimentos	53
4.7 Dosagem de aminoácidos com HPLC	54
4.8 Dosagem de monoaminas e metabólitos com HPLC	55
4.9 Análise da glicemia com espectrofotômetro	57

5. Estudo Histopatológico	58
5.1 Dissecção das Áreas Cerebrais	58
5.2 Coloração de Nissl com Cresil Violeta	58
5.3 Imunoensaio para Fator de Necrose Tumoral (TNF- α)	60
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
7. RESULTADOS	61
7.1 Estudo Comportamental	61
7.2 Comportamento de ratos adultos observados durante 3 horas após administração de pilocarpina.	61
7.2.1 Latência de Primeira Convulsão de ratos adultos observados durante 3 horas após administração de Pilocarpina.	63
7.2.2 Taxa de Sobrevivência de ratos adultos observados durante 24 horas após administração de Pilocarpina.	65
7.3 Latência de Primeira Convulsão de ratos adultos observados durante 3 horas após administração de Pentilenotetrazol.	67
7.3.1 Taxa de Sobrevivência de ratos adultos observados durante 24 horas após administração de Pentilenotetrazol.	69
7.4 Aspectos neuroquímicos – Aminoácidos. (HPLC)	71
7.4.1 Efeitos do pré-tratamento com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg sobre a concentração de aminoácidos em córtex frontal de ratos adultos após a administração da Pilocarpina 400mg/kg (P400).	71
7.4.2 Efeitos do pré-tratamento com pentoxifilina 25 e 50mg/kg sobre a concentração de aminoácidos em Córtex Temporal de ratos adultos após a administração da pilocarpina 400mg/kg (P400).	82
7.4.3 Efeitos do pré-tratamento com pentoxifilina 25 e 50mg/kg sobre a concentração de aminoácidos em Hipocampo de ratos adultos após a administração da pilocarpina 400mg/kg (P400).	93
7.4.4 Efeitos do pré-tratamento com pentoxifilina 25 e 50mg/kg sobre a concentração de aminoácidos em Corpo Estriado de ratos adultos após a administração da pilocarpina 400mg/kg (P400).	104
7.5 Aspectos neuroquímicos – Aminas. (HPLC)	115
7.5.1 Efeitos do pré-tratamento com pentoxifilina 25 e 50mg/kg sobre a concentração de aminas em corpo estriado de ratos adultos após a administração da pilocarpina	115

400mg/kg (P400).

7.6 Efeitos do pré-tratamento com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg sobre a concentração glicêmicas de ratos adultos após a administração da Pilocarpina 400mg/kg (P400). 122

7.7 Análise Histopatológica 124

7.7.1 Corpúsculo de Nissl por Coloração Cresil Violeta 124

7.7.2 Imunohistoquímica para Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) 126

8. DISCUSSÃO 128

8.1 Estudo Comportamental 131

8.2 Estudo da Determinação dos Níveis de Aminoácidos 135

8.3 Estudo da Determinação dos Níveis de Aminas 138

8.4 Estudo da Determinação dos Níveis Glicêmicos 140

8.5 Estudo Histopatológico 143

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS 145

10. CONCLUSÕES 147

REFERÊNCIAS 148

1. INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRIA DA EPILEPSIA

No decorrer da história, a epilepsia foi associada a possessões divinas e demoníacas, a doenças contagiosas ou à loucura, encontrando diferentes formas de definição, diagnóstico e tratamento. Do mesmo modo que a loucura, a epilepsia foi estigmatizada, perpetuando idéias que persistem até os dias de hoje. Em decorrência disso, muitos portadores podem ser vítimas do preconceito, fato que colabora para que numerosas pessoas tornem-se resistentes a admitir o diagnóstico ou a consentir em iniciar um tratamento adequado.

No Museu Britânico há o mais velho relato detalhado sobre epilepsia. É um capítulo de um livro de medicina da babilônia datado por volta de 2000 a.C. e registra, de forma detalhada, diferentes tipos de ataques epiléticos atualmente reconhecidos. O tratamento era considerado um assunto espiritual e enfatizava a epilepsia como sendo de natureza sobrenatural, onde cada tipo de ataque epilético era associado ao nome de um espírito ou deus, normalmente do ma (WHO, 1997).

Os povos primitivos acreditavam que as doenças eram castigos lançados pelos deuses para punir determinada ofensa cometida. O efeito do tratamento estaria atribuído a intervenção de forças divinas invocadas por sacerdotes ou feiticeiros através do uso de magias em rituais religiosos, preparando porções medicamentosas com poder curativo. O tratamento era predominantemente empírico e empregava diversos meios na tentativa de chegar à cura: sangrias, purgações, fumigações, sucções, sudoríferos e ventosas, não havendo outra alternativa, o homem continuava a aceitar as terapias disponíveis. (LYONS & PETRUCCELLI, 1987).

Hippocrates, combatendo as superstições, conseguiu tratar as doenças por outra abordagem. Como exemplo, podemos citar os “ataques epiléticos” que foi demonstrado como sendo consequência de uma disfunção cerebral e não mais uma ação de raiva e vingança dos deuses sobre os homens. A compilação de suas escrituras intituladas “Hippocratic Collection” ou “Corpus Hippocraticum” no século IV a.c. foram reunidas na Biblioteca de Alexandria e continha princípios de Anatomia, Fisiologia, Patologia, Prognósticos, Cirurgia, Ginecologia, Ética, além de referências, de modo geral, às doenças mentais e estados

emocionais de pacientes. Hippocrates reconhecia o cérebro como um órgão relacionado com o pensamento e a sensação (LYONS & PETRUCCELLI, 1987).

De acordo com Dreifuss (1996) em 175 d.C. Galeno reconheceu que a epilepsia era uma doença do cérebro e conseguiu classificar as epilepsias em dois tipos: as epilepsias de causas desconhecidas e as epilepsias que resultavam de outras doenças. Apesar das afirmações de Hipócrates e Galeno, as crenças em torno da epilepsia como possessão, maldição ou castigo perpetuaram por muito tempo. Na Grécia, a epilepsia era considerada como sendo uma possessão divina e os “possuídos” eram colocados em templos e passavam a ser vistos como sacerdotes. Acreditavam, os gregos, que uma pessoa tinha convulsão por ser tocada pelos deuses.

Na Idade Média, os conceitos se reverteram. Na Grécia antiga a epilepsia era definida de *morbus sacer* (doença sagrada) e na Idade Média passa a ser chamada de *morbus demoniacus* (doença do demônio). “Talvez, essa definição tenha perdurado até a atualidade e causado uma conotação meio religiosa entre camadas sociais mais populares, que acreditam ser a epilepsia causada por problemas espirituais”.

Na época da Idade Média ocorreram muitas perseguições a pessoas consideradas hereges. Os loucos e portadores de crises epiléticas sofreram perseguição nesta época, por volta de 1484, período da Santa Inquisição e passaram a ser condenados às fogueiras, pois, pregava-se que essas doenças de causa desconhecida eram causadas por feitiçaria, bruxaria. No século XVIII, surgiram novos conceitos que eram opostos às explicações sobrenaturais e demoníacas para a epilepsia porém, não foram suficientes para a mudança de concepções, dado o forte estigma de a crise epilética estar relacionada com possessão demoníaca.

No século XIX, diversos nomes foram importantes no estudo médico da epilepsia e da doença mental (PINEL, 1745-1826; ESQUIROLL, 1772-1840; MOREL, 1809-1879; LOMBROSO, 1836-1909; HUGHLINGS JACKSON, 1835-1911, entre outros). Nesses estudos, relacionava-se a epilepsia à insanidade e ao mesmo tempo em que o desenvolvimento da ciência médica era beneficiada pelos estudiosos citados, deixavam-se rastros que sedimentavam o estigma da loucura ao portador de epilepsia no seu ambiente social (MOREIRA, 2004). No século XIX houve muitos avanços nas ciências biológicas

especificamente na neurofisiologia, o que repercutiu nos estudos das patologias cerebrais e dentre elas a epilepsia (MOREIRA, 2004).

Foram obtidos avanços significativos nas últimas décadas em técnicas cirúrgicas eficazes, métodos histoquímicos, imunológicos e de radioisótopos utilizados para mapear a distribuição de neurotransmissores centrais, sistemas enzimáticos e de seus receptores. O uso da neuroimagem estrutural possibilitou um maior sucesso na avaliação diagnóstica e no tratamento de diversas doenças. A ressonância magnética nuclear é um procedimento de imagem estrutural muito utilizado, ao lado da Tomografia Computadorizada. A tomografia por emissão de fóton único é uma técnica de neuroimagem funcional aplicada para investigação complementar da ressonância magnética nuclear e de estudos na tomografia por emissão de pósitrons (BERKOVICK & NEWTON, 1998).

A clonagem molecular também forneceu base importante para um maior entendimento de receptores, possibilitando assim uma abordagem terapêutica mais específica para tratar distúrbios do SNC. Apesar desses avanços, dos progressos das explorações para-clínicas, dos resultados obtidos da experimentação e até mesmo o conhecimento dos fatores genéticos que podem contribuir para a etiologia da epilepsia em cerca de 40% desses pacientes (GARDINER, 1999), os mecanismos responsáveis pelo fenômeno epiléptico não se encontram totalmente esclarecidos.

1.2 EPIDEMIOLOGIA

A Epilepsia é considerada um dos maiores distúrbios cerebrais em todo o mundo. É, possivelmente, a mais universal de todas as entidades médicas. Aproximadamente 100 milhões de pessoas terão epilepsia em algum momento de suas vidas e 5% da humanidade terão pelo menos uma crise epiléptica durante a vida (WHO, 2005).

Em países mais desenvolvidos, a incidência é de aproximadamente 1%, ou seja, cinquenta milhões de pessoas são portadoras desta condição, subindo para 2% em nações menos desenvolvidas (BEAGLEHOLE et al., 1996).

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

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

Estima-se que o número de novos casos por ano está em torno de dois milhões em todo o mundo. Pelo menos 50% dos casos começam na infância ou adolescência, e sabe-se que, 70% a 80% das pessoas com epilepsia podem ter uma vida normal se tiverem um tratamento adequado (BEAGLEHOLE et al., 1996).

A Crise epilética pode durar de segundos a minutos, porém a sua repercussão pode durar uma vida inteira. Estima-se que cerca de 3,5 milhões de pessoas têm epilepsia na América Latina e aproximadamente 100 mil casos novos somam-se a cada ano, de cada 100 pessoas, 1 a 2 têm epilepsia. Pelo menos 50% dos casos começam na infância ou adolescência. O Ministério da Saúde não tem uma estimativa real da prevalência e incidência de epilepsia no Brasil. A grande prevalência das epilepsias na América Latina é muito preocupante, pois além das grandes dificuldades econômicas temos baixo investimento em áreas sociais, com altas taxas de desemprego e subemprego, dificuldades geográficas e falta de uma política de saúde para as epilepsias. Essa alta prevalência também afeta a economia, aumentando os custos diretos e indiretos das epilepsias.

A epilepsia é uma das condições neurológica mais comum em todo o mundo. No Brasil, foram feitos apenas alguns poucos estudos epidemiológicos sobre essa condição,

como, por exemplo, na cidade de São Paulo em 1986 pela liga Brasileira de Epilepsia. Marino et al. (1986) encontraram na grande São Paulo, uma prevalência de 11,9 em 1000 indivíduos. Fernandes et al. (1998), utilizando o questionário de rastreamento neurológico para epilepsia, numa combinação de três protocolos, o da Organização Mundial da Saúde (OMS), do International Community-Based Epilepsy Research Group (ICBERG) e o de Porto Alegre constataram taxas de prevalência de 16,5 em 1000 indivíduos para epilepsia ativa (presença de crise, em vigência de tratamento ou não, nos últimos 24 meses) e de 20,3 em 1 000 para epilepsia inativa. Borges et al. (2004) encontraram uma prevalência de epilepsia de 18 em 1000 habitantes em São José do Rio Preto, uma cidade do interior do Estado de São Paulo.

1.3 DEFINIÇÕES & CLASSIFICAÇÃO DAS EPILEPSIAS

Uma importante definição a ser citada é a classificação internacional de síndromes epiléticas, aprovada pela Liga Internacional Contra a Epilepsia , que foi criada em 1985 e revisada em 2005: “Crise epilética é uma ocorrência transitória de sinais e / ou sintomas devido à atividade neural anormal excessiva ou síncrona no cérebro.”

“A epilepsia é um distúrbio do cérebro caracterizada por uma predisposição persistente a gerar crises epiléticas e pelas consequências neurobiológicas, cognitivas, psicológicas e sociais desta condição. A definição da epilepsia requer a ocorrência de pelo menos um ataque epilético” (FISHER et al., 2005).

O termo “convulsão” refere-se à alteração transitória do comportamento recorrente do disparo rítmico, sincrônico e desordenado de populações de neurônios cerebrais. Já o termo “epilepsia” refere-se a um distúrbio da função cerebral caracterizado pela ocorrência periódica e imprevisível de convulsões (BRUNTON, 2006). Fuchs et al (2004) definem a epilepsia como um distúrbio cerebral crônico de diversas etiologias, caracterizado por manifestações recorrentes clinicamente diversificadas, entre as quais figuram as convulsões.

Engel e Pedley (1997) definiram como uma afecção crônica de etiologia diversa, caracterizada por crises repetidas, devido a uma descarga excessiva dos neurônios cerebrais em diferentes estruturas e associada eventualmente com diversas manifestações clínicas ou não, podendo ocorrer também quando há um aumento do nível basal de excitação do Sistema

Nervoso Central (SNC), superior ao limiar da convulsão. De Lorenzo et al (2001) demonstraram, ainda, que a atividade convulsiva pode ocorrer após a perda suficiente e duradoura de neurônios em diferentes regiões cerebrais. Em geral, não existe nenhuma causa reconhecível, embora surja freqüentemente após alguma lesão cerebral, como traumatismo, infecção (meningite) ou crescimento de tumor ou outros tipos de doença neurológica (HOPKINS et al., 1995)

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

John Hughlings Jackson, o criador dos conceitos modernos sobre epilepsia, definiu-a como uma descarga neuronal temporária e excessiva de poucas células, cujo nível de tensão e instabilidade fica muito acima das demais células corticais (JACKSON, 1931 *apud* FISHER, 1989). Em 1992, Bloom & Engel definiram a epilepsia como um distúrbio crônico caracterizado pela recorrência de crises epilépticas que aparecem em resposta a vários distúrbios na estrutura e função do cérebro. Tais distúrbios podem ser de origem genética ou podem ser adquiridos, resultando de processos infecciosos, neoplasias, lesão cerebral e traumatismos decorrentes do parto ou até mesmo de uma queda (BLOOM & ENGEL, 1992).

Crise epiléptica é definida como a manifestação excessiva e/ou hipsincrônica resultante da atividade epiléptica, autolimitada ou não, de neurônios cerebrais. Quando as mesmas não apresentam curso autolimitado são denominadas crises contínuas e configuram o quadro de estado epiléptico. O Estado epiléptico ou *status epilépticus* pode ser definido como uma crise duradoura, que não mostra sinais clínicos de interrupção após o tempo habitual da maioria 32 das crises recorrentes sem que a função do sistema nervoso central retorne ao período interictal (entre as crises convulsivas) (ENGEL, 2001).

As crises epilépticas podem se desenvolver com graus diferentes de envolvimento muscular. O evento motor consiste de um aumento ou diminuição 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 relaxamentos gerando abalos musculares sucessivos) ou mioclônico (contrações musculares muito breves, semelhantes a choques). A diminuição da contração muscular caracteriza as mioclonias negativas e as crises atônicas (ENGEL, 2001). Segundo a Classificação Internacional das Crises Epilépticas de 1981, (Comissão de Classificação e Terminologia do ILAE, 1981); há três grupos de crises: as parciais ou focais, as generalizadas e as crises não classificáveis.

Crises parciais são aquelas nas quais, em geral, as primeiras manifestações clínicas e eletroencefalográficas indicam ativação de um sistema neuronal limitado à parte de um hemisfério cerebral. Na classificação das crises epiléticas, a consciência é entendida como a capacidade de responsividade e percepção consciente. Quando está alterada, diz-se que há comprometimento da consciência. O que distingue a crise parcial simples da complexa é o comprometimento da consciência na última. Na crise parcial complexa, admite-se o envolvimento hemisférico bilateral, principalmente das estruturas mesiais temporais durante o período de alteração da consciência.

A crise de ausência é caracterizada pela parada súbita das atividades associada a olhar fixo, durante cerca de 30 segundos e seguido de uma volta abrupta ao comportamento normal. Uma crise mioclônica consiste de uma breve contração dos músculos, como choques, podendo ser restrita à parte de uma extremidade ou generalizada. Uma crise tônica consiste de uma contração muscular mantida, enquanto uma crise clônica é caracterizada por períodos alternados de contração e relaxamento muscular; crises tônico-clônicas geralmente envolvem grupos de músculos ao longo do corpo, são associadas à perda de consciência e duram aproximadamente de 30 a 60 segundos. Um paciente propenso freqüentemente exibe tipos múltiplos de crise, em episódios epiléticos diferentes (MCNAMARA, 1994).

As crises generalizadas podem ser divididas em convulsivas (como as crises tônico-clônicas) e não convulsivas (ex: as crises de ausência, mioclônicas, tônicas de breve duração e atônicas). Se forem parciais serão classificadas de acordo com a localização do sítio de origem e de propagação dos sintomas dentro do córtex cerebral. Se estas ocorrerem com a manutenção da consciência, serão denominadas parciais simples e se, por outro lado, causarem prejuízo à consciência serão denominadas crises parciais complexas.

As crises parciais complexas representam cerca de 40 % de todas as crises e 55% das crises em adultos. Estão associadas com anormalidades eletrográficas ictais e interictais, resultantes de alterações das estruturas límbicas do lobo temporal, incluindo o hipocampo, amígdala e neocórtex temporal. Algumas crises parciais complexas podem ter origem em estruturas extra-temporais e uma simples aura pode anunciar o início de uma crise (SUTULA, 1990). As crises parciais simples muitas vezes evoluem para crises parciais complexas e as crises parciais, por sua vez, podem evoluir para crises generalizadas (BLOOM & ENGEL, 1992).

As crises serão denominadas primárias ou idiopáticas quando não se conhece ou se suspeita a etiologia, a não ser possível predisposição hereditária e, secundárias ou sintomáticas são as que derivam de alguma doença conhecida ou possível do sistema nervoso central. O termo criptogênica refere-se àquelas crises cuja causa é desconhecida (COMISSION, 1989).

A crise pode ser “não-epiléptica”, como por exemplo, decorrente do eletrochoque ou convulsivantes químicos, ou “epiléptica” quando ocorre sem indução aparente (MCNAMARA, 1994). As manifestações comportamentais de uma crise são determinadas pelas funções normalmente atribuídas à região cortical onde a crise se inicia.

Quadro 1: Classificação Internacional dos diferentes tipos de crises epilépticas.

Crises Parciais (focais)

Crise parcial simples (com sintomas motores, sensoriais, autonômicos ou psicológicos)

Crise parcial complexa

Crise parcial complexa com generalização secundária

Crises Generalizadas (convulsivas ou não convulsivas)

Ausência ;

Mioclônicas

Clônicas

Tônicas

Tônico-clônicas (grande-mal)

Atônicas

Não Classificadas

Fonte: WESTBROOK, G. L. In: Kandel et al.,2000

1.4 REFRATARIEDADE DA EPILEPSIA AO TRATAMENTO

As causas de epilepsia compreendem a predisposição genética, lesões cerebrais, intoxicação e tumores. Estimativas indicam que mais de 80% das pessoas com epilepsia vivem em países em desenvolvimento, onde há mais desnutrição, doenças infecciosas e deficiência no atendimento médico, e grande número de pacientes pode permanecer sem tratamento (Relatório sobre Saúde Mental no Mundo/OMS/ONU, 2001). Nesses países, 60 a 90% das pessoas com epilepsia não recebem tratamento devido às deficiências do sistema de saúde e ao estigma social, prejudicando seriamente a qualidade de vida do epiléptico (BEAGLEHOLE et al., 1996). Somente 25 a 45% das pessoas que recebem tratamento para epilepsia estão completamente livres de crises após 12 meses de tratamento (MATTSON et al., 1992).

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

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

Sabe-se que, 70% a 80% das pessoas com epilepsia podem ter uma vida normal se tiverem um tratamento adequado (BEAGLEHOLE et al., 1996). Se um episódio convulsivo inicial contribui para o desenvolvimento da epilepsia, o tratamento após a primeira convulsão pode ser um fator de extrema importância para redução deste risco (FUCHS et al., 2004; MUSICCO et al., 1997).

Embora drogas antiepilépticas sejam comumente usadas para controlar e prevenir convulsões, seu uso prolongado carrega um risco considerável de morbidade. A decisão de iniciar uma terapia com anticonvulsivantes é tomada apenas quando os riscos de novas convulsões superam os riscos do tratamento (SIRVEN, 2002). Aproximadamente 50 milhões de pessoas no mundo têm epilepsia refratária aos atuais tratamentos medicamentosos (PORTER e ROGAWSKI, 1992) e, além disso, muitas vezes, o fracasso do tratamento é atribuído à necessidade de retirada, devida aos efeitos colaterais.

Desta forma, novos medicamentos antiepilépticos eficazes são necessários para melhorar a qualidade de vida de muitas pessoas acometidas pela epilepsia e o estudo de drogas anticonvulsivantes com baixa toxicidade, poucos efeitos colaterais e grande potencial terapêutico pode contribuir sobremaneira para o tratamento da epilepsia, melhorando a qualidade de vida e restabelecimento físico e mental dos portadores dessa doença em todo o mundo. Substâncias com propriedades anticonvulsivantes têm sido exaustivamente estudadas na tentativa de se conhecer drogas com eficácia para tipos específicos de convulsão, bem como os mecanismos controladores do aparecimento dessas convulsões (TURSKI et al., 1987; FISHER, 1989).

1.5 NEUROTRANSMISSORES E EPILEPSIA

Sistema Colinérgico

Inúmeros estudos sugerem o envolvimento do sistema colinérgico na epilepsia humana (OLNEY et al., 1983; TURSKI et al., 1983a,b,c,d; JOPE et al., 1986; HIRSCH et al., 1992; NATHANSON et al., 1999; MICHOTTE et al., 2000; PERSINGER et al., 2001; KOFMAN & PATISHI, 1999).

O sistema colinérgico tem como neurotransmissor a acetilcolina (ACh). A ACh é um importante neurotransmissor excitatório no cérebro (NATHANSON et al., 1999; OLNEY et al., 1983 e 1986). A estimulação cerebral induzida pela ACh ocorre através da ativação dos receptores colinérgicos cerebrais, onde cerca de 99% destes são muscarínicos, e 1% são nicotínicos (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).

No fim de 1980, através de técnicas de biologia molecular, foram identificados 5 subtipos de receptores muscarínicos (M1, M2, M3, M4, e M5) (BONNER et al., 1987; LIAO et al., 1989; NATHANSON et al., 1999). A estimulação dos receptores M1, M3 e M5 ativa a hidrólise dos fosfoinosítídeos, na qual causa a liberação de cálcio intracelular e metabolismo do ácido araquidônico. Já os receptores M2 e M4 quando estimulados conduzem a inibição da adenilil ciclase, diminuindo os níveis de AMPc (HULME et al., 1990; PERALTA et al., 1987 e 1988; WESS et al., 1990)

Os receptores muscarínicos são amplamente distribuídos em todo corpo e exercem inúmeras funções vitais no cérebro e no sistema nervoso autônomo (JOPE, 1979; LEFKOWITZ et al., 1996). No cérebro os receptores muscarínicos são importantes na memória e na fisiopatologia das doenças afetivas e na esquizofrenia (DAVIS et al., 1975 e 1980).

A administração periférica de altas doses do agonista muscarínico colinérgico pilocarpina produz convulsões em roedores (TURSKI et al., 1989; 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). Assim, o processo convulsivo, decorrente do tratamento de ratos com pilocarpina em doses convulsivas, parece depender da ativação dos receptores muscarínicos, podendo envolver o metabolismo dos fosfoinosítídeos e sendo capaz de produzir lesões cerebrais e alterações comportamentais (MARINHO et al., 1997; 1998).

A pilocarpina também altera os níveis do neurotransmissor colinérgico (associado às convulsões induzidas em ratos pela administração de agonistas colinérgicos, principalmente pilocarpina, está o intenso aumento observado na síntese e liberação da ACh), podendo, ainda, produzir alterações nos níveis de outros neurotransmissores (noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e GABA), embora pouco se conheça sobre estas alterações (MICHOTTE et al., 2000; DE LORENZO et al., 2000; RAOL et al., 2001; COSTA-LOTUFO et al., 2002).

Sistema Glutamatérgico

GLU é um dos aminoácidos (AA) mais abundante neurotransmissor excitatório extremamente potente sobre neurônios, em virtualmente todas as regiões do SNC (WATKINS & OLVERMAN, 1987). Devido às suas altas concentrações e larga distribuição este aminoácido influencia todas as funções do SNC. Por exemplo, podem contribuir para anormalidades associadas com a epilepsia, danos cerebrais característicos das doenças neurodegenerativas, tais como: doença de Huntington, doença de Alzheimer e doença de Parkinson, além das alterações associadas à isquemia cerebral, traumatismo cerebral e encefalopatia devido à SIDA (HAYES et al., 1992; LANCASTER, 1992; SPINK & MARTIN, 1991; LIPTON et al., 1991; DINGLEDINE et al., 1990; CHOI et al., 1990; MELDRUM & GARTHWAITE, 1990; FADEN et al., 1989). Entretanto, este neurotransmissor desempenha um papel importante no aprendizado e memória (BLISS & COLLINGRIDGE, 1993; WILLNER et al., 1992; NG et al., 1991; DAVIS et al., 1992). O glutamato desempenha um importante papel no desenvolvimento do SNC, como indução sináptica, migração, diferenciação e morte celular (JOHNSTON, 1995; VALLANO, 1998).

Alguns estudos sugerem o envolvimento do sistema glutamatérgico na manutenção e/ou propagação da epilepsia humana (MICHOTTE et al., 2001; LING et al., 2001). O sistema glutamatérgico tem como neurotransmissor o GLU, juntamente com outro aminoácido, aspartato (ASP), e possivelmente o homocisteato são os principais e ubíquos transmissores que medeiam respostas sinápticas excitatórias rápidas no SNC.

O GLU é armazenado em vesículas sinápticas e liberado por exocitose cálcio dependente. Sua ação é concluída principalmente pela sua recaptação por transportadores para as terminações nervosas e neuroglia. Este transporte em algumas circunstâncias ocorrer de forma inversa (despolarização por aumento de potássio extracelular) e constituir uma fonte de liberação de GLU (ATTWELL et al., 1993), um processo que pode ocorrer em diversas patologias neurológicas, como isquemia cerebral e convulsão. Acredita-se que o neurotransmissor glutamatérgico pode ter uma crucial importância no desenvolvimento e manutenção das convulsões, que ocorre no fenômeno epilético (NAFFAHMAZZACORATTI et al., 2004)

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

A ativação do receptor NMDA provoca a abertura do canal iônico com a entrada de íons Ca^{+2} , em algumas células isto leva a ativação de uma proteína calmodulina, que por outro lado estimula a produção de óxido nítrico (NO) e este ativando a guanilato ciclase (GC) que pode destruir os neurônios diretamente (IZUMI et al., 1992; DAWSON et al., 1991). A inibição da NOS inibe o dano neuronal induzido pelo NMDA, isquemia e hipóxia (MONCADA et al., 1992; WALLIS et al., 1992; DE SARRO et al., 2004).

Existem várias indicações de que o cálcio tem um papel na epileptogênese (HEINEMANN, 2002; PUMAIN, 1981; PUMAIN et al., 1984). Durante as convulsões, a concentração de cálcio intracelular aumenta e o cálcio extracelular diminui (HEINEMANN et al., 2002). A origem do influxo de cálcio neuronal durante os potenciais epileptogênicos não é conhecida. A hipótese existente é que, num processo patológico como é o estado epiléptico, há liberação de glutamato que, por sua vez, ativa os receptores de NMDA levando à necrose neuronal por elevação da concentração de cálcio, ativando, potencialmente, enzimas dependentes de cálcio (MELDRUM & GARTHWAITE, 1990). Assim, seria esperado que os antagonistas dos receptores de NMDA bloqueassem a entrada de cálcio e protegessem as células neuronais contra as lesões em várias condições patológicas, inclusive nas convulsões induzidas por pilocarpina. A provável participação do Ca^{++} , nestes processos, possibilita a investigação das ações dos bloqueadores de canais de cálcio sobre o desenvolvimento das convulsões.

Sistema GABAérgico

Alguns estudos sugerem o envolvimento do sistema GABAérgico na manutenção e/ou propagação da epilepsia humana (COSTA-LOTUFO et al., 2002; FREITAS et al., 2004a). O sistema GABAérgico tem como neurotransmissor o GABA. O GABA está presente em todo o tecido cerebral, porém não em outros tecidos de mamíferos, exceto em quantidades mínimas. No cérebro é um importante neurotransmissor inibitório em quantidade abundante (aproximadamente 10 $\mu\text{mol/g}$ de tecido); no sistema nigroestriatal, porém, ocorre em concentrações menores (2 a 5 $\mu\text{mol/g}$) em toda a substância cinzenta (LUDDENS & WISDEN, 1991).

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

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

Sistema Dopamonérgico

Alguns estudos sugerem o envolvimento do sistema dopaminérgico na manutenção e/ou propagação da epilepsia humana (MARINHO et al., 1997 e 1998).

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

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

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

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

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

O sistema dopaminérgico parece exercer um papel regulatório na atividade epileptogênica cerebral (ANLEZARK & MELDRUM, 1975; ENGLE & SHARPLESS, 1979; LOSCHER & CZUCZWAR, 1986; TURSKI et al., 1988; WARTER et al., 1988; AL-TAJIR et al., 1990a,b; BARONE et al., 1990a,b; MARINHO et al., 1997; THIEL & FOWKES, 2004).

O mecanismo de ação e a área cerebral afetada pela DA para controlar a propagação das convulsões ainda não foram determinados, mas acredita-se que receptores D1 localizados em várias estruturas cerebrais podem controlar a propagação da atividade convulsiva.

A DA exerce seus efeitos no cérebro, principalmente, através dos receptores D1 e D2 (SEEMAN et al., 1981). Esses dois subtipos de receptores interagem cooperativamente para controlar o comportamento motor normal, mas a maneira pela qual influenciam na propagação das convulsões ainda não foi estabelecida (WADDINGTON & O'BOYLE, 1989).

Sistema Serotonérgico

Alguns estudos sugerem o envolvimento do sistema serotonérgico na manutenção e/ou propagação da epilepsia humana (PEROUTKA, 1988). O sistema serotonérgico tem como neurotransmissor a 5-HT. A 5-HT é um importante neurotransmissor inibitório em muitas áreas do SNC (JULIUS, 1991).

A estimulação inibitória induzida pela 5-HT ocorre através da ativação de muitas vias da 5-hidroxitriptamina em neurônios da *rafe* ou nas regiões da parte superior do tronco cerebral (PEROUTKA, 1988). A 5-HT está presente em fibras não-mielinizadas que inervam difusamente muitas regiões do SNC, mas a sua densidade de inervação é diferente para as áreas cerebrais (PEROUTKA, 1988). Os receptores serotonérgicos, principalmente o 5-HT₁ exercem efeitos predominantemente inibitórios e estão relacionados com o humor e o

comportamento (COOPER et al., 1991). Acredita-se que a maioria dos efeitos de ativação serotoninérgica no cérebro é provavelmente devido à estimulação dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT1A.

Os receptores serotoninérgicos são amplamente distribuídos em todo corpo e exercem inúmeras funções vitais no cérebro e no sistema nervoso periférico (Cooper et al., 1991). No fim de 1980, através de técnicas de biologia molecular, foram identificados subtipos de receptores serotoninérgicos (5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT2A, 5-HT2B, 5-HT2C, 5-HT3, 5-HT4) (HARTIG, 1989). Esses receptores encontram-se distribuídos no SNC de forma diferenciada e divergem quanto ao mecanismo de ativação. Os subtipos 5-HT1A, 5-HT1B e 5-HT1D, agem por inibição da adenilil ciclase (AC), diminuindo os níveis de AMPc. Já os subtipos 5-HT2A, 5-HT2B e 5-HT2C transmitem sinais através da mobilização de Ca⁺⁺ no SNC (HARTIG, 1989). O subtipo 5-HT3 é um canal iônico, receptor do tipo 1, enquanto que, o 5-HT4 age por estimulação da adenilil ciclase (AC), aumentando os níveis de AMPc.

