

c 66499
R 138312/10/04
19/07/04

R\$ 14,70



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, HISTOPATOLÓGICAS E
NEUROQUÍMICAS EM RATOS ADULTOS DURANTE A FASE
AGUDA DA CONVULSÃO INDUZIDA POR PILOCARPINA**

RIVELILSON MENDES DE FREITAS

**Fortaleza-CE
2003**

D
616.853
4938a
BX-1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

RIVELILSON MENDES DE FREITAS

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, HISTOPATOLÓGICAS E
NEUROQUÍMICAS EM RATOS ADULTOS DURANTE A FASE
AGUDA DA CONVULSÃO INDUZIDA POR PILOCARPINA**

Fortaleza-CE

2003

Rivelilson Mendes de Freitas

Alterações comportamentais, histopatológicas e neuroquímicas em ratos adultos durante a fase aguda da convulsão induzida por pilocarpina.

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

Orientadora:

Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles

**Fortaleza
2003**

F938a Freitas, Rivelilson Mendes

Alterações comportamentais, histopatológicas e neuroquímicas, em ratos adultos durante a fase aguda da convulsão induzida por pilocarpina / Rivelilson Mendes de Freitas - Fortaleza, 2003.

147f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

1. Epilepsia - convulsões. 2. Pilocarpina. I. Título

CDD 616.853

Rivelilson Mendes de Freitas

Alterações comportamentais, histopatológicas e neuroquímicas, em ratos adultos durante a fase aguda da convulsão induzida por pilocarpina.

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

Data da aprovação: 16 / 01 / 2003

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles
Orientadora da Dissertação

Profa. Dra. Glauce Socorro de Barros Viana
Co-orientadora da Dissertação

Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC

Ao meu maior tesouro: *Deus*,
pelos pais maravilhosos,
e a vida que me concedeu.

Aos meus amados e guerreiros
pais *Raimundo e Maria*, a minha
querida irmã *Rizângela Lyne*, ao meu
bem querido *Willy* e a alguém especial
pelo apoio, amor e por
comprenderem a minha ausência.

“Pai Nosso”

*“que estás no céu,
Santificado seja o teu nome:
Venha o teu reino,
Seja feita a tua vontade,
Assim na terra como no céu;
O pão nosso de cada dia
Nos dá hoje;
E perdoa-nos as dívidas,
Assim como nós perdoamos aos nossos devedores;
E não nos deixe
Cair em tentação;
Mas livra-nos do mal
Pois teu é o reino o poder e a glória
Para sempre*

Amém...

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. *Marta Maria de França Fonteles*, minha orientadora. Admiro à sua dedicação integral a Universidade Federal do Ceará, seus esforços nas inúmeras pesquisas que realiza, e nas suas aulas dinâmicas e descontraídas. Agradeço por tudo, principalmente pela paciência, críticas e conselhos.

À Profa. Dra. *Glauce S. de Barros Viana* pela sua colaboração preciosa, apoio, críticas e incentivos prestados, a mim durante a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. *Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos* pela sua dedicação à pesquisa e à docência, e as horas despendidas na ajuda da elaboração dos experimentos e discussão dos meus resultados, sendo a sua participação indispensável para realização deste trabalho. Que muitos e muitos bolsistas possam desfrutar da maravilhosa atenção desta pesquisadora exemplar.

Ao *Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa* o meu profundo agradecimento por aceitar o convite para participar da minha banca examinadora.

À *Profa. Dra Geanne Matos de Andrade Cunha, Prof Dr. Vietla S. Rao e à Profa. Dra Francisca Cléa Florenço de Sousa*, por prontamente participarem da minha banca de Exame de Qualificação.

Aos meus *colegas e professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia*, pela compreensão e disponibilidade para a realização deste trabalho, em especial à *Juvênia, Daniele, Lissiana, Iri Sandro, Cícero e Karla Deisy*.

Ao meu querido amigo *Flávio Damasceno Maia* por estar sempre presente, ajudando-me e aconselhando-me, nos momentos bons e principalmente nos ruins e pela sua presteza em resolver problemas para mim. *Que Deus ilumine o seu caminho!!!! Hoje e sempre..... E que contemple a sua vida de coisas boas e maravilhosas....*

Aos meus grandes amigos *Francisco Iraldo e Mariana Brinzeno*, pelo carinho e compreensão. Obrigado por tudo !!!!

À turma do *Laboratório de Neurofarmacologia* pelo convívio agradável. Em especial agradeço à técnica *Vilani Rodrigues Bastos*, que me ajudou em vários momentos e que exerce uma função brilhante de técnica de laboratório.

À Farmácia Escola sob a direção do *Prof. Dr. Carlos Couto* por gentilmente doar água Milli-Q utilizada neste trabalho. Também à técnica *Zenaide dos Santos Pereira* pela sua colaboração na parte histológica, confeccionando lâminas para a análise microscópica.

À *Profa. Dra. Márcia Pitombeira* pela excelente realização da análise microscópica. À veterinária *Dra. Maria Artemiza* por ser sempre favorável na disponibilização de animais e por sua atenção aos trabalhos no Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

À minha querida irmã *Rizângela Lyne* que sempre esteve bem próxima de mim, acompanhando-me nos momentos difíceis dessa luta e da vida, o meu profundo agradecimento. *Que as estrelas do seu destino brilhem com a intensidade que você merece!*

Ao meu amado e inestimável pai *Raimundo da Silva Freitas*, pelas orações constantes e o apoio incondicional. E a quem tudo devo. Muito obrigado.

Amor, igual ao seu jamais terei, por mim sorristes, cantastes, chorastes, sofrestes! A intensidade do orgulho e a grandeza do amor que tenho pela senhora mãezinha querida, *Maria Mendes da Silva*, nem as estrelas do céu somadas aos grãos de areia das praias do mundo se aproximam. Minha vida só tem valor por que tenho a senhora ao meu lado. *Assim, como a felicidade é amar, sou feliz por que amo você....*

O meu sincero agradecimento à *Coordenação do Curso de Pós-Graduação (Prof. Dr. Ronaldo, Sílvia, Áura)* e aos meus *colegas de pós-graduação* que me estimularam e me acompanharam durante esse período de realização do curso de Mestrado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Amor, igual ao seu jamais terei, por mim sorristes, cantastes, chorastes, sofrestes! A intensidade do orgulho e a grandeza do amor que tenho pela senhora mãezinha querida, *Maria Mendes da Silva*, nem as estrelas do céu somadas aos grãos de areia das praias do mundo se aproximam. Minha vida só tem valor por que tenho a senhora ao meu lado. *Assim, como a felicidade é amar, sou feliz por que amo você....*

O meu sincero agradecimento à *Coordenação do Curso de Pós-Graduação (Prof. Dr. Ronaldo, Sílvia, Áura)* e aos meus *colegas de pós-graduação* que me estimularam e me acompanharam durante esse período de realização do curso de Mestrado.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

RESUMO	xxx
ABSTRACT	xxxii
ABREVIATURAS	xxviii
INTRODUÇÃO	
1. Epilepsia	1
1.1. Conceito e terminologia	1
1.2. Fisiopatologia	2
1.3. Tipos de crises epilépticas	3
1.4. Fases da convulsão límbica em animais	5
1.5. Epidemiologia	6
1.6. Perspectivas	7
2. O sistema colinérgico e a epilepsia	9
2.1. O sistema colinérgico muscarínico	9
2.1.1. Alterações na concentração dos neurotransmissores durante a fase aguda da convulsão induzida por pilocarpina	13
2.1.2. Alterações sobre os níveis de segundos mensageiros durante a fase aguda da convulsão induzida por pilocarpina	14
3. O sistema dopaminérgico e a epilepsia	15
3.1. O sistema dopaminérgico	15
3.2. O envolvimento da pilocarpina com o sistema dopaminérgico	20
4. O sistema serotoninérgico e a epilepsia	23
4.1. O sistema serotoninérgico	23
4.2. O envolvimento da pilocarpina com o sistema serotoninérgico	27
5.0. Modelos colinérgicos de convulsão	28

6.0.	Modelo de convulsão com lítio e pilocarpina	29
4.1.	Modelo de convulsão com pilocarpina em alta dose	30

OBJETIVOS

33

MATERIAL E MÉTODOS

1.	Animais	35
2.	Tratamento dos grupos experimentais	35
2.1.	Preparo da droga e tratamento dos animais	35
2.1.1.	Protocolo experimental realizado com ratos adultos	37
3.	Materiais utilizados nos experimentos	38
4.	Estudo comportamental	40
5.	Determinação da Atividade Acetilcolinesterásica (AChE)	42
5.1.	Método	42
5.2.	Soluções reagentes	43
6.	Estudo histopatológico	44
6.1.	Procedimento experimental	44
6.2.	Método de coloração	45
7.	Dissecação das áreas cerebrais	46
8.	Determinação da densidade de receptores muscarínicos	48
8.1.	Método	48
8.2.	Procedimento experimental	48
8.3.	Soluções reagentes	50
9.	Determinação da densidade de receptores dopaminérgicos	51
9.1.	Método para os receptores dopaminérgicos (RD ₁ e RD ₂)	51
9.1.1.	Método	51
9.1.2.	Procedimento experimental	52
9.1.3.	Soluções reagentes	53

10	Dosagem de proteína	55
101.	Método	55
10.2.	Soluções reagentes	56
11.	Determinação de monoaminas e metabólitos com HPLC	57
11.1.	Método	57
11.2.	Procedimento experimental	58
11.3.	Soluções reagentes	59
12.	Análise estatística	63

RESULTADOS

1.	Estudo comportamental	64
1.1.	Efeitos de P400 no comportamento de ratos adultos observados durante 1h e 24h após administração de pilocarpina	64
1.2.	Latência das convulsões e de instalação do estado epiléptico em ratas adultas com 2 meses de idade tratadas com pilocarpina 400mg/Kg	67
2.	Análise histopatológica de animais adultos com 2 meses de idade tratados com pilocarpina 400mg/Kg	69
3.	Estudos Neuroquímicos	75
3.1.	Efeitos da administração da pilocarpina 400mg/Kg sobre a atividade acetilcolinesterásica em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade	75
3.2.	Efeitos da administração da pilocarpina 400mg/Kg sobre a densidade dos receptores muscarínicos (M_1+M_2) e sobre a constante de dissociação (K_d) ao ligante em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade	77

3.3.	Efeitos da administração da pilocarpina 400mg/Kg sobre a densidade dos receptores dopaminérgicos D ₁ -like e sobre a constante de dissociação (K _d) ao ligante em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade	81
3.4.	Efeitos da administração da pilocarpina 400mg/Kg sobre a densidade dos receptores dopaminérgicos D ₂ -like e sobre a constante de dissociação (K _d) em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade	85
3.5.	Efeitos da administração da pilocarpina 400mg/Kg (P400) sobre as concentrações de monoaminas e seus metabólitos DA, DOPAC, HVA, 5-HT e 5-HIAA em corpo estriado de ratas com 2 meses de idade	89
3.6.	Efeitos da administração da pilocarpina 400mg/Kg (P400) sobre a taxa de metabolização das monoaminas DA e 5-HT em corpo estriado de ratas com 2 meses de idade	91
	DISCUSSÃO	95
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	114
	CONCLUSÕES	117
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

LISTA DE TABELAS

Resultados

Tabela 1	Latência das convulsões e do estado epiléptico para ratos com 2 meses de idade após a administração de pilocarpina 400 mg/Kg	68
Tabela 2	Percentagem de animais adultos (2 meses de idade) com lesão cerebral após tratamento com pilocarpina (400mg/Kg)	71
Tabela 3	Percentagem de alterações histopatológicas em estruturas cerebrais de ratos adultos (2 meses de idade) tratados com P400	74
Tabela 4	Efeitos da pilocarpina 400 mg/Kg (P400) sobre a densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos (M_1+M_2) e sobre a constante de dissociação (K_d) em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade	78
Tabela 5	Efeitos da pilocarpina 400 mg/Kg (P400) sobre o número de receptores dopaminérgicos D_1 e sobre a constante de dissociação (K_d) em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade	82
Tabela 6	Efeitos da pilocarpina 400 mg/Kg (P400) sobre o número de receptores dopaminérgicos D_2 -like e sobre a constante de dissociação (K_d) em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade	86

LISTA DE QUADROS

INTRODUÇÃO

- Quadro 1** Precusores e enzimas envolvidas na síntese e na metabolização da acetilcolina (ACh), e metabólitos formados 11
- Quadro 2** Localização dos receptores muscarínicos no Sistema Nervoso Central (SNC) e segundos mensageiros 12
- Quadro 3** Alterações na concentração de neurotransmissores durante a fase aguda da convulsão induzida por pilocarpina 13
- Quadro 4** Alterações sobre os níveis de segundos mensageiros durante a fase aguda da convulsão induzida por pilocarpina 14
- Quadro 5** Precusores e enzimas necessárias para a síntese da dopamina (DA), enzimas metabolizadoras e metabólitos formados 18
- Quadro 6** Localização no Sistema Nervoso Central (SNC) dos receptores dopaminérgicos e segundos mensageiros 19
- Quadro 7** Precusores e enzimas envolvidas na síntese e na metabolização da serotonina (5-HT), e metabólitos formados 25
- Quadro 8** Localização dos receptores serotoninérgicos no Sistema Nervoso Central (SNC) e segundos mensageiros 26

MATERIAL E MÉTODOS

- Quadro 1** Protocolos experimentais de tratamentos dos animais 37
- Quadro 2** Parâmetros comportamentais observados após tratamento agudo com pilocarpina 400mg/Kg 41
- Quadro 3** Coloração em Hematoxilina - Eosina (HE) 45

LISTA DE FIGURAS

Material e Métodos

- Figura 1** Dissecção cerebral mostrando a retirada do corpo estriado de rato adulto 47
- Figura 2** Aparelho de HPLC com detecção de fluorescência e eletroquímica 61
- Figura 3** Modelo de Cromatograma padrão das monominas (DA, 5-HT) e metabólitos (DOPAC, 5-HIAA e HVA), obtido através do aparelho de HPLC com detecção de fluorescência e eletroquímica 62

Resultados

- Figura 1** Percentagem de animais adultos que apresentaram sinais colinérgicos periféricos, tremores e movimentos estereotipados após administração de pilocarpina 400 mg/Kg (P400) 65
- Figura 2** Percentagem de animais adultos que apresentaram convulsões, estado epiléptico, e mortalidade após administração de pilocarpina 400 mg/Kg (P400) 66
- Figura 3** Alterações histopatológicas em corpo estriado de ratos adultos observados por 1h 72
- Figura 4** Alterações histopatológicas em corpo estriado de ratos adultos observados por 24h 73
- Figura 5** Efeitos sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade tratados com pilocarpina 400 mg/Kg (P400) 76

- Figura 6** Percentagem do número de receptores muscarínicos (B_{max}) 79 em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade tratados com pilocarpina 400 mg/Kg (P400) relativo ao período de observação
- Figura 7** Percentagem do valor da constante de dissociação (K_d) dos 80 receptores muscarínicos em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade tratados com pilocarpina 400 mg/Kg (P400) relativo ao período de observação
- Figura 8** Percentagem do número de receptores (B_{max}) dopaminérgicos 83 D_1 -like, em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade tratados com pilocarpina 400 mg/Kg (P400) relativo ao período de observação
- Figura 9** Percentagem do valor da constante de dissociação (K_d) dos 84 receptores dopaminérgicos D_1 -like, em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade tratados pilocarpina 400 mg/Kg (P400) relativo ao período de observação
- Figura 10** Percentagem do número de receptores (B_{max}) dopaminérgicos 87 D_2 -like, em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade tratados com pilocarpina 400 mg/Kg (P400) relativo ao período de observação
- Figura 11** Percentagem entre a constante de dissociação (K_d) dos 88 receptores dopaminérgicos D_2 -like, em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade tratados com pilocarpina 400 mg/Kg (P400) relativo ao período de observação

- Figura 12** Concentração dos neurotransmissor dopamina (DA) e seus 92
metabólitos 3,4 ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido
homovanílico (HVA) em corpo estriado de ratos com 2 meses
de idade tratados com pilocarpina 400 mg/Kg
- Figura 13** Concentração dos neurotransmissor serotonina (5-HT), e seu 93
metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), em corpo
estriado de ratos com 2 meses de idade tratados com
pilocarpina 400 mg/Kg
- Figura 14** Taxa de metabolização dos neurotransmissores dopamina 94
(DA) e serotonina (5-HT), em corpo estriado de ratos com 2
meses de idade tratados com pilocarpina 400 mg/Kg

RESUMO

Alterações comportamentais, histopatológicas e neuroquímicas em ratos adultos durante a fase aguda da convulsão induzida por pilocarpina. RIVELILSON MENDES DE FREITAS. Orientadora: Marta Maria de França Fonteles. Dissertação de Mestrado. Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2003.

Estudos comportamentais, histopatológicos e neuroquímicos foram realizados em ratos com 2 meses de idade, através da administração de pilocarpina 400mg/Kg, subcutânea, P400, a fim de investigar o mecanismo da fase aguda do processo convulsivo. Os animais foram observados durante 1 e 24h, sendo sacrificados logo depois o período de cada observação. Os estudos comportamentais mostraram que a administração de P400, produziu sinais colinérgicos periféricos e movimentos estereotipados em todos os animais nos dois períodos de observação. Somente o índice de desenvolvimento de convulsões, estado epiléptico, foi menor, e não houve morte nos animais com 1h de observação. O estudo da latência das convulsões e do estado epiléptico mostraram que os animais com P400 apresentaram a primeira convulsão antes de uma hora de observação que progrediram para o estado epiléptico após 32 minutos da primeira convulsão. A análise histopatológica revelou que áreas como hipocampo, córtex entorrinal, corpo estriado e substância negra sofreram alterações nos animais adultos, observados 24h e mortos logo em seguida. No grupo observado por 1h nenhuma alteração foi vista. Os estudos neuroquímicos revelaram que a atividade acetilconesterásica estriatal dos animais que tiveram convulsão e estado epiléptico sofreu uma redução significativa apenas na primeira hora da fase aguda. Após a observação de 24h, a atividade enzimática tendeu a retornar para o seu nível normal, semelhante ao controle (NaCl 0,9%). A densidade dos receptores colinérgicos e dopaminérgicos estriatais após 1 e 24h de observação apresentou-se diminuída e não alterada, respectivamente, nos animais adultos tratados com P400. A constante de dissociação (K_d) dos receptores colinérgicos muscarínicos (M_1+M_2) apresentou-se diminuída apenas nos animais que apresentaram convulsão, estado epiléptico e que foram sacrificados 24h depois do tratamento. Quanto, aos receptores dopaminérgicos (D_1 e D_2) foi vista uma diminuição do K_d em ambos os períodos de observação no grupo com P400. No que se refere à determinação de monoaminas e seus metabólitos, o P400 reduziu a concentração de dopamina (DA), 3,4 ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) e da serotonina (5-HT), no corpo estriado dos animais no período de 1 e 24h de observação. Com relação aos metabólitos, ácido homovanílico (HVA) e ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) as alterações observadas foram diferenciadas. O conhecimento da fisiopatologia da convulsão e a identificação dos mecanismos de instalação, propagação e manutenção do processo convulsivo devem ser melhores investigados para facilitar o conhecimento de fatores inerentes à epilepsia.