O início das convulsões pode ser produzido através da estimulação da atividade colinérgica endógena (JOPE et al., 1986 e 1992; MORRISETT et al., 1987a; MARINHO et al., 1998). O processo convulsivo decorrente do tratamento de ratos com pilocarpina, em doses convulsivas, parece interagir com o sistema serotoninérgico, uma vez que a ativação do receptor serotoninérgico do tipo 5-HT1A pode inibir a estimulação colinérgica, sendo, assim, um mecanismo compensatório para inibir ou cessar as convulsões, já os receptores 5-HT2-símile quando estimulados atuam propagando e estimulando a atividade epiléptica em diferentes as áreas cerebrais (PEROUTKA, 1988).

1.6 FISIOPATOLOGIA E MODELO DE CONVULSÃO

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

No modelo de epilepsia induzido por alta dose de pilocarpina, pode-se observar perda neuronal de algumas áreas cerebrais, a saber: 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; TURSKI et al., 1983a; CLIFFORD et al., 1987; MARINHO et al., 1997; BORELLI et al., 2002, FREITAS et 2006e).

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

Um aumento na expressão de genes de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) no hipocampo foi descrito em amostras cerebrais de pacientes com convulsões (BARANZINI et al., 2002; VEZZANI et al., 2005; RAO et al., 2009). A atividade convulsivante, induzida em modelos experimentais de *Status Epilépticus* ou após aplicação intracerebral de ácido caínico relata um rápido aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias bem como vários marcadores da imunidade inata (citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, fator de transcrição NF κ B, fatores do complemento e moléculas de adesão). Um aumento na expressão de genes de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) no hipocampo foi descrito em amostras cerebrais de pacientes com convulsões (BARANZINI et al., 2002; VEZZANI et al., 2005; RAO et al., 2009).

1.7 INFLAMAÇÃO E EPILEPSIA

A inflamação é conhecida por participar da mediação de um número crescente de transtornos e doenças neurológicas agudas e crônicas. Mesmo assim, o envolvimento da inflamação na patogênese da epilepsia e convulsões induzidas por danos cerebrais foi apreciado só recentemente. Processos inflamatórios, incluindo a ativação da microglia e astrócitos e produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas relacionadas, têm sido descritos em pacientes com epilepsia humana, bem como em modelos experimentais de epilepsia. Convulsões induzidas quimicamente ou eletricamente aumentam citocinas no

cérebro de roedores (JANKOWSKY, et al 2001; OPRICA, et al 2003; TURRIN, et al 2004; PLATA-SALAMAN, et AL 2000; DE SIMONI, et AL 2000; VEZZANI, et AL 2000). Apesar de IL-1 β , TNF- α e IL-6 serem expressos em baixos níveis no cérebro normal, seu mensageiro RNA e os níveis de proteína são rapidamente (≤ 30 min) aumentadas após a indução de convulsões, diminuindo a níveis basal dentro de 48-72 h desde o início de convulsões (DE SIMONI, et AL 2000). Notavelmente, IL-1 β é ainda supra-regulada no cérebro 60 dias após o status epiléptico em ratos com crises espontâneas⁽⁴⁰⁾. Citocinas pró-inflamatórias são induzidas no cérebro também por convulsões audiogênicas e luminosas (GAHRING, et AL 1997; PLATA-SALAMAN, et AL 2000). Síntese de citocinas no cérebro tem sido detectada na microglia e nos astrócitos, apesar de subconjuntos de neurônios do hipocampo expressarem IL-1 β em ratos espontaneamente epiléticos.

Outros estudos mostram a participação de citocinas e mediadores inflamatórios como IL-1, TNF- α , COX-2, PG_{E2}, PG_{F2 α} , PG_{D2}, estando relacionado, inclusive, com processo de neurodegeneração.

O estado inflamatório crônico no cérebro pode predispor à ocorrência de convulsões e perda neuronal de células. A IL-6 em astrócitos mostrou uma sensibilidade aumentada a convulsões induzidas pelos agonistas glutamatérgicos e uma perda constitutiva de γ -aminobutírico (GABA) - e neurônios positivos para albumina no hipocampo, pode estar implicado na propensão a desenvolver convulsões (SAMLAND, et al 2003). A superexpressão de TNF- α e IL-6 no cérebro foi associada com a ocorrência de mudanças neurodegenerativas idade-dependente e crises espontâneas esporádicas (CUNNINGHAM, et AL 1996; PROBERT, et al 1995; CAMPBELL, et AL 1993). Também estudos tem mostrado interações funcionais específicas existem entre as citocinas e PGs, o glutamato e neurotransmissão GABA-mediada, que podem constituir o mecanismo chave interligando a inflamação com epilepsia e interações entre as citocinas e neurotransmissores clássicos (DE SIMONI, et AL 1998), um aumento na sua concentração extracelular pode influenciar a excitabilidade neuronal e da resposta do cérebro a uma lesão.

Em adultos, a epilepsia do lobo temporal (ELT) é o tipo mais comum de epilepsia focal, em que aproximadamente dois terços dos pacientes apresentam esclerose hipocampal (epilepsia mesial temporal, EMT). Nas ELTs, o hipocampo é uma região crítica na manutenção das crises epiléticas e sua fisiopatologia está associada a um padrão bem definido de perda neuronal nos subcampos CA1 e CA3, infiltração de células da glia

(astrogliose) e plasticidade axonal com brotamento de fibras musgosas na camada molecular interna do giro denteado (NGUYEN, 2002).

No hipocampo epiléptico, os genes pró-apoptóticos geralmente são mais expressos nas regiões CA1 e CA3, enquanto os genes anti-apoptóticos são mais expressos nas células granulares do giro denteado (WILDE, et AL 2000).

Evidências de respostas inflamatórias em certas epilepsias motivaram estudos da expressão diferencial de genes envolvidos com o sistema imune (CHENG, et AL 1994). Entre esses, destacam-se as citocinas (IL-1 β , TNF- α and IL-6 e seus respectivos receptores neuronais rIL-1, rTNF e Gp130), mediadores antiinflamatórios (antagonista Ra do receptor IL-1), quimiocinas (MIP-1 α e MCP-1), mediadores inflamatórios (COX-2), moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1) e metaloproteinases (mmp9). Crises epilépticas induzidas química ou eletricamente aumentam os níveis de citocinas e mediadores antiinflamatórios no cérebro de roedores (MATTSON, et al 1995; MINAMI et al 1990 e 1992). Devido à interação funcional que existe entre citocinas e neurotransmissores, o aumento desses mediadores inflamatórios pode influenciar a excitabilidade neuronal e a resposta do cérebro a injúrias (OPRICA, et al 2003). De fato, estudos experimentais em roedores mostram que reações inflamatórias podem levar a uma maior excitabilidade e injúrias neuronais. Além disso, alguns tratamentos com antiinflamatórios reduzem crises epilépticas em modelos experimentais (CHENG, et AL 1994).

A apoptose pode ser deflagrada por estímulos externos por meio da ativação de receptores específicos presentes na superfície celular (*via extrínseca* ou via de receptor de morte celular), chamados de receptores de morte, ou pelo estresse intracelular (*via intrínseca* ou mitocondrial). Ambas as vias culminam com a ativação de caspases que levam à morte celular (BERGANTINI, et al 2005; BERKKANOGLU, et al 2004).

A via apoptótica extrínseca é desencadeada pela interação de ligantes específicos a grupo de receptores cognatos pertencentes à família do fator de necrose tumoral (TNF), capazes de provocar a ativação caspase-3 e, conseqüentemente morte celular (BOATRIGT, et al 2003; GRIVICICH, et al 2007).

O receptor Fas (CD95/APO-1), molécula de superfície celular de 45 kDa pertencente à família do TNF, tem-se tornado paradigma para estudos da via extrínseca da apoptose. Seu ligante (Fas-L/ CD178) é uma proteína de 37 kDa pertencente à superfamília dos TNFs

(BERKKANOGLU, et al 2004; ZHOU, et al 2006; SELAM, et al 2001; OTSUKI Y, et al 2001). O Fas e Fas-L estão envolvidos no processo de morte celular, após a interação do Fas-L na superfície da célula, com o receptor Fas, há formação de agregados na forma de trímeros, que se ligam à proteína adaptadora FADD (*Fas associated death domain*) presente no citoplasma. Este complexo molecular se liga à pró-caspase-8, resultando na formação do complexo DISC (*Death Inducing Signalling Complex*), onde ocorre a ativação (dimerização/clivagem) da pró-caspase-8, resultando na ativação da caspase-3 efetora, o que culmina na morte celular (BOATRRIGHT, et al 2003).

A via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular, como privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia, dentre outros. Em resposta a estes fatores, a mitocôndria sofre modificações de potencial de membrana interna, de permeabilidade de membrana e aumento de densidade de matriz. Estas alterações mitocondriais podem ser cruciais para o disparo da morte, podendo facilitar a translocação de proteínas mitocondriais, bloqueio na síntese de ATP e aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, que leva à oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, além de contribuir para a ativação de caspases-9 e 3. O desarranjo mitocondrial também pode facilitar a liberação de citocromo C para o citoplasma, onde o mesmo forma complexo com o fator de ativação associado à apoptose-1 (APAF-1) e caspase-9, o chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando a caspase-9 ativa, que é capaz de ativar a caspase-3 e provocar a apoptose (BOATRRIGHT, et al 2003; HENGARTNER, et al 2000; GRIVICICH, et al 2007).

Deve-se mencionar que em ambas as vias, a ativação da caspase-3 é o ponto crucial e irreversível do fenômeno de morte celular, ou seja, neste estágio não há mecanismos que possam reverter a apoptose (HENGARTNER, et al 2000).

Evidências mostram que a perda neuronal na epilepsia crônica poderiam em parte ser por apoptose celular, o que caracteriza uma programação de eventos fisiológicos, mas também poderia ocorrer em consequência de insultos tóxicos e doenças neurológicas através da sinalização de múltiplas formas de receptores de morte, disfunção mitocondrial e ativação de enzimas caspases que danificam o DNA (COLLINS et al., 1997; EARNSHAW et al., 1999; ISHIMARU et al., 1999; SASTRY and RAO, 2000).

1.8 MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPILEPSIA INDUZIDO POR PILOCARPINA

Na tentativa de aproximar os modelos animais dos fenômenos observados em humanos, várias técnicas têm sido desenvolvidas mimetizando tipos específicos de epilepsia (revisado por FISHER, 1989). Para que um modelo experimental seja classificado como um modelo de epilepsia ele deve preencher os seguintes requisitos: demonstrar a presença de atividade epileptiforme nos registros eletroencefalográficos e clinicamente apresentar uma atividade semelhante àquelas observadas durante uma crise epiléptica. Em animais geneticamente modificados, o aparecimento das crises epilépticas espontâneas ou induzidas está relacionado com aspectos associados à formação e ao desenvolvimento do sistema nervoso; e em não genéticos, as crises epilépticas são desencadeadas através da estimulação química ou elétrica do sistema nervoso em animais "normais" (MELLO et al., 1986).

Desde a década de 1960, esses modelos experimentais servem como *screening* farmacológico de drogas antiepilépticas (WHITE, 1997), contribuindo, paralelamente, com informações a respeito dos mecanismos envolvidos na gênese e manutenção das crises. A partir das décadas de 1970 e 1980, com o aparecimento de modelos experimentais crônicos induzidos, sendo o principal destes o modelo de *kindling*, os estudos das drogas antiepilépticas se voltaram para a identificação de agentes capazes de prevenir a epileptogênese e/ou diminuir os déficits comportamentais de longa duração decorrentes das crises (Queiroz, et al 2002).

Nas décadas de 1980 e 1990, dois outros modelos foram extensamente utilizados: o modelo da pilocarpina e o modelo do ácido caínico, e ambos replicam características fenomenológicas das epilepsias humanas do lobo temporal (TURSKI et al., 1983; 1989).

A administração local ou sistêmica desses compostos resulta em um padrão de crise límbica duradoura bastante característica (*status epilépticus*), que após um período conhecido como silencioso (de 3 a 14 dias), leva o animal a apresentar crises espontâneas e recorrentes (TURSKI et al., 1983a). A lesão cerebral induzida pelo *status epilepticus* nesses modelos pode ser considerada como equivalente a um evento epileptogênico no ser humano, como, por exemplo, uma convulsão febril.

A administração aguda de altas doses de pilocarpina, agonista muscarínico colinérgico, induz mudanças comportamentais e convulsões que progridem, dentro de uma a duas horas, para *status epilepticus* (SE). O modelo de convulsão com pilocarpina em roedores, especialmente o modelo com ratos, tem fornecido informações sobre características comportamentais e neuroquímicas, associadas com atividade convulsiva, que se assemelham à epilepsia lobo temporal humana.

A fisiopatologia da epilepsia, ainda não estar completamente definida. Os diferentes modelos de convulsão em animais são bastante utilizados para estudar a fisiopatologia do processo convulsivo, uma vez que, reproduz as alterações comportamentais e eletroencefalográficas que são semelhantes à epilepsia do lobo temporal de humanos (BEMARI et al., 1980 e 1981). Estes modelos são utilizados para estudar o envolvimento dos sistemas de neurotransmissores como moduladores da epileptogênese, como também permite observar as alterações comportamentais, histopatológicas, e outros parâmetros neuroquímicos relacionados com a atividade epiléptica (CAVALHEIRO et al., 1994; MARINHO et al., 1997 e 1998; COSTA-LOTUFO et al., 2002; Freitas et 2006e).

No modelo de epilepsia induzido por alta dose de pilocarpina, pode-se observar perda neuronal de algumas áreas cerebrais, a saber: 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; TURSKI et al., 1983a; CLIFFORD et al., 1987; MARINHO et al., 1997; BORELLI et al., 2002, Freitas et 2006e).

A estimulação de determinadas áreas produzem respostas diferentes e conseqüentemente afetam profundamente o comportamento do animal, induzindo processos patológicos, tais como: a epilepsia (MARINHO et al., 1997, FREITAS et al., 2003a; MORAES et al., 2000). Despertando o interesse para se estudar os efeitos da estimulação de quatro áreas deste sistema no processo convulsivo induzido por pilocarpina. As áreas escolhidas foram hipocampo, corpo estriado, córtex frontal e córtex temporal.

De uma maneira geral, as convulsões induzidas por pilocarpina, podem produzir dano neuronais em diversas áreas e, especialmente, nas estruturas límbicas, causando perda neuronal em áreas, como: hipocampo, corpo estriado, amígdala, córtex piriforme, córtex

entorrinal, córtex frontal, tálamo, substância nigra, entre outras (HONCHAR et al., 1983 e 1990; TURSKI et al., 1983a; CLIFFORD et al., 1987).

A literatura registra danos morfológicos em diversas estruturas cerebrais após convulsão e estado epiléptico (EP) (MELLO et al., 1996). As principais alterações que podem ser associadas ao processo convulsivo são: o alargamento dos ventrículos, deformação do giro dentado com moderada dispersão das células granulares e perda neuronal em diversas áreas (hipocampo, córtex cerebral, corpo estriado, córtex piriforme, amígdala, tálamo, núcleo subtalâmico, corpo caloso, córtex motor e área septal). A pilocarpina pode não ser capaz de produzir toxicidade aguda, no entanto, pode induzir neurodegeneração após o estado epiléptico (fase aguda) e nas convulsões recorrentes espontâneas (fase crônica) (MELLO et al., 1996; HOLMES et al., 2004; HOFFMANN, et al., 2006).

O modelo de epilepsia induzido por pilocarpina têm sido extensivamente analisado, uma vez que, exhibe convulsões recorrentes espontâneas e podem esclarecer muitas das alterações vistas na epilepsia do lobo temporal de humanos. As mudanças histopatológicas observadas no hipocampo reproduzem muitas destas alterações em humanos, incluindo perda neuronal e remoção do tecido de sustentação do SNC, bem como permite ainda avaliar a presença de dano neuronal no cérebro de ratos que não apresentaram convulsão (MELLO et al., 1993 e 1996; AVOLI et al., 1994; MARINHO et al., 1997; DE BRUIN et al., 1999; PERSINGER & DUPONT, 2004; KRSEK et al., 2004).

Quadro 2 - Modelos experimentais e sua relação com as diferentes formas das epilepsias no ser humano

MODELO EXPERIMENTAL	TIPO DE EPILEPSIA	SITUAÇÃO
Injeção ou aplicação tópica de metais		
Cobalto (1960)	Epilepsia focal (1)	Semicrônico
Ácido túngstico (1960)	Epilepsia focal (1), grande mal	Agudo
Creme de alúmen (1937)	Epilepsia focal recorrente, pequeno mal e crises de ausência	Semicrônico
Estimulação química		
Penicilina (1945)	Pequeno mal mioclônico, epilepsia corticorreticular generalizada	Agudo
Estricnina (1900)	Crises com foco cortical	Agudo
Ouabaína (1966)	Epilepsia límbica	Agudo
Pentilenotetrazol (1960)	Pequeno mal e crises generalizadas	Agudo
Picrotoxina (1960)	Epilepsias do lobo temporal	Agudo e crônico
Bicuculina (1970)	Epilepsia de longa duração	Agudo e crônico
Substâncias colinomiméticas (1949)	Epilepsias focais e do lobo temporal	Agudo e crônico
Hidrazinas e piridoxais (1949)	Crises generalizadas Agudo Insulina	Agudo
Insulina (1940)	Crises metabólicas	Agudo
Pilocarpina (1983)	Epilepsia de Lobo Temporal	Agudo
Estimulação elétrica		
Eletrochoque (1870)	Epilepsia focal	Agudo
Abrasamento (1969)	Crises parciais e generalizadas, pequeno mal e auras	Agudo e crônico
Neurotoxinas		
Ácido caínico (1970)	Epilepsia do lobo temporal	Agudo e crônico
Ácido ibotênico (1979)	Epilepsia do lobo temporal	Agudo e crônico
Ácido domóico (1987)	Epilepsia do lobo temporal	Agudo e crônico

Fonte: Modificado de Mello et al. (1986)

1.9 FÁRMACOS ANTIEPILEPTICOS

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

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

A grande maioria dos fármacos atualmente utilizados possui boa tolerabilidade, contudo os riscos de morbidade desenvolvidos pelo paciente podem ser, em alguns casos, drásticos. Os benzodiazepínicos consistem na maior classe de fármacos utilizados (principalmente no grande mal), e o diazepam, midazolam, e o bromazepam são os principais representantes desta classe que atuam facilitando a abertura dos canais de cloreto e, desta forma, potencializando as ações do GABA. Outra classe de fármacos são os barbitúricos, que também atuam potencializando os efeitos gabaérgicos e cujos representantes principais são o fenobarbital, muito utilizado em crises generalizadas e juvenis e o pentobarbital, comumente utilizado em modelos experimentais de indução de sono.

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

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

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

Quadro 3 – Mecanismos de ação dos fármacos antiepiléticos

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

1.10 PENTOXIFILINA

A pentoxifilina, 1-(5-oxohexil)-3,7-(dimetilxantina) é uma metilxantina inibidora de fosfodiesterases usada no tratamento de doenças venosas oclusivas periféricas que aumenta a perfusão em tecidos pouco vascularizados (MULLER, 1981; STREITER, 1988; RIENECK 1993) e claudicação intermitente (ACETTO, 1982; PORTER *et al.*, 1982). Este efeito é atribuído a sua capacidade de melhorar a flexibilidade da membrana das hemácias e permitir a sua passagem por capilares menores que seus diâmetros.

A pentoxifilina inibe a fosfodiesterase IV e promove elevação dos níveis intracelulares de AMPc reduzindo, assim, a atividade fagocítica, produção de íon superóxido e liberação de enzimas lisossomais por células porlimofonucleares (BESSLER *et al.*, 1986).

Alguns estudos apontam que o aumento da concentração intracelular de AMPc inibe a síntese de TNF- α *in vitro* (TANNENBAUM and HAMILTON, 1989; TAFFET *et al.*, 1989). Vários autores relatam a atividade anti-tumoral da pentoxifilina (TEICHER *et al.*, 1991; RIENECK 1993; CHING *et al.*, 1998; SAMPAIO *et al.*, 1998; MARQUES *et al.*, 1999). Há estudos que sugerindo que a pentoxifilina além de inibir o TNF- α inibe, também, a transcrição de seu gene, afetando a transcrição da sua síntese (HEN-I, *et al.*, 2004) além de aumentar a degradação do RNAm para tal citocina (STRIETER *et al.* 1988).

Há evidências crescentes de que pentoxifilina também altera a produção e atividade de outras citocinas como: IL-1 (SULLIVAN *et al.*, 1988; NEUNER, *et al.*, 1994), IL-2 (THANHÄUSER *et al.*, 1993, ALEGRE *et al.*, 1991; RIENECK, 1993), IL-6 (SCHANDENE *et al.*, 1992; NEUNER, *et al.*, 1994), IFN- γ (THANHÄUSER *et al.*, 1993; RIENECK, 1993).

Em humanos, após administração oral, a pentoxifilina é rapidamente absorvida. Preparações orais possuem apenas 20 a 30% de biodisponibilidade por causa do alto clearance de primeira passagem. Em voluntários saudáveis pentoxifilina é eliminada da circulação com uma meia vida de eliminação de 0.9 horas após administração oral e cerca de 1 a 1.6 horas após administração intravenosa. As transformações metabólicas são responsáveis pela baixa e variável biodisponibilidade da droga, e menos de 1% da dose é excretada de forma inalterada na urina. Além da transformação metabólica observada no fígado o próprio sangue pode ser capaz de metabolizar pentoxifilina. Sete metabólitos de pentoxifilina são conhecidos, mas hidroxipentoxifilina e carboxipentoxifilina são os 2 compostos mais presente em humanos (SMITH *et al.*, 1986).

Numerosos estudos com pentoxifilina demonstraram sua segurança e efeitos adversos mínimos mesmo quando administrada durante longos períodos. Estudos farmacocinéticos com pentoxifilina IV em indivíduos saudáveis mostraram que os efeitos adversos predominantes da pentoxifilina foram náuseas e vômitos assim como nos indivíduos com distúrbios hematológicos (WINDMEIER e GRESSNER, 1997).

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A epilepsia é uma condição neurológica grave de maior prevalência no mundo e que pode induzir a dificuldade na execução das atividades profissionais do paciente (GILLIAM et al., 2004). A incidência da epilepsia varia de acordo com a localização geográfica. Ela ocorre com maior frequência nos países em desenvolvimento, onde há maior índice de desnutrição, doenças infecciosas, deficiência no atendimento médico e carência no tratamento (DE LORENZO et al., 2001).

Em países mais desenvolvidos, a incidência é de aproximadamente 1%, ou seja, cinquenta milhões de pessoas são portadoras desta condição, aumentando para 2% em nações menos desenvolvidas, tornando-se um grave problema de saúde pública (BEAGLEHOLE et al., 1996).

Estima-se que o número de novos casos por ano está em torno de dois milhões em todo o mundo. Pelo menos 50% dos casos começam na infância ou adolescência, e sabe-se que, 70% a 80% das pessoas com epilepsia podem ter uma vida normal sem prejuízo social e psicológico se tiverem um tratamento e um acompanhamento psicológico adequado (BEAGLEHOLE et al., 1996).

Inúmeras pesquisas visam descobrir novas estratégias farmacológicas antiepiléptica através de novos compostos eficazes para a epilepsia de difícil controle ou de compostos com menor toxicidade para aquelas já tratadas pelo arsenal terapêutico atualmente disponível (BOECK et al., 2004; PISANI et al., 2004; EYAL et al., 2004).

Nosso grupo demonstrou ação neuroprotetora da cafeína, uma xantina, em modelo animal de Doença de Parkinson (AGUIAR, 2006). Diversos autores têm mostrado ação neuroprotetora da pentoxifilina em modelos de isquêmica cerebral (BRUNO et al., 2009).

Embora a terapia padrão possibilite o controle das crises convulsivas em 70-80% desses pacientes, 20-30% dos indivíduos apresentam uma epilepsia não controlada, justificando portanto, a necessidade de se estudar os processos convulsivos, como também estudar novas drogas como possíveis agentes farmacológicos para o tratamento da epilepsia.

A Pentoxifilina tem se mostrado candidata potencial à terapia da epilepsia por promover diminuição da excitotoxicidade mediada por glutamato, potencialização dos receptores da dopamina e inibição da resposta neuroinflamatória. Contudo, muitos estudos são necessários para se determinar os mecanismos neuroprotetores desta droga que sejam realmente eficazes no controle da epilepsia nos pacientes e na melhora da qualidade de vida, o que justifica a relevância deste estudo.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliação dos efeitos neuroprotetores da Pentoxifilina sobre a fase aguda do processo convulsivo induzido por pilocarpina ou pentilenotetrazol em ratos

3.2 Objetivos específicos

Avaliação dos efeitos neuroprotetores nos modelos de convulsão tônico-clônica induzido por pentilenotetrazol e lobo temporal induzido por pilocarpina.

Determinação dos aspectos comportamentais como: latência de 1ª convulsão e latência de morte.

Determinação dos níveis de aminoácidos e monoaminas, bem como seus metabólitos em córtex frontal, temporal, hipocampo e corpo estriado.

Determinação dos níveis glicêmicos

Determinação do TNF- α para imunohistoquímica

produzidos nos animais pré-tratados com pentoxifilina e induzido convulsão com pilocarpina.

4. Materiais e Métodos

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso variando entre 180 e 220g, provenientes do Biotério Central do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará. O projeto foi submetido ao comitê de Ética e Pesquisa Animal (CEPA) da Universidade Federal do Ceará com número de protocolo: 107/11.

Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com no máximo 06 animais, em condições ambientais semelhantes, com ciclo claro / escuro alternado de 12 horas, recebendo ração padrão tipo Purina e água *ad libitum*.

4.2 Drogas e Materiais utilizados

4.2.1 Pentoxifilina

Pentoxifilina (Trental®) dissolvido em água destilada, obtendo-se uma solução com concentração de 10mg/mL.

4.2.2 Pilocarpina

Cloridrato de pilocarpina (Sigma Chemical Co.,USA) dissolvida em água destilada, obtendo-se uma concentração final de 100mg/mL.

4.2.3 Pentilenotetrazol

Pentilenotetrazol (Sigma Chemical Co.,USA) dissolvida em água destilada, obtendo-se uma concentração final de 100mg/mL.

4.3 Tratamento dos Grupos Experimentais

Ratos albinos Wistar (180-220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg (PTX25+P400 e PTX 50+P400) ou água destilada por via oral (Normal e P400). Após 60 minutos foi administrado Pilocarpina 400mg/Kg por via intraperitoneal.

Quadro 4. Droga utilizada e via de administração

Droga	Dose	Via de Administração	Abreviatura
Pentoxifilina	25mg/Kg	Via oral	PTX 25
	50mg/Kg	Via oral	PTX 50
Pilocarpina	400mg/Kg	Via intraperitoneal	P 400
Pentilenotetrazol	80mg/Kg	Via intrapeitoneal	PTZ 80

Quadro 5. Grupos Experimentais

Grupos Experimentais	Drogas Utilizadas
Grupo Normal	Água destilada
Controle P400	Pilocarpina 400mg/Kg
PTX 25 + P400	Pentoxifilina 25mg/Kg + Pilocarpina 400mg/Kg
PTX 50 + P400	Pentoxifilina 50mg/Kg + Pilocarpina 400mg/Kg

Observações comportamentais foram realizadas após os tratamentos e os animais foram observados durante três horas. Os animais que não sobreviveram até o final do período de observação foram decapitados logo após a morte e os sobreviventes foram sacrificados por decapitação logo após estudo comportamental. Córtex frontal, hipocampo, corpo estriado e córtex temporal foram imediatamente dissecados sobre gelo e armazenados à -80°C para realização de estudos neuroquímicos.

4.4 Estudo Comportamental

Nas convulsões induzidas por pilocarpina ou pentilenotetrazol os animais tratados e controles foram divididos em gaiolas contendo de 3 a 4 animais e colocados em ambiente reservado, sendo feita a observação direta. Todos os grupos experimentais foram observados durante 3 horas após a injeção de pilocarpina ou pentilenotetrazol, de acordo com o tratamento previsto. Nos animais que receberam pentilenotetrazol observamos a latência de primeira convulsão, latência de morte e taxa de sobrevida em 24 horas. Nos animais que receberam pilocarpina os seguintes parâmetros foram observados: presença de sinais colinérgicos periféricos, movimentos estereotipados, convulsões motoras, instalação de estado

epiléptico, número de mortes, latência de primeira convulsão e latência de morte em cada grupo. O quadro abaixo apresenta estes parâmetros juntamente com suas características. Depois desse período de observação, as áreas cerebrais dissecadas foram utilizadas para os estudos neuroquímicos.

Quadro 6. Parâmetros comportamentais

Parâmetros	Características
Sinais colinérgicos periféricos	Miose, cromodaciorréia, piloereção, diarreia
Movimentos estereotipados	Aumento das atividades de roer, coçar-se, mastigar e “wet-dog shakes” (ato de sacudir – semelhante a um cachorro molhado).
Convulsões	Tônico – clônica.
Estado epiléptico	Convulsões intermitentes.
Latência de primeira convulsão	Intervalo de tempo em segundos entre a injeção de pilocarpina e o aparecimento da primeira convulsão.
Latência de morte	Intervalo de tempo em segundos entre a injeção de pilocarpina e a morte do animal.
Nº de mortes	Determinado durante o período de 3 hora após a administração de pilocarpina.

Fonte: adaptado de Turski et al., 1983

4.5 Dissecção de áreas cerebrais

Após as determinações comportamentais os animais foram decapitados com uma guilhotina (Harvard, USA). Em seguida, os encéfalos foram rapidamente retirados e colocados sobre papel alumínio numa placa de petri com gelo para posterior dissecção das áreas cerebrais a serem estudadas.

Córtex frontal, hipocampo, corpo estriado e córtex temporal foram isolados das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma pinça de microdissecção, sendo a sua retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex.

Terminada a dissecação, a área isolada foi colocada em eppendorf devidamente identificado, pesada e conservada a -80°C para uso posterior. Quando foi necessária a estocagem por certo período de tempo (até seis meses) os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação que os ensaiados imediatamente realizados após dissecação (BURKE e GREENBAUN, 1987; FIELDER et al., 1987).

4.6 Material utilizado nos Experimentos

- Agitador de tubos (modelo 251, FANEN, São Paulo, Brasil);
- Balança analítica (modelo H5, Mettler, Suíça); Banho maria (FANEN, modelo 102/1, SP, Brasil);
- Balança para animais (Filizola ID 1500, Brasil);
- Centrífuga refrigerada (modelo Eppendorf);
- Cubetas para leitura em espectrofômetro (Sarstedt, Alemanha Oriental);
- Equipamento de HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance – Detector eletroquímico (Shimadzu, Japão), constando de: Detector eletroquímico (Modelo L-ECD-6A; Shimadzu, Japão) e Eletrodo de Carbono (Shimadzu); Degaseificador (DGU-2A Shimadzu, Japão); Integrador (C-R6A Chromatopac, Shimadzu, Japão); Injetor (Shimadzu Corp., Japão);
- Equipamento para filtração a vácuo (Millipore Apparatus, Bedford, MA, EUA);
- Espectrofotômetro (Modelo Beckman DU, Fullerton, CA, USA) com medidor de absorvância digital e outros acessórios (acoplado ao sistema de modernização Gilford, Oberlin, Ohio, USA);
- Estufa de secagem e esterilização (modelo 315 SE FANEN, SP, Brasil);
- Freezer – 80°C (Modelo ULT 2586 – 3D14, Revco Scientific, Inc. Asheville, N.C., EUA);
- Guilhotina (Harvard, USA);
- Homogeneizadores (Bellico, USA);
- Material Cirúrgico;
- Micropipetas (H.E. Pedersen, Dinamarca);
- Medidor de pH, modelo B374 (Micronal, SP, Brasil);
- Sonicador (Modelo PT 10-35 (Brinkmann Instruments Inc. NY, EUA).