ABSTRACT

Behavioural histopathological and neurochemical alterations in adult rat during the acute phase of pilocarpine-induced seizures. RIVELILSON MENDES DE FREITAS. Supervisor: Marta Maria de França Fonteles. Master's dissertation. Graduation in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology, UFC, 2003.

Behavioral, histopathological and neurochemical studies were carried out with 2 months-old rats treated with pilocarpine 400mg/Kg, s.c., (P400), subcutaneous, in order to investigate the mechanism involved in the acute phase of seizures. The animals were observed for 1 and 24h after the P400 administration, and sacrificed after the observation periods. The behavioral studies showed that in both observation periods after administration of P400, peripheral cholinergic signs and stereotyped movements were observed in all animals. Animals observed for 1h presented convulsions, status epilepticus and death in less degree when compared to 24h observation period. Histopathological analysis revealed cerebral alterations in the experimental model, predominantly in the 24h group. After P400 treatment, areas such as hippocampus, entorhinal cortex, striatum and substantia nigra were equally damaged in the 24h group. Neurochemical studies showed that activity of acetylcholinestase was decreased in the 1h period, while no alteration was observed in the 24h period. Histopathological alterations were not observed in the 1h group. Biochemical studies showed that striatum cholinergic receptors in adult rats were decreased and unchanged, 24 and 1h, respectively. P400 decreases Kd values of muscarinic receptors (M_1+M_2) only in animals that showed convulsions, status epilepticus and were sacrificed after 24h of treatment. It was observed that in dopaminergic receptors (D_1 and D_2) Kd values decreased in both periods of observation, 1 and 24h after P400 treatment. P400 decrease monoamine levels: dopamine (DA) and 3,4-dihydroxyphenylacetic (DOPAC) and serotonin (5-HT) on striatum in both periods of observation. However, metabolites levels of HVA and 5-HIAA were altered in different ways. The knowledge of seizures physiopatology and its mechanism should be better investigated.

LISTAS DE ABREVIATURAS

AC- Adenilil ciclase

ACETIL CoA- Acetilcoenzima A

ACh- Acetilcolina

AMPc- Adenosina monofosfato cíclico

ANOVA- Análise de variância

Bmax- Número máximo de receptores

BSA- Bovine seric albumine

CAT- Colina acetil transferase

COMT- Catecol orto metiltransferase

D₁ e D₂- Receptores dopaminérgicos do tipo 1 e 2

DA- Dopamina

DOPAC- Ácido 3, 4 dihidroxifenilacético

EEG- Eletroencefalograma

EP – estado epiléptico

EUA - Estados Unidos da América

GABA- Ácido gama aminobutírico

HVA- Ácido homovanílico

3H- NMS- 3H- N- Metilescopolamina

5- HT- 5- Hidroxitriptamina (serotonina)

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

5-HIAA - 5-hidroxiindolacético

i.p.- Intraperitoneal

Kd- Constante de dissociação

MAO- Monoaminoxidase

M₁ e M₂- Receptores muscarínicos do tipo 1 e 2

ME- Movimento estereotipado

MK-801- Antagonista para receptores de NMDA

NE- Noradrenalina

NMDA- N- metil- D- aspartato

PG- Proteína transdutora do sinal ligada ao GTP

PI- Fosfoinositídeos

PIP₂- Fosfatidilinositol 4, 5-bifosfato

PIP-Fosfatidilinositol 4-fosfato

PKC- Proteína quinase C

PLC- Fosfolipase C

PTZ- Pentilenotetrazol.

RCM- Receptores colinérgicos muscarínicos

RD₂- Receptores dopaminérgicos D₂

RNA_m- Ácido ribonucleico mensageiro

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

SCP- Sinais colinérgicos periféricos

s.c.- Subcutâneo

SNC- Sistema Nervoso Central

SNP - Sistema Nervoso Periférico

TSH- Hormônio tireotrófico

v.o.- Via oral

INTRODUÇÃO

1. Epilepsia

1.1. Conceito e terminologia

A epilepsia é um distúrbio neurológico com taxa de prevalência de 5% (DeLorenzo et al., 2001). Aproximadamente 30 a 50% dos pacientes epiléticos são sintomáticos, e esta condição pode ser adquirida através de um *stress* ambiental (Aminof et al., 1980, DeLorenzo et al., 2000).

A epilepsia é definida como uma afecção crônica de etiologia diversa, caracterizada por crises repetidas, devida a uma descarga excessiva dos neurônios cerebrais, associada eventualmente com diversas manifestações clínicas e paraclínicas, podendo ocorrer também quando há um aumento do nível basal de excitação do sistema nervoso, superior ao limiar da convulsão. DeLorenzo e colaboradores (2001) demonstraram, ainda, que a atividade convulsiva pode ocorrer após a perda suficiente e duradoura de neurônios.

A epilepsia está associada a mudanças bioquímicas em algumas áreas cerebrais afetando vários neurotransmissores (monoaminas, aminoácidos e peptídeos) (Michotte et al., 1997 e 2000), o metabolismo dos carboidratos, os segundos mensageiros, a expressão gênica, envolvidos na fisiopatologia responsável pelas alterações ao longo do tempo nos neurônios (Meldrum et al., 1990; Simonin et al., 2000).

Os modelos de epilepsia semelhante a dos humanos podem ser utilizados para estudar as mudanças neuroquímicas relatadas durante o desenvolvimento e na manutenção das convulsões, possibilitando o estudo de drogas para o tratamento de pacientes epiléticos (Marinho et al., 1997),

e também servindo para caracterizar prontamente os mecanismos envolvidos nas fases da epilepsia.

1.2. Fisiopatologia

A fisiopatologia da epilepsia, ainda não estar completamente definida. Os modelos de convulsão em animais reproduzem alterações comportamentais e eletroencefalográficas que são semelhantes à epilepsia do lobo temporal de humanos (Bem-Ari 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 dados neuroquímicos relacionados com o processo convulsivo (Cavalheiro et al., 1994; Marinho et al., 1997 e 1998; Costa-Lotufô et al., 2002).

No modelo de epilepsia induzido por alta dose de pilocarpina, ocorre perda neuronal de algumas áreas cerebrais, a saber: hipocampo, corpo estriado, amígdala, córtex piriforme, córtex entorrinal, septum lateral, tálamo, neocórtex e substância negra, sugerindo o envolvimento de 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). Entre as áreas em que ocorre dano neuronal, o estriado, além de ser uma das áreas mais acometidas, pode estar relacionada de forma importante com os mecanismos de propagação e manutenção (epileptogênese) da convulsão (Marinho et al., 1998). Barone et al., (1991) demonstraram que através da administração intracerebral em corpo estriado de agonistas dopaminérgico D₂ havia proteção com relação ao desenvolvimento de convulsão em ratos adultos, sugerindo também a participação dessa área cerebral nas convulsões límbicas.

Em geral, as convulsões parecem depender da ativação do receptor muscarínico, da alteração da atividade enzimática de alguns sistemas, (Simonic et al., 2000; Naffah-Mazzacoratti et al., 2001; Liu et al., 2002), do metabolismo dos fosfoinositídeos, (Marinho et al., 1998) como também da participação de outros sistemas de neurotransmissão (dopaminérgico (Kulkarni et al., 1996), serotoninérgico (Cavalheiro et al., 1995), GABAérgico, (Loup et al., 1999; Costa-Lotufó et al., 2002), e glutamatérgico (Massieu et al., 1994; Chamberlain et al., 2000), sendo, portanto, um modelo adequado para se investigar e esclarecer melhor a fisiopatologia das convulsões.

1.3. Tipos de crises epilépticas

1.3.1. Crises epilépticas parciais:

Ocorrem geralmente quando apenas uma parte do cérebro é afetada, sendo classificadas em:

- *Crises epilépticas parciais Simples*: caracterizadas pelo fato de o paciente ficar consciente durante a crise. As mais freqüentes são as motoras, que podem se manifestar como abalos musculares das mãos, pés ou face; estas crises podem progredir para um lado todo do corpo e pode desenvolver uma crise generalizada do tipo tônico-clônica.

- *Crises epilépticas parciais Complexas*: estão associadas a uma alteração da consciência. O sinal transmitido antes da crise pode ser uma sensação de sonho, de medo, opressão no estômago que sobe para a garganta, e ainda um quadro de alucinações, tais como: ouvir sons, sentir cheiros e gostos estranhos. Associadas as essas sensações ocorre perda de contato com o meio ambiente, aumento da salivação, movimentos de mastigação, de

marcha e/ou movimentos estereotipados com as mãos. Essas crises podem ser seguidas de crises tônico-clônicas.

1.3.2. Crises epilépticas generalizadas:

Ocorrem geralmente quando todo o cérebro é afetado, sendo classificadas em:

- Crises Tônico-clônicas: que podem se iniciar com um grito acompanhado de perda da consciência com queda ao solo, endurecimento do corpo e abalos musculares generalizados. Pode ocorrer perda de saliva com sangue devido à mordedura da língua, coloração arroxeadada dos lábios, respiração ruidosa, às vezes ocorre também aumento da micção. A duração é de poucos minutos e após a crise há sonolência, podendo acordar com vômitos, dor de cabeça e dores musculares.

- Crises Tônicas: ocorre perda da consciência, queda ao solo, o corpo fica endurecido, com a respiração irregular, aumento da salivagem, coloração arroxeadada da pele.

- Crises Mioclônicas: tem como característica principal ser de curta duração e manifestar-se principalmente após o despertar, com movimentos bruscos de todo o corpo, semelhantes a um choque ou susto, principalmente nos membros superiores.