4.7 Dosagem de aminoácidos com HPLC

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para determinação dos níveis de aminoácidos, foram retiradas as áreas cerebrais correspondentes ao córtex frontal, hipocampo, corpo estriado e córtex temporal para a posterior preparação dos homogenatos. Para a preparação do homogenato, foi utilizado um volume de 10% da área em ácido perclórico 0,1M.

MÉTODO

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

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

PREPARO DOS PADRÕES DOS AMINOÁCIDOS

Todos os aminoácidos foram preparados nas concentrações de 2,5 mmol/L ou 2,5 mM. Glutamato, aspartado, glicina, taurina e GABA foram solubilizados em ácido perclórico 0,1 M. O ácido perclórico foi preparado adicionando 1,8 mL do ácido e completado o volume para 300 mL com água mili-Q.

PREPARO DAS AMOSTRAS:

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

SOLUÇÃO DE DERIVATIZAÇÃO:

13.5mg de OPA foi dissolvido em 250 μ l de etanol, juntamente com 10 μ l de 2-mercaptoetanol, o volume da solução foi então completado para 2.25ml com tampão borato, pH 9,3. A solução foi filtrada com o milipore 0.22 μ m. A solução foi acondicionada em vidro

âmbar no refrigerador, por no máximo uma semana. Para as derivatizações, 20µl da amostra foi diluída em 20µl de OPA e injetada no HPLC após um minuto de agitação.

DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA DE AMINOÁCIDOS (AA) POR GRADIENTE

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

FASE MÓVEL A:

- 50 mM NaH₂PO₄
- Volume final = 250 ml
- 20% v/v MetOH
- pH = 5.5

FASE MÓVEL B:

- Metanol puro (Padrão HPLC)

DERIVATIZAÇÃO PRÉ-COLUNA

TAMPÃO BORATO

- Bórax 1,24g
- Água Mili Q
- Ajustar o pH para 9,3 (com NaOH ou HCL)
- Volume final = 50 ml

4. 8 Dosagem de monoaminas e metabólitos com HPLC

MÉTODO

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

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

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

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram decapitados três horas após a injeção de pilocarpina e imediatamente, tiveram seus cérebros dissecados sobre gelo. O córtex frontal, hipocampo, corpo estriado e córtex temporal foram utilizados para preparar homogenatos a 10%. Os tecidos cerebrais foram sonicados em ácido perclórico (HClO_4) por trinta segundos e centrifugados por vinte minutos em centrífuga refrigerada a 14.000 rpm. O sobrenadante foi filtrado em filtro milipore 0,22 μm . Uma alíquota de 20 μL desse sobrenadante foi, então, injetada no equipamento HPLC para análise química.

Para a análise das monoaminas, uma coluna CLC-ODS (M) com comprimento de 25cm, calibre 4,6mm e diâmetro da partícula de 3 μm , da Shimadzu-Japão, foi utilizada. A fase móvel utilizada foi composta por tampão ácido cítrico 0,163M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico, 0,60M (SOS), como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4% v/v e tetrahydrofurano 1,7% v/v. Noradrenalina (NA), Dopamina (DA), Ácido diidroxifenilacético (DOPAC), 5-hidroxitriptamina (5-HT) e Ácido Homovanílico (HVA) foram eletronicamente detectados usando um detector amperométrico (Modelo L-ECD-6A da Shimadzu, Japão) pela oxidação em um eletrodo de carbono vítreo fixado em 0,85 V relativo a um eletrodo de referência Ag-AgCl.

SOLUÇÕES REAGENTES

- Fase Móvel

Foram pesados 15,75g de ácido cítrico (grupo química, RJ, Brasil) e completado para um volume de 400mL com água puríssima (Milli-Q). esta solução foi ajustada para pH 3,0 com hidróxido de sódio 12,5 M (Reagen, RJ Brasil). A esta solução foi adicionado o SOS 75 mg (Sigma, MO, EUA) e completado o volume para 471,5 mL com água Milli-Q. Em seguida, foi procedida à filtração e degaseificação, e posteriormente adição de 20mL de acetonitrila (Carlo erba Reagenti, ML, Itália) e 10 mL de tetrahidrofurano (Sigma, MO, EUA) para um volume final de 500mL.

ÁCIDO PERCLÓRICO 0,1M

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

PADRÕES

Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4ng de NA, DA, DOPAC, 5-HT, HVA (Sigma, MO, EUA). A partir da altura ou área dos picos desses padrões, as concentrações de monoaminas nos tecidos foram calculadas no programa *Microsoft Excel*® em um computador e os resultados expressos em ng/g de tecido.

4.9 Análise da glicemia com espectrofotômetro

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Uma hora após a injeção de pilocarpina, foi coletado uma alíquota de sangue, através do plexo orbital para posterior análise dos níveis glicêmicos na fase aguda do processo convulsivo utilizando o kit Labtest Glicose PAP Liquiform®.

AMOSTRA

Na realização da coleta de sangue foi utilizado heparina sódica para evitar a coagulação das amostras de sangue. As amostras foram mantidas resfriadas em gelo e

centrifugadas a temperatura de 4°C, 12000 rpm por 15min. O plasma (analito) foi retirado para medição dos níveis de glicose.

5. Estudo Histopatológico

5.1 Dissecção das Áreas Cerebrais

Cérebros de ratos tratados e controles foram submetidos à análise histopatológica. Após as três horas de observação comportamental, os animais foram decapitados, os cérebros removidos e fixados em formalina a 10% por 24 horas. Cortes sagitais, feitos em intervalos de 1 mm, foram obtidos a partir de um corte inicial ao nível do quiasma óptico.

Para estudo microsscópico, secções de 5 µm foram feitas, coradas em Cresil Violeta ou imunoenensaio para Fator de Necrose Tumoral (TNF-α) e analisadas com auxílio de um microscópio óptico. As áreas cerebrais foram observadas e classificadas de acordo com o Atlas de Paxinos & Watson (1986).

Para análise das lesões nas estruturas, foram observados os seguintes parâmetros: aspectos normais semelhantes aos controles ou a presença de células tumefeitas, núcleos picnóticos, morte celular e vacuolização.

5.2 Coloração de Nissl com Cresil Violeta

Solução de Cresil Violeta:

- 2,5 g de acetato de cresil violeta
- 500 ml de água destilada
- 10 ml de ácido acético 25%
- Aquecer a mistura de cresil com água até 40°C, agitando-a por 5 minutos
- Filtrar a solução final em papel filtro
- Acrescentar o ácido acético até que o pH da solução esteja entre 3 e 3,5

Coloração:

Após montar os slices em lâminas gelatinadas (ou silanizadas), esperar secar bem por aproximadamente 20 minutos e mergulhar as lâminas em:

Quadro 7. Procedimento para Coloração Cresil Violeta

SOLUÇÃO	TEMPO DE IMERSÃO
Hidratação do Tecido	
Xilol I	3 minutos
Xilol II	3 minutos
Álcool 100% I	3 minutos
Álcool 100% II	3 minutos
Álcool 95%	3 minutos
Álcool 70%	3 minutos
Álcool 50%	3 minutos
Água destilada	2 minutos c/ mergulhos
Coloração do Tecido	
Cresil violeta	1 a 7 minutos
Água destilada	2 minutos c/ mergulhos
Desidratação do Tecido	
Álcool 50%	2 minutos
Álcool 70%	2 minutos
Álcool 95%	2 minutos
Álcool 100% I	2 minutos
Álcool 100% II	2 minutos
Xilol I	2 minutos
Xilol II	2 minutos

- Secar bem
- Montar em meio de montagem aquoso (Entelan)

Análise das Lâminas

- Analisar em microscópio de luz os cortes obtidos e corados e comparar com o Atlas de sistema nervoso de ratos (Paxinos), a fim de tentar identificar alguns núcleos e regiões específicos do sistema nervoso.
- Comparar os cortes obtidos pelos diferentes grupos e identificar diferenças morfológicas entre os cortes.

5.3 Imunoensaio para Fator de Necrose Tumoral (TNF- α)

A imunohistoquímica para TNF- α foi realizada seguindo a metodologia da estreptavidina-biotina-peroxidase.

A parafina foi extraída dos slices nas lâminas que foram então hidratados em xilol e álcool e imerso em tampão citrato 0,1 M (pH 6,0) sob o calor promovido por microondas durante 15 minutos para recuperação antigênica.

Após o resfriamento obtido por temperatura ambiente por 20 minutos, lavagens sequenciais das lâminas em tampão fosfato salina (PBS) foram realizadas.

Estas lavagens foram alternadas com bloqueio da peroxidase endógena em solução de H₂O₂ a 3% (15 minutos).

As lâminas foram incubadas durante a noite (4°C) com os anticorpos primários anti-TNF- α diluído em PBS com soro albumina bovina a 5% (PBS-BSA). Após a lavagem no dia seguinte as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário biotilado anti-IgG diluído em PBS-BSA, durante 30 minutos.

Após outra lavagem, as lâminas foram incubadas com o complexo peroxidase streptavidina conjugada (ABC Vectastatin ®) por 30 minutos. Uma lavagem final foi feita com PBS e, em seguida, foi feito um procedimento de coloração com o cromogen 3,3 diaminobenzidina peróxido (DAB), seguido de contra-coloração com hematoxilina de Mayer.

No final, as lâminas foram desidratadas. Controle negativo foi processado e também o anticorpo primário foi substituído por PBS-BSA 5%.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados com ANOVA seguidos de Student-Newman-Keuls como *post hoc*. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas em $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 Estudo Comportamental

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

7.2 Comportamento de ratos adultos observados durante 3 horas após administração de pilocarpina.

Cerca de cinco minutos após a administração de Pilocarpina, 400mg/Kg, i.p. (P400) os animais mostraram sinais colinérgicos periféricos (miose, piloereção, cromodaciorréia, salivação, diarreia, diurese, tremores), e movimentos estereotipados (aumento da atividade de roer, coçar, mastigar e *wet-dog shakes* – ato de sacudir semelhante a um cachorro molhado), seguidos por convulsões motoras límbicas. Essas mudanças foram mais pronunciadas nos grupos pré-tratados com Pentoxifilina. (**Tabela 01**).

Tabela 1. Porcentagem de alterações comportamentais induzida por Pilocarpina (P400) em ratos Wistar machos pré-tratados com Pentoxifilina (PTX25+P400 e PTX50+P400) e Ácido Valpróico (Ác. Valpróico 100 + P400).

Alterações Comportamentais (%)	P400	PTX25+P400	PTX50+P400	Ác. Valpróico 100 + P400
Número de animais	37	35	34	6
SCP*	100	100	100	100
ME**	100	100	100	100
Convulsões	91,9 (34)	88,6 (31)	88,2 (30)	66,7 (4)
Morte	89,2 (33)	80 (28)	76,5 (26)	16,7 (1)

P400 (n=37); PTX25+P400 (n=35); PTX50+P400 (n=34) e Ác. Valpróico 100+P400 (animais pré-tratados com Ácido Valpróico 100mg/Kg v.o. após 01 hora tratados com Pilocarpina 400mg/Kg, i.p.; n=6). *SCP: Sinais colinérgicos periféricos: miose, piloereção, cromodacriorréia, salivação, diarreia, diurese, tremores. **ME: Movimentos estereotipados: aumento da atividade de roer, coçar, mastigar e o ato de sacudir.

7.2.1 Latência de Primeira Convulsão de ratos adultos observados durante 3 horas após administração de Pilocarpina.

Poucos minutos após a administração de Pilocarpina, 400mg/Kg, i.p. (P400) os animais mostraram sinais colinérgicos periféricos (miose, piloereção, cromodaciorréia, salivação, diarreia, diurese, tremores), e movimentos estereotipados (aumento da atividade de roer, coçar, mastigar e *wet-dog shakes* – ato de sacudir semelhante a um cachorro molhado), seguidos por convulsões motoras límbicas.

Durante o período de observação (03 horas após administração de Pilocarpina, 400mg/Kg, i.p.), podemos verificar que o tempo em segundos decorrido para o aparecimento da primeira convulsão foi significativamente aumentado no grupo PTX25+P400, quando comparado ao grupo controle (P400), $p < 0,01$. (Controle P400 = $1033 \pm 51,98$ segundos; grupo PTX25+P400 = $1221 \pm 98,38$ segundos). Não houve diferença significativa entre o grupo controle (P400) e o grupo PTX50+P400, porém houve diferença significativa entre o grupo PTX25+P400 e PTX50+P400, $p < 0,05$. (grupo PTX25+P400 = $1221 \pm 98,38$ segundos; grupo PTX50+P400 = $1169 \pm 84,6$ segundos). Sinais colinérgicos periféricos e movimentos estereotipados permaneceram inalterados em todos os grupos pré-tratados com Pentoxifilina. Nenhum animal, dos grupos que receberam apenas água destilada ou apenas Pentoxifilina apresentou atividade convulsiva (**Figura 1**).

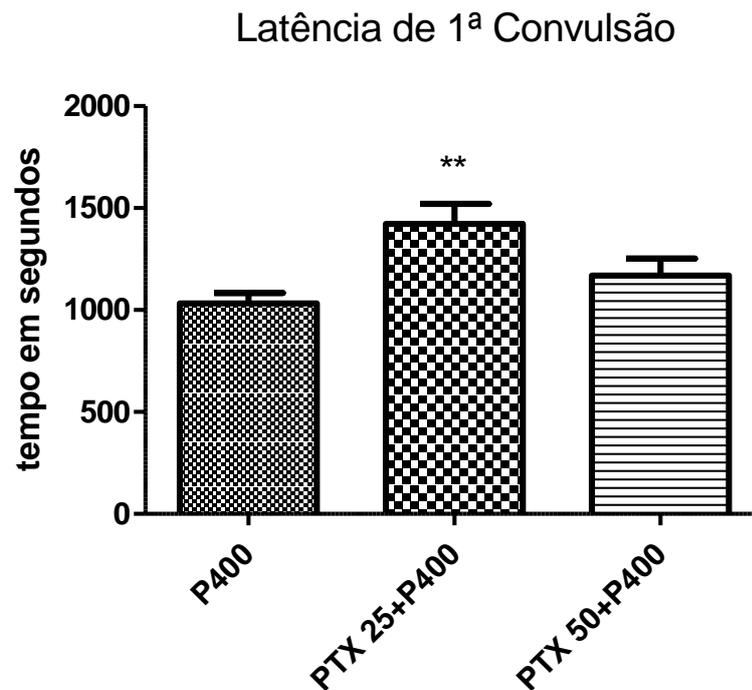


Figura 1. Latência de 1ª Convulsão após administração de pilocarpina (P400) em ratos Wistar machos pré-tratados com pentoxifilina (PTX25+P400 e PTX50+P400).

Ratos Wistar machos (180-220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina (25 e 50mg/Kg, v.o.) e após 01 hora foi induzida a convulsão com Pilocarpina (400mg/Kg, i.p.). O grupo controle foi pré-tratado com água destilada (0,5mL, v.o.) e após 01 hora foi induzida a convulsão com Pilocarpina (400mg/Kg, i.p.). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. As barras representam média \pm E.P.M. (P400, n=34; PTX25+P400, n=31; PTX50+P400, n=30). ** $p < 0,01$ comparado ao grupo controle. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

7.2.2 Taxa de Sobrevivência de ratos adultos observados durante 24 horas após administração de Pilocarpina.

Durante os estudos comportamentais, foi analisada a taxa de sobrevivência (número de animais que sobrevivem 24 horas após administração de Pilocarpina). Os grupos pré-tratados com Pentoxifilina e o grupo pré-tratado com água destilada receberam após 01 hora injeção intraperitoneal de Pilocarpina 400mg/Kg, i.p. e permaneceram em observação durante 24 horas para determinação do número de mortes e da porcentagem de animais que sobreviveram após indução de convulsão com Pilocarpina. **(Tabela 02).**

Tabela 2. Número de Mortes e porcentagem de sobrevivência, após administração de pilocarpina, na presença ou ausência de pentoxifilina, em ratos.

Grupos	Nºmortes/Nºanimais	Morte 24h (%)	Sobrevivência 24h (%)
P400	6/8	75	25
PTX25+P400	3/7	43	57
PTX50+P400	3/7	43	57

P400 (n=8); PTX25+P400 (n=7); PTX50+P400 (n=7)

7.3 Latência de Primeira Convulsão de ratos adultos observados durante 3 horas após administração de Pentilenotetrazol.

Cerca de 1 a 2 minutos após a administração de Pentilenotetrazol, 80mg/Kg, i.p. (PTZ80) os animais apresentaram convulsão clônicas.

Durante o período de observação (03 horas após administração de Pentilenotetrazol, 80mg/Kg, i.p.), podemos verificar que o tempo em segundos decorrido para o aparecimento da primeira convulsão foi significativamente aumentado nos grupos pré-tratados com Pentoxifilina (PTX25+PTZ80 e PTX50+PTZ80), quando comparado ao grupo controle (PTZ80). (Controle PTZ80 = $91,80 \pm 6,565$ segundos; grupo PTX25+PTZ80 = $231,2 \pm 33,49$ segundos; PTX50+PTZ80 = $342,9 \pm 54,70$). (**Figura 2**).

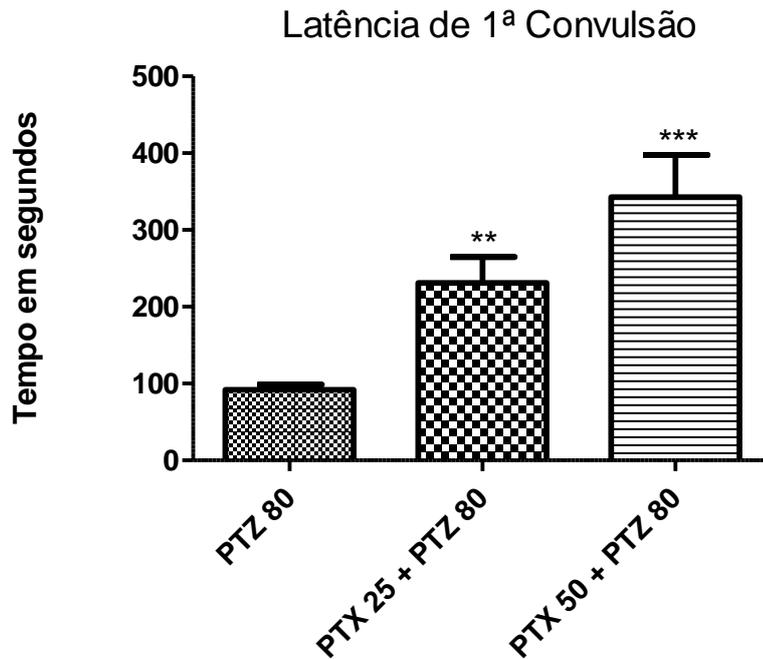


Figura 2. Latência de 1ª Convulsão após administração de pentilenotetrazol (PTZ80) em ratos Wistar machos pré-tratados com pentoxifilina (PTX25+PTZ80 e PTX50+PTZ80).

Ratos Wistar machos (180-220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina (25 e 50mg/Kg, v.o.) e após 01 hora foi induzida a convulsão com Pentilenotetrazol (80mg/Kg, i.p.). O grupo controle foi pré-tratado com água destilada (0,5mL, v.o.) e após 01 hora foi induzida a convulsão com Pentilenotetrazol (80mg/Kg, i.p.). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. As barras representam média \pm E.P.M. (PTZ80, n=20; PTX25+PTZ80, n=20; PTX50+PTZ80, n=17). *** p<0,001 comparado ao grupo controle. ** p<0,01 quando comparado ao grupo controle. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

7.3.1 Taxa de Sobrevivência de ratos adultos observados durante 24 horas após administração de Pentilenotetrazol.

Durante os estudos comportamentais, foi analisada a taxa de sobrevivência (número de animais que sobrevivem 24 horas após administração de Pentilenotetrazol). Os grupos pré-tratados com Pentoxifilina e o grupo pré-tratado com água destilada receberam após 01 hora injeção intraperitoneal de Pentilenotetrazol 80mg/Kg, i.p. e permaneceram em observação durante 24 horas para determinação do número de mortes e da porcentagem de animais que sobreviveram após indução de convulsão com Pentilenotetrazol. Durante o período de observação foi analisado a presença convulsões clônicas, morte, taxa de sobrevivência em 24 horas, bem como latência de primeira convulsão. (**Tabela 03**).

Tabela 3. Número de Mortes e porcentagem de sobrevivência, após administração de pentilenotetrazol, na presença ou ausência de pentoxifilina, em ratos.

Grupos	Nº convulsões/Nºanimais	Nºmortes/Nºanimais	Morte 24h (%)	Sobrevivência 24h (%)
PTZ80	14/14	14/14	100	0
PTX25+PTZ80	14/14	9/14	64	36
PTX50+PTZ80	7/14	4/14	29	71

Ratos Wistar machos (180 – 220g) grupo PTZ80 (animais pré-tratados com água destilada, v.o. após 01 hora tratados com Pentilenotetrazol 80mg/Kg, i.p.; n=14); grupo PTX25+PTZ80 (animais pré-tratados com Pentoxifilina 25mg/Kg, v.o. após uma hora 01 hora tratados com Pentilenotetrazol 80mg/Kg, i.p.; n=14); grupo PTX50+PTZ80 (animais pré-tratados com Pentoxifilina 50mg/Kg, v.o. após uma hora 01 hora tratados com Pentilenotetrazol 80mg/Kg, i.p.; n=14).

7.4 Estudos neuroquímicos – Aminoácidos. (HPLC)

7.4.1 Efeitos do pré-tratamento com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg sobre a concentração de aminoácidos em córtex frontal de ratos adultos após a administração da Pilocarpina 400mg/kg (P400).

Os resultados das determinações dos níveis de aminoácidos em córtex frontal de ratos adultos tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/Kg, v.o., após 01 hora injetado Pilocarpina 400mg/Kg, i.p., e sacrificados 03 horas depois foram expressos em nmol/grama de tecido, e apresentados nas figuras 3 a 7.

Determinação dos Níveis de Aspartato no Córtex Frontal

A figura 3 mostra os resultados da determinação dos níveis de aspartato no córtex frontal dos animais nos diversos grupos estudados. Não houve diferenças significativas nos níveis de aspartato no córtex frontal dentre os diversos grupos estudados, apesar de haver uma tendência a redução no grupo PTX25+P400. Normal ($15,83 \pm 1,492$ nmol/g de tecido); P400 ($15,13 \pm 1,824$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($12,54 \pm 0,6115$ nmol/g de tecido) e PTX50+P400 ($15,33 \pm 1,346$ nmol/g de tecido). (**Figura 3**).

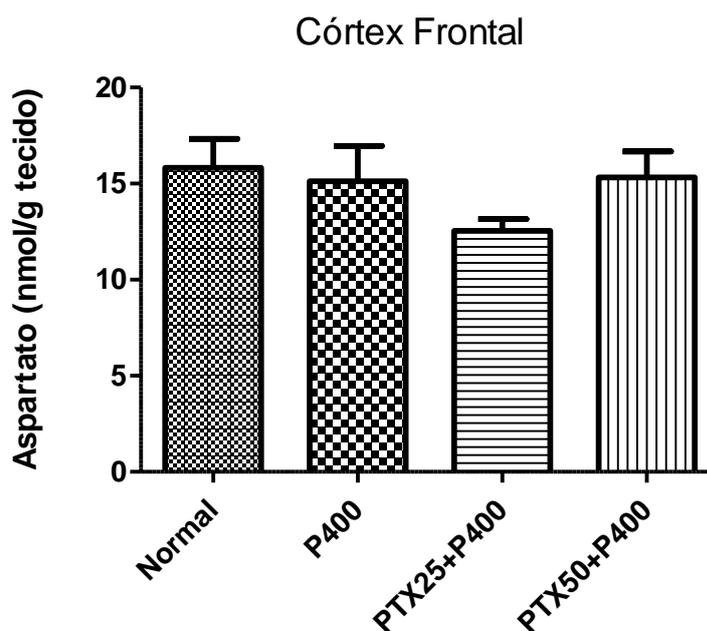


Figura 3. Efeitos da Pentoxifilina sobre as Concentrações de Aspartato (nmol/g de tecido) em córtex frontal de ratos no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora com Pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de Pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de aspartato foi determinada em 20 μ L de homogenato. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Determinação dos Níveis de Glutamato no Córtex Frontal

A figura 4 mostra uma redução significativa ($p < 0,001$) nos níveis de glutamato nos grupos pré-tratados com Pentoxifilina nas duas doses estudadas (PTX25+P400 e PTX50+P400) em relação ao grupo controle (P400) e ao grupo normal (pré-tratado com água destilada, 0,5mL, v.o. e após 01 hora tratados com solução salina, 0,5mL, i.p.). Normal ($4,840 \pm 0,4869$ nmol/g de tecido); P400 ($6,082 \pm 0,6377$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($0,8217 \pm 0,1487$ nmol/g de tecido) e PTX50+P400 ($1,448 \pm 0,2376$ nmol/g de tecido). **(Figura 4).**

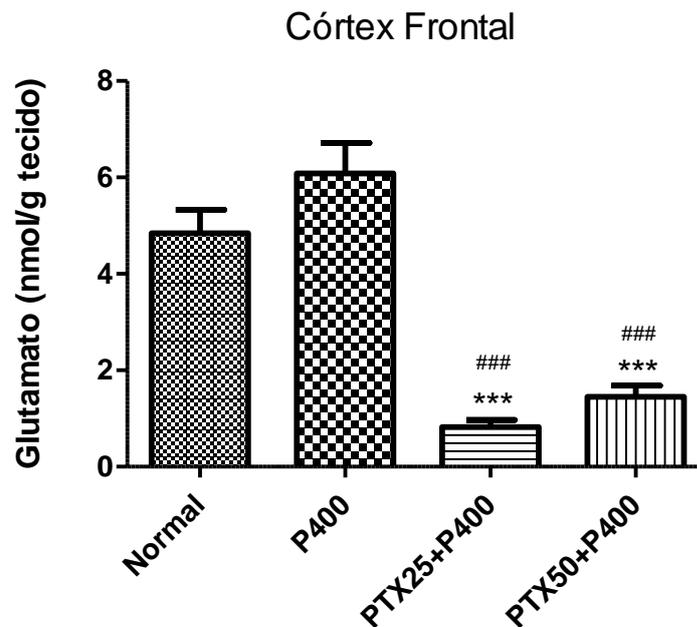


Figura 4. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Glutamato (nmol/g de tecido) em Córtex Frontal de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora com pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de glutamato foi determinada em 20 μ L de homogenato. *** p<0,001 comparado ao grupo P400. ### p<0,001 quando comparado ao grupo Normal. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Determinação dos Níveis de Glicina no Córtex Frontal

A figura 5 mostra um aumento significativo nos níveis de glicina no grupo P400 em comparação com o grupo Normal ($p < 0,01$); grupo PTX25+P400 ($p < 0,001$) e grupo PTX50+P400 ($p < 0,01$). Os níveis de glicina foram significativamente reduzidos no grupo PTX25+P400 a valores abaixo do grupo Normal ($p < 0,5$), já o grupo PTX50+P400 manteve os níveis de glicina próximos dos níveis do grupo Normal. Normal ($15,11 \pm 1,179$ nmol/g de tecido); P400 ($21,98 \pm 2,068$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($7,641 \pm 1,657$ nmol/g de tecido) e PTX50+P400 ($12,44 \pm 1,727$ nmol/g de tecido). (**Figura 5**).

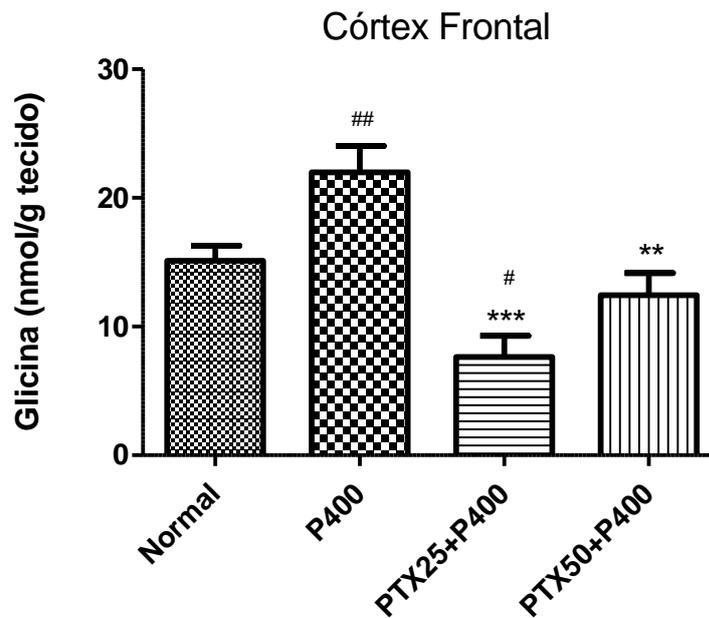


Figura 5. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Glicina (nmol/g de tecido) em Córtex Frontal de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora com pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de glicina foi determinada em 20 μ L de homogenato. *** p<0,001 comparado ao grupo P400. ** p<0,01 comparado ao grupo P400. ## p<0,01 comparado ao grupo Normal. # p<0,05 comparado ao grupo Normal. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Determinação dos Níveis de Taurina no Córtex Frontal

De acordo com a figura 6, houve um aumento significativo nos níveis de taurina no córtex frontal dos animais submetidos ao modelo de convulsão induzido por pilocarpina quando comparado ao grupo Normal. Podemos observar um aumento significativo no grupo PTX50+P400 quando comparado ao grupo P400 ($p < 0,01$). Normal ($1,812 \pm 0,6493$ nmol/g de tecido); P400 ($6,749 \pm 0,7761$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($5,323 \pm 0,7976$ nmol/g de tecido) e PTX50+P400 ($10,91 \pm 1,293$ nmol/g de tecido). (**Figura 6**).

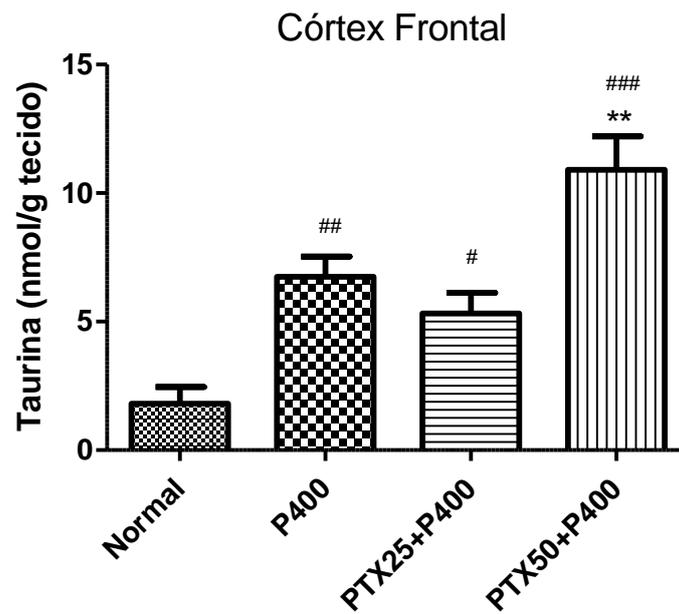


Figura 6. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Taurina (nmol/g de tecido) em Córtex Frontal de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora com pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de taurina foi determinada em 20 μ L de homogenato. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Normal. ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo Normal. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Normal. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo P400. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Determinação dos Níveis de GABA no Córtex Frontal

Como podemos observar na figura 16, houve uma redução significativa nos níveis de GABA nos grupos PTX25+P400 e PTX50+P400 quando comparados com o grupo Normal e P400. Normal ($13,15 \pm 1,071$ nmol/g de tecido); P400 ($12,08 \pm 0,7109$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($8,053 \pm 0,3986$ nmol/g de tecido) e PTX50+P400 ($9,446 \pm 0,7388$ nmol/g de tecido). **(Figura 7).**

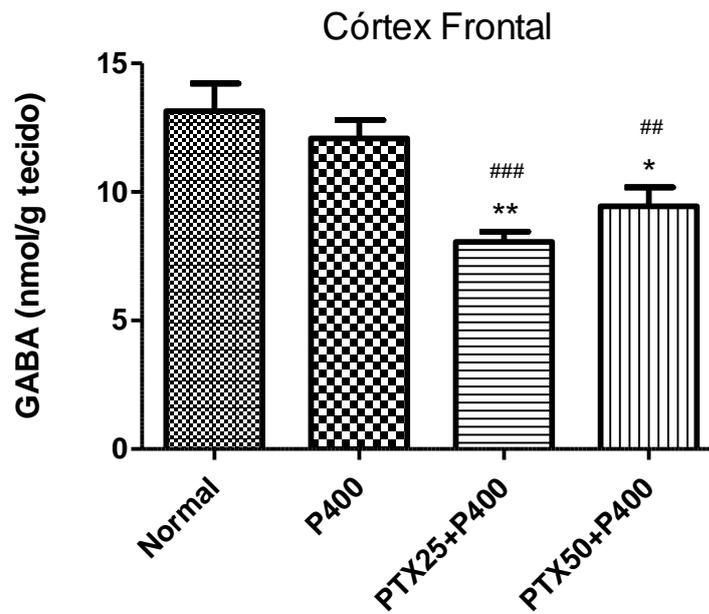


Figura 7. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de GABA (nmol/g de tecido) em Córtex Frontal de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora com pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de GABA foi determinada em 20 μ L de homogenato. ^{###} p<0,01 quando comparado ao grupo Normal. ^{###} p<0,001 quando comparado ao grupo Normal. * p<0,5 quando comparado ao grupo P400. ** p< 0,01 quando comparado ao grupo P400. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Tabela 04. Efeitos do pré-tratamento com pentoxifilina (25 e 50mg/kg) sobre as concentrações de aminoácidos em Córtex Frontal de ratos submetidos a convulsões induzidas por pilocarpina 400 mg/kg (P400).