- Crises de ausência: a crise pode se manifestar como um desligamento com o ambiente externo, há interrupção da fala e das atividades motoras por alguns segundos, voltando logo a seguir à atividade que estava realizando antes da crise. Essas crises podem se repetir várias vezes ao dia, ocorrendo perda de consciência de forma parcial ou completa.

- Crises atípicas de ausência: caracterizada pela ocorrência de ataques com aparecimento e término mais rápidos do que o habitual para as crises de ausência, associados a um EEG mais heterogêneo.

- Crises atônicas: caracterizada pela perda do tônus postural, com inclinação da cabeça e queda devido à perda do equilíbrio (Guyton & Hall, 1997).

1.4. Fases da convulsão límbica em animais

A epilepsia do lobo temporal ou límbica é a forma mais comum de epilepsia. Sendo caracterizada por convulsões recorrentes espontâneas que são, muitas vezes, bloqueadas por tratamentos com drogas antiepiléticas, e pode estar associada à esclerose do hipocampo (Meldrum et al., 1990; Lothamn et al., 1981). A base molecular para o desenvolvimento da epilepsia sintomática ainda é pouco definida (Zouhar et al., 1989).

A convulsão límbica é uma manifestação clínica resultante de descargas neuronais anormais, produzindo uma superexcitação dos neurônios, podendo ocorrer também através da quebra do equilíbrio entre os mecanismos inibitórios e excitatórios (Zouhar et al., 1989). Os mecanismos de ativação, propagação e manutenção da convulsão são largamente estudados e pouco conhecidos.

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

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

Estudos recentes foram feitos utilizando esse modelo para entender a atividade convulsiva e o papel dos sistemas dos neurotransmissores nesse processo (Starr & Starr, 1993; Mello et al., 1996; Cavalheiro et al., 1994; Fujikawa, 1996; DeLorenzo et al., 2000).

1.5. Epidemiologia

A epilepsia é a condição neurológica grave de maior prevalência no mundo. A incidência da epilepsia varia de acordo com a localização geográfica. Ela ocorre com maior frequência nos países em desenvolvimento, onde há mais desnutrição, doenças infecciosas e deficiência no atendimento médico (DeLorenzo et al., 2001).

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

Nos países em desenvolvimento, 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 epilético (Beaglehole et al., 1996).

1.6. Perspectivas

Muitos estudos indicam a importância das monoaminas e aminoácidos no fenômeno epilético (Mc Donald et al., 1991; El-Etri et al., 1993; Michotte et al., 2000; Nadler et al., 2001). Os mecanismos de como estes neurotransmissores influenciam o processo convulsivo ainda não estão completamente esclarecidos, portanto, devem ser melhor estudados para contribuir com o conhecimento da epilepsia e determinar como as concentrações das monoamianas variam em função do tempo com relação às fases do processo convulsivo.

Os mecanismos envolvidos na indução e manutenção da epilepsia ainda não são bastante conhecidos. A hipótese de que neurotransmissores

como: o glutamato e o GABA, participem durante as desordens convulsivas sugerem que alterações na transmissão excitatória e inibitória, respectivamente, podem contribuir para modificar a excitabilidade neuronal (Patel & Meldrum, 1988; Meldrum et al., 1990; Avoli et al., 1994; Costa-Lotufo et al., 2002). Esta hipótese é sustentada pela eficiência das drogas anticonvulsivantes que aumentam a transmissão GABAérgica ou diminuem a glutamatérgica (Avoli et al., 1994; Ling et al., 2001). A participação primária do sistema GABA, glutamatérgico e de outros neurotransmissores na epilepsia é, entretanto, pouco definida, em particular ficando em geral restrita a função dos receptores.

Inúmeras pesquisas visam descobrir novas estratégias farmacológicas contra a epilepsia, através de novos compostos eficazes para a epilepsia de difícil controle ou de compostos com menor toxicidade para aquelas epilepsias já tratadas pelo arsenal terapêutico atualmente disponível. Obviamente, na ausência de um sistema isolado que funcione para o estudo da epilepsia é impossível prever qual das vertentes acima mencionadas, ou a melhor delas, vai gerar algum resultado de aplicação na epileptologia clínica.

2. O sistema colinérgico e a epilepsia

2.1. O sistema colinérgico muscarínico

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).

O sistema colinérgico tem como neurotransmissor a acetilcolina (ACh). A ACh é um importante neurotransmissor excitatório no cérebro (Olney et al., 1983 e 1986; Nathanson et al., 1999). 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 (Pepeu et al., 1983; Elgoyhen et al., 2000). Assim, a maioria dos efeitos de ativação colinérgica no cérebro é provavelmente devido à estimulação dos receptores colinérgicos muscarínicos (RCM).

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

No fim de 1980, através de técnicas de biologia molecular, foram identificados 5 subtipos de receptores muscarínicos (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , e M_5) (Bonner et al., 1987; Liao et al., 1989; Nathanson et al., 1999). Esses receptores encontram-se distribuídos no SNC de forma diferenciada e divergem quanto ao mecanismo de ativação. Os subtipos M_1 , M_3 , e M_5 transmitem sinais através da mobilização de Ca^{++} no SNC (Fisher &

Agranoff, 1987; Berridge & Irvine, 1989b). Um determinado estímulo faz com que o receptor ative uma enzima efetora, a fosfolipase C (PLC), através de uma proteína G (Elgoyhen et al., 2000). A PLC promove uma cascata de eventos, finalizando com a produção de dois segundos mensageiros, o inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e 1,2-diacilglicerol (DAG) que vão transmitir a informação do receptor para o interior da célula.

Os subtipos M₂ e M₄ agem por inibição da adenilil ciclase (AC), diminuindo os níveis de AMPc. O **Quadro 1** sumariza as informações gerais sobre a acetilcolina e o **Quadro 2** sobre os receptores muscarínicos. A administração periférica de altas doses de agonistas muscarínicos colinérgicos, pilocarpina, produz convulsões em roedores (Turski et al., 1989; Marinho et al., 1997).

O início das convulsões pode ser bloqueado pela atropina e atenuado pela inibição da atividade colinérgica endógena (Jope et al., 1986 e 1992; Morrisett et al., 1987a; Marinho et al., 1997).

O processo convulsivo decorrente do tratamento de ratos com pilocarpina, agonista colinérgico, em doses convulsivas, parece depender da ativação dos receptores muscarínicos, podendo envolver o metabolismo dos fosfoinositídeos e sendo capaz de produzir lesões cerebrais e alterações comportamentais (Marinho et al., 1997 e 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 acetilcolina.

A pilocarpina pode produzir alterações nos níveis de outros neurotransmissores (noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e GABA), embora pouco se conheça sobre estas alterações (Michotte et al., 2000; Delorenzo et al., 2000; Raol et al., 2001; Costa-Lotufó et al., 2002).

Quadro 1 - Precursores e enzimas envolvidas na síntese e na metabolização da acetilcolina (ACh), e metabólitos formados

ACETILCOLINA	
Precursores	colina e acetilcoenzima A (acetil-CoA)
Enzima sintetizadora	colina acetiltransferas (CAT)
Enzima metabolizadora	Acetilcolinesterase (AChE)
Metabólitos	Colina e ácido acético

Fonte: Ehlert et al., 1995.

Quadro 2 – Localização dos receptores muscarínicos no Sistema Nervoso Central (SNC) e segundos mensageiros

SUBTIPOS DE RECEPTORES	LOCALIZAÇÃO NO SNC	SEGUNDOS MENSAGEIROS
M ₁	↑ cérebro ↑ hipocampo ↑ córtex frontoparietal ↑ caudado-putamen núcleo accumbens, amígdala	IP ₃ + DAG
M ₂	↓ cérebro	AMPc canais de K ⁺
M ₃	↑ córtex ↑ hipocampo ↓ corpo estriado	IP ₃ + DAG
M ₄	↑ córtex ↑ hipocampo ↑ corpo estriado	AMPc
M ₅	↓ menos do que 2%	IP ₃ + DAG

Abreviaturas:

(↑): alta densidade; (↓): baixa densidade;

IP₃: trifosfato de inositol; DAG: diacilglicerol; AMPc: adenosina monofosfato cíclico;

Fonte: Ehlert et al., 1995; Berridge, 1984.

2.1. Alterações na concentração dos neurotransmissores durante a fase aguda da convulsão induzida por pilocarpina

A interferência predominante da pilocarpina nas atividades dos neurotransmissores durante a convulsão e estado epiléptico é sumariada no Quadro 3.

Quadro 3 - Alterações na concentração de neurotransmissores durante a fase aguda da convulsão induzida por pilocarpina

CONCENTRAÇÃO DOS NEUROTRANSMISSORES						
Pilocarpina	NE	DA	DOPAC	HVA	5-HT	5-HIAA
RCv - 1 hora	↓	-	↑	↑	-	↑
RNCv - 1 hora	↓	-	↑	↑	-	↑
RCv - 24 horas	↓	↑	↑	↑	↑	↑
RNCv - 24 horas	-	-	-	-	-	-

Abreviaturas:

RCv: Rato convulsivo e **RNCv:** Rato não convulsivo;

NE: noradrenalina; **DA:** dopamina; **DOPAC:** 3,4-ácido dihidroxifenilacético; **HVA:** ácido homovanílico; **5-HT:** serotonina e **5-HIAA:** ácido 5-hidroxiindolacético;

(↓): diminui a concentração; (↑): aumenta a concentração; (-): não altera a concentração;

Fonte: El-Etri et al., 1993.

2.2. Alterações sobre os níveis de segundos mensageiros durante a fase aguda da convulsão induzida por pilocarpina

Os efeitos da pilocarpina sobre os níveis dos segundos mensageiros durante as convulsões e estado epiléptico está sumarizado no **Quadro 4**.