Grupo	CONCENTRAÇÕES DE AMINOÁCIDOS (nmol/g de tecido)				
	Aspartato	Glutamato	Glicina	Taurina	GABA
Normal	15,83 ± 1,5	4,840 ± 0,5	15,11 ± 1,2	1,812 ± 0,7	13,15 ± 1,1
P400	15,13 ± 1,8	6,082 ± 0,6	21,98 ± 2,1	6,749 ± 0,8	12,08 ± 0,7
PTX25+P400	12,54 ± 0,6	0,8217 ± 0,2*	7,641 ± 1,7*	5,323 ± 0,8	8,053 ± 0,4*
PTX50+P400	15,33 ± 1,3	1,448 ± 0,2*	12,44 ± 1,7*	10,91 ± 1,3*	9,446 ± 0,7*

* Significativo em relação ao grupo controle P400.

Ratos Wistar machos foram tratados ou não com pentoxifilina (25 e 50mg/kg, v.o.) ou água destilada (0,5ml, v.o.), após uma hora, estes animais receberam a dose única de pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). Imediatamente após a morte, os cérebros desses animais foram dissecados e retirados o córtex frontal sob o gelo para em seguida realização da determinação dos aminoácidos. (ANOVA e Student-Newman-Keuls como teste *post-hoc*).

7.4.2 Efeitos do pré-tratamento com pentoxifilina 25 e 50mg/kg sobre a concentração de aminoácidos em Córtex Temporal de ratos adultos após a administração da pilocarpina 400mg/kg (P400).

Os resultados das determinações dos níveis de aminoácidos em córtex temporal de ratos adultos tratados com pentoxifilina 25 e 50mg/Kg, v.o., após 01 hora injetado pilocarpina 400mg/Kg, i.p., e sacrificados 03 horas depois foram expressos em nmol/grama de tecido, e apresentados nas figuras 8 a 12.

Determinação dos Níveis de Aspartato no Córtex Temporal

A figura 8 mostra os resultados da determinação dos níveis de aspartato no córtex temporal dos animais nos diversos grupos estudados. Observou-se uma redução significativa nos grupos pré-tratados com pentoxifilina (PTX25+P400 e PTX50+P400) com relação ao grupo P400. Os níveis de aspartato reduziram nos grupos pré-tratados com pentoxifilina (PTX25+P400 e PTX50+P400) a próximo dos níveis normais quando comparado ao grupo Normal. Normal ($10,00 \pm 1,017$ nmol/g de tecido); P400 ($18,09 \pm 2,020$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($7,847 \pm 1,767$ nmol/g de tecido) e PTX50+P400 ($8,181 \pm 1,345$ nmol/g de tecido). **(Figura 8).**

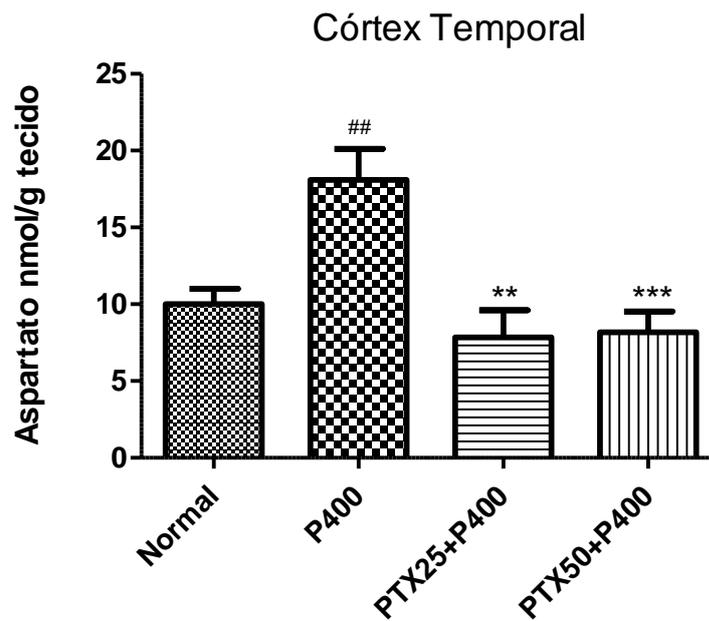


Figura 8. Efeitos da Pentoxifilina sobre as Concentrações de Aspartato (nmol/g de tecido) em córtex temporal de ratos no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora administrado pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de aspartato foi determinada em 20 μ L de homogenato. ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo P400. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo P400. ## $p < 0,01$ quando comparado ao grupo NORMAL. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Determinação dos Níveis de Glutamato no Córtex Temporal

A figura 9 mostra redução significativa nos níveis de glutamato no córtex temporal de ratos pré-tratados com ambas as doses de pentoxifilina (25 e 50mg/Kg, v.o.) quando comparado com o grupo controle P400 (pilocarpina, 400mg/Kg, i.p.). Os níveis de glutamato aumentaram significativamente no grupo controle P400 (pilocarpina, 400mg/Kg, i.p.) quando comparado com o grupo Normal (animais pré-tratados com água destilada, v.o. e após uma hora administrado solução salina de cloreto de sódio 0,9%, i.p.). Os níveis de glutamato no grupo PTX50+P400 mantiveram-se próximo dos níveis normais e no grupo PTX25+P400 houve uma redução significativa quando comparado com o grupo Normal. Normal ($4,097 \pm 0,2925$ nmol/g de tecido); P400 ($9,436 \pm 0,7165$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($2,057 \pm 0,2098$ nmol/g de tecido); PTX50+P400 ($3,851 \pm 0,5436$ nmol/g de tecido). (**Figura 9**).

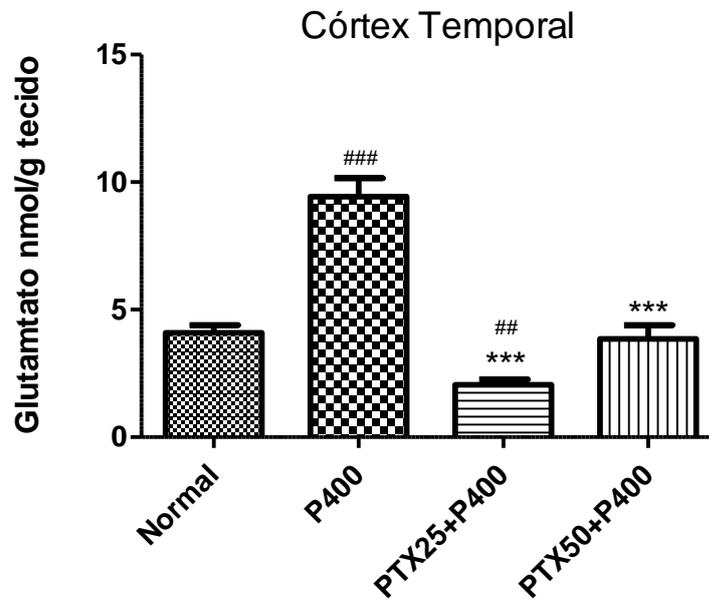


Figura 9. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Glutamato (nmol/g de tecido) em Córtex Temporal de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora administrado pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de glutamato foi determinada em 20 μ L de homogenato. *** p<0,001 comparado ao grupo P400. ### p<0,001 quando comparado ao grupo Normal. ## p<0,01 quando comparado ao grupo Normal. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Determinação dos Níveis de Glicina no Córtex Temporal

Houve um aumento significativo nos níveis de glicina no grupo P400 (pilocarpina, 400mg/Kg, i.p.) quando comparado com o grupo Normal. Os níveis de glicina reduziram significativamente no grupos pré-tratados com pentoxifilina (PTX25+P400 e PTX50+P400) a valores abaixo dos níveis normais quando comparado com os grupos P400 e Normal. Normal ($15,07 \pm 2,177$ nmol/g de tecido); P400 ($23,93 \pm 2,085$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($7,288 \pm 0,6068$ nmol/g de tecido); PTX50+P400 ($8,199 \pm 1,233$ nmol/g de tecido). **(Figura 10).**

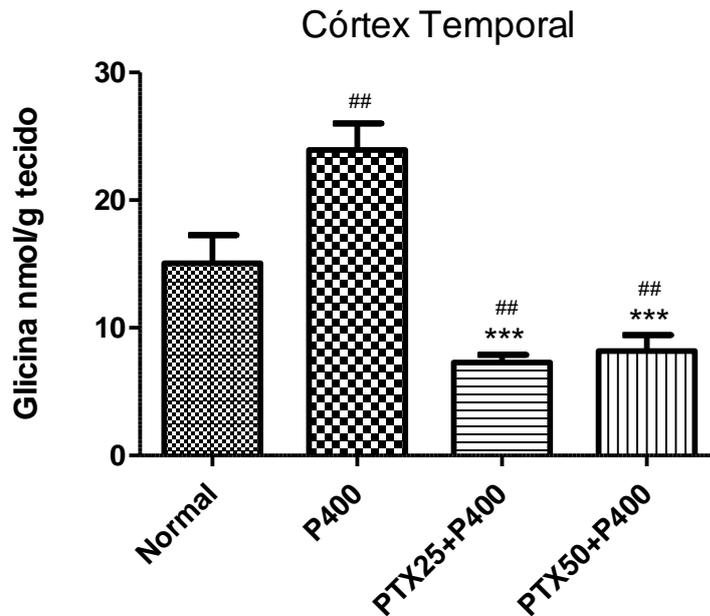


Figura 10. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Glicina (nmol/g de tecido) em Córtex Temporal de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora com pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de glicina foi determinada em 20 μ L de homogenato. *** p<0,001 comparado ao grupo P400. ## p<0,01 comparado ao grupo Normal. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Determinação dos Níveis de Taurina no Córtex Temporal

De acordo com a figura 11 observamos um aumento significativo nos níveis de taurina no grupo P400 (pilocarpina, 400mg/Kg, i.p.) quando comparado com o grupo Normal. Nos grupos PTX25+P400 e PTX50+P400 (pentoxifilina, 25 e 50mg/Kg, v.o.) houve uma redução significativa nos níveis de taurina quando comparado com o grupo P400. Os níveis de taurina permaneceram próximo dos níveis normais nos grupo PTX25+P400 e PTX50+P400, pois não houve diferença significativa nos grupos pré-tratados com pentoxifilina quando comparado com o grupo Normal. Normal ($4,797 \pm 0,7102$ nmol/g de tecido); P400 ($6,674 \pm 0,6620$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($3,537 \pm 0,5015$ nmol/g de tecido); PTX50+P400 ($4,159 \pm 0,2143$ nmol/g de tecido). (**Figura 11**).

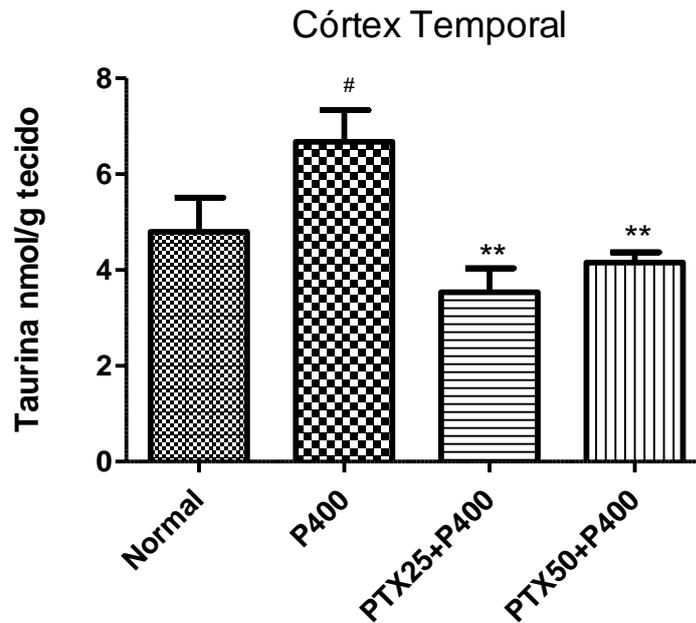


Figura 11. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Taurina (nmol/g de tecido) em Córtex Temporal de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora administrado pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de taurina foi determinada em 20 μ L de homogenato. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Normal. ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo P400. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Determinação dos Níveis de GABA no Córtex Frontal

Não houve diferença significativa entre os grupos previamente tratados com pentoxifilina (25 e 50mg/Kg, v.o.) e os grupos controle P400 (pilocarpina, 400mg/Kg, i.p.) e Normal (solução salina 0,9%, i.p.). Houve diferença significativa, entre o grupo PTX50+P400 quando comparado ao grupo PTX25+P400. Normal ($10,05 \pm 1,193$ nmol/g de tecido); P400 ($8,931 \pm 1,312$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($7,137 \pm 0,9399$ nmol/g de tecido); PTX50+P400 ($11,44 \pm 0,8185$ nmol/g de tecido). (**Figura 12**).

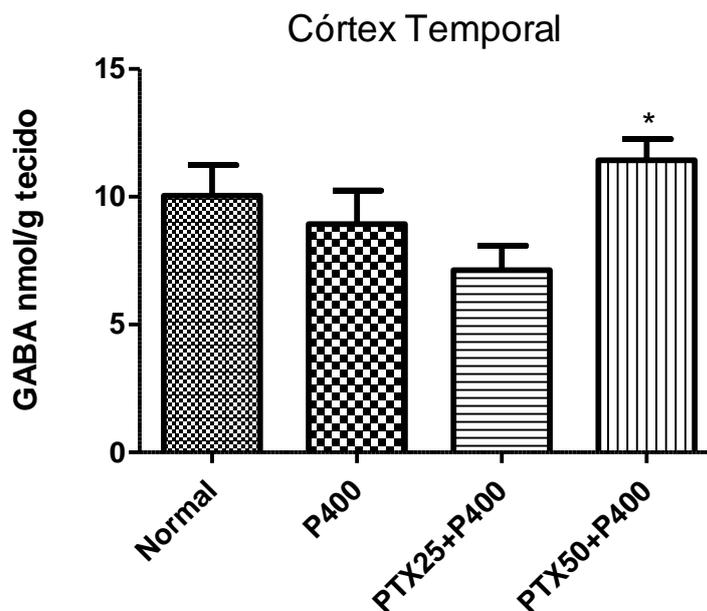


Figura 12. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de GABA (nmol/g de tecido) em Córtex Temporal de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora administrado pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de GABA foi determinada em 20 μ L de homogenato. * $p < 0,5$ quando comparado ao grupo PTX25+P400. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Tabela 05. Efeitos do pré-tratamento com pentoxifilina (25 e 50mg/kg) sobre as concentrações de aminoácidos em Córtex Temporal de ratos submetidos a convulsões induzidas por pilocarpina 400 mg/kg (P400).

CONCENTRAÇÕES DE AMINOÁCIDOS (nmol/g de tecido)					
Grupo	Aspartato	Glutamato	Glicina	Taurina	GABA
Normal	10,00 ± 1,0	4,097 ± 0,3	15,07 ± 2,2	4,797 ± 0,7	10,05 ± 1,2
P400	18,09 ± 2,0	9,436 ± 0,7	23,93 ± 2,1	6,674 ± 0,7	8,931 ± 1,3
PTX25+P400	7,847 ± 1,8*	2,057 ± 0,2*	7,288 ± 0,6*	3,537 ± 0,5*	7,137 ± 0,9
PTX50+P400	8,181 ± 1,4*	3,851 ± 0,5*	8,199 ± 1,2*	4,159 ± 0,2*	11,44 ± 0,8

* Significativo em relação ao grupo controle P400.

Ratos Wistar machos foram tratados ou não com pentoxifilina (25 e 50mg/kg, v.o.) ou água destilada (0,5ml, v.o.), após uma hora, estes animais receberam a dose única de pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). Imediatamente após a morte, os cérebros desses animais foram dissecados e retirados o córtex temporal sob o gelo para em seguida realização da determinação dos aminoácidos. (ANOVA e Student-Newman-Keuls como teste *post-hoc*).

7.4.3 Efeitos do pré-tratamento com pentoxifilina 25 e 50mg/kg sobre a concentração de aminoácidos em Hipocampo de ratos adultos após a administração da pilocarpina 400mg/kg (P400).

Os resultados das determinações dos níveis de aminoácidos em hipocampo de ratos adultos tratados com pentoxifilina 25 e 50mg/Kg, v.o., após 01 hora injetado pilocarpina 400mg/Kg, i.p., e sacrificados 03 horas depois foram expressos em nmol/grama de tecido, e apresentados nas figuras 13 a 17.

Determinação dos Níveis de Aspartato no Hipocampo

A figura 13 mostra os resultados da determinação dos níveis de aspartato no hipocampo dos animais nos diversos grupos estudados. Observou-se uma redução significativa nos grupos pré-tratados com pentoxifilina (PTX25+P400 e PTX50+P400) e no grupo controle P400 com relação ao grupo Normal. Os níveis de aspartato tiveram significativo aumento no grupo PTX25+P400 quando comparado com o grupo P400. Normal ($6,988 \pm 0,7711$ nmol/g de tecido); P400 ($1,110 \pm 0,09764$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($3,326 \pm 0,4723$ nmol/g de tecido) e PTX50+P400 ($2,011 \pm 0,07514$ nmol/g de tecido). **(Figura 13).**

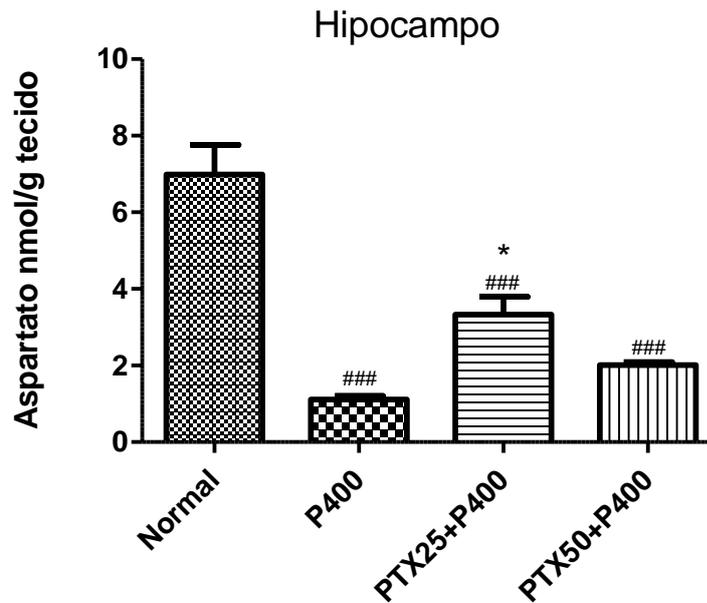


Figura 13. Efeitos da Pentoxifilina sobre as Concentrações de Aspartato (nmol/g de tecido) em Hipocampo de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora administrado pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de aspartato foi determinada em 20 μ L de homogenato. * $p < 0,05$ quando comparado com o grupo P400. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Normal. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Determinação dos Níveis de Glutamato no Hipocampo

A figura 14 mostra redução significativa nos níveis de glutamato no hipocampo de ratos pré-tratados com ambas as doses de pentoxifilina (25 e 50mg/Kg, v.o.) e no grupo controle P400 quando comparado com o grupo Normal. Normal ($2,532 \pm 0,3598$ nmol/g de tecido); P400 ($0,5995 \pm 0,1114$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($0,8649 \pm 0,1749$ nmol/g de tecido); PTX50+P400 ($0,9082 \pm 0,07345$ nmol/g de tecido). **(Figura 14)**.

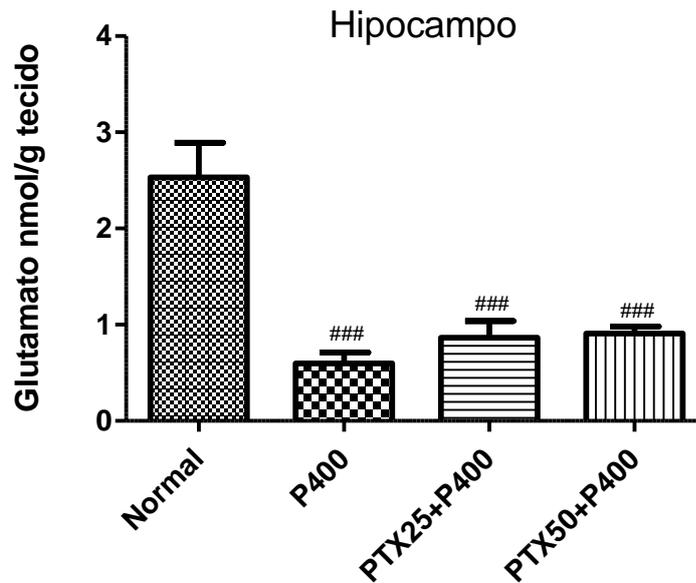


Figura 14. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Glutamato (nmol/g de tecido) em Hipocampo de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora administrado pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de glutamato foi determinada em 20 μ L de homogenato. ### p<0,001 quando comparado ao grupo Normal. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Determinação dos Níveis de Glicina no Hipocampo

Conforme os resultados obtidos e demonstrados através da figura 15 há uma redução significativa nos níveis de glicina no grupo P400 (pilocarpina, 400mg/Kg, i.p.) quando comparado com o grupo Normal. Os níveis de glicina reduziram significativamente no grupo pré-tratado com pentoxifilina (50mg/Kg, v.o.) quando comparado com os grupos Normal. Houve um aumento significativo nos níveis de glicina no grupo PTX25+P400 (pentoxifilina, 25mg/Kg, v.o.) quando comparado com o grupo controle P400 (pilocarpina, 400mg/Kg, i.p.). Houve diferença significativa entre os grupos pré-tratados com pentoxifilina 25mg/Kg (PTX25+P400) e 50mg/Kg (PTX50+P400) $p < 0,001$. Normal ($7,253 \pm 0,8846$ nmol/g de tecido); P400 ($2,220 \pm 0,3090$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($9,162 \pm 0,9292$ nmol/g de tecido); PTX50+P400 ($1,393 \pm 0,1723$ nmol/g de tecido). (**Figura 15**).

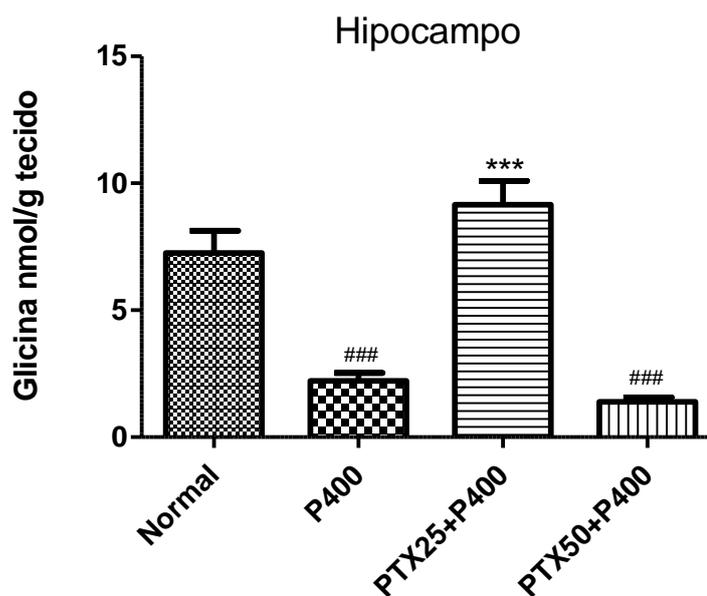


Figura 15. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Glicina (nmol/g de tecido) em Hipocampo de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora com pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de glicina foi determinada em 20 μ L de homogenato. *** p<0,001 comparado ao grupo P400. ### p<0,001 comparado ao grupo Normal. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Determinação dos Níveis de Taurina no Hipocampo

De acordo com a figura 16, observamos uma redução significativa nos níveis de taurina no grupo P400 (pilocarpina, 400mg/Kg, i.p.) quando comparado com o grupo Normal. Nos grupos PTX25+P400 e PTX50+P400 (pentoxifilina, 25 e 50mg/Kg, v.o.) houve um aumento significativo nos níveis de taurina quando comparado com o grupo P400. Os níveis de taurina permaneceram próximo dos níveis normais no grupo PTX50+P400 e aumentaram significativamente no grupo PTX25+P400 quando comparado com o grupo Normal. Houve diferença significativa entre os grupos pré-tratados com pentoxifilina 25mg/Kg e 50mg/Kg com $p < 0,001$. Normal ($2,662 \pm 0,4780$ nmol/g de tecido); P400 ($0,6514 \pm 0,2148$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($5,220 \pm 0,7426$ nmol/g de tecido); PTX50+P400 ($2,342 \pm 0,1812$ nmol/g de tecido). **(Figura 16).**

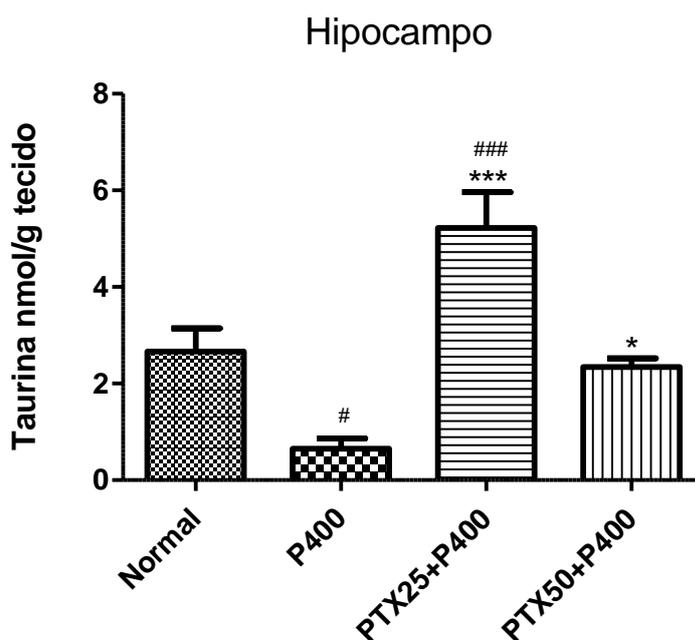


Figura 16. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Taurina (nmol/g de tecido) em Hipocampo de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora administrado pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de taurina foi determinada em 20 μ L de homogenato. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Normal. ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Normal. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo P400. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo P400. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Determinação dos Níveis de GABA no Hipocampo

De acordo com a figura 17, observamos uma redução significativa nos níveis de GABA no grupo P400 (pilocarpina, 400mg/Kg, i.p.) quando comparado com o grupo Normal (solução salina 0.9%, i.p.). Houve um aumento significativo nos níveis de GABA em ambos os grupos pré-tratados com pentoxifilina (PTX25+P400 e PTX50+P400) quando comparados com o grupo P400. O aumento nos níveis de GABA manteve-se próximo dos níveis normais no grupo PTX25+P400 (pentoxifilina, 25mg/Kg, v.o.) quando comparado com o grupo Normal. O grupo PTX50+P400 (pentoxifilina, 50mg/Kg, v.o.) obteve níveis reduzidos de GABA quando comparado com o grupo Normal. Houve diferença significativa entre os grupos pré-tratados com pentoxifilina (PTX25+P400 PTX50+P400) com $p < 0,001$. Normal ($6,238 \pm 0,2077$ nmol/g de tecido); P400 ($1,045 \pm 0,03755$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($6,394 \pm 0,5660$ nmol/g de tecido); PTX50+P400 ($2,936 \pm 0,3129$ nmol/g de tecido). (**Figura 17**).

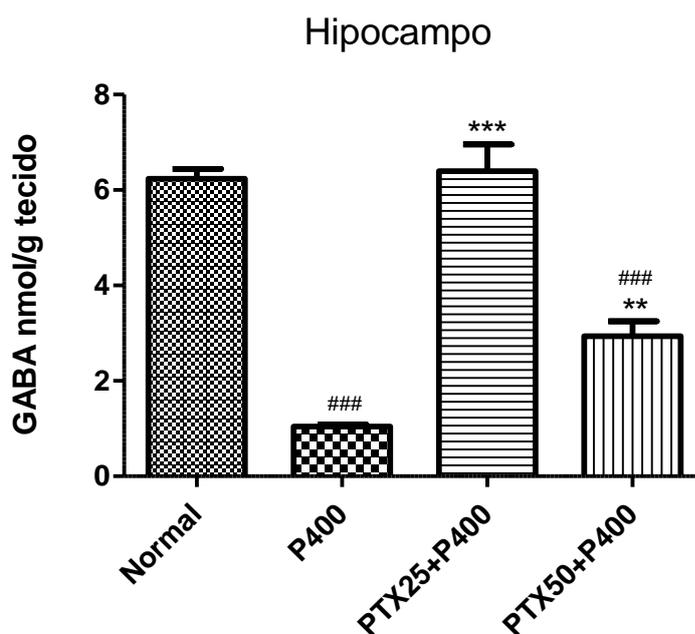


Figura 17. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de GABA (nmol/g de tecido) em Hipocampo de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora administrado pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de GABA foi determinada em 20 μ L de homogenato. ### p<0,001 quando comparado ao grupo Normal. *** p<0,001 quando comparado ao grupo P400. ** p<0,01 quando comparado ao grupo P400. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Tabela 06. Efeitos do pré-tratamento com pentoxifilina (25 e 50mg/kg) sobre as concentrações de aminoácidos em Hipocampo de ratos submetidos a convulsões induzidas por pilocarpina 400 mg/kg (P400).

CONCENTRAÇÕES DE AMINOÁCIDOS (nmol/g de tecido)					
Grupo	Aspartato	Glutamato	Glicina	Taurina	GABA
Normal	6,988 ± 0,8*	2,532 ± 0,4*	7,253 ± 0,9*	2,662 ± 0,5*	6,238 ± 0,2*
P400	1,110 ± 0,1	0,5995 ± 0,1	2,220 ± 0,3	0,6514 ± 0,2	1,045 ± 0,04
PTX25+P400	3,326 ± 0,5*	0,8649 ± 0,2	9,162 ± 0,9*	5,220 ± 0,7*	6,394 ± 0,6*
PTX50+P400	2,011 ± 0,1	0,9082 ± 0,1	1,393 ± 0,2	2,342 ± 0,2*	2,936 ± 0,3*

* Significativo em relação ao grupo controle P400.