Quadro 4 - Efeito da pilocarpina sobre os níveis dos segundos mensageiros

NÍVEIS DOS SEGUNDOS MENSAGEIROS
PI: estimulação da enzima inositol fosfatase → ↑ PI → ↑ atividade neuronal
AC: inibição da AC → ↓ atividade do AMPc → ↓ atividade neuronal
PG: alteração da função de várias proteínas G acopladas à AC e fosfolipase C
PKC: modulação da fosforilação de proteínas específicas dependentes de PKC
Expressão dos genes: alteração dos RNAm de proteínas envolvidas com a regulação da função sináptica

Abreviaturas:

PI: metabolismo dos fosfoinositídeos;

AC: adenilil ciclase;

PG: proteína G;

PKC: proteína quinase C;

Fonte: Ehlert et al., 1995.

3. O sistema dopaminérgico e a epilepsia

3.1. O Sistema dopaminérgico

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

A dopamina exerce seus efeitos biológicos por interagir com os receptores específicos. Esses receptores foram classificados originalmente segundo Keabian & Calne (1979), como receptores dopaminérgicos D_1 (RD_1) e D_2 (RD_2).

Esses receptores realizam suas ações por se acoplarem e ativarem diferentes complexos de proteína G. O receptor D_1 interage com o complexo de proteína G_s , resultando em ativação da adenilil ciclase e um aumento nos níveis de AMPc intracelular. Os receptores D_2 interagem com um complexo de proteína G_i para inibir a produção de AMPc (Cooper et al., 1991; Civelli et al., 1993).

Estudos indicam que os receptores dopaminérgicos podem influenciar a função celular através de outros mecanismos, além de estimular ou inibir a adenilil ciclase. O receptor D_1 parece fazer também um efeito estimulatório no "turnover" do fosfoinositídeo. Enquanto o receptor D_2 , além de inibir a adenilil ciclase, aumenta a condutância para o K^+ e modula o metabolismo do fosfoinositídeo (Cooper et al., 1991; Civelli et al., 1993).

O avanço da biologia molecular (incluindo clonagem de genes) e o aperfeiçoamento de técnicas de radioligantes possibilitou a identificação de quatro subtipos de receptores D_2 (D_{2c} , D_{2L} , D_3 e D_4) e um subtipo de receptor D_1 (D_5). O receptor D_2 foi dividido em dois subtipos: D_{2c} (curto) e

o D_{2L} (longo), onde o D_{2L} se diferencia do D_{2c} por possuir 29 aminoácidos a mais na sua estrutura. Esses dois subtipos parecem ter uma farmacologia idêntica. Um terceiro subtipo de receptor D₂ determinado foi D₃, encontrado em altos níveis em certas regiões do sistema límbico cerebral, enquanto, baixos níveis são observados no corpo estriado. O perfil farmacológico do subtipo D₃ é similar, mas não idêntico ao D₂. O mecanismo efetor do subtipo D₃ ainda não é conhecido (Cooper et al., 1991).

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

O subtipo de receptor D₁ encontrado, chamado de D₅, é farmacologicamente similar ao receptor D₁, porém sua afinidade por agonistas endógenos (dopamina) é cerca de dez vezes maior. Similar ao D₁, o subtipo D₅ estimula a ativação da adenilil ciclase, sendo esse o seu mecanismo efetor. Sua localização está principalmente nas áreas límbicas (Sokoloff & Schwartz, 1995; Sokoloff et al., 1995).

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

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

propriedades farmacológicas e estruturais desses subtipos clonados (D_{2C}, D_{2L}, D₃, D₄ e D₅) não são suficientemente divergentes daquelas já existentes (D₁ e D₂).

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

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

Um resumo do sistema dopaminérgico, no que se refere à síntese de dopamina, metabolismo é apresentado no **Quadro 5**, a localização dos receptores e o sistema de segundos mensageiros envolvidos é apresentado no **Quadro 6**.

Quadro 5 - Precursores e enzimas necessárias para a síntese de dopamina (DA), enzimas metabolizadoras e metabólitos formados

DOPAMINA	
Precursores	tirosina (a) → L-diidroxifenilalanina (L-dopa) (b) → dopamina
Enzimas sintetizadoras	(a) tirosina hidroxilase; (b) L-aminoácido descarboxilase (dopa descarboxilase)
Enzimas metabolizadoras	MAO _B (monoamino-oxidase) COMT (catecol-O-metil transferase)
Metabólitos	DOPAC (ácido 3,4 diidroxifenilacético) HVA (ácido homovanílico)

Fonte: Civelli, 1995 e Sokoloff et al., 1995.

Quadro 6 - Localização no Sistema Nervoso Central (SNC) dos receptores dopaminérgicos e segundos mensageiros

SUBTIPOS DE RECEPTORES	LOCALIZAÇÃO NO SNC	SEGUNDOS MENSAGEIROS
D ₁	corpo estriado núcleo accumbens	↑ AMPc
D ₂	corpo estriado núcleo accumbens substância negra área tegmentar ventral hipocampo	↓ AMPc
D ₃	substância negra área tegmentar ventral núcleo accumbens hipocampo	?
D ₄	córtex frontal hipocampo cerebelo	?
D ₅	Hipocampo núcleo parafascicular do tálamo	↑ AMPc

(↑) aumenta ou (↓) diminui o nível do segundo mensageiro.

Fonte: Civelli, 1995; Chen & Weiss, 1991 e Sokoloff et al., 1995.

3. 2. O envolvimento da pilocarpina com o sistema dopaminérgico

Cavalheiro e colaboradores (1994) demonstraram que a pilocarpina em altas doses (350-380mg/Kg) afetava a taxa de metabolização de monoaminas sugerindo um importante papel desses neurotransmissores nas convulsões recorrentes em ratos. O papel das monoaminas e, em particular, da dopamina, no processo convulsivo, ainda não foi estabelecido (El-Etri et al., 1993).

Os efeitos da pilocarpina sobre o sistema dopaminérgico são opostos de acordo com o tipo de receptor ativado. Receptor D₂, mas não D₁, tem atividade anticonvulsivante induzida por eletrochoque ou por petilenotetrazol em roedores (Barone et al., 1990a;b).

Al-Tajir e colaboradores (1990a;b;c) estudaram a expressão das convulsões motoras, e demonstraram que receptores D₁ e D₂ medeiam efeitos pró-convulsivantes e anticonvulsivantes em ratos tratados com pilocarpina, respectivamente.

Cavalheiro e colaboradores (1994) mostraram que há um aumento na concentração e uma diminuição da taxa de metabolização da dopamina, sugerindo que a liberação de dopamina no hipocampo pode estar diminuída durante o estado epiléptico, período silencioso e no período crônico do processo convulsivo.

El-Etri e colaboradores (1993) demonstraram efeitos contrários no *locus cereleus*, portanto, sugere-se que após as convulsões e estado epiléptico as alterações nos níveis dos neurotransmissores nas áreas cerebrais podem ocorrer de forma diferente.

As diferenças observadas no efeito da pilocarpina sobre os níveis de dopamina podem ser explicadas pelas características particulares das inervações do sistema dopaminérgico em cada uma de suas regiões. O

sistema nigroestriatal inervando o *caudato-putamen* tem a capacidade de regular, por si só, a síntese de dopamina. Com a formação de dopamina nessa região, os autoceptores, que regulam a síntese, deixarão de agir e os níveis endógenos serão mantidos de forma constante (Stephen & Corcoran, 1979).

A administração aguda de pilocarpina produz um aumento na atividade motora e uma concomitante diminuição na dopamina estriatal. O sistema dopaminérgico é, particularmente, interessante, no que se refere aos seus efeitos no processo convulsivo, já que a ativação dos receptores D₁ e D₂ produz repostas opostas para a atividade epiléptica.

O limiar das convulsões é inversamente proporcional ao conteúdo nigroestriatal de dopamina. A depleção da dopamina é um bom índice de resistência as convulsões (Barone et al., 1990a). Altos níveis de dopamina no cérebro podem induzir convulsões em diferentes espécies de animais (Kilian & Frey, 1973; Anlezark & Meldrum, 1975; King & Burnham, 1980; Quesney, 1981). Por outro lado, uma redução na concentração de dopamina cerebral foi vista nas proximidades de um foco epiléptico (Mori et al., 1987) e no fluído cerebrospinal de epilépticos (Hiramatsu et al., 1982). Esses achados sugerem que a resistência de um animal para desencadear convulsão depende marcadamente do balanço da atividade dopaminérgica no cérebro.

Estudos realizados por Barone et al. (1990a) caracterizando os efeitos dos agonistas dopaminérgicos sobre os receptores dopaminérgicos D₁ e D₂, mostraram que o tratamento com SKF38393 (agonista dopaminérgico) aumenta a atividade dopaminérgica D₁, provavelmente através de uma ação direta ou indireta sobre as proteínas G acopladas ao receptor, podendo refletir alterações no processo de acoplamento e/ou na

capacidade das proteínas G, uma vez ativadas, de estimularem a adenilil ciclase e aumentarem o nível de AMPc intracelular.

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).

O mecanismo de ação e a área cerebral afetada pela dopamina 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 dopamina 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).

Utilizando altas doses de pilocarpina como modelo de epilepsia, diferentes drogas dopaminérgicas foram estudadas (Turski et al., 1988; Al-Tajir et al., 1990a,b; Barone et al., 1990a,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 ocorrer com os receptores D₂ (Barone et al., 1991).

O modelo de epilepsia induzido por pilocarpina em altas doses, auxiliará no esclarecimento das ações do sistema dopaminérgico, como também sobre a participação de outros sistemas, tais como serotoninérgico, glutamatérgico e GABAérgico que interagem de forma direta ou indireta com o sistema colinérgico no processo convulsivo.