Ratos Wistar machos foram tratados ou não com pentoxifilina (25 e 50mg/kg, v.o.) ou água destilada (0,5ml, v.o.), após uma hora, estes animais receberam a dose única de pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). Imediatamente após a morte, os cérebros desses animais foram dissecados e retirados o hipocampo sob o gelo para em seguida realização da determinação dos aminoácidos. (ANOVA e Student-Newman-Keuls como teste *post-hoc*).

7.4.4 Efeitos do pré-tratamento com pentoxifilina 25 e 50mg/kg sobre a concentração de aminoácidos em Corpo Estriado de ratos adultos após a administração da pilocarpina 400mg/kg (P400).

Os resultados das determinações dos níveis de aminoácidos em corpo estriado de ratos adultos tratados com pentoxifilina 25 e 50mg/Kg, v.o., após 01 hora injetado pilocarpina 400mg/Kg, i.p., e sacrificados 03 horas depois foram expressos em nmol/grama de tecido, e apresentados nas figuras 18 a 22.

Determinação dos Níveis de Aspartato no Corpo Estriado

A figura 18 mostra os resultados da determinação dos níveis de aspartato no corpo estriado dos animais nos diversos grupos estudados. Observou-se uma redução significativa no grupo PTX50+P400 (pentoxifilina, 50mg/Kg, v.o.) com relação ao grupo Normal (solução salina 0,9%, i.p.). Normal ($9,434 \pm 0,9675$ nmol/g de tecido); P400 ($7,332 \pm 0,5682$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($7,345 \pm 0,7569$ nmol/g de tecido) e PTX50+P400 ($6,252 \pm 0,3252$ nmol/g de tecido). (**Figura 18**).

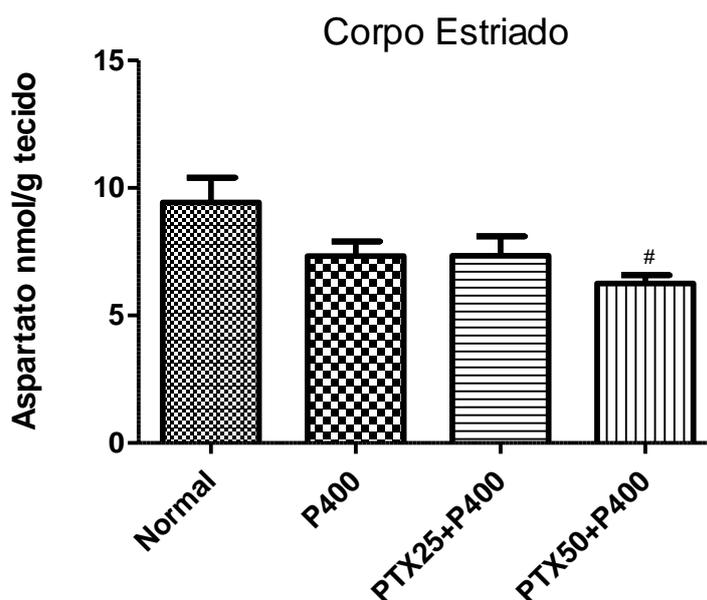


Figura 18. Efeitos da Pentoxifilina sobre as Concentrações de Aspartato (nmol/g de tecido) em Corpo Estriado de ratos no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora administrado pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de aspartato foi determinada em 20 μ L de homogenato. # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Normal. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Determinação dos Níveis de Glutamato no Corpo Estriado

A figura 19 mostra os resultados da determinação dos níveis de glutamato no corpo estriado dos animais nos diversos grupos estudados. Observou-se um aumento significativo nos níveis de glutamato no corpo estriado do grupo controle P400 (pilocarpina, 400mg/Kg, i.p.) quando comparado ao grupo Normal (solução salina 0,9%, i.p.). Houve uma redução significativa nos níveis de glutamato nos grupos pré-tratados com pentoxifilina (25 e 50mg/Kg, v.o.) quando comparado com o grupo controle P400. Não houve diferença significativa entre os grupos pré-tratados com pentoxifilina (PTX25+P400 e PTX50+P400) e o grupo Normal. Normal ($2,297 \pm 0,4707$ nmol/g de tecido); P400 ($4,639 \pm 0,6076$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($1,190 \pm 0,1468$ nmol/g de tecido); PTX50+P400 ($0,9558 \pm 0,08296$ nmol/g de tecido). (**Figura 19**).

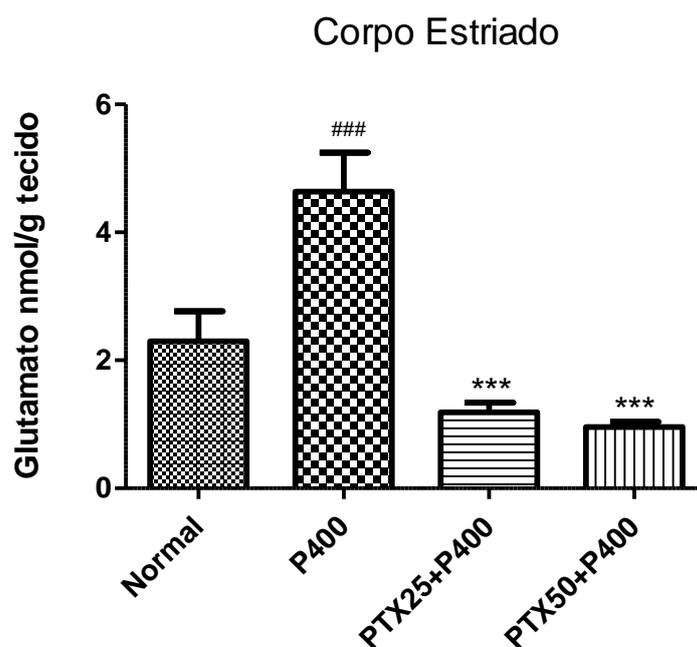


Figura 19. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Glutamato (nmol/g de tecido) em Corpo Estriado de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora administrado pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de glutamato foi determinada em 20 μ L de homogenato. ### p<0,001 quando comparado ao grupo Normal. *** p<0,001 quando comparado ao grupo P400. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Determinação dos Níveis de Glicina no Corpo Estriado

Conforme demonstrado através da figura 20 há um aumento significativo nos níveis de glicina no grupo P400 (pilocarpina, 400mg/Kg, i.p.) quando comparado com o grupo Normal. Os níveis de glicina reduziram significativamente nos grupos pré-tratados com pentoxifilina (25 e 50mg/Kg, v.o.) quando comparado com o grupo P400. Não houve uma diferença significativa nos níveis de glicina nos grupos PTX25+P400 e PTX50+P400 quando comparado com o grupo Normal. Normal ($8,317 \pm 1,927$ nmol/g de tecido); P400 ($14,29 \pm 1,390$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($9,108 \pm 0,3694$ nmol/g de tecido); PTX50+P400 ($6,483 \pm 0,3384$ nmol/g de tecido). **(Figura 20).**

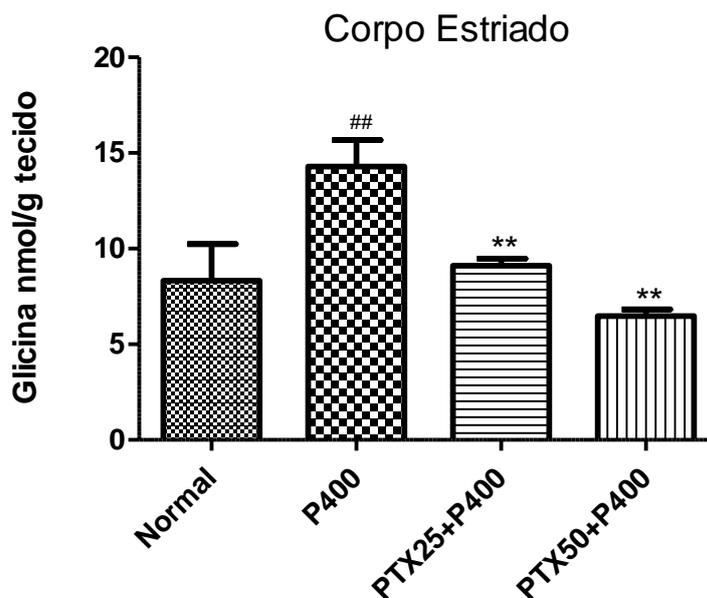


Figura 20. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Glicina (nmol/g de tecido) em Corpo Estriado de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora com pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de glicina foi determinada em 20 μ L de homogenato. ## p<0,01 comparado ao grupo Normal. ** p<0,01 comparado ao grupo P400. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Determinação dos Níveis de Taurina no Corpo Estriado

De acordo com a figura 21, observamos um aumento significativo nos níveis de taurina no grupo P400 (pilocarpina, 400mg/Kg, i.p.) quando comparado com o grupo Normal. Nos grupos PTX25+P400 e PTX50+P400 (pentoxifilina, 25 e 50mg/Kg, v.o.) houve uma redução significativa nos níveis de taurina quando comparado com o grupo P400. Os níveis de taurina permaneceram próximo dos níveis normais em ambos os grupos pré-tratados com pentoxifilina, não havendo diferença significativa quando comparado com o grupo Normal. Houve diferença significativa entre os grupos pré-tratados com pentoxifilina 25mg/Kg e 50mg/Kg com $p < 0,001$. Normal ($4,945 \pm 1,152$ nmol/g de tecido); P400 ($9,081 \pm 0,6181$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($4,869 \pm 0,2140$ nmol/g de tecido); PTX50+P400 ($3,520 \pm 0,1621$ nmol/g de tecido). (**Figura 21**).

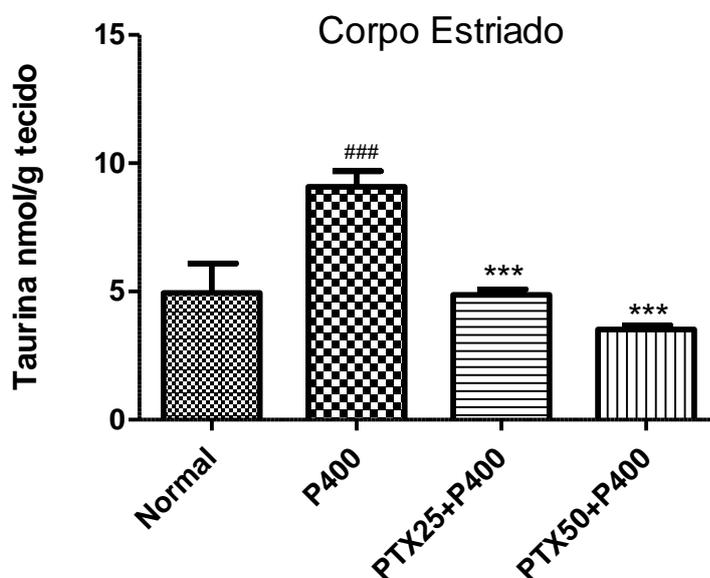


Figura 21. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Taurina (nmol/g de tecido) em Corpo Estriado de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora administrado pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de taurina foi determinada em 20 μ L de homogenato. ### p<0,001 quando comparado ao grupo Normal. *** p<0,001 quando comparado ao grupo P400. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Determinação dos Níveis de GABA no Corpo Estriado

De acordo com a figura 22, foi observado um aumento significativo nos níveis de GABA no grupo P400 (pilocarpina, 400mg/Kg, i.p.) quando comparado com o grupo Normal (solução salina 0.9%, i.p.). Houve uma redução significativa nos níveis de GABA em ambos os grupos pré-tratados com pentoxifilina (PTX25+P400 e PTX50+P400) quando comparados com o grupo P400. Os níveis de GABA mantiveram-se próximo dos níveis normais no grupo PTX25+P400 (pentoxifilina, 25mg/Kg, v.o.) e PTX50+P400 (pentoxifilina, 50mg/Kg, v.o.) quando comparado com o grupo Normal. Normal ($4,083 \pm 0,6684$ nmol/g de tecido); P400 ($17,72 \pm 1,179$ nmol/g de tecido); PTX25+P400 ($6,094 \pm 0,1677$ nmol/g de tecido); PTX50+P400 ($4,590 \pm 0,2844$ nmol/g de tecido). (**Figura 22**).

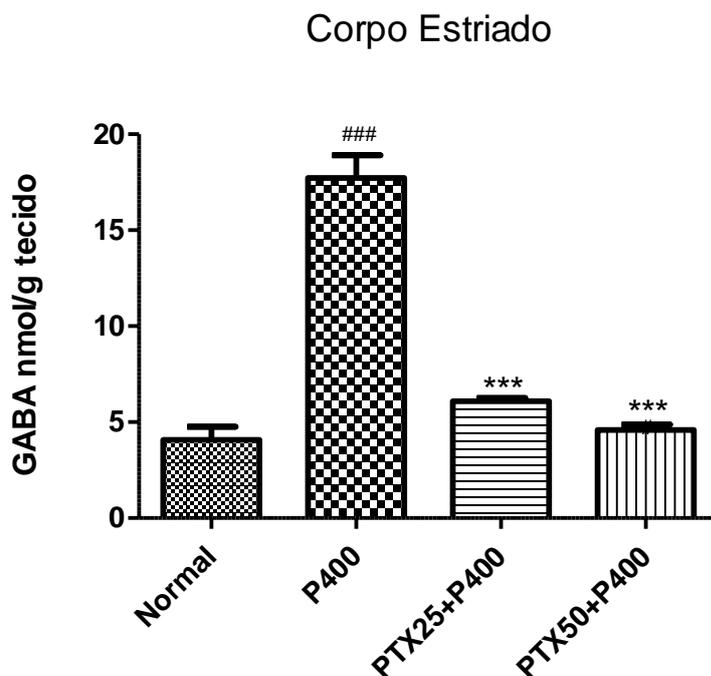


Figura 22. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de GABA (nmol/g de tecido) em Corpo Estriado de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina em ratos.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora administrado pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de GABA foi determinada em 20 μ L de homogenato. ### p<0,001 quando comparado ao grupo Normal. *** p<0,001 quando comparado ao grupo P400. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Tabela 07. Efeitos do pré-tratamento com pentoxifilina (25 e 50mg/kg) sobre as concentrações de aminoácidos em Corpo Estriado de ratos submetidos a convulsões induzidas por pilocarpina 400 mg/kg (P400).

Grupo	CONCENTRAÇÕES DE AMINOÁCIDOS (nmol/g de tecido)				
	Aspartato	Glutamato	Glicina	Taurina	GABA
Normal	9,434 ± 0,9	2,297 ± 0,5*	8,317 ± 1,9*	4,945 ± 1,2*	4,083 ± 0,7*
P400	7,332 ± 0,6	4,639 ± 0,6	14,29 ± 1,4	9,081 ± 0,6	17,72 ± 1,2
PTX25+P400	7,345 ± 0,8	1,190 ± 0,1*	9,108 ± 0,4*	4,869 ± 0,2*	6,094 ± 0,2*
PTX50+P400	6,252 ± 0,3	0,9558 ± 0,1*	6,483 ± 0,3*	3,520 ± 0,2*	4,590 ± 0,3*

* Significativo em relação ao grupo controle P400.

Ratos Wistar machos foram tratados ou não com pentoxifilina (25 e 50mg/kg, v.o.) ou água destilada (0,5ml, v.o.), após uma hora, estes animais receberam a dose única de pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). Imediatamente após a morte, os cérebros desses animais foram dissecados e retirados o corpo estriado sob o gelo para em seguida realização da determinação dos aminoácidos. (ANOVA e Student-Newman-Keuls como teste *post-hoc*).

7.5 Estudos neuroquímicos – Aminas. (HPLC)

7.5.1 Efeitos do pré-tratamento com pentoxifilina 25 e 50mg/kg sobre a concentração de aminas em corpo estriado de ratos adultos após a administração da pilocarpina 400mg/kg (P400).

Os resultados das determinações dos níveis de aminas em corpo estriado de ratos adultos tratados com pentoxifilina 25 e 50mg/Kg, v.o., após 01 hora injetado pilocarpina 400mg/Kg, i.p., e sacrificados 03 horas depois foram expressos em ng/mg de tecido, e apresentados nas figuras 23 a 25.

Determinação dos Níveis de Dopamina no Corpo Estriado

A figura 23 mostra os resultados da determinação dos níveis de dopamina no corpo estriado dos animais nos diversos grupos estudados. Não houve diferença significativa dos níveis de dopamina no corpo estriado do grupo controle P400 quando comparado ao grupo Normal. Houve um aumento significativo nos níveis de dopamina no grupo pré-tratado com pentoxifilina na dose de 25mg/Kg, (PTX25+P400) quando comparado com o grupo controle P400 e, também, quando comparado ao grupo Normal. Houve uma redução significativa nos níveis de dopamina no grupo pré-tratado com pentoxifilina na dose de 50mg/Kg (PTX50+P400) quando comparado com o grupo Normal. Não houve diferença significativa entre o grupo PTX50+P400 e o grupo controle P400. Houve diferença significativa entre os grupos pré-tratados com pentoxifilina ($p < 0,001$). (PTX25+P400 e PTX50+P400). Normal ($3,011 \pm 0,2474$ ng/mg de tecido); P400 ($1,240 \pm 0,3259$ ng/mg de tecido); PTX25+P400 ($6,404 \pm 0,5803$ ngl/mg de tecido) e PTX50+P400 ($0,5344 \pm 0,1332$ ng/mg de tecido). (**Figura 23**).

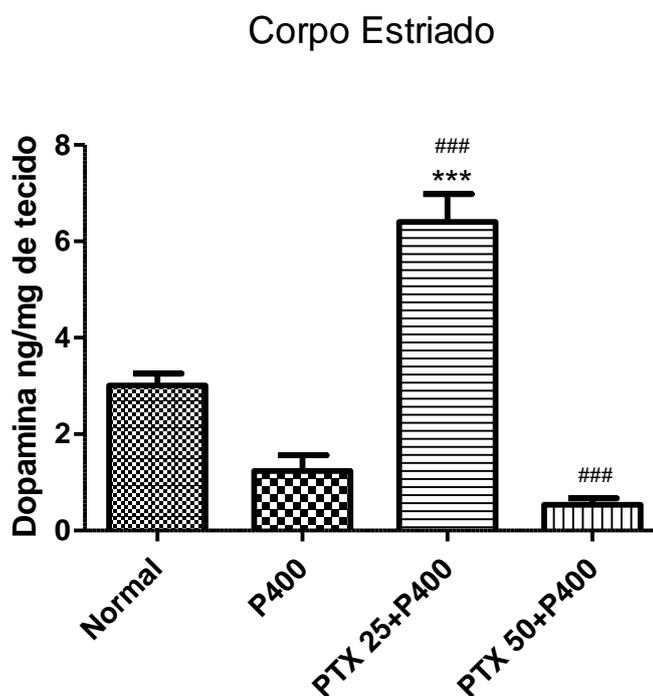


Figura 23. Efeitos da Pentoxifilina sobre as Concentrações de Dopamina (ng/mg de tecido) em Corpo Estriado de ratos no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora com pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de dopamina foi determinada em 20 μ L de homogenato. *** p<0,001 quando comparado ao grupo P400. ### p<0,001 quando comparado ao grupo Normal. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Determinação dos Níveis de DOPAC no Corpo Estriado

A figura 24 mostra os resultados da determinação dos níveis de DOPAC no corpo estriado dos animais nos diversos grupos estudados. Houve um aumento significativo nos níveis de DOPAC nos grupos que receberam pilocarpina (P400, PTX25+P400 e PTX50+P400) quando comparados com o grupo Normal. Os níveis de DOPAC no grupo pré-tratado com pentoxifilina na dose de 25mg/Kg (PTX25+P400), apesar de significativamente elevados quando comparado com o grupo Normal, apresenta uma redução significativa quando comparado com o grupo controle P400. Não houve diferença significativa entre o grupo pré-tratado com pentoxifilina na dose de 50mg/Kg (PTX50+P400) e o grupo controle P400. Houve diferença significativa entre os grupos pré-tratados com pentoxifilina (PTX25+P400 e PTX50+P400, $p < 0,01$). Normal ($0,3239 \pm 0,03910$ ng/mg de tecido); P400 ($1,868 \pm 0,2178$ ng/mg de tecido); PTX25+P400 ($0,9712 \pm 0,1938$ ng/mg de tecido) e PTX50+P400 ($1,933 \pm 0,1611$ ng/mg de tecido). (**Figura 24**).

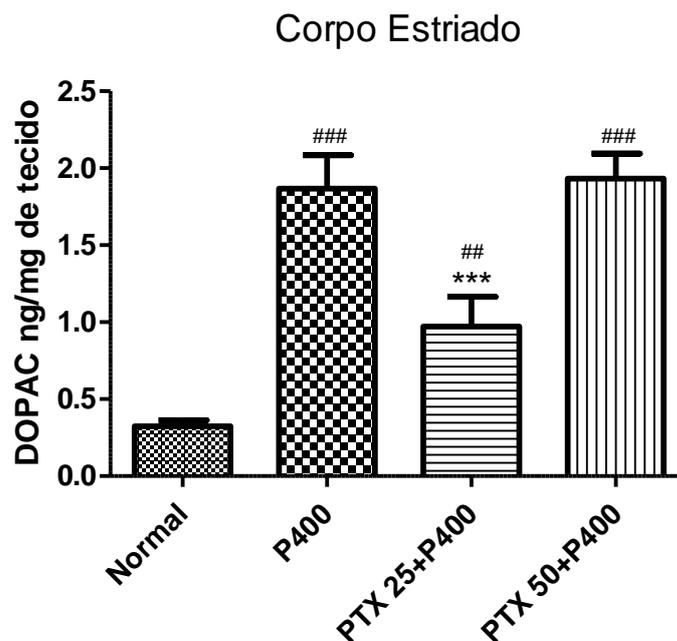


Figura 24. Efeitos da Pentoxifilina sobre as Concentrações de DOPAC (ng/mg de tecido) em Corpo Estriado de ratos no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora com pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de dopamina foi determinada em 20 μ L de homogenato. *** p<0,001 quando comparado ao grupo P400. ### p<0,001 quando comparado ao grupo Normal. ## p<0,01 quando comparado ao grupo Normal. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Determinação dos Níveis de Serotonina no Corpo Estriado

A figura 25 mostra os resultados da determinação dos níveis de DOPAC no corpo estriado dos animais nos diversos grupos estudados. Não houve diferença significativa entre o grupo controle P400 e o grupo Normal. Ambos os grupos pré-tratados com pentoxifilina (25 e 50mg/Kg) apresentaram significativo aumento nos níveis de serotonina quando comparado com o grupo controle P400 e , também, quando comparado com o grupo Normal. Normal ($4,432 \pm 1,475$ ng/mg de tecido); P400 ($6,566 \pm 1,002$ ng/mg de tecido); PTX25+P400 ($21,64 \pm 0,4886$ ng/mg de tecido) e PTX50+P400 ($17,87 \pm 2,424$ ng/mg de tecido). (**Figura 25**).

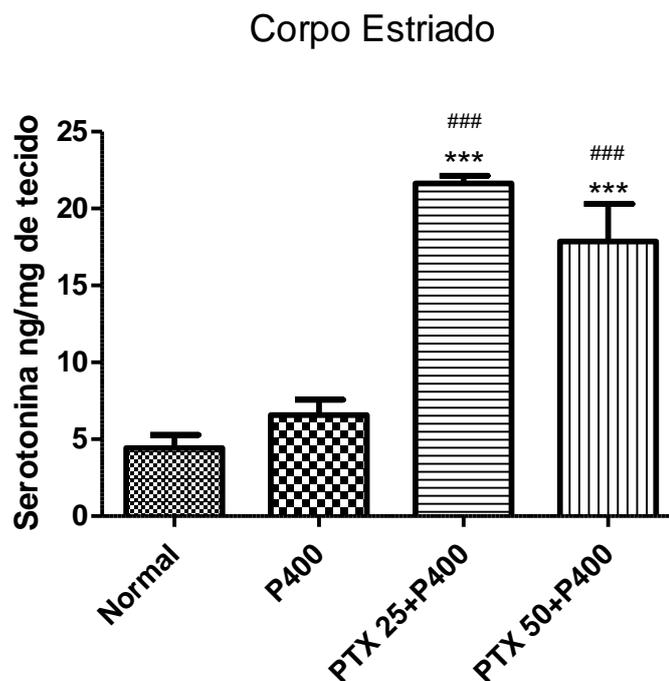


Figura 25. Efeitos da Pentoxifilina sobre as Concentrações de Serotonina (ng/mg de tecido) em Corpo Estriado de ratos no modelo de convulsão induzido por pilocarpina.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora com pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 03 horas de observação. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). A concentração de dopamina foi determinada em 20 μ L de homogenato. *** p<0,001 quando comparado ao grupo P400. ### p<0,001 quando comparado ao grupo Normal. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

Tabela 08. Efeitos do pré-tratamento com pentoxifilina (25 e 50mg/kg) sobre as concentrações de aminas em Corpo Estriado de ratos submetidos a convulsões induzidas por pilocarpina 400 mg/kg (P400).

CONCENTRAÇÕES DE AMINAS (ng/mg de tecido)			
Grupo	Dopamina	DOPAC	Serotonina
Normal	3,011 ± 0,25*	0,3239 ± 0,04*	4,432 ± 0,85
P400	1,240 ± 0,33	1,868 ± 0,22	6,566 ± 1,00
PTX25+P400	6,404 ± 0,58*	0,9712 ± 0,19*	21,64 ± 0,49*
PTX50+P400	0,5344 ± 0,13	1,933 ± 0,16	17,87 ± 2,42*

* Significativo em relação ao grupo controle P400.

Ratos Wistar machos foram tratados ou não com pentoxifilina (25 e 50mg/kg, v.o.) ou água destilada (0,5ml, v.o.), após uma hora, estes animais receberam a dose única de pilocarpina (400 mg/kg, i.p.). Imediatamente após a morte, os cérebros desses animais foram dissecados e retirados o corpo estriado sob o gelo para em seguida realização da determinação dos aminoácidos. (ANOVA e Student-Newman-Keuls como teste *post-hoc*).

7.6 Efeitos do pré-tratamento com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg sobre a concentração glicêmicas de ratos adultos após a administração da Pilocarpina 400mg/kg (P400).

Os resultados das determinações dos níveis glicose plasmática de ratos adultos tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/Kg, v.o., após 01 hora da administração de Pilocarpina 400mg/Kg, i.p., foram expressos em mg/dL de sangue, e apresentados nas figuras 26.

Determinação dos Níveis Glicêmicos

A figura 26 mostra os resultados da determinação dos níveis de glicose plasmática após a administração de Pilocarpina (400mg/Kg, i.p.) nos diversos grupos estudados. A indução da convulsão com Pilocarpina elevou significativamente os níveis glicêmicos dos animais do grupo P400 em comparação com o grupo Normal (solução salina 0,9%, i.p.). Os animais pré-tratados com Pentoxifilina (25 e 50mg/Kg, v.o.) mantiveram os níveis glicêmicos próximo dos níveis normais quando comparado com o grupo Normal, sendo estes níveis significativamente reduzidos quando comparado com o grupo controle P400. Normal ($92,00 \pm 4,777$ mg/dL de plasma); P400 ($305,1 \pm 29,77$ mg/dL de plasma); PTX25+P400 ($128,4 \pm 29,76$ mg/dL de plasma) e PTX50+P400 ($115,4 \pm 21,41$ mg/dL de plasma). (**Figura 26**).

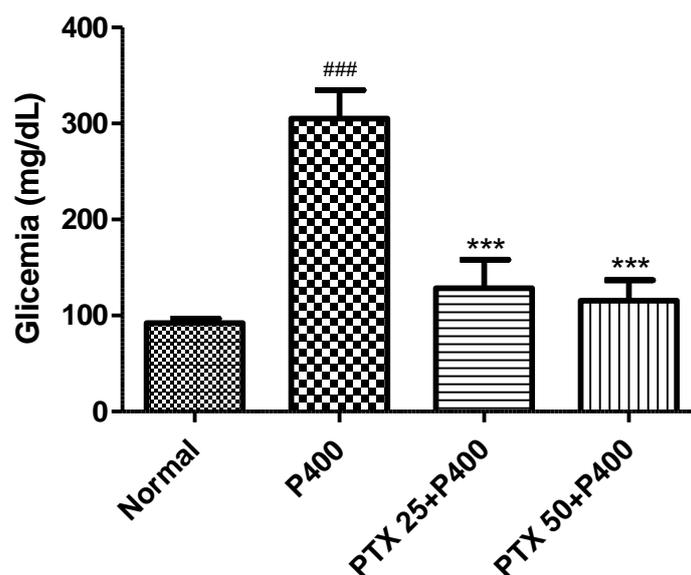


Figura 26. Efeitos da Pentoxifilina sobre as concentrações de Glicose (mg/dL) em plasma de ratos no modelo de convulsão induzido por Pilocarpina.

Ratos Wistar machos (180 – 220g) foram pré-tratados com Pentoxifilina 25 e 50mg/kg, v.o. (PTX25+P400 e PTX50+P400) e após 01 hora com Pilocarpina 400mg/kg, i.p. Os controles receberam água destilada, seguido de Pilocarpina (P400) ou solução salina 0,9% (Normal). Os animais foram submetidos a um período de 01 horas de observação e logo em seguida coletado amostra de sangue para análise dos níveis glicêmicos. Os valores representam a média \pm EPM (n=6). *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo P400; ### $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Normal. (Análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls como teste *post hoc*).

7.7 Análise Histopatológica

7.7.1 Corpúsculo de Nissl por Coloração Cresil Violeta

Na figura 27, podemos observar no quadro “A”, a morfologia íntegra das células neuronais na região CA3 do hipocampo no grupo Normal (animais que receberam água destilada por via oral e após uma hora solução salina 0,9% intraperitoneal). No quadro B, podemos observar uma alteração na morfologia (seta vermelha) de todas as células neuronais e a perda do núcleo em muitos destes neurônios da região CA3 do hipocampo pertencente ao grupo controle P400 (pilocarpina 400mg/Kg i.p.). O grupo pré-tratado com pentoxifilina (50mg/Kg v.o.), representado no quadro C, apresenta uma preservação na morfologia (seta preta) de alguns neurônios da região CA3 do hipocampo e mesmo aqueles neurônios que apresentam alterações morfológicas (seta vermelha) podemos observar a preservação de seus núcleos.

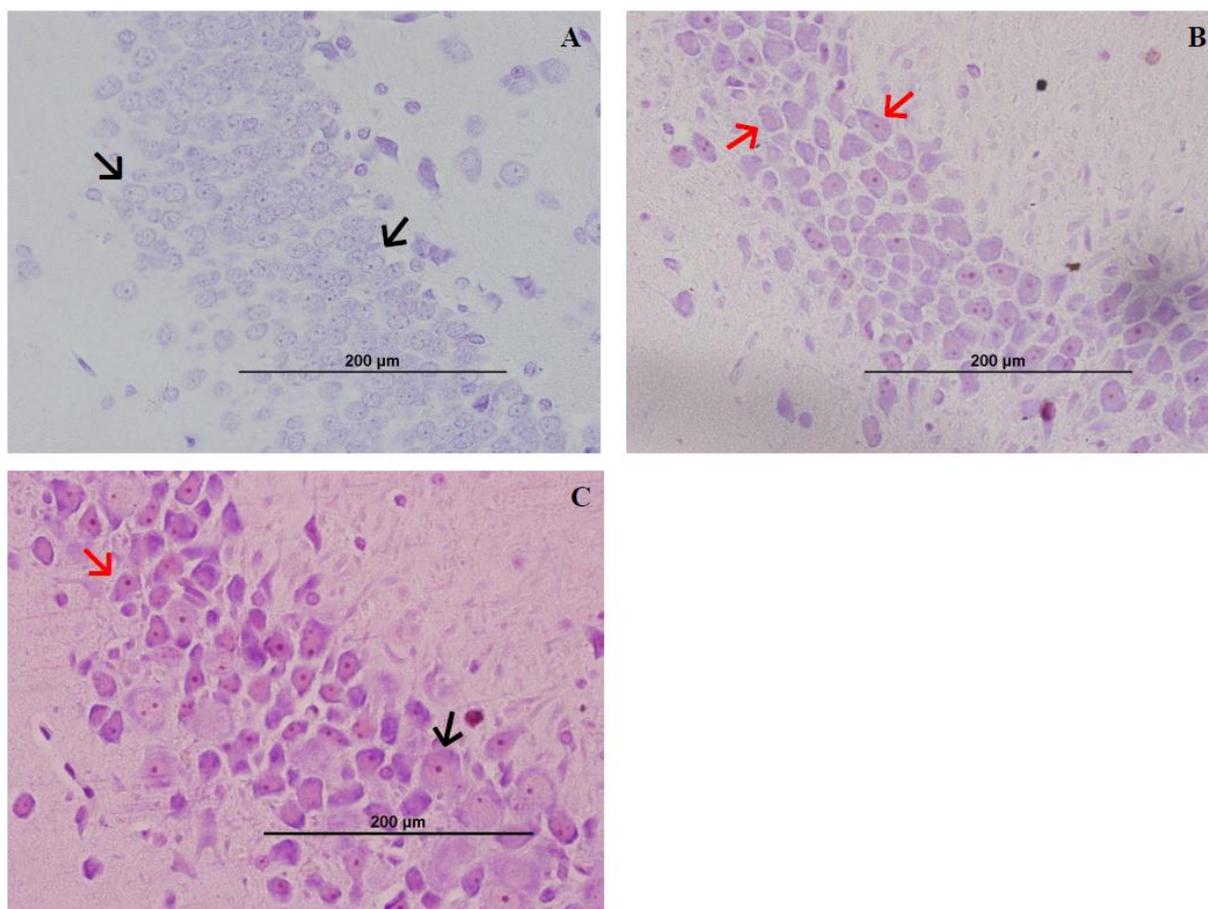


Figura 27. Microfotografia da Região CA3 do Hipocampo nos Diferentes Grupos Estudados por Coloração Cresil Violeta. A) Grupo Normal. Animal que recebeu solução salina i.p. B) Grupo P400. Animal submetido a convulsão com pilocarpina 400mg/Kg i.p. C) Grupo PTX50+P400. Animal que foi pré-tratado com pentoxifilina 50mg/Kg e após 01h induzido convulsão com pilocarpina 400mg/Kg i.p.

7.7.2 Imunohistoquímica para Fator de Necrose Tumoral (TNF- α)

Na figura 28, podemos observar no quadro “A”, a ausência de marcação para TNF- α nos citoplasmas das células neuronais da região CA3 do hipocampo no grupo Normal (animais que receberam água destilada por via oral e após uma hora solução salina 0,9% intraperitoneal). No quadro B, podemos observar uma intensa marcação para a citocina inflamatória TNF- α (seta vermelha) de quase todas as células da região CA3 do hipocampo pertencente ao grupo controle P400 (pilocarpina 400mg/Kg i.p.). O grupo pré-tratado com pentoxifilina (25mg/Kg), representado no quadro C, apresenta uma leve marcação citoplasmática para TNF- α (seta vermelha) de alguns neurônios da região CA3 do hipocampo. O grupo PTX50+P400 (pré-tratado com pentoxifilina 50mg/Kg) não apresentaram marcação para TNF- α nos citoplasmas dos neurônios na região hipocampal estudada.

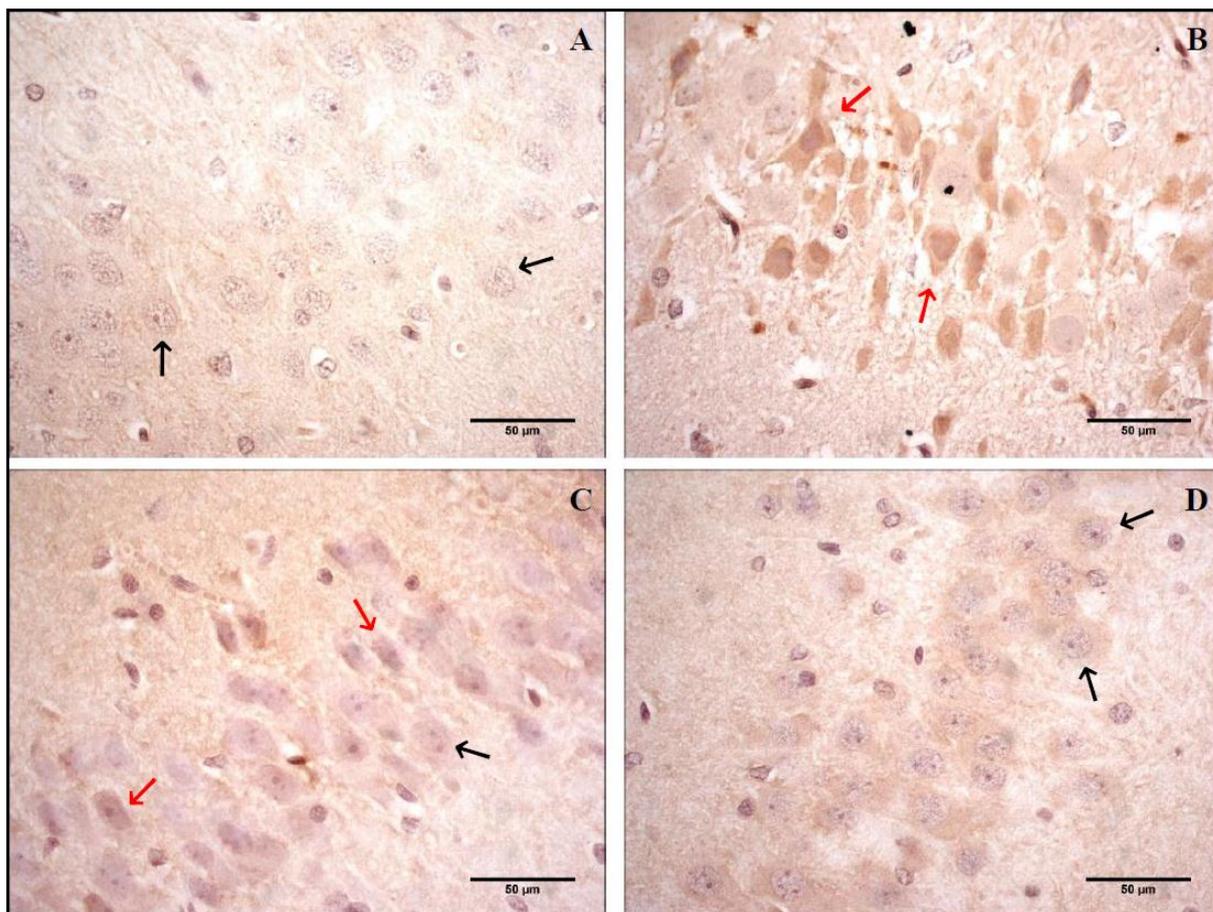


Figura 28. Imunohistoquímica para TNF-alfa na Região CA3 do Hipocampo nos Diferentes Grupos Estudados. A) Grupo Normal. Animal que recebeu solução salina i.p. B) Grupo P400. Animal que foi induzido convulsão com pilocarpina 400mg/Kg i.p. C) Grupo PTX25+P400. Animal que foi pré-tratado com pentoxifilina 25mg/Kg e após 01h induzido convulsão com pilocarpina 400mg/Kg i.p. D) Grupo PTX50+P400. Animal que foi pré-tratado com pentoxifilina 50mg/Kg e após 01h induzido convulsão com pilocarpina 400mg/Kg i.p.

8. DISCUSSÃO

Algumas pesquisas têm focado nos estudos da epileptogênese em animais na intenção de investigar a origem e a propagação das convulsões no cérebro (DOS SANTOS et al., 2000; PRIEL et al., 1996). Estes estudos além de investigar a fisiopatologia das convulsões, buscam fornecer subsídios para identificação de novos agentes terapêuticos para a epilepsia.

Análises comportamentais e eletroencefalográficas demonstraram que a administração sistêmica de pilocarpina em roedores induz convulsões com foco de início no sistema límbico, principalmente no hipocampo (TURSKI et al., 1983). Essa atividade convulsiva torna-se secundariamente generalizada, sugerindo que este modelo mimetiza diversos aspectos das convulsões parciais complexas com generalização secundária em humanos. Essas convulsões generalizadas mostram-se resistentes a grande parte dos medicamentos anticonvulsivantes. (KLITGAARD et al., 1998). Modelos de convulsão induzidos em animais reproduzem alterações comportamentais e eletroencefalográficas que são semelhantes à epilepsia do lobo temporal de humanos (BEM-ARI et al., 1980; HONCHAR et al., 1983, CAVALHEIRO et al., 1991). As convulsões induzidas por pilocarpina têm sido largamente exploradas em modelos animais, haja vista, como foi anteriormente citado mimetiza a epilepsia do lobo temporal humano (TLE), seja em fatores comportamentais ou encefalográficos, bem como em danos neuroanatômicos (OLNEY et al., 1983; TURSKE et al., 1983, 1989; PERSINGER et al., 1988; FERREIRA et al., 2003).

O SNC mostra uma reação imune inata bem organizada em resposta a uma variedade de injúrias cerebrais. Citocinas, como a interleucina-1 β (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6), embora expressos em níveis muito baixos no tecido cerebral saudável, são rapidamente induzidos após uma isquemia, trauma e dano excitotóxico (ALLAN et al., 2001). A atividade convulsivante, induzida em modelos experimentais de *Status Epilepticus* ou após aplicação intracerebral de ácido caínico relata um rápido aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias bem como vários marcadores da imunidade inata (citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, fator de transcrição NF κ B, fatores do complemento e moléculas de adesão). Um aumento na expressão de genes de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- α) no hipocampo foi descrito em amostras cerebrais de pacientes com convulsões (BARANZINI et al., 2002; VEZZANI et al., 2005; RAO et al., 2009). Várias injeções intracerebroventriculares de antagonista do receptor de interleucina-1 significativamente

diminuiu a severidade comportamental das convulsões durante estimulação elétrica e reduziu seletivamente os níveis de TNF- α no hipocampo 18 horas após o *Status epilepticus*, sugerindo que a indução de convulsões espontaneamente recorrentes envolvem a ativação de citocinas inflamatórias e a expressão de genes pró e anti-inflamatórios no hipocampo. RAO et al., 2008 mostraram que as citocinas são rapidamente induzidas no cérebro após diferentes inflamações periférica o que resulta na diminuição do limiar de convulsão induzido pelo PTZ. Essas mudanças possuem um papel ativo na hiperexcitabilidade do tecido epilético (SIMONI et al., 2000). Ainda não é claro se esses sinais pró-inflamatórios predisõem a convulsões ou se são expressos após uma convulsão. Além disso, as citocinas têm sido implicados como mediadores de várias formas de neurodegeneração no cérebro.

A pentoxifilina, 1-(5-oxohexil)-3,7-(dimetilxantina) é o análogo da metilxantina, apresenta propriedades semelhantes às da cafeína, teofilina e teobromina. Usada no tratamento de doenças venosas oclusivas que aumenta a perfusão em tecidos pouco vascularizados (STREITER et al., 1988, RIENECK et al., 1993; CUNHA et al., 2000). As metilxantinas atuam inibindo várias famílias das enzimas fosfodiesterases, resulta em concentrações mais altas de AMPc e, em alguns tecidos, do GMPc intracelulares (RAO et al., 1998; BRUNO et al., 2009). A pentoxifilina atua como inibidor da fosfodiesterase 4, que induz aumento de adenosina monofosfato cíclico, melhorando o fluxo da microcirculação; diminui a migração de neutrófilos; reduz a liberação de citocinas; aumenta a produção de prostaciclina; e reduz a liberação de espécies reativas de oxigênio. Essas propriedades têm sido responsabilizadas pela sua ação de atenuação sobre as lesões de isquemia e reperfusão (BESSLER et al., 1986; DOHERTY et al., 1991; SCHRATZBERGER et al., 1998; ŞENER et al., 2000; SILVEIRA et al., 2004; ZHANG et al., 2005; BRASILEIRAO et al., 2007)..A pentoxifilina tem se mostrado promissora com ação neuroprotetora em diversos estudos de injúrias cerebrais e doenças neurodegenerativas. TARIQ et al., 2008; CUNHA et al., 2000).

Pentoxifilina tem sido utilizada em estudos experimentais como eficientes inibidores da produção de TNF- α em resposta a lipopolissacarídeos (NOEL et al., 1998). Pentoxifilina também apresenta propriedades antiinflamatórias exercendo efeitos inibitórios sobre interleucina-1 β (SULLIVAN et al., 1988), IL-6 (SCHANDENE et al., 1992), IL-8 (NEUNER, et al., 1994), IFN- γ (THANHÄUSER et al., 1993) e IL-2 (ALEGRE et al., 1991; RIENECK, 1993; THANHÄUSER et al., 1993), e um forte efeito inibidor na produção de NO em camundongos (VADIEI et al., 1996). A pentoxifilina inibe não só a capacidade fagocítica de

monócitos e também, a produção de superóxido. Além de aumentar AMPc intracelular a pentoxifilina também diminui os níveis de RNAm para a produção de TNF- α afetando a transcrição para a sua síntese (HEN-I, et al., 2004). Pentoxifilina aumenta os níveis intracelulares de AMPc em macrófagos um efeito inibidor na produção de TNF- α por estas células (SZTRYMF et al., 2004). Vários estudos sugerem que o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a ativação dos receptores TNFR ativam a via extrínseca da indução da apoptose, e possuem um papel importante na patogênese de algumas doenças neurodegenerativas. (WALDMEIER & TATTON, 2004). Por ser uma droga de ação inibitória sobre o TNF- α (TEICHER et al., 1991; RIENECK et al., 1993) e não causarem os efeitos adversos em demasia e nem apresentarem os custos elevados a Pentoxifilina pode ser uma nova alternativa terapêutica para inibição da neuroinflamação.

O presente trabalho visou avaliar os efeitos neuroprotetores antiepilépticos da pentoxifilina, que, em trabalhos atuais, vem mostrando alta capacidade em reverter danos cerebrais. Tendo em vista que a Pilocarpina, quando administrada em doses moderadamente altas mimetiza a epilepsia do lobo temporal humano, resolvemos estudar tal região cerebral no nosso modelo animal. No modelo de epilepsia induzido por alta dose de pilocarpina, as áreas em que ocorre dano neuronal: o hipocampo, o corpo estriado e o córtex frontal, além de serem as áreas mais acometidas, podem estar relacionados de forma importante com os mecanismos de instalação, da propagação e/ou manutenção (epileptogênese) das convulsões límbicas (MARINHO et al., 1998; BORELLI & BOZZI, 2002).

Os mecanismos neuroprotetores desse derivado de xantina ainda não são muito bem conhecidos. Desta forma, este trabalho objetivou estudar o processo convulsivo desencadeado através de uma única dose de pilocarpina (400mg/Kg, i.p; P400), bem como as ações da pentoxifilina neste processo convulsivo em ratos jovens com 180 – 220g, através da análise das alterações comportamentais e neuroquímicas (efeito sobre sistemas de Neurotransmissores: níveis de aminoácidos e aminas cerebrais) em córtex frontal, córtex temporal, hipocampo e corpo estriado.

8.1 Estudo Comportamental

O efeito anticonvulsivante de muitas drogas antiepilépticas foi primeiro determinado em modelos animais, como o eletrochoque máximo (MES) ou pentilenotetrazol (PTZ), demonstrando que a atividade clínica pode ser prevista por estes modelos laboratoriais. (LOSCHER & SCHMIDT, 1994, 2004; LUSZCZKI et al., 2007).

O estudo comportamental do presente trabalho analisou as alterações ocorridas após o pré-tratamento com pentoxifilina, seguido da indução do período convulsivo após a administração da pilocarpina 400mg/kg. As alterações epiléticas observadas com a administração de pilocarpina 400 mg/kg incluíram um exacerbado aumento em todos os sinais colinérgicos periféricos, dentre eles, tremores, diarreia, salivação e aumento de todas as secreções glandulares. A epilepsia pode ser caracterizada por episódios de alteração no comportamento. Essas convulsões apresentam, ainda, uma temporária redução da consciência e contrações involuntárias do músculo esquelético (JOBÉ et al., 2003).

No presente estudo comportamental realizado em animais tratados com uma única dose de pilocarpina (400mg/Kg, i.p.; P400) apresentaram as características descritas na literatura. Todos os animais observados por 3h apresentaram sinais colinérgicos periféricos, movimentos estereotipados e convulsões.

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).

No presente trabalho foi mostrado que a pentoxifilina também protege os animais contra as convulsões induzidas pela pilocarpina, efeitos semelhantes foram observados não somente no aumento do tempo para o início do aparecimento das primeiras convulsões, mas também no aumento da sobrevivência desses animais. Contudo, curiosamente, a relação dose-resposta não pôde ser observada, haja vista que os efeitos neuroprotetores foram melhor

percebidos na dose menor, ou seja, de 25mg/kg, e, interessantemente, foi observado que, com o aumento da dose de pentoxifilina utilizada notamos um decréscimo nas características neuroprotetoras.

A Pentoxifilina é uma dimetilxantina que pode induzir efeitos fisiológicos e farmacológicos por diversos mecanismos incluindo translocação de cálcio extracelular, aumento de AMPc e GMPc causado pela inibição de fosfodiesterases, e bloqueio de receptores de adenosina. (CUNHA et al., 2000; TARIQ et al., 2007; BRUNO et al., 2009) Contudo, recentes estudos indicam que antagonistas de receptores de adenosina do tipo A1 podem antagonizar convulsões induzidas pelo NMDA ou pentilenotetrazol, enquanto foi observada uma ação próconvulsivante de agonistas de ambos os receptores de adenosina (KLITGAARD et al. 1993; VON LUBITZ et al. 1993). Em contraste, agonistas seletivos para os receptores A1 e A2 antagonizam convulsões induzidas pelo metil-6,7-dimetoxi-4-etil- β -carbolina-3-carboxilato (DMCM), um agonista inverso do receptor de benzodiazepínicos. Isto pode confirmar uma interação entre receptores de adenosina e receptores GABA-benzodiazepínicos (KLITGAARD et al. 1993). Estudos demonstraram que a cafeína e outras xantina não-seletivas administradas cronicamente mostrou significativa proteção contra convulsões induzidas pelo NMDA (GEORGIEV et al., 1993; SARRO et al., 1997).

De acordo com FREDHOLM AND LINDSTROM, (1986) a Pentoxifilina é um potente bloqueador da recaptação de adenosina com baixa afinidade pelos receptores de adenosina, portanto, pode haver uma maior ativação endógena dos receptores de adenosina devido ao bloqueio da sua recaptação. (SHI et al., 1998; GEANNE et al., 2000; VIANA et al., 2005; GOMES et al., 2011).

O receptor de adenosina A₁ é largamente distribuído em todo o cérebro, com uma alta densidade no hipocampo, onde ele media um efeito modulatório sobre a hiperexcitabilidade neural (DUNWIDDIE et al., 2001; THOMPSON et al., 1992). O receptor A₁ pode tornar os neurônios do hipocampo menos excitáveis e menos sensíveis a entrada sináptica excitatória pela ativação de uma proteína guanosina trifosfato (GTP) acoplada a um canal de K⁺ e inibindo a liberação de diferentes neurotransmissores, principalmente glutamato (DUNWIDDIE et al., 1985; FREDHOLM et al., 1988). Em contraste, a distribuição do receptor de adenosina do tipo A_{2A} é mais concentrado no núcleo *accumbens*, tubérculo olfatório e corpo estriado, com uma baixa densidade no hipocampo (JARVIS et al., 1989;

WEISS et al., 2003). No hipocampo, o receptor A_{2A} é co-expresso e localizado em associação com o receptor A_1 , indicando que um pode interferir funcionalmente no outro (CUNHA et al., 1994; LOPES et al., 1999). Foi demonstrado que a ativação do receptor A_{2A} pode induzir respostas facilitatórias no hipocampo (CUNHA et al., 2000).

Os mecanismos pelos quais o receptor A_{2A} exerce sua ação excitatória ainda não está completamente elucidada, mas tem sido postulado que agonistas A_{2A} podem facilitar a liberação de glutamato e acetilcolina (RICHARDSON et al., 1992; CUNHA et al., 1994; SEBASTIÃO et al., 1996). Além disso, os receptores A_{2A} podem atenuar a ação inibitória dos receptores A_1 (CUNHA et al., 1994).

Um papel excitatório tem sido associado com a ativação de receptores A_{2B} e A_3 . O receptor A_3 exibe baixa afinidade pela adenosina e é necessário altas concentrações de adenosina para ativar esse receptor (DUNWIDDIE et al., 1999). Assim, o efeito neuroprotetor e anticonvulsivante da adenosina está atribuído ao receptor A_1 , enquanto que os receptor A_{2A} e A_3 estão relacionados com a ação próconvulsivante e podem estar relacionado com morte celular (VON LUBITZ et al., 1994; DUNWIDDIE et al., 1999, ETHERINGTON et al., 2004).

A adenosina é um potente anticonvulsivante em muitos modelos experimentais de epilepsia, incluindo o modelo de pilocarpina (DUNWIDDIE et al., 1985; ; FREDHOLM et al., 1988; ETHERINGTON et al., 2004; GOUDER et al., 2003). As propriedades antiepilépticas da adenosina são principalmente devido à ação inibitória dos receptores A_1 sobre a transmissão sináptica no hipocampo (DRAGUNOW et al., 1991; DUNWIDDIE et al., 1999). Há relatos de aumento nos níveis de adenosina no cérebro durante as crises (GEORGE et al., 1997).

Estudos recentes demonstram que o bloqueio do receptor A_{2A} , utilizando deleção genética, antagonista seletivo (YACOUBI et al., 2008; D'ALIMONTE et al., 2009) ou antagonista não-seletivo, como a administração crônica de cafeína (YACOUBI et al., 2008), pode promover uma sólida proteção contra a evolução grave das convulsões. Além disso, a administração crônica de cafeína ou bloqueio efetivo do receptor A_{2A} previne o dano neural após as convulsões (GEORGIEV et al., 1993; RIGOULOT et al., 2003; PORCIÚNCULA et

al., 2006) e parece ser um indicador geral de prognóstico favorável em doenças neurodegenerativas (MOUTAERY et al., 2003; SACHSE et al., 2008).

A Pentoxifilina atua como um bloqueador misto de transportadores e receptores de adenosina modulando os sistemas excitatório e inibitório em áreas cerebrais envolvidas com o início, propagação e/ou manutenção da epileptogênese como hipocampo com maior densidade de receptores do tipo A_1 e corpo estriado com maior densidade de receptores do tipo A_{2A} , promovendo uma ação neuroprotetora no nosso modelo animal de epilepsia do lobo temporal confirmando os dados encontrados na literatura.

Possivelmente, em altas doses (iguais ou superiores 100mg/kg, i.p.), a pentoxifilina apresenta toxicidade, desde que foi observado que, quando os animais recebem pentoxifilina na dose de 100mg/kg, i.p. em dose única, ocorre significativo aumento na incidência da morte desses animais, justificando a não utilização desta dosagem em nosso trabalho. Portanto, o aumento na dose de pentoxifilina não está diretamente ligado a um aumento na sua capacidade neuroprotetora.

Com relação ao pré-tratamento com a pentoxifilina observamos uma notável proteção contra as convulsões induzidas pela Pilocarpina, contudo, na dose menor (25mg/kg) ocorreu o melhor efeito neuroprotetor no que diz respeito às latências da primeira convulsão e taxa de sobrevivência. Nossos estudos apresentaram que as xantinas, tais como a pentoxifilina além de ter sua ação neuroprotetora em situações isquêmicas e inflamatórias bem como ter participação neuroprotetora em distúrbios neurodegenerativos, como na doença de Parkinson, este fármaco também apresentara ação antiepileptogênica. (TARIQ et al., 2008; BRUNO et al., 2009).

Nossos resultados confirmaram essa ação anticonvulsivante da Pentoxifilina, através do aumento evidenciado na latência de início das convulsões e taxa de sobrevivência, bem como na redução do aparecimento das convulsões nos animais após a administração de P400.

O modelo das quimioconvulsões ou das convulsões induzidas pelo Pentilenotetrazol (PTZ) reproduz um quadro parecido ao encontrado na crise epiléptica do “pequeno-mal” ou crise de ausência. O Pentilenotetrazol promove convulsões por inibir canais de cloreto associados com receptores $GABA_A$, reduzindo assim a neurotransmissão inibitória. Drogas como os benzodiazepínicos e alguns barbitúricos parecem atuar promovendo a

potencialização da inibição sináptica mediada por GABA, reduzindo a excitabilidade neuronal e aumentando o limiar convulsivante. O aumento da latência para o aparecimento das convulsões é um forte indicativo de uma ação anticonvulsivante. (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2002). GABA, atua via receptor GABA_A, sendo bem definido como o principal neurotransmissor inibitório do cérebro maduro, onde atenua a excitabilidade neuronal. (HENSCHEL et al., 2008).

Nossos resultados demonstraram o efeito anticonvulsivante da Pentoxifilina usando o modelo de convulsão induzido pelo Pentilenotetrazol (PTZ). A Pentoxifilina promoveu um aumento significativo da latência de primeira convulsão e até mesmo uma supressão da convulsão clônica induzida pelo Pentilenotetrazol de forma dose dependente. Todos os animais que receberam Pentilenotetrazol, 80mg/Kg, i.p., apresentaram convulsão e morreram. A Pentoxifilina reduziu em 50% o número de animais que apresentaram convulsão na maior dose (50mg/Kg), elevou significativamente o tempo de início para aparecimento da convulsão, de forma dose-dependente, bem como aumentou a taxa de sobrevivência em 36% e 71% nas doses de 25 e 50 mg/Kg respectivamente. Sendo, os efeitos neuroprotetores observados em ambas as doses testadas, no entanto, com melhores resultados na maior dose de Pentoxifilina (50mg/Kg).

8.2 Estudo da Determinação dos Níveis de Aminoácidos

Estudos de convulsões induzidas quimicamente têm mostrado em nível pré-sináptico que a atividade convulsivante está associada com uma ampla gama de alterações bioquímicas locais, afetando a liberação de vários neurotransmissores cerebrais como monoaminas e aminoácidos (MELDRUM et al., 1995; STARR et al., 1996; JACOBSSON et al., 1997; OLSEN & AVOLI, 1997; LI et al., 2000; FERRAZ et al., 2002).

No modelo de convulsão com pilocarpina, estudos demonstram que as convulsões são ativadas pelo sistema colinérgico (CARDONE et al., 1994; MARINHO et al., 1998; FREITAS et al., 2003) que promovem um importante papel na ativação das convulsões límbicas e nos sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos, GABAérgicos e glutamatérgicos que são responsáveis pela propagação e/ou manutenção das convulsões e indução do *Status Epilepticus* induzido pela Pilocarpina (FREITAS et al., 2004; TOMÉ et al., 2010).

As convulsões podem ser vistas como resultantes de um desequilíbrio entre os processos excitatórios e inibitórios no cérebro. Os mecanismos propostos para a geração e disseminação da atividade epiléptica no cérebro incluem a diminuição da neurotransmissão inibitória, que é mediada principalmente pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), ou aumento da neurotransmissão excitatória, que é mediada principalmente pelo aminoácido glutamato. (SCORZA et al., 2002; ILODIGWE et al., 2010)

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o maior neurotransmissor inibitório no cérebro dos mamíferos. Sua ação é principalmente ativar o receptor ionotrópico GABA tipo A ($GABA_A$ Rs), levando a um influxo interno de Cl^- e uma resposta de hiperpolarização pós-sináptica. A transmissão GABAérgica forma atividade neural especialmente por duas vias e modos de inibição temporalmente únicos (FARRANT et al., 2005). A sinapse inibitória resulta de níveis transitoriamente altos de GABA associados com uma liberação evocada de GABA, que ativa os receptores $GABA_A$. Estudos prévios de fatias cerebrais (BRICKLEY et al., 1996; SEMYANOV et al., 2003), culturas neuronais (LIU et al., 1995; BAI et al., 2001) e *in vivo* (CHADDERTON et al., 2004) tem mostrado que diferentes subtipos de receptor $GABA_A$ são responsáveis por mediar a inibição tônica, dependendo das regiões cerebrais e tipos celulares (SEMYANOV et al., 2004; FARRANT et al., 2005). Recentes estudos sugerem que a inibição pode regular a excitabilidade da rede neural (SEMYANOV et al., 2003). O comprometimento da inibição também pode contribuir para estados patológicos como a epilepsia crônica (HOUSER et al., 2003). Portanto, o reforço da inibição GABAérgica é uma abordagem terapêutica promissora para doenças envolvendo a hiperexcitabilidade.

Nossos resultados mostram que a Pentoxifilina promoveu um aumento significativo nos níveis deste importante aminoácido inibitório (GABA) no córtex temporal e no hipocampo em relação ao grupo submetido apenas à administração de pilocarpina. A Taurina, outro aminoácido inibitório, tem seus níveis elevados significativamente no córtex frontal, e no hipocampo de animais pré-tratados com pentoxifilina em relação ao grupo submetido apenas à administração de pilocarpina, participando de modo somatório nos resultados obtidos. Contribuindo, assim, com os resultados comportamentais e ação neuroprotetora no modelo de convulsão estudado.

Alguns estudos demonstraram que ocorre *downregulation* dos receptores gabaérgicos em diferentes áreas cerebrais submetidas à convulsões induzidas por pilocarpina. O GABA é

o principal neurotransmissor inibitório no córtex cerebral, mantendo o tônus inibitório que se contrabalança com a excitação neuronal (FRITSCHY et al., 1999). Quando esse balanço é descontrolado as convulsões ocorrem (TREIMAN et al., 2001).

Tem sido sugerido que a atividade convulsiva está diretamente relacionada a um aumento na liberação e a uma ineficiente recaptção de aminoácidos excitatórios, tais como glutamato e aspartato. A ativação do receptor NMDA medeia a excitotoxicidade e morte neuronal em muitas desordens neurodegenerativas bem como no processo isquêmico (DIRNAGL et al., 1999; LEE et al., 1999; GAGLIARDI et al., 2000). Dados anteriores mostraram que a pentoxifilina é capaz de proteger neurônios de lesão cerebral e preservar as funções neurológicas em isquemia global transitória em ratos (SIRIN et al., 1998; BRUNO et al., 2009).

Estudos têm mostrado que a excitotoxicidade está relacionada com uma superprodução de radicais livres no hipocampo de ratos adultos. A liberação excessiva de aminoácidos como o glutamato pode matar os neurônios através da ativação excessiva de seus receptores facilitando a instalação e/ou propagação das crises (MACDONALD et al., 1989; CAVALHEIRO et al., 1994; MELDRUM et al., 1994). Dependendo da maturidade neuronal, o glutamato pode induzir morte por apoptose ou necrose (FERRER et al., 1995) por alterar a homeostase do cálcio e induzir o estresse oxidativo (LEITE et al., 1990; MURPHY AND BARABAN, 1990; SANTOS et al., 2010).

Em estudos recentes tem sido demonstrado que ocorre um aumento na densidade de receptores glutamatérgicos no hipocampo, córtex frontal e no corpo estriado de animais submetidos à ensaios convulsivos (FREITAS et al., 2004), sugerindo que isso pode ser adquirido durante o *status epilepticus*. Estes estudos sugerem que a ativação excessiva de receptores de aminoácidos excitatórios pode causar convulsões prolongadas que também pode ser causada pela penicilina e compostos que antagonizam os efeitos do ácido gama-aminobutírico (GABA). (SCORZA et al., 2002).

Neste estudo, apresentamos que a Pentoxifilina reduziu significativamente os níveis de deste importante aminoácido excitatório (glutamato) no córtex frontal, no córtex temporal e no corpo estriado em relação ao grupo submetido apenas à administração de pilocarpina. A Pentoxifilina promoveu uma redução nos níveis de aspartato no córtex temporal, outro

considerável aminoácido excitatório, em relação ao grupo submetido apenas à administração de pilocarpina. As reduções nos níveis destes aminoácidos, que estão diretamente envolvidos com a excitabilidade neuronal e como demonstrados na literatura relacionam-se diretamente com o processo convulsivo é de supra importância na promoção da atividade neuroprotetora, antiepileptogênica e anticonvulsivante da pentoxifilina no nosso modelo de convulsão estudado.