4. O sistema serotoninérgico e a epilepsia

4.1. O sistema serotoninérgico

Alguns estudos sugerem o envolvimento do sistema serotoninérgico na manutenção e/ou propagação da epilepsia humana (Peroutka, 1988). O sistema serotoninérgico tem como neurotransmissor a serotonina (5-HT). A 5-HT é um importante neurotransmissor inibitório em muitas áreas do Sistema Nervoso Central (SNC) (Julius, 1991).

A estimulação inibitória induzida pela 5-HT ocorre através da ativação de muitas vias da 5-hidroxitriptamina (5-HT) em neurônios da rafe ou nas regiões da parte superior do tronco cerebral (Peroutka, 1988). A 5-HT está presente em fibras não-mielinizadas que inervam difusamente muitas regiões do SNC, mas a sua densidade de inervação é diferente para as áreas cerebrais (Peroutka, 1988). Os receptores serotoninérgicos, 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-HT_{1A}.

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 4 subtipos de receptores muscarínicos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}, 5-HT₃, 5-HT₄) (Hartig., 1989). Esses receptores encontram-se distribuídos no SNC de forma diferenciada e divergem quanto ao mecanismo de ativação. Os subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D}, agem por inibição da adenilil ciclase

(AC), diminuindo os níveis de AMPc. Já os subtipos 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C} transmitem sinais através da mobilização de Ca⁺⁺ no SNC (Hartig., 1989).

Um determinado estímulo faz com que o receptor ative uma enzima efetora, a fosfolipase C (PLC), através de uma proteína Gs (Elgoyheñ et al., 2000). A PLC promove uma cascata de eventos, finalizando com a produção de dois segundos mensageiros, o inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) e 1,2-diacilglicerol (DAG) que vão transmitir a informação do receptor para o interior da célula.

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 **Quadro 7** sumariza as informações gerais sobre a serotonina e o **Quadro 8** sobre os receptores serotoninérgicos.

Quadro 7- Precursores e enzimas envolvidas na síntese e na metabolização da serotonina (5-HT), e metabólitos formados

SEROTONINA	
Precursor	Triptofano (a) → 5-hidroxitriptofano 5-hidroxitriptofano (b) → 5-HT
Enzima sintetizadora	(a) Triptofano 5-hidroxilase (b) L-descarboxilase
Enzima metabolizadora	MAO _A (monoamino-oxidase)
Metabólitos	5-HIAA (ácido 5-hidroixindolacético) 5-HTOL (5-hidroxitriptofol)

Fonte: Erspamer, 1978d.

Quadro 8 – Localização dos receptores serotoninérgicos no Sistema Nervoso Central (SNC) e segundos mensageiros

SUBTIPOS DE RECEPTORES	LOCALIZAÇÃO	SEGUNDOS MENSAGEIROS
5-HT _{1A}	SNC	↓ AMPc
5-HT _{1B}	SNC	↓ AMPc
5-HT _{1D}	SNC Vasos sanguíneos	↓ AMPc
5-HT _{2A}	SNC SNP Musculatura lisa	IP ₃ + DAG
5-HT _{2B}	Fundo gástrico	IP ₃ + DAG
5-HT _{2C}	SNC Plexo coróide	IP ₃ + DAG
5-HT ₃	SNP SNC	Canal iônico
5-HT ₄	SNP (TGI) SNC	↑ AMPc

Abreviaturas:

(↑): aumenta e (↓) diminui a concentração;

IP₃: trifosfato de inositol; DAG: diacilglicerol; AMPc: adenosina monofosfato cíclico; SNP: sistema nervo periférico; TGI: trato gastrointestinal;

Fonte: Cooper et al., 1991.

4.2. O envolvimento da pilocarpina com o sistema serotoninérgico

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, agonista colinérgico, em doses convulsivas, parece interagir com o sistema serotoninérgico, uma vez que a ativação do receptor serotoninérgico do tipo 5-HT₁ pode inibir a estimulação colinérgica (Peroutka, 1988), sendo, assim, um mecanismo compensatório para inibir ou cessar as convulsões.

A pilocarpina também altera os níveis do neurotransmissor serotoninérgico. Associado às convulsões induzidas em ratos pela administração de agonistas colinérgicos (principalmente pilocarpina) está o aumento observado na concentração da serotonina durante as 24h da fase aguda das convulsões (El-Etri et al., 1993).

A pilocarpina modifica também a concentração de outros neurotransmissores (acetilcolina, noradrenalina, dopamina, glutamato e GABA), sendo importante um estudo mais detalhado para uma melhor compreensão da participação das monoaminas no processo convulsivo (Michotte et al., 2000; Delorenzo et al, 2000; Raol et al., 2001).

5. Modelos colinérgicos de convulsão

Em condições fisiológicas, a estimulação colinérgica induzida por ACh é importante para os processos cerebrais como memória e aprendizagem (Bartus et al., 1982). Contudo, a acetilcolina em alta concentração, como ocorre depois de uma exposição por organofosforados, que são agentes anticolinesterásicos ou colinérgicos indiretos, apresenta intensos efeitos sobre a energia celular (Pazdernik et al., 1985; El-Etri et al., 1993) e metabolismo dos fosfoinosítídeos (Flynn & Wecker, 1987; Marinho et al., 1998; Chamberlain et al., 2000).

Essas mudanças estão associadas a uma hiperexcitação elétrica dos neurônios (Konopacki et al., 1987; Morrisett et al., 1987a,b), e frequentemente são acompanhadas por convulsões (Olney et al., 1986; Morrisett et al., 1987a,b e 1992; Piredda & Gale, 1985; Jope et al., 1987; Savolainen et al., 1988a,b; Turski et al., 1983a,b,c).

A ACh, os anticolinesterásicos e análogos da ACh são efetivos agentes epileptogênicos quando aplicados intracerebralmente (Cavalheiro et al., 1983; Cohen et al., 1981; Olney et al., 1983) ou sistemicamente (Lundy & Shaw, 1983; Turski et al., 1983d; Cavalheiro et al., 1996 e 1999). Injeções diretas na amígdala (Turski et al., 1983b) e no hipocampo (Turski et al., 1983c) de agonistas colinérgicos muscarínicos e colinomiméticos, em ratos, mostram ocorrências eletroencefalográficas e comportamentais de convulsões límbicas acompanhadas por lesões cerebrais semelhantes àquelas produzidas por ácido caínico (Ben-Ari et al., 1980;1981) e folatos (Olney et al., 1986).

A hipótese da participação do sistema colinérgico na propagação das convulsões é dada através de estudos demonstrando que lesões dos neurônios colinérgicos na substância inominata, inibem a produção de

convulsões estimuladas eletricamente, na amígdala (Kimura et al., 1981). A atropina, um antagonista muscarínico, suprimiu a propagação das convulsões estimuladas na amígdala (Marinho et al., 1997), enquanto que, injeções locais de colinomiméticos intensificaram a atividade convulsiva hipocampal (Burchfield et al., 1979).

A pesquisa sobre epileptogênese colinérgica tem favorecido o conhecimento das propriedades excitatórias da ACh (Olney et al., 1986; Savolainen & Hirvonen, 1992). Vários modelos animais de convulsões induzidas por agentes colinérgicos têm recentemente sido desenvolvidos para explorar esses mecanismos e o papel do sistema colinérgico cerebral na fisiopatologia da epilepsia humana (Olney et al., 1983; Turski et al., 1983a,b,c,d; Joep et al., 1986; Fisher, 1989; Hirsch et al., 1992; Costa-Lotufo et al., 2002).

5.1. Modelo de convulsão com lítio e pilocarpina

O lítio é capaz de potencializar *in vivo* a ação da fisostigmina, e ratos tratados com lítio e colinomiméticos apresentam convulsões (Samples et al., 1977; Davis & Hatoun, 1980). Em colaboração a esses dados, foi descrito um modelo de estado epiléptico que era produzido pela administração de pilocarpina em ratos pré-tratados com lítio (Joep et al., 1986).

A administração de doses subconvulsivas de pilocarpina (30mg/Kg, por via subcutânea) 24h depois de cloreto de lítio (3mEq/Kg, via intraperitoneal) resulta em convulsões (Joep et al., 1986; Marinho et al., 1998).

As alterações comportamentais dos animais que exibem convulsões com lítio-pilocarpina são semelhantes àquela observada com altas doses de

pilocarpina. Segundo Marinho e colaboradores (1998) e Clifford e colaboradores (1987), os registros comportamentais podem ser divididos em duas fases. A primeira, consistindo no aparecimento, dentro de 5 a 10 minutos depois da injeção de pilocarpina, de sinais colinérgicos periféricos (piloereção, salivação, cromodacriorréia, tremor e diarreia).

Os sinais colinérgicos persistem cerca de 20 minutos depois da injeção, mas tendem a diminuir com a manifestação das outras características da síndrome. Quase que paralelamente às manifestações de estimulação colinérgica, surgem os comportamentos estereotipados incluindo movimentos orais, aumento na mastigação, cheirar, coçar e também de ranger os dentes e balançar a cabeça.

A segunda fase ocorre dentro de 20 a 30 minutos depois da administração da pilocarpina, sendo caracterizada pela ocorrência de convulsões que se iniciam com um notável aumento nas ações de cheirar e mastigar, associados aos olhos cintilantes e balanço da cabeça dos animais, progredindo, dentro de 5 a 30 segundos, para contrações das extremidades superiores, desenvolvendo o ato de empinar-se e uma subsequente queda ocasional, devido à perda de equilíbrio.

Os episódios de convulsões recorrentes aparecem cerca de 35 minutos depois da administração da pilocarpina, progredindo para o estado epilético e morte dos animais dentro de 24 horas (Marinho et al., 1997 e 1998).