8.3 Estudo da Determinação dos Níveis de Aminas

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

Estudos sugerem que o neurotransmissor dopamina participa do controle da excitabilidade neuronal durante episódios convulsivos em modelos animais (WEINSHENKER e SZOT, 2002), na qual pesquisas com antagonistas D_1/D_2 misturados, como haloperidol, clorpromazina e tioridazina, mostraram que esses agentes produzem um efeito próconvulsivante profundo em muitas espécies e com uma enorme variedade de agentes convulsivantes (TURSKI et al., 1988; OGREN e PAKH, 1993).

FREITAS et al. (2006) mostram que antagonistas do receptor dopaminérgico D_2 aumentaram o número de animais que convulsionaram e apresentaram *status epilepticus*, e reduziram a latência das convulsões bem como também reduziram a latência do estado epiléptico. Foi visto que agonistas dos receptores D_2 apresentam atividade anticonvulsivante em convulsões induzidas por eletrochoque e/ou por pentilenotetrazol em roedores (LOSCHER et al., 1986).

Evidências indicam que a substância negra é a principal estrutura cerebral envolvida na propagação e expressão das convulsões motoras (LOUSHER et al., 1986). A substância negra é rica em receptores dopaminérgicos dos subtipos D_1 e D_2 podendo ser uma estratégia para promover a redução ou inibição da propagação da convulsão mediada por esta estrutura ou outras áreas cerebrais. (FREITAS et al. 2006)

FREITAS et al. (2003) encontrou diferenças significativas no conteúdo de monoaminas no corpo estriado de ratos jovens após convulsões induzidas por pilocarpina. Havendo uma diminuição na concentração do neurotransmissor DA, durante o *status epilepticus* em ratos jovens sacrificados após 1h e 24h de observação. Com relação ao metabólito da DA (DOPAC) foi visto uma redução da concentração no corpo estriado após 1h e 24h das convulsões induzidas por pilocarpina. Estudo de TARIQ et al (2008) demonstrou uma redução nos níveis de dopamina e DOPAC em ratos com 20 dias que receberam pilocarpina.

Durante as convulsões induzidas por pilocarpina há mudanças nos níveis de monoaminas e seus metabólito, podendo ser tanto uma causa ou um efeito da atividade epiléptica. Baseado na relativa importância de diversas monoaminas (DA e 5-HT) em convulsões e por descrições na literatura demonstrando o corpo estriado como sendo responsável pela propagação da atividade convulsiva induzida pela pilocarpina, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos da Pentoxifilina sobre os níveis de monoaminas e seus respectivos metabólitos no corpo estriado de ratos adultos após a convulsões induzidas por pilocarpina.

Nossos resultados confirmam os achados na literatura, mostrando uma redução significativa nos níveis de dopamina no corpo estriado de animais que receberam pilocarpina e também foi encontrado um aumento significativo nos níveis de dopamina nos animais que receberam Pentoxifilina na dose de 25mg/Kg. Este resultado pode estar diretamente relacionado com os achados comportamentais encontrados no nosso trabalho para esta dose estudada.

O estudo de pacientes com epilepsia do lobo temporal mostra uma possível ligação do sistema serotoninérgico com a atividade convulsiva. Durante as convulsões pode ser verificado que este sistema apresenta certos episódios de disfunção durante a convulsão (JOBÉ et al., 2003).

A participação da serotonina (5-HT) durante as convulsões foi sugerida através de modelos genéticos de epilepsia e induzidos por substâncias químicas (JOBÉ et al., 2003). As inervações serotoninérgicas em diferentes áreas cerebrais parecem estar envolvidas no processo

convulsivo, modulando o quadro convulsivo. A inibição da síntese ou liberação da 5-HT parece exacerbar a atividade epiléptica (JOBE et al., 2003).

Os inibidores da recaptação da 5-HT apresentam um excelente efeito anticonvulsivante em convulsões genéticas induzidas em camundongos e em alguns casos de epilepsia em humanos (DAILEY & NARITOKU, 1996), sugerindo que aumentos na concentração da 5-HT podem impedir a propagação da atividade epiléptica, e os déficits na transmissão serotoninérgica podem facilitar a instalação e a manutenção da atividade epiléptica (JOBE et al., 1999).

Nossos estudos determinaram uma redução nos níveis de serotonina nos animais que receberam apenas pilocarpina e, contrariamente, houve um aumento significativo nos níveis de serotonina nos animais que foram pré-tratados com Pentoxifilina em ambas as doses testadas. Estes dados corroboram com a literatura, confirmando um envolvimento desta amina no processo convulsivo induzido por pilocarpina e relacionam a ação neuroprotetora da Pentoxifilina ao promover elevação nos níveis de serotonina.

A significativa neuroproteção proporcionada pela Pentoxifilina pode, de algum modo, ser atribuído à sua capacidade de atenuar a depleção nos níveis destas importantes monoaminas envolvidas no início, propagação ou manutenção da epilepsia no nosso modelo animal de epilepsia do lobo temporal induzido por pilocarpina.

8.4 Estudo da Determinação dos Níveis Glicêmicos

Vários autores têm relatado alterações no consumo de glicose cerebral durante o *status epilepticus*. De acordo com Fernandes e col. (1999), o hipermetabolismo, em animais mais velhos, ocorre em áreas associadas com dano cerebral.

Estudos recentes mostram uma hiperglicemia durante as três primeiras horas, após o início do *status epilepticus*, em ratos adultos. Assim, esta hiperglicemia poderia estar envolvida na lesão cerebral observada nesses animais após o *status epilepticus* induzido pela pilocarpina. Esta hiperglicemia pode facilitar a entrada de glicose no cérebro e pode estar envolvida na morte celular durante o *status epilepticus*.

Alguns resultados mostraram que apenas a hiperglicemia é capaz de matar neurônios, principalmente na região de hilo, sugerindo que o aumento da glicose cerebral intensifica a morte celular. Durante o *status epilepticus* ocorre hipermetabolismo no cérebro, promovido pela intensa atividade neuronal (FERNANDES et al., 1999). Animais com 21 dias já apresentavam hiperglicemia durante as primeiras horas de *status epilepticus*, assemelhando-se aos dados encontrados em animais adultos. Não foi determinado se a hiperglicemia ocorre devido a uma ação direta da pilocarpina sobre as células do pâncreas, modificando a liberação de insulina e / ou se a atuação do *status epilepticus* sobre o núcleo hipotalâmico seria capaz de modificar essa secreção hormonal. No que diz respeito à expressão de GLUT3 encontraram níveis elevados deste transportador de glicose em animais apresentando *status epilepticus*. (SANTIAGO et al., 2006)

Sokoloff e col. (1977) desenvolveram um método capaz de avaliar as alterações na atividade funcional do cérebro induzido por diversos agentes farmacológicos ou toxicológicos utilizando [¹⁴C]-2-deoxiglicose. A técnica autoradiográfica foi usada para rastrear a utilização de glicose regional através do tecido cerebral em estado fisiológico de consciência e condições patológicas experimentais.

A medição do metabolismo cerebral durante as crises e períodos interictal tem sido usada para identificar as estruturas do SNC responsáveis pela geração, propagação e controle da epilepsia (SOKOLOFF et al., 1977; SCORZA et al., 2002; SANTIAGO et al., 2006). Mostrou-se uma drástica modificação na utilização local de glicose cerebral durante o *status epilepticus* (MELDRUM et al., 1983; INGVAR et al., 1986; SCORZA et al., 2002; SANTIAGO et al., 2006). Estudos correlacionaram o desenvolvimento de dano neural em diferentes modelos de convulsão em roedores e primatas com regiões marcadas por hipermetabolismo.

SCORZA et. al em 2002, através da técnica utilizando [¹⁴C]-2-deoxiglicose, demonstrou a utilização de glicose durante o *status epilepticus* em diversas áreas cerebrais em comparação com o grupo controle, sendo a utilização mais pronunciada nas áreas correspondentes ao hipocampo (+50,6%), caudado-putamem (+30,6%), córtex frontoparietal (+32,2%), amígdala (+31,7%), córtex entorrinal (+28,2%), núcleo talâmico (+93,5%) e substância nigra (+50,3%). (SCORZA et al., 2002).

Estudos clínicos mostram que adultos com hiperglicemia têm uma maior predisposição para crises convulsivas. Por outro lado, parece que níveis extracelulares elevados de glicose está associado com hiperexcitabilidade neuronal, indicando que o equilíbrio de glicose é necessária para a neurotransmissão normal (SCHWECHTER et al., 2003).

Schwechter e colaboradores em 2003 estudaram a correlação entre hiperglicemia e convulsão em animais diabéticos (hiperglicêmicos), não-diabéticos e hiperglicêmicos, hipoglicêmicos (jejum) e normais. Os animais hiperglicêmicos e diabéticos tiveram uma latência de convulsão significativamente menor do que os animais controle. Os animais em jejum (hipoglicêmicos) tiveram uma latência de convulsão maior comparado com o grupo controle. Os animais hiperglicêmicos e não diabéticos receberam uma solução de glicose 20% 30 minutos antes de ser induzido a convulsão com “Flurothyl” e apresentaram latência de convulsão menor que o grupo controle que recebeu solução salina 0,9%. Os ratos hiperglicêmicos apresentaram um limiar significativamente menos para convulsões clônicas induzidas pelo “Flurothyl”, sugerindo ação próconvulsivante da hiperglicemia.

Em seguida, Schwechter e colaboradores avaliaram os efeitos dos níveis de glicose extracelular elevados sobre a atividade epileptiforme *in vitro*. Fatias de córtex entorrinal-hipocampo foram expostas a um meio extracelular livre de Mg^{2+} com 10 mM de glicose extracelular (concentração de glicose usual utilizada em fatias cerebrais) ocorrendo descargas epileptiformes típicas. Quando os níveis de glicose foram aumentados para 20 mM, a frequência epileptiforme não alterou, no entanto, a amplitude aumentou significativamente, sugerindo uma ativação neuronal avançada. O efeito foi revertido quando os níveis de glicose foram reduzidos para 10 mM.

Em nossos experimentos observamos um aumento significativo (331%) nos níveis glicêmicos nos ratos tratados com Pilocarpina 400mg/Kg, i.p., quando comparado ao grupo Normal. Esses resultados condizem com o observado na literatura, confirmando um efeito hiperglicêmico na epilepsia. Os animais pré-tratados com Pentoxifilina, em ambas as doses de 25 e 50 mg/Kg, tiveram uma redução significativa de 237% e 264% nos níveis glicêmicos quando comparado com o grupo controle P400. Os animais pré-tratados com Pentoxifilina em ambas as doses de 25 e 50 mg/Kg mantiveram os níveis glicêmicos próximos dos níveis normais quando comparado com o grupo Normal, que recebeu injeção de solução salina

0,9%, não havendo diferença significativa nos níveis glicêmicos entre os animais dos grupo pré-tratados com Pentoxifilina e o grupo Normal. Nossos resultados sugerem uma ação hipoglicemiante da pentoxifilina sobre o efeito hiperglicemiante do processo convulsivo. De acordo com os resultados encontrados na literatura, que demonstram uma relação direta entre hiperglicemia e aumento da excitabilidade neuronal na epilepsia, havendo uma redução do limiar da convulsão e um maior dano em áreas cerebrais envolvidas no início, propagação e manutenção da epilepsia, podemos sugerir que a Pentoxifilina, mantém a glicemia em níveis normais após a indução da convulsão com Pilocarpina, 400mg/Kg e este resultado pode estar diretamente relacionado com sua ação neuroprotetora.

8.5 Estudo Histopatológico

A epilepsia do lobo temporal pode estar à associada à esclerose do hipocampo (MELDRUM et al., 1990; LOTHAMN et al., 1981). Patologicamente a esclerose hipocampal refere-se a uma perda neuronal em grau variável e relativamente seletiva em CA1, CA3 e regiões do giro denteado do hipocampo. A epilepsia do lobo temporal, a forma mais freqüente das epilepsias resistentes ao tratamento farmacológico entre a população adulta, se caracteriza por perda neuronal hipocampal e comprometimento cognitivo progressivos (GUEDES et al., 2006). Em casos mais graves, além da esclerose hipocampal, há perda neuronal também em locais extra-hipocampais, como córtex entorrinal, giro para-hipocampal, amígdala, tálamo e cerebelo. Entretanto, a perda celular fora do hipocampo não ocorre a menos que haja também perda neuronal no hipocampo (GUEDES et al., 2006). Do ponto de vista estrutural, o hipocampo é a região cerebral mais sensível aos efeitos neuropatológicos desencadeados pela ação epileptiforme resultante da ativação colinérgica (CAVALHEIRO et al., 1991 e 1995; SCORZA et al., 2005; AUVIN et al., 2010).

A coloração de Nissl é uma das técnicas mais utilizadas para investigação do sistema nervoso. Ela permite a evidenciação da substância de Nissl, material granular constituído por DNA ribossomal, o qual concentra-se principalmente no nucléolo, possibilitando a discriminação desta estrutura celular específica. O corante utilizado para evidenciar a substância de Nissl foi o cresil violeta. Comparamos os cortes obtidos pelos diferentes grupos e identificamos diferenças morfológicas entre os cortes.

De acordo com a literatura, o modelo de convulsão induzido por pilocarpina promove intensa morte neuronal na região do hipocampo, principalmente na sub-área CA1 e CA3 do hipocampo (CAVALHEIRO et al., 1991 e 1995; SCORZA et al., 2005). Nossos resultados confirmam estes dados. Podemos sugerir uma possível ação neuroprotetora da pentoxifilina ao reduzir alterações morfológicas nas células neuronais e, também, ao diminuir a perda de núcleos pelos neurônios da região CA3 do hipocampo.

Alguns trabalhos mostram que o TNF- α promove mudanças na expressão do receptor de glutamato de ratos que receberam LPS (HARR et al., 2008), bem como em subtipos de receptores para TNF- α em camundongos nocaute (BALOSSO et al., 2009), e pela capacidade do TNF- α induzir mudanças rápidas na função e expressão de subunidade do receptor AMPA (STELLWAGEN et al., 2005). Esta citocina inflamatória modula a excitabilidade, interagir com convulsões, influencia a probabilidade de desenvolver epilepsia, do tipo e da gravidade de crises espontâneas.

Nossos resultados mostraram que a pentoxifilina inibe a produção de TNF- α de maneira dose dependente no modelo de convulsão induzido por pilocarpina. Sugerimos que a ação neuroprotetora na pentoxifilina pode estar delacionada com a inibição desta importante citonina inflamatória envolvida no processo epileptogênico.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora todos os grupos experimentais tenham manifestado os sinais colinérgicos periféricos iniciados com a injeção da pilocarpina ou tônico-clônico com a injeção de pentilenotetrazol, nem todos os animais dos grupos pré-tratados com pentoxifilina convulsionaram. Podemos ainda observar que houve um considerável aumento no tempo para que fosse iniciada a primeira convulsão nos animais pré-tratados com a droga, onde observamos um aumento de 18% no grupo pré-tratado com pentoxifilina na dose de 25mg/Kg, quando comparado com o grupo P400 e um aumento de 151,8% e 273,5% nas doses de 25 e 50mg/Kg respectivamente em relação ao grupo PTZ80.

Observamos ainda que não pôde ser notado um efeito dose/resposta no que diz respeito á atividade neuroprotetora da pentoxifilina, haja visto que a dose menor (25mg/kg) se mostrou mais eficiente que a dose maior (50mg/kg) no prolongamento das convulsões no modelo de convulsão induzido por pilocarpina. Percebemos ainda, indicativos de toxicidade da pentoxifilina em doses mais altas (iguais ou superiores a 100mg/kg).

Quanto aos níveis de aminoácidos percebemos considerável diminuição nas concentrações de glutamato nos grupos pré-tratados com pentoxifilina, indicando uma possível via neuroprotetora, notamos também em contrapartida um considerável aumento nos níveis de aminoácidos inibitórios como o GABA em importantes áreas cerebrais relacionadas com início, propagação e/ou manutenção da epilepsia, sugerindo a participação destes no desencadear de crises epiléticas induzidas pela pilocarpina.

Quanto aos níveis de amins, observamos aumento nos níveis de Dopamina e Serotonina no corpo estriado de animais pré-tratados com pentoxifilina na dose de 25mg/Kg, sugerindo a participação destas no desencadear de crises epiléticas induzidas pela pilocarpina e sugerindo que este aumento pode estar relacionado com o melhor resultado comportamental observado nesta dose.

Diversos estudos mostram o efeito hiperglicêmico promovido pelo processo convulsivo induzido pela pilocarpina e a relação entre uma maior taxa de metabolização em áreas cerebrais relacionadas com a epileptogênese com maior dano cerebral envolvido, assim, sugerimos que a ação neuroprotetora na pentoxifilina pode estar relacionada com seus efeitos

normoglicêmicos durante o processo convulsivo, reduzindo assim danos cerebrais e morte neuronal em áreas cerebrais envolvidas com a epileptogênese.

Nossos resultados sugerem que a neuroinflamação envolvida no processo convulsivo é reduzida pela inibição do TNF- α pela pentoxifilina de forma dose dependente, promovendo uma ação neuroprotetora por preservar a morfologia e o núcleo neuronal, uma importante organela para manutenção vital da célula.

10. CONCLUSÕES

Com o desenvolvimento deste trabalho, podemos observar que o pré-tratamento com pentoxifilina interfere com vários sistemas neuroprotetores quando os animais são submetidos a convulsão induzida pela pilocarpina na dose de 400mg/kg ou pentilenotetrazol na dose de 80mg/Kg. Tal efeito foi evidenciado através da redução nos níveis de aminoácidos excitatórios como o glutamato e, por outro lado, um aumento nos níveis de aminoácidos inibitórios como o GABA reforçando a existência de uma possível via modulatória desses aminoácidos no controle e desenvolvimento de crises epiléticas quando ocorre no pré-tratamento com pentoxifilina. O aumento nos níveis de dopamina e serotonina pela pentoxifilina na menor dose (25mg/Kg) demonstram o importante envolvimento destas aminas no processo convulsivo. A pentoxifilina impediu a hiperglicemia durante a crise convulsiva, enfatizando a relação das alterações metabólicas no convulsão. O TNF- α é uma citocina inflamatória presente na epileptogênese que foi inibido pela pentoxifilina de forma dose-dependente. O pré-tratamento com pentoxifilina promove uma ação neuroprotetora preservando a morfologia e o núcleo de neurônios na região CA3 do hipocampo. Nossos estudos sugerem que a pentoxifilina possui ação neuroprotetora no modelo de convulsão induzido por pilcoarpina e pentilenotetrazol em ratos, porém mais estudos devem ser realizados para desvendar os mecanismos de ação neuroprotetores da pentoxifilina.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, L. M.; VASCONCELOS, H. V. N. JR., D. S. MACÊDO, A. A. OLIVEIRA, R. M. FREITAS, S. M. VASCONCELOS, G. M. A. CUNHA, F. C. F. SOUSA, G. S. B. VIANA. Neuroprotective effects of caffeine in the model of 6-hydroxydopamine lesion in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 84; 415–419; 2006.

ALEGRE M.L., GASTALDELLO K., ABRAMOWICZ D., KINNAERT P., VEREERSTRAETEN P., DE PAUW L., VANDENABEELE P., MOSER M., LEO O, GOLDMAN M. Evidence that pentoxifylline reduces anti-CD3 monoclonal antibody-induced cytokine release syndrome. *Transplantation*. Oct;52(4):674-9, 1991.

ALLAN, S. M. and ROTHWELL, N. J. cytokines and acute neurodegeneration. *neuroscience*, volume 2, october 2001.

AL-TAJIR, G., CHANDLER, C.J., STARR, B.S., STARR, M.S. Opposite effect of stimulation of D1 and D2 dopamine receptors on the expression of motor seizures in mouse and rat. *Neuropharmacology*, v. 29, p. 657-661, 1990b.

AL-TAJIR, G., STARR, M.S. Anticonvulsant effect of striatal dopamine D2 receptor stimulation: dependence on cortical circuits. *Neuroscience*, v. 43, p. 51-57, 1991b.

AL-TAJIR, G., STARR, M.S. D2 agonists protect rodents against pilocarpine-induced convulsions by stimulating D2 receptors in the striatum, but not in the substantia nigra. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, v. 39, p. 109-113, 1991a.

AL-TAJIR, G., STARR, M.S., CHANDLER, C.J., STARR, B.S. Opposing effects of dopamine D1 and D2 receptor stimulation on the propagation of motor seizures in mice and rats. *Br. J. Pharmacol.*, v. 99, p. 261, 1990c.

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

ANLEZARK, G.M., MELDRUM, B.S. Effects of apomorphine, ergocornine and piribedil on audiogenic seizures in DBA/2 mice. *Br. J. Pharmacol.*, v. 53, p. 419-421, 1975.

ATTWELL, D., BARBOUR, B., SZATKOWSKI, M. Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron*, v. 11, p. 401-407, 1993.

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

BARANZINI SE, LAXER K, BOLLEN A, OKSENBERG JR. Gene expression analysis reveals altered brain transcription of glutamate receptors and inflammatory genes in a patient with chronic focal (Rasmussen's) encephalitis. *J Neuroimmunol*; 128:9–15; 2002.

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

BARONE, P., PALMA, V., PARASHOS, S. A., CHASE, T.N., CAMPANELLA, G. Role of D1 and D2 dopamine receptors in pilocarpine-induced seizures. *In: CARPENTER, M. B., BERNARDI, G., Di CHIARA, G., STANZIONE, P. Basal ganglia III*, p. 568,1990a.

BARONE, P., PARASHOS, S.A., PALMA, V., MARIN, C., CAMPANELLA, G., CHASE, T.N. Dopamine D1 receptor modulation of pilocarpine-induced convulsions. *Neuroscience*, v. 34, p. 209-217, 1990b.

BEAGLEHOLE, R., BONITA, R., KJELLSTROM, T. *Epidemiologia Básica*. 1a Edição, Lis Gráfica Editora Ltda, 1996.

BERGANTINI AP, CASTRO FA, SOUZA AM, CONTE ACF. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2005;27:120-5.

BERKKANOGLU M, GUZELOGLU-KAYISLI O, KAYISLI UA, SELAM BF, ARICI A. Regulation of Fas ligand expression by vascular endothelial growth factor in endometrial stromal cells *in vitro*. *Mol. Human Reprod*. 2004;10:393-8.

BERKOVIC, S. F. , NEWTON, M. R. SPECT Cerebral – Tomografia por Emissão de Fóton Único na Avaliação da Epilepsia Parcial. In: Cavalheiro, E. A., Costa, J.C., Palmmini, A. and Yacubian, E.M.T.(eds.) *Fundamentos Neurobiológicas das Epilepsias. Aspectos clínicos e cirúrgicos*. São Paulo: Lemos Editorial, vol.1 cap.10, p. 673-685, 1998

BESSLER H., GILGAL R., DJALDETTI M., ZAHAVI I. Effect of pentoxifylline on the phagocytic activity, cAMP levels, and superoxide anion production by monocytes and polymorphonuclear cells. *J Leukoc Biol.* Dec;40(6):747- 54, 1986.

BLISS, T.V.P. & COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, v. 361, p. 31-39, 1993.

BLOOM, F. E. , ENGEL, J. JR. Aberrant genetic expression and opportunities for epilepsy research. *Epilepsy Res. Suppl.* v.9, p. 18,1992.

BOATRIGT KM, SALVESEN GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.*; 15:725-31; 2003.

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

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

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

BORTOLOTTO, Z.A., TURSKI, L. The susceptibility of rats to pilocarpine-induced seizures is age-dependent. *Dev. Brain Res.*, v. 37, p. 43-58, 1987.

Brain Insults: Experimental Approaches and Translational Research. *PHARMACOLOGICAL REVIEWS* Vol. 62, No. 4, 668–700, 2010

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

BRUNO, R. B.; MARQUES, T. F.; BATISTA, T. M. T.; LIMA, J. C. S. S.; ARRUDA, K.G.; CUNHA, G.M.A.; VITORB, H.V.N.; VIANA, G. S. B. Pentoxifylline treatment improves neurological and neurochemical deficits in rats subjected to transient brain ischemia. *Brainresearch*, 1260; 55–64; 2009.

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

CAMPBELL IL, ABRAHAM CR, MASLIAH E, et al. Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 90:10061-5; 1993.

CAVALHEIRO, E.A., BELLÍSSIMO, M.I., NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G. Profile of prostaglandin levels in the rat hippocampus in pilocarpine model of epilepsy. *Neurochemical*, v. 27, n. 6, p. 461-466, March 1995.

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

CAVALHEIRO, E.A., DELFRIO, F.S., TURSKI, W.A., CALDEREZZO FILHO, L.S., discovery. *Epilepsia*, v. 33, p. S1-6, 2002.

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

CAVALHEIRO, E.A., GUEDES, R.C.A. Blockade of spreading depression in chronic epileptic rats: reversion by diazepam. *Epilepsy Res.*, v. 27, p. 33-40, 1997.

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

CAVALHEIRO, E.A., PERES, C.A., SCORZA, F.A., ARIDA, R.M. The course of untreated seizures in the pilocarpine model of epilepsy. *Epilepsy Res.*, v. 34, p. 99-107, 1999.

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

CHENG B, CHRISTAKOS S, MATTSON MP. Tumor necrosis factors protect neurons against metabolic-excitotoxic insults and promote maintenance of calcium homeostasis. *Neuron*; 12:139–53; 1994.

CHING L.M.; BROWNE W.L.; TCHERNEGOVSKI, R.; GREGORY, T.; BAGULEY, B.C.; PALMER, B.D. Interaction of thalidomide, thalidomide analogues of thalidomide and pentoxifylline with the anti-tumor agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acet acid: concomitant reduction of serum tumor necrosis factor-alpha and enhancement of anti-tumor activity. *British J Cancer*. 78(3): 336-343, 1998.

CHOI, D.W., MONYER, H., GIFFARD, R.G., GOLDBERG, M.P., CHRISTINE, C.W. Acute brain injury, NMDA receptors, and hydrogen ions: observations in cortical cell cultures. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 268, p. 501-504, 1990.

CIVELLI, O. Molecular biology of the dopamine receptor subtypes. *In*: Bloom, F. E., Kupfer, D. J. *Psychopharmacology*, New York: Raven Press, p. 155-161, 1995.

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

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

CLIFFORD, D.B., PODOLSKY, A., ZORUMSKI, C.P. Acute effects of lithium on hippocampal kindled seizures. *Epilepsia*, v. 26, p. 689-692, 1985.

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

correlation with early childhood convulsions. *Ann. Neurol.*, v. 22, n. 3, p. 334-340, Sept. 1987.

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

CUNHA RA, JOHANSSON B, VAN DER PLOEG I, et al. Evidence for functionally important adenosine A2a receptor in the rat hippocampus. *Brain Res*; 649:208–16; 1994.

CUNHA RA, RIBEIRO JA. Adenosine A2a receptor facilitation of synaptic transmission in the CA1 area of the rat hippocampus requires protein kinase C but not protein kinase A activation. *Neurosci Lett*; 289:127–30; 2000.

CUNNINGHAM AJ, MURRAY CA, O'NEILL LA, et al. Interleukin-1beta (IL-1 beta) and tumour necrosis factor (TNF) inhibit longterm potentiation in the rat dentate gyrus in vitro. *Neurosci Lett*; 203:17–20; 1996.

D'ALIMONTE, I.; M. D'AURO, R. CITRARO, F. BIAGIONI, S. JIANG, E. NARGI, S. BUCCELLA, P.D. IORIO, P. GIULIANI, P. BALLERINI, F. CACIAGLI, E. RUSSO, G.D. SARRO, R. CICCARELLI, Altered distribution and function of A2A adenosine receptors in the brain of WAG/Rij rats with genetic absence epilepsy, before and after appearance of the disease, *Eur. J. Neurosci.* 30; 1023–1035; 2009.

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

DAVIS, M., RAINNIE, D., CASSELL, M. The role of the amygdala in fear and anxiety. *Annual Rev. Neurosci.*, v. 15, p. 353-375, 1992.

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

DAWSON, V.L., DAWSON, T.M., LONDON, E.D., BREDT, D.S., SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 88, p. 6368-6371, 1991.

De BRUIN, V.M.S, MARINHO, M.M.F., SOUSA, F.C.F., VIANA, G.S.B. Behavioural and neurochemical alterations after Lithium-Pilocarpine administration in young and adult rats: a comparative study. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour*, v. 65, n. 3, p. 547-551, August 1999.

DE LORENZO, R.J., CHURN, S.B., KOCHAN, L.D. Chronic inhibition of Ca²⁺/Calmodulin Kinase II activity in the pilocarpine model of epilepsy. *Brain Research*, v. 875, p. 66-77, June 2000.

DE LORENZO, R.J., RAZA, M., PAL, S., RAFIQ, A. Long-term alteration of calcium homeostatic mechanisms in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Brain Research*, v. 903, p. 1-12, January 2001.

DE LORENZO, R.J., RICE, A., OMOJOKUN, O., CHURN, S.B., KOCHAN, L.D. Status epilepticus results in an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent inhibition of Ca²⁺-calmodulin-dependent kinase II activity in the rat. *Neuroscience*, v. 95, n. 3, p. 735-743, 2000..

DE SARRO, G., IBBADU, G.F., MARRA, R., ROTIROTI, D., LOIACONO, A., DI PAOLA, E.D., RUSSO, E. Seizure susceptibility to various convulsant stimuli in dystrophin-deficient *mdx* mice. *Neuroscience Research*, v. , p. 2004.

DE SIMONI M G, PEREGO C, RAVIZZA T, MONETA D, CONTI M, MARCHESI F, DE LUIGI A, GARATTINI S & VEZZANI A, Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus, *Eur J Neurosci*, 12 (2000) 2623.

DE SIMONI MG, IMERI L. Cytokine-neurotransmitter interactions in the brain. *Biol Signals Recept* 1998;7:33-44.

DE SIMONI MG, PEREGO C, RAVIZZA T, et al. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci*; 12:2623-33; 2000.

DINGLELINE, R., MCBAIN, C.J., MCNAMARA, J.O. Excitatory amino acid receptors in epilepsy. *Trends Pharm. Sci.*, v. 11, p. 379, 1990.

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

DRAGUNOW M. Adenosine and epileptic seizure. In: Phillis JW, ed. *Adenosine and adenine nucleotides as regulators of cellular function*. Boca Raton: CRC Press; 367-79; 1991.

DREIFUSS, F. E. The epilepsies: clinical implications of the international classification. *Epilepsia*, v. 31 (suppl.3) :S3-S19, 1990.

DUNWIDDIE TV, MASINO SA. The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci*; 24:31–55; 2001.

DUNWIDDIE TV. Adenosine and suppression of seizures. *Adv Neurol*; 79:1001–10; 1999.

DUNWIDDIE TV. The physiological role of adenosine in the central nervous system. *Int Rev Neurobiol*; 27:63–139; 1985.

DUNWIDDIE, T. V.; and Susan A. Masino, THE ROLE AND REGULATION OF ADENOSINE IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. *Annu. Rev. Neurosci.* 24:31–55; 2001.

EEMAN, P. Brain dopamine receptors. *Pharmac. Rev.*, v. 32, p. 229-313, 1981.

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

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

ENGEL, J., PEDLEY, T.A. *Epilepsy: A comprehensive text-book*, Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997.

ENGEL, J.Jr. ILAE Commission Report. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and hydroxytryptamine, [3H]-lysergic acid diethylamide and [3H]-spiroperidol. *Mol Pharmacol*, v. 16, p. 687-699, 1979.

ENGLE, J.JR., SHARPLESS, N.S. Long-lasting depletion of dopamine in the rat amygdala induced by kindling stimulation. *Brain Research*, v. 136, p. 381-386, 1979.

ETHERINGTON LAV, FRENGUELLI BG. Endogenous adenosine modulates epileptiform activity in rat hippocampus in a receptor subtypedependent manner. *Eur J Neurosci*;19:2539–50; 2004.

FADEN, A. I., DEMEDIUK, P., PANTER, S.S., VINK, R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science*, v. 244, p. 798-800, 1989.

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

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

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

FISHER, A., KONTTINEN, Y., FOX, R.I. Use of muscarinic agonists in the treatment of Sjogren's Syndrome. *Clinical Immunology*, v. 101, n.3, p. 249-263, 2001.

FISHER, S.R. Animal models of epilepsies. *Brain Research Reviews*, v. 14, p. 245-278, June 1989.

FREDHOLM BB, DUNWIDDIE TV. How does adenosine inhibit transmitter release? *Trends Pharmacol*; 9:130–4; 1988.

FREITAS, R.M. Alterações comportamentais, histopatológicas e neuroquímicas em ratos adultos durante a fase aguda da convulsão induzida por pilocarpina. Fortaleza, 2003 [Dissertação de Mestrado]. Fortaleza: Faculdade de Medicina da UFC; 2003.

FREITAS, R.M., AGUIAR L.M.V., SOUSA, F.C.F., VASCONCELOS, S.M.M., VIANA, G.S.B., FONTELES, M.M.F. Modifications in muscarinic, dopaminergic and serotonergic receptors concentrations in the hippocampus and striatum of epileptic rats, *Life Sci*, v.78, p.253-258, 2005b.

FREITAS, R.M., FELIPE, C.F.B., NASCIEMENTO, V.S., OLIVEIRA, A.A., VIANA, G.S.B., FONTELES, M.M.F. Pilocarpine-induced seizures in adult rats: monoamine content

and muscarinic and dopaminergic receptor changes in the striatum. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, v. 136, n. 2, p. 103-108, 2003b.

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, 2004b.

FREITAS, R.M., OLIVEIRA, A.A., SOUSA, F.C.F., VASCONCELOS, S.M.M., VIANA, G.S.B., FONTELES, M.M.F. Expression of muscarinic and dopaminergic receptors and monoamine levels frontal cortex of epileptic rats, *Pharmacol. Biochem. Beh.*, v. 83, n. 2, p. 302-306, 2006a.

FREITAS, R.M., OLIVEIRA, AA, VASCONCELOS, S.M.M., SOUSA, F.C.F., VIANA, G.S.B., FONTELES, M.M.F. Pathophysiology of status epilepticus induced by pilocarpine. *Current Medicinal Chemistry – Central Nervous System Agents - CNSA-MC.*, v., p., 2006e.

FREITAS, R.M., SOUSA, F.C.F., VASCONCELOS, S.M.M., VIANA, G.S.B., FONTELES, M.M.F. Pilocarpine-induced seizures in adult rats: lipid peroxidation level, nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the hippocampus, striatum and frontal cortex. *Pharmacol. Biochem. Beh.*, v. 78, n. 2, p. 327-332, 2004a.

FREITAS, R.M., SOUSA, F.C.F., VASCONCELOS, S.M.M., VIANA, G.S.B., FONTELES, M.M.F. Monoamine levels after pilocarpine-induced status epilepticus in hippocampus, and frontal cortex of Wistar rats, *Neurosci Lett.*, v. 370, p.196-200, 2004c.

FREITAS, R.M., SOUSA, F.C.F., VIANA, G.S.B., FONTELES, M.M.F. Acetylcholinesterase activities in hippocampus, frontal cortex and striatum of Wistar rats after pilocarpine-induced status epilepticus, *Neurosci Lett.*, v. 399, p. 76-78, 2006b.

FREITAS, R.M., SOUSA, F.C.F., VIANA, G.S.B., FONTELES, M.M.F. Effect of gabaergic, glutamatergic, antipsychotic and antidepressant drugs on pilocarpine-induced seizures and status epilepticus. *Neurosci. Lett.*, v. 408, p.79-83, 2006c.

FREITAS, R.M., SOUSA, F.C.F., VIANA, G.S.B., FONTELES, M.M.F. Pharmacological studies of the opioids, mood stabilizer and dopaminergic drugs on pilocarpine-induced seizures and status epilepticus. *Neurosci. Lett.*, v. 408, p. 84-88, 2006d.

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

FREITAS, R.M., VASCONCELOS, S.M.M., SOUSA, F.C.F., VIANA, G.S.B., FONTELES, M.M.F. Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in Wistar rats, *The FEBS Journal*, v. 272, n. 6, p. 1307-1312, 2005a.

FREITAS, R.M., VIANA, G.S.B., FONTELES, M.M.F. Striatal monoamines levels during status epilepticus. *Rev. Psiquiatr. Clín.*, v. 30, p. 76-79, 2003c.

FRIEDMAN, A.; DINGLELINE, R.; Molecular cascades that mediate the influence of inflammation on epilepsy. *Epilepsia*, 52(Suppl. 3):33–39, 2011

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

GAHRING LC, WHITE HS, SKRADSKI SL, et al. Interleukin-1alpha in the brain is induced by audiogenic seizure. *Neurobiol Dis*; 3:263–9; 1997.

GARDINER, R. M. Genetic basis of the human epilepsies. *Epilepsy Research*, v.36, p.91-95, 1999.

GEORGE B, KULKARNI SK. Modulation of lithium-pilocarpine-induced status epilepticus by adenosinergic agents. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*; 19:329–33; 1997.

GEORGIEV V, JOHANSSON B, FREDHOLM BB Long-term caffeine treatment leads to a decreased susceptibility to NMDA-induced clonic seizures in mice without changes in adenosine A1 receptor number. *Brain Res* 612:271-277; 1993.

GOMES, C. V.; MANUELLA P. KASTER, ANGELO R. TOMÉ, PAULA M. AGOSTINHO, RODRIGO A. CUNHA Adenosine receptors and brain diseases: Neuroprotection and neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta* 1808, 1380–1399; 2011.

GOUDER N, FRITSCHY JM, BOISON D. Seizure suppression by adenosine A1 receptor activation in a mouse model of pharmaco-resistant epilepsy. *Epilepsia*; 44:877–85, 2003.

GRIVICICH I, REGNER A, ROCHA, AB. Morte celular por apoptose. *Rev Bras Cancerol.*; 53:335-43; 2007.

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

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

HAYES, R.L., JENKINS, L.W., LYETH, B.G. Neurotransmitter-mediated mechanisms of traumatic brain injury; acetylcholine and excitatory amino acids. *J. Neurotrauma*, v. 9, p. S173-S187, 1992.

HEINEMANN, J., KARDOS, J., KANN, O., GABRIEL, S., SCHUCHMANN, S., KOVACS, R. Free radicalmediated cell damage after experimental status epilepticus in hippocampal slices cultures. *J. Neurophysiol.*, v. 88, p. 2909-2918, 2002.

HENGARTNER MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*; 407:770-6; 2000.

HEN-I, L.; SHI-JYE, C.; WANG, D.; NAN-HSIUNG, F. Pharmacological modulation of TNF production in macrophages. *J Microbiol Immunol Infect* . 37: 8 – 15, 2004

HENSCHER, O.; Keith E. Gipson, and Angelique Bordey. GABAA Receptors, Anesthetics and Anticonvulsants in Brain Development. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2008 April ; 7(2): 211–224.

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

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

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

HONCHAR, M.P., VOGLER, G.P., GISH, B.G., SHERMAN, W.R. Evidence that phosphoinositide metabolism in rat cerebral cortex stimulated by pilocarpine, physostigmine, and pargyline *in vivo* is not changed by chronic lithium treatment. *Journal Neurochemical*, v. 55, p. 172-180, 1990.

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

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.

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

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.

INGVAR M. Cerebral blood flow and metabolic rate during seizures: Relationship to epileptic brain damage. *Ann NY Acad Sci* 1986;462:194-206.

JANKOWSKY JL, PATTERSON PH. The role of cytokines and growth factors in seizures and their sequelae. *Prog Neurobiol* 2001;63:125-49.

JARVIS MF, WILLIAMS M. Direct autoradiographic localization of adenosine A2 receptors in the rat brain using A2-selective agonist, [3H]CGS 21680. *Eur J Pharmacol*; 168:243-6; 1989.

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

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

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

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

KLITGAARD H, KNUTSEN LJS, THOMSEN C Contrasting effects of adenosine A1 and A2 receptor ligands in different chemoconvulsive rodent models. *Eur J Pharmacol* 242:221-228; 1993.

KLITGAARD, A., MATAGNE, J., GOBERT, WÜLFERT E. Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy. *European Journal of Pharmacology*, v. 353, p. 191–206,1998.

KLITGAARD, H. Levetiracetam: the preclinical profile of a new class of antiepileptic drugs? *Epilepsia*, v. 42, p. 13-18, 2001.

KLITGAARD, H., MATAGNE, A., GRIMEE, R., VANNESTE-GOEMAERE, J.,MARGINEANU, D. Electrophysiological, neurochemical, and regional effects of levetiracetam in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy, *Seizure*, v. 12, p. 92-100, 2003.

KOFMAN, O., PATISHI, Y. Interactions of lithium and drugs that affect signal transduction on behaviour in rats. *European Neuropsychopharmacology*, v. 9, p. 385-397, 1999.

KRSEK, P., MIKULECK, A., DRUGA, R., KUBOV, H., HLINAK, Z., SUCHOMELOV, L., MARES, P. Longterm behavioral and morphological consequences of nonconvulsive status epilepticus in rats. *Epilepsy & Behavior*, v. 5, p. 180–191, 2004.

LANCASTER, B. Alcohol, nitric oxide, and neurotoxicity: is there a connection?-A review. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v. 16, p. 539-541, 1992.

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

LEONARD, C. S.; LLINÁS, R. Serotonergic and cholinergic inhibition of mesopontine cholinergic neurons controlling REM sleep: an in vitro electrophysiological study.

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

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

LIPTON, S.A., SUCHER, N.J., KAISER, P.K., DREYER, E.B. Synergistic effects of HIV coat protein and NMDA receptor-mediated neurotoxicity. *Neuron*, v. 7, p. 111-118, 1991.

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

LOPES LV, CUNHA RA, RIBEIRO JA. Crosstalk between A1 and A2a adenosine receptors in the hippocampus and cortex of young adult and aged rats. *J Neurophysiol*; 82:3196–203;1999.

LOSCHER, W.; Claudia Brandt. Prevention or Modification of Epileptogenesis after

LOUSCHER, W., CZUCZWAR, S.J. Studies on the involvement of dopamine D1 e D2 receptors in the anticonvulsant effect of dopamine agonists in various rodent models of epilepsy. *European Journal Pharmacology*, v. 128, p. 55- 65, 1986.

LUDENS, H., WISDEN, W. Function and pharmacology of multiple GABAA receptor subunits. *Trends Pharmacol Sci.*, v. 12, p. 49-51, 1991.

LYONS, A. S. ; PETRUCELLI, R. J. *Medicine: an illustrated history*. New York: Abradale Press, 1987.

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

MARINHO, M.M.F., SOUSA, F.C.F., BRUIN, V.M.S., VALE, M.R., VIANA, G.S.B. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic

receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. *Neurochemistry International*, v. 33, p. 299-306, 1998.

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

MARQUES L.J, ZHENG L., POULAKIS N., GUZMAN J., COSTABEL U. Pentoxifylline inhibits TNF-alpha production from human alveolar macrophages. *Am J Respir Crit Care Med*. Feb;159(2):508-11, 1999.

MATTSON MP, CHENG B, BALDWIN SA, et al. Brain injury and tumor necrosis factors induce calbindin D-28k in astrocytes: evidence for a cytoprotective response. *J Neurosci Res*; 42:357–70; 1995.

MATTSON, R.H., CRAMER, J.A., COLLINS, J.F. A comparison of valproate with CBZ for the treatment of complex partial seizures and secondarily generalized tonic-clonic seizures in adults. *N. Eng. J. Med.* v. 327, p. 765-771, 1992.

MCNAMARA, J. O. Cellular and molecular basis of epilepsy. *The Journal of Neuroscience*, v.14, n.6, p.3413 - 3425, 1994.

MELDRUM B. Metabolic factors during prolonged seizures and their relation to nerve cell death. In Delgado-Escueta AV, Wasterlain CG, Treiman DM, Porter RJ (eds). *Advances in Neurology*, Vol. 34: Status epilepticus. New York: Raven Press, 1983:261-275.

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

MELLO, L.E., SANTOS, J.G.JR., LONGO, B.M., BLANCO, M.M., OLIVEIRA, M.G.M. Behavioral changes resulting from the administration of cycloheximide in the pilocarpine model of epilepsy. *Brain Research.*, v. 1066, p. 37-48, 2005.

MELLO, L.E.A.M., CAVALHEIRO, E.A., TAN, A.M., KUPFER, W. R., PRETORIUS, J.K., BABB, T.L., FINCH, D.M. Circuit Mechanisms of Seizures in the Pilocarpine Model of Chronic Epilepsy: Cell Loss and Mossy Fiber Sprouting. *Epilepsia*, v. 34, p. 985-995, 1993.

MELLO, L.E.A.M., DEL BEL, E.A., GOMES, E.L.T., OLIVEIRA, J.A.C., WAKAMATSU, H., CAIRASCO, N.G. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates

of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizures susceptible Wistar rats. *Epilepsy Research*, v. 26, p. 177-192, 1996.

MELLO, L.E.A.M., SILVA, J.G. The role of mossy cell death and activation of protein synthesis in the sprouting of dentate mossy fibers: evidence from calretinin and Neo-Timm staining in pilocarpine-epileptic mice. *Epilepsia*, v. 41, S. 6, S18-S23, 2000.

MELO, T.M., SONNEWALD, U., TOURET, M., NEHLIG, A. Cortical glutamate metabolism is enhanced in a genetic model of absence epilepsy. *J. Cereb. Blood Flow. Metab.*, v. 15, p. 23-27, 2006.

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

MINAMI M, KURAISHI Y, YAMAGUCHI T, et al. Convulsants induce interleukin-1 beta messenger RNA in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*; 171:832-7, 1990.

MIRRIONE, M. M.; WYNNE K. SCHIFFER, MUSTAFA SIDDIQ, STEPHEN L. DEWEY, AND STELLA E. TSIRKA. PET Imaging of Glucose Metabolism in a Mouse Model of Temporal Lobe Epilepsy. *SYNAPSE* 59:119-121; 2006.

MONCADA, C., LEKIEFFRE, D., ARVIN, B., MELDRUM, B. Effect of NO synthase inhibition on NMDA- and ischaemia-induced hippocampal lesions. *Neuroreport*, v. 3, p. 530-532, 1992.

MORAES, M.F.D, GALVIS-ALONSO, O.Y., GARCIA-CAIRASCO, N.G. Audiogenic kindling in the Wistar rat: a potential model for recruitment of limbic structures. *Epilepsy Res.*, v. 39, p. 251-259, 2000.

MOREIRA, S. R. G.; *Epilepsia: concepção histórica, aspectos conceituais, diagnóstico tratamento. Mental*, ano II, n.3, Barbacena, p.107-122, Nov.204.

MORRISETT, R.A., JOPE, R.S., SNEAD III, O.C. Effects of drugs on the initiation and maintenance of status epilepticus induced by administration of pilocarpine to lithium-pretreated rats. *Experimental Neurology*, v. 97, p. 193-200, 1987a.

MULLER R. Hemoheological and peripheral vascular diseases: a new therapeutic approach. *J. Med.* 12: 209-235, 1981.

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

NATHANSON, N.M., MCKINNON, L.A., KALAYDJIAN, A.E., HAMILTON, S.E., ROSOFF, M.L., NADLER, L.S. Molecular analysis of the regulation of muscarinic receptor expression and function. *Life Sciences*, v. 64, n. 6/7, p. 375-379, 1999.

NEUNER P, KLOSNER G, SCHAUER E, POURMOJIB M, MACHEINER W, GRUNWALD C, KNOBLER R, SCHWARZ A, LUGER TA, SCHWARZ T. Pentoxifylline in vivo down-regulates the release of IL-1 beta, IL-6, IL-8 and tumour necrosis factor-alpha by human peripheral blood mononuclear cells. *Immunology*; 83(2):262-7; 1004.

NG, K.T., GIBBS, M.E., CROWE, S.F., SEDMAN, G.L., HUA, G.L., ZHAO, W., ODOWD, B., RICKARD, N., GIBBS, C.L., SYKOVA, E., SVOBODA, J., JENDELOVA, P. Molecular mechanisms of memory formation. *Mol. Neurobiol.*, v. 5, p. 333-350, 1991.

NGUYEN MD, JULIEN JP, RIVEST S. Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci*; 3:216-27; 2002.

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

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

OPRICA M, ERIKSSON C, SCHULTZBERG M. Inflammatory mechanisms associated with brain damage induced by kainic acid with special reference to the interleukin-1 system. *J Cell Mol Med*; 7:127-40; 2003.

OTSUKI Y. Apoptosis in human endometrium: apoptotic detection methods and signaling. *Med Electron Microsc*; 34:166-73; 2001.

PEPEU, G. *Trends Pharmacol. Science*, v. 5, p. 416- 418, 1983.

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

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

PEROUTKA, S.J., SNYDER, S.H. Multiple serotonin receptors: differential binding of [3H]-5- Neuroscience, v. 59, p. 309, 1994.

PERSINGER, M.A., DUPONT, M.J. Emergence of spontaneous seizures during the lithium/pilocarpine-induced epilepsy and neuronal the right temporal cortices. *Epilepsy & Behavior*, v. 60 , p. 125-129, 2004.

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

PLATA-SALAMAN CR, ILYIN SE, TURRIN NP, et al. Kindling modulates the IL-1beta system, TNF-alpha, TGF-beta1, and neuropeptide mRNAs in specific brain regions. *Brain Res Mol Brain Res*; 75:248–58; 2000.

PORCIÚNCULA, L.O.; P.M. CANAS, C.R. OLIVEIRA, R.A. CUNHA, Blockade of adenosine A 2^a receptors differently alters convulsive behaviour and prevents hippocampal damage in two models of temporal lobe epilepsy, *Purinergic Signal* 2; 134–135, 2006.

PORTER JM, CUTLER BS, LEE BY, REICH T, REICHLER FA, SCOGIN JT, STRANDNESS DE. Pentoxifylline efficacy in the treatment of intermittent claudication: multicenter controlled double-blind trial with objective assessment of chronic occlusive arterial disease patients. *Am Heart J*. Jul;104(1):66-72, 1982.

PORTER, R.J, ROGAWSKI, M.A New antiepileptic drugs: from serendipity to rational

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

PROBERT L, AKASSOGLU K, PASPARAKIS M, et al. Spontaneous inflammatory demyelinating disease in transgenic mice showing central nervous system-specific expression of tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:11294–8.

QUINTANS-JÚNIOR, L, J. Reinaldo Nóbrega de ALMEIDA, Anne Caroline Guerra Mendes FALCÃO, Maria de Fátima AGRA, Maria de Fátima Vanderlei de SOUSA e José Maria BARBOSA-FILHO. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro; *Acta Farm. Bonaerense* 21 (3): 179-84; 2002.

RAO R S, MEDHI B, SAIKIA U N, ARORA S K, TOOR J S, KHANDUJA K L & PANDHI P, Experimentally induced various inflammatory models and seizure: understanding the role of cytokine in rat, *Eur Neuropsychopharmacol*, 10; 760, 2008.

RAO, R. S.; PRAKASH, A. & MEDHI, B.; Role of different cytokines and seizure susceptibility: A new dimension towards epilepsy research. *Indian Journal of Experimental Biology* Vol. 47, pp. 625-634, 2009.

RAOL, Y.H., LYNCH, D.R., BROOKS-KAYAL, A.R. Role of excitatory amino acids in developmental epilepsies. *Ment. Retard Dev. Disabil Res. Rev.*, v. 2, n. 4, p. 254-260, 2001.

RICHARDSON PJ, CUNHA RA. Extracellular metabolism and function of purines in immunisolated cholinergic nerve terminals. *Neurochem Int*; 21(suppl):Q10; 1992.

RIENECK, K.; DIAMANT, M.; HAAHR, P.M.; SCHONHARTING, M.; BENDTZEN, K. *In vivo* immunomodulatory effects of pentoxifylline. *Immunol Lett.* 37: 131, 1993.

RIGOULOT, M.-A.; C. LEROY, E. KONING, A. FERRANDON, A. Nehlig, Prolonged low-dose caffeine exposure protects against hippocampal damage but not against the occurrence of epilepsy in the lithium-pilocarpine model in the rat, *Epilepsia* 44; 529–535, 2003.

SACHSE, K. T.; E.K. JACKSON, S.R. WISNIEWSKI, D.G. GILLESPIE, A.M. PUCCIO, R.S.B. CLARK, C.E. DIXON, P.M. KOCHANNEK, Increases in cerebrospinal fluid caffeine concentration are associated with favorable outcome after severe traumatic brain injury in humans, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28; 395–401, 2008.

SAGAR, H. J.; OXBURY, J. M. Hippocampal neuron loss in temporal lobe epilepsy:

SAMLAND H, HUITRON-RESENDIZ S, MASLIAH E, et al. Profound increase in sensitivity to glutamatergic but not cholinergic agonist-induced seizures in transgenic mice with astrocyte production of IL-6. *J Neurosci Res*; 73:176–87, 2003.

SAMPAIO, E.P.; SARNO, E.M.; GALILLY, R.; COHN, Z.A.; KAPLAN, G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor a production by stimulated human monocytes. *J. Exp. Med.* 173: 699 - 703, 1991.

SANTIAGO, J F.C.; CARVALHO, F. F.; PEROSA, S. R.; SILIANO, M. R.; ESPER A. CAVALHEIRO, DÉBORA AMADO, NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.; EFFECT OF GLYCEMIC STATE IN RATS SUBMITTED TO *STATUS EPILEPTICUS* DURING DEVELOPMENT. *Arq Neuropsiquiatr*; 64(2-A):233-239, 2006.

SARRO, A. D. SILVANA GRASSO, MARIA ZAPPALÀ FELICE NAVA, GIOVAMBATTISTA DE SARRO Convulsant effects of some xanthine derivatives in genetically epilepsy-prone rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 356:48–55, 1997.

SCHANDENE L., VANDENBUSSCHE P., CRUSIAUX A., ALEGRE M.L., ABRAMOWICZ D., DUPONT E., CONTENT J., GOLDMAN M. Differential effects of pentoxifylline on the production of tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin-6 (IL-6) by monocytes and T cells. *Immunology*. May;76(1):30-4, 1992.

SCHEEL D., SCHLUTER C., ERNST M., FLAD H.D., ULMER A.J. Pentoxifylline: a potent inhibitor of IL-2 and IFN-gamma biosynthesis and BCG-induced cytotoxicity *Immunology*. Sep;80(1):151-6, 1993.

SCHWECHTER, E. M.; Veliskova J, Velisek L, HYPERGLYCEMIA LOWERS SEIZURE THRESHOLD: Correlation between Extracellular Glucose and Seizure Susceptibility in Adult Rats. 2003

SCORZA, F. A.; RICARDO MARIO ARIDA, MARGARETH ROSE PRIEL, LINEU CALDERAZZO4, ESPER ABRÃO CAVALHEIRO, GLUCOSE UTILISATION DURING STATUS EPILEPTICUS IN AN EPILEPSY MODEL INDUCED BY PILOCARPINE. *Arq Neuropsiquiatr*; 60(2-A):198-203, 2002.

SEBASTIÃO AM, RIBEIRO JA. A2 receptor mediated excitatory actions of adenosine in the nervous system. *Prog Neurobiol*; 48:167–89, 1996.

SELAM B, KAYISLI UA, MULAYIM N, ARICI A. Regulation of Fas ligand expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *Biol Reprod.*; 65:979-85, 2001.

SHI, D.; DALY, J. W.; Chronic Effects of Xanthines on Levels of Central Receptors in Mice. *Cellular and Molecular Neurobiology*, Vol. 19, No. 6, 1999

SIRVEN, J.I Antiepileptic drug therapy for adults: When to initiate and how to choose. with epilepsy: Report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. *Epilepsia*, v. 42, n. 6, p. 796-80, 2001.

SMITH R.V., WALLER E.S., DOLUISIO J.T., BAUZA M.T., PURI S.K., HO I, LASSMAN H.B. Pharmacokinetics of orally administered pentoxifylline in humans. *J Pharm Sci.* Jan;75(1):47-52, 1986.

SMITH, K.A., LACHMAN, L.B., OPPENHEIN, J.J. AND FAVATA, M.F. The functional relationship of the interleukins. *J. Exp. Med.* 151: 1551, 1980.

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

SOKOLOFF L, REIVICH M, KENNEDY C, et al. The [14C] deoxyglucose method for the measurement of cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the concious and anesthetized albino rat. *J Neurochem*; 28:897-916, 1997.

SPINK, D.C., MARTIN, D.L. Excitatory amino acids in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.*, v. 29, p. 110, 1991.

STRIETER R.M., REMICK D.G., WARD P.A., SPENGLER R.N., LYNCH J.P. 3RD, LARRICK J., KUNKEL S.L. Cellular and molecular regulation of tumor necrosis factor-alpha production by pentoxifylline..*Biochem Biophys Res Commun.* Sep 30;155(3):1230-6, 1988.

SULLIVAN G.W., CARPER H.T., NOVICK W.J.JR, MANDELL G.L. Inhibition of the inflammatory action of interleukin-1 and tumor necrosis factor (alpha) on neutrophil function by pentoxifylline. *Infect Immun.* Jul;56(7):1722-9, 1988.

SUTULA, T. P. Experimental models of temporal lobe epilepsy: new insights from the study of kindling and synaptic reorganization. *Epilepsia*, v. 31, suppl.3, p.45 - 54, 1990.

SZTRYMF, B.; RABILLER, A.; NUNES, H.; SAVALE, L.; LEBREC, D.; LEPAPE, A.; De MONTPREVILLE, V.; MAZMANIAN, M.; HUMBERT, M.; HERVE, P. Prevention of

hepatopulmonary syndrome by pentoxifylline in cirrhotic rats. *Eur Respir J.* 23: 752 – 758, 2004.

TAFFET S.M., SINGHEL K.J., OVERHOLTZER J.F., SHURTLEFF S.A. Regulation of tumor necrosis factor expression in a macrophage-like cell line by lipopolysaccharide and cyclic AMP. *Cell Immunol.* May;120(2):291-300, 1989.

TANNENBAUM C.S., HAMILTON T.A. Lipopolysaccharide-induced gene expression in murine peritoneal macrophages is selectively suppressed by agents that elevate intracellular cAMP. *J Immunol.* Feb 15;142(4):1274-80, 1989.

TARIQ, M.; AHMAD, M.; KHALAF AL MOUTAERY, SALEH AL DEEB Pentoxifylline ameliorates lithium-pilocarpine induced status epilepticus in young rats. *Epilepsy & Behavior* 12; 354–365, 2008.

TEICHER, B.A.; HOLDEN, S.A.; HERMAN, T.S.; EPELBAUM, R.; PARDEE, A.B.; DEZUBE, B. Efficacy of pentoxifylline as a modulator of alkylating agent activity *in vitro* and *in vivo*. *Anticancer Res.* 11(4): 1555 - 60, 1991.

THANHAUSER A., REILING N., BOHLE A., TOELLNER K.M., DUCHROW M.,

THIEL, R.J., FOWKES, S.W. Down syndrome and epilepsy: a nutritional connection? *Medical Hypotheses*, v. 62, p. 35–44, 2004.

THOMPSON SM, HAAS HL, GAHWILLER BH. Comparison of the actions of adenosine at pre and postsynaptic receptors in the rat hippocampus *in vitro*. *J Physiol*;451:347–63, 1992.

TURRIN NP, RIVEST S. Innate immune reaction in response to seizures: implications for the neuropathology associated with epilepsy. *Neurobiol Dis*;16:321–34, 2004.

TURSKI, L., CAVALHEIRO, A.A., SIEKLUCKA-DZIUBA, M., IKONOMIDOU-TURSKI, C., CZUCWAR, S.J., TURSKI, W.A. Seizures produced by pilocarpine: neuropathological sequelae and activity of glutamate decarboxylase in the rat forebrain. *Brain Research*, v. 398, p. 37-48, 1986b.

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

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

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

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

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

TURSKI, W.A., CAVALHEIRO, E.A., BORTOLOTTI, Z.A., MELLO, L.M., SCHWARZ, M., TURSKI, L. Seizures produced by pilocarpine in mice a behavioral electroencephalographic and morphological analysis. *Brain Research*, v. 321, p. 237-254, 1984.

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

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

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

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

VEZZANI A, MONETA D, CONTI M, ET AL. Powerful anticonvulsant action of IL-1 receptor antagonist on intracerebral injection and astrocytic overexpression in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* ; 97:11534–9, 2000.

VEZZANI, A. Inflammation and Epilepsy. *Epilepsy Currents*, Vol. 5, No. 1 (January/February) pp. 1–6, 2005

VIANNA, E. P. M.; ALICE TEIXEIRA FERREIRA, FLÁVIA DONA, ESPER ABRÃO CAVALHEIRO, AND MARIA JOSÉ DA SILVA FERNANDES Modulation of Seizures and Synaptic Plasticity by Adenosinergic Receptors in an Experimental Model of Temporal Lobe Epilepsy Induced by Pilocarpine in Rats. *Epilepsia*, 46(Suppl. 5):166–173, 2005

VON LUBITZ DK, LIN RC, POPIK P, et al. Adenosine A3 receptor stimulation and cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol*; 263:59–67, 1994.

VON LUBITZ DKJE, PAUL IA, CARTER M, JACOBSON KA (1993) Effects of N6-cyclopentyl adenosine and 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine on N-methyl-D-aspartate induced seizures in mice. *Eur J Pharmacol* 249:265-270

WADDINGTON, J.L., O'BOYLE, K.M. Drugs acting on brain dopamine receptors: a conceptual re-evaluation five years after the first selective D1 antagonist. *Pharmac. Ther.*, v. 43, p. 1-52, 1989.

WALLIS, R.A., PANIZZON, K., WASTERLAIN, C.G. Inhibition of nitric oxide synthase protects against hypoxic neuronal injury. *Neuroreport*, v. 3, p. 645-648, 1992.

WARTER, J-M., VERGNES, M., DePAULIS, A., TRANCHANT, C., RUMBACH, L., MICHELETTI, G., MARESCAUX, C. Effects of drugs affecting dopaminergic neurotransmission in rats with spontaneous petit mal-like seizures. *Neuropharmacology*, v. 27, p. 269-274, 1988.

WATKINS, J.C., OLVERMAN, H.J. Excitatory amino acids in the brain-focus on NMDA receptors. *Trends Neurosci.*, v. 10, p. 265-272, 1987.

WEISS SM, BENWELL K, CLIFFE IA, et al. Discovery of nonxanthine adenosine A_{2a} receptor antagonists for the treatment of Parkinson's disease. *Neurology*; 61:S101–6, 2003.

WESS, J., DUTTARROY, A., GOMEZA, J., ZHANG, W., YAMADA, M., FELDER, C.C., BERNARDINI, N., REEH, P.W. Muscarinic receptor subtypes mediating central and peripheral antinociception studied with muscarinic receptor knockout mice: A review. *Life Sciences*, v. 72, p. 2047–2054, 2003.

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

WESTBROOK, G. L. Seizures and Epilepsy. In: KANDEL, E.R., SCHWARTZ, J. H., JESSELL, T. M. (eds.) *Principles of Neural Science* 4th edition McGraw Hill, p. 911, 2000.

WILDE GJ, PRINGLE AK, SUNDSTROM LE, et al. Attenuation and augmentation of ischaemia-related neuronal death by tumour necrosis factor-alpha in vitro. *Eur J Neurosci*; 12:3863–70, 2000.

WILLNER, J., GALLAGHER, M., GRAHAM, P. W., CROOKS, G. B. N-methyl-D-aspartate antagonist D-APV selectively disrupts taste-potentiated odor aversion learning. *Behav. Neurosci.*, v. 106, p. 315-323, 1992.

WINDMEIER C., GRESSNER A.M. Pharmacological aspects of pentoxifylline with emphasis on its inhibitory actions on hepatic fibrogenesis. *Gen pharmacol.* Aug;29(2):181-96, 1997.

YACOUBI, M. E. L.; C. LEDENT, M. PARMENTIER, J. COSTENTIN, J.-M. VAUGEOIS, Evidence for the involvement of the adenosine A_{2A} receptor in the lowered susceptibility to pentylenetetrazol-induced seizures produced in mice by long-term treatment with caffeine, *Neuropharmacology* 55; 35–40, 2008.

ZHOU JH, CHEN HZ, YE F, LU WG, XIE X. Fas-mediated pathways and apoptosis in normal cervix, cervical intraepithelial neoplasia and cervical squamous cancer. *Oncol Reports*;16:307-11, 2006.