5.2. Modelo de convulsão com pilocarpina em alta dose

Em roedores, a administração sistêmica de altas doses de pilocarpina produz convulsões e subsequente desenvolvimento de estado epilético (Turski et al., 1983a,b e 1989; Persinger et al., 1993 e 2001), 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; Marinho et al., 1997; Mello & Silva, 2000).

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

A administração sistêmica de pilocarpina (400mg/Kg, subcutânea, s.c., P400), um potente agonista colinérgico muscarínico, produz mudanças comportamentais semelhantes à observada no modelo com lítio-pilocarpina e eletroencefalográficas nas convulsões límbicas em ratos. Estas convulsões são acompanhadas de danos cerebrais que topograficamente se assemelham às produzidas por KA (ácido caínico) e folatos (Olney et al., 1983), sendo também frequentemente observado na autópsia de humanos epiléticos (Corsellis & Bruton, 1983).

Vários estudos utilizam metilescopolamina (1mg/Kg), 30 minutos antes da administração de pilocarpina, com a intenção de reduzir os sinais colinérgicos periféricos (Cavalheiro et al., 1996 e 1999). No entanto, em nossos experimentos, não foi adotado este procedimento a fim de se evitar possíveis alterações neuroquímicas e metabólicas, que prejudicariam a interpretação e análise dos dados devido à administração de mais uma droga ao animal.

Várias pesquisas têm sido realizadas, utilizando os modelos de convulsão (lítio-pilocarpina e pilocarpina em alta dose) com o objetivo de caracterizar o modelo, investigar a fisiopatologia, identificar agentes terapêuticos para a epilepsia (Kulkarni & George, 1995 e 1996; Fujikawa, 1995 e 1996; Costa-Lotufo et al., 2002).

Neste mesmo sentido, *Alterações comportamentais, histopatológicas e neuroquímicas em ratos adultos durante a fase aguda da convulsão induzida por pilocarpina*, também foram estudadas utilizando o modelo pilocarpina em alta dose (P400). Os animais foram tratados com uma única dose de cloridrato de pilocarpina (400mg/kg, subcutânea, s.c.), e observados por 1 e 24h, sendo sacrificados após o período de observação aqueles que apresentaram convulsões, estado epiléptico e que sobreviveram ao tratamento.

Estudos comportamentais, histopatológicos e neuroquímicos foram realizados nesses animais com a finalidade de fornecer subsídios para esclarecer a fase aguda do processo convulsivo.

OBJETIVOS

O mecanismo do processo convulsivo ainda não foi completamente esclarecido. Dessa forma, com o intuito de investigar a fisiopatologia das convulsões, decidiu-se estudar as convulsões induzidas por pilocarpina em alta dose (400mg/Kg; P400) em ratas adultas fêmeas com 2 meses de idade que apresentaram convulsão, estado epiléptico e que foram sacrificadas após 1 e 24h de observação, através dos seguintes aspectos:

- ☞ **Estudo comportamental dos animais adultos tratados com pilocarpina;**
- ☞ **Estudo da latência das convulsões e na instalação do estado epiléptico;**
- ☞ **Análise histopatológica das áreas cerebrais dos animais adultos tratados com pilocarpina;**
- ☞ **Determinação da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) em corpo estriado de ratos adultos;**

- ∞ **Determinação da densidade máxima dos receptores colinérgicos muscarínicos (M_1+M_2) e dopaminérgicos (RD_1 - e RD_2 -símile);**

- ∞ **Determinação dos níveis das monoaminas: dopamina (DA), 5-hidroxitriptamina (5-HT) e seus metabólitos: ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA) e ácido 5-hidroxiindol-3-acético (5-HIAA);**

- ∞ **Determinação da taxa de metabolização das monoaminas: dopamina (DA) e 5-hidroxitriptamina (5-HT);**

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizadas ratas Wistar fêmeas adultas com 2 meses de idade, com peso variando de 250-280g, provenientes do Biotério Central do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com no máximo 6 animais, em condições ambientais semelhantes, com ciclo claro/escuro alternado de 12 horas, recebendo ração padrão tipo Purina e água *ad libitum*.

2. Tratamento dos grupos experimentais

2.1. Preparo da droga e tratamento dos animais

O Cloridrato de pilocarpina (Sigma Chemical Co., USA) foi dissolvido em água bidestilada, obtendo-se a concentração final 400 mg/mL.

Os animais foram tratados com pilocarpina 400mg/Kg, via subcutânea e observados por 1 e 24h após a administração. Os controles foram tratados com salina NaCl 0,9%. O **Quadro 1** sumariza os protocolos experimentais de tratamento e observação.

Após 1 e 24h da administração de pilocarpina, os animais que apresentaram convulsões, estado epiléptico e sobreviveram ao tratamento foram sacrificados, seus cérebros removidos e o corpo estriado dissecado sobre gelo e armazenado em condições apropriadas para estudos

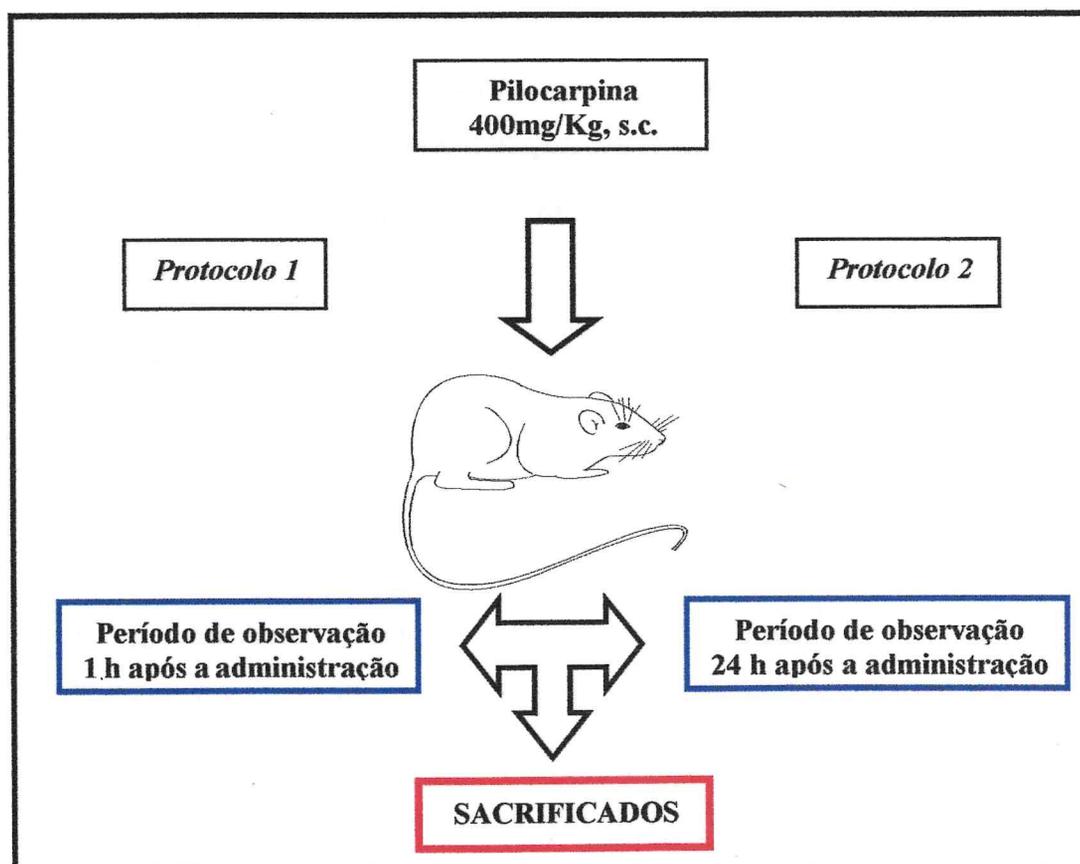
neuroquímicos. Com relação aos estudos histopatológicos, os cérebros foram colocados diretamente em formalina a 10%.

2.1.1. Protocolo experimental realizado com ratas:

O **Quadro 1** apresenta o resumo esquemático dos protocolos experimentais utilizados para o estudo. No protocolo 1, as ratas adultas foram tratadas com uma única dose de pilocarpina (400mg/Kg, s.c; P400), ou com NaCl 0,9% (controle) e observadas durante 1h após a administração e, em seguida, sacrificadas. Por sua vez, no protocolo 2 as ratas adultas foram tratadas também com uma única dose de pilocarpina (400mg/Kg, s.c; P400), ou com NaCl 0,9% (controle) e observadas durante 24h após a administração e, em seguida, sacrificadas.

- O **Quadro 1** sumariza os protocolos experimentais de tratamento

Quadro 1 – Protocolos experimentais de tratamentos dos animais



3. Materiais utilizados nos experimentos

- ✓ Agitador de tubos (modelo 251, FANEN, São Paulo, Brasil);
- ✓ Balança analítica (modelo H5, Mettler, Suíça);
- ✓ Banho maria (FANEN, modelo 102/1, SP, Brasil);
- ✓ Centrífuga (modelo J-21C, Beckman, CA, USA);
- ✓ Contador de Cintilação Líquida (modelo LS 100, Beckman, Fullerton, CA, USA);
- ✓ Contador de Cintilação Líquida (modelo LS 6500, CA, USA);
- ✓ Cubetas de plástico para leitura em espectrofômetro (Sarstedt, Alemanha Oriental);
- ✓ Espectrofômetro (modelo DU 640 B, Beckman, CA, USA);
- ✓ Equipamento de Millipore para filtração à vácuo (Millipore apparatus, Bedford, MA, USA);
- ✓ Estufa de secagem e esterilização (modelo 315 SE FANEN, SP, Brasil);
- ✓ Frascos de vidro para contagem de cintilação (*vials*, Beckman, Fullerton, CA, USA);
- ✓ Homogeneizadores (Bellico, USA);
- ✓ Guilhotina (Harvard, USA);
- ✓ Micropipetas (H.E. Pedersen, Dinamarca)
- ✓ Medidor de pH, modelo B374 (Micronal, SP, Brasil);
- ✓ Cortador (aparelho para obtenção de fatias de tecidos frescos, desenvolvido no Laboratório de Farmacologia-bioquímica do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará);
- ✓ Carbogênio (tubo contendo 5 % CO₂ + 95 % O₂);

- ✓ Microscópio ótico (Nikon, type 119, binocular);
- ✓ Micrótomo (820 Spencer, American Optical Corporation);
- ✓ Centrífuga refrigerada (modelo Eppendorf);
- ✓ Filtros de fibra de vidro (GF/B Whatman, Maidstone, England);
- ✓ Homogeneizadores (Bellico, EUA);
- ✓ Equipamento de HPLC-Cromatografia Líquida de Alta Performance-
Detector eletroquímico (Shimadzu, Japão), constante de: Detector
eletroquímico (Modelo L-ECD-6A; Shimadzu, Japão) e Eletrodo de
carbono (Shimadzu); Degaseificador (DGU-2A Shimadzu , Japão);
Integrador (C-R6A Chromatopac, Shimadzu, Japão);
- ✓ Injetor (Shimadzu Corp., Japan);
- ✓ Micropipetas (H,E. Pedersen, Dinamarca);
- ✓ Medidor de pH, modelo B374 (Micronal, SP, Brasil);
- ✓ Sonicador (Modelo PT 10-35. Brinkmann Instruments Inc. NY,
EUA).

4. Estudo comportamental

Os animais tratados e controles foram divididos em gaiolas contendo no máximo 6 animais e colocados em ambiente reservado, sendo feita à observação direta. Todos os grupos experimentais foram observados após a administração da pilocarpina, de acordo com o tratamento previsto, perfazendo um total de 1h e 24h de observação. No período noturno os animais foram observados a cada 1 hora.

Os seguintes parâmetros foram observados: presença de sinais colinérgicos periféricos (SCP), tremores, movimentos estereotipados, convulsões motoras, desenvolvimento ou não de estado epilético e número de animais que morreram em cada grupo.

O **Quadro 2** apresenta estes parâmetros juntamente com suas características, segundo descrito previamente por Arnold et al., 1973 e Turski et al., 1983a;b e 1984. Depois do período de observação, os animais foram sacrificados, os cérebros removidos, sendo dissecado o corpo estriado para a realização de estudos específicos, tais como, análise histopatológica e estudos neuroquímicos.

Quadro 2 - Parâmetros comportamentais observados após tratamento agudo com pilocarpina 400mg/Kg

PARÂMETROS	CARACTERÍSTICAS
Sinais colinérgicos periféricos (SCP)	miose, cromodaciorréia, piloereção, diarréia, salivação e diurese.
Tremores	-
Movimentos estereotipados (ME)	aumento das atividades de roer, coçar-se, mastigar e <i>wet-dog shakes</i> (ato de sacudir – semelhante a um cachorro molhado).
Convulsões	tônico/clônica com ou sem <i>rearing</i> (ato de empinar-se)
Estado epiléptico	convulsões intermitentes durante até 30 min
Número de animais que morreram em cada grupo	determinado durante o período de 1h e 24 horas depois da administração da pilocarpina

Fonte: Turski et al., 1983a;b e 1984.

5. Determinação da Atividade Acetilcolinesterásica (AChE)

5.1. Método

A atividade acetilcolinesterásica foi determinada segundo Ellman e colaboradores (1961), tendo como princípio a medida da velocidade de produção de tiocolina à proporção que a acetiltiocolina (ATC), utilizada como substrato é hidrolisada.

Isto é acompanhado pela reação contínua do tiol com o íon 5:5-ditiobis-2-nitrobenzoato (I) para produzir o ânion amarelo do ácido 5-tio-2-nitro-benzóico (II), cuja coloração é medida em 412 nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, o que permitiu leituras automáticas em sistema digital e forneceu maior sensibilidade.

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

5.2. Soluções Reagentes

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

↳ Tampão fosfato de sódio

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$ (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) 0,1 M em água bidestilada, pH 7,0.

↳ Solução de iodeto de acetiltiocolina

- ATC (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 75 mM em água bidestilada.

↳ Solução de ácido 5:5-ditiobis-2-nitrobenzoato

- DTNB (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 10 mM em tampão fosfato de sódio.

6. Estudo histopatológico

6.1. Procedimento experimental

Os cérebros de ratos tratados e controles foram submetidos à análise histopatológica. Os animais foram observados durante 1h e 24 horas. Os animais que apresentaram convulsão, estado epiléptico e sobreviveram após os respectivos períodos de observação foram decapitados, os cérebros removidos e fixados em formalina a 10% por 72 horas. Cortes sagitais, feitos em intervalos de 1 mm, foram obtidos a partir de um corte inicial próximo aos corpos mamilares.

Para o estudo microscópico, secções de 10 μ foram feitas, coradas em Hematoxilina-Eosina, 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 a análise das lesões cerebrais, foram observados os seguintes parâmetros: aspectos normais semelhantes aos controles ou a presença das células tumefeitas, atrofiadas, núcleos picnóticos, morte neuronal, gliose e vacuolização.

O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada estrutura examinada (Peredery et al., 1992; Bureau et al., 1994). Os animais foram definidos como tendo lesão cerebral quando havia pelo menos 50% de alteração em uma ou mais estruturas.

6.2. Método de coloração

O método de coloração utilizado para a análise histopatológica dos tecidos cerebrais foi o que usa como corante a Hematoxilina-Eosina (HE). As soluções utilizadas e as etapas do método encontram-se sumarizadas no Quadro 3.

Quadro 3 - Coloração em Hematoxilina - Eosina (HE)

MÉTODO: HEMATOXILINA – EOSINA	
CORANTE	
Hematoxilina - 7 g - Eosina - 0,5 g álcool absoluto - 50 a 80 mL alúmen de potássio amônio - 100 mL água destilada q.s.p - 100 mL óxido amarelo de mercúrio - 2,5 g água destilada q.s.p - 1000 mL	
ETAPAS	
1. desparafinização do material por 10 min	6. eosina por 1 min
2. álcool: 70, 80 e 96%	7. lavagem com H ₂ O
3. lavagem com H ₂ O	8. álcool: 70, 80 e 96 %
4. hematoxilina por 5 min	9. clarear material com xilol H ₂ O
5. lavagem com água destilada	10. montar lâminas (lamínulas + bálsamo do Canadá)

7. Dissecação das áreas cerebrais

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

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

O corpo estriado (caudado, putâmen e globo pálido) foi isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação, sendo a sua retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex (Figura 1).

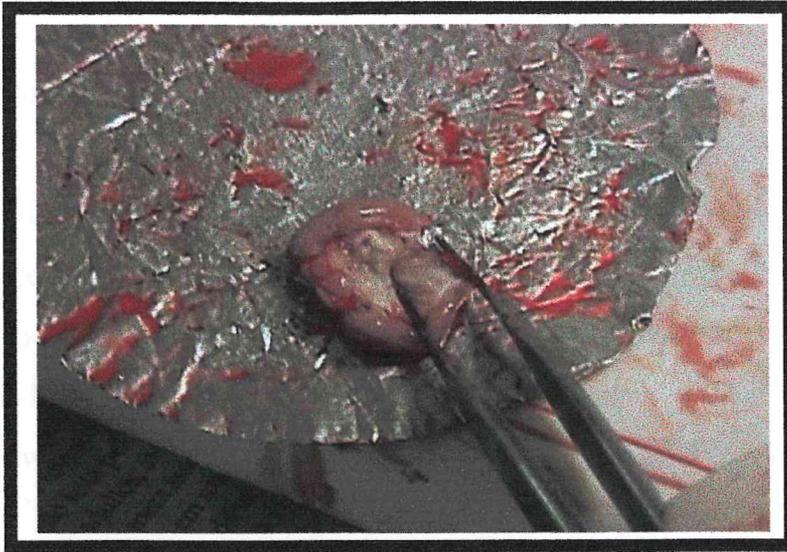


Figura 1- Dissecação cerebral mostrando a retirada do corpo estriado de rato adulto.

Após o término da dissecação, cada área foi colocada em papel de alumínio devidamente identificado, pesada e conservada a -80°C para uso posterior. Quando as áreas foram estocadas durante um certo período de tempo (no máximo 2 meses), os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação daqueles que foram ensaiados imediatamente ou 24 h após a dissecação (Burke & Greenbaun, 1987; Fielder et al., 1987).

8. Determinação da densidade de receptores muscarínicos

8.1. Método

A densidade de receptores muscarínicos (M_1+M_2) foi determinada através de ensaios de *binding*, executados em homogenatos cerebrais, utilizando-se o ligante específico $^3\text{H-N}$ -metilescopolamina ($^3\text{H-NMS}$, 85 Ci/mmol-New England), de acordo com método previamente descrito (Dombrowski et al., 1983).

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

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

8.2. Procedimento experimental

Terminada a dissecação das áreas cerebrais em gelo, como mencionado anteriormente, foram feitos homogenatos a 10% de corpo estriado (CE) em tampão fosfato de sódio, 150 mM, pH 7,4.

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

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

A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-100 com uma eficiência de 67%. A ligação específica foi calculada como a ligação total menos a ligação não-específica feita na presença de atropina 12,5 μM . Os resultados para a densidade máxima de receptores (B_{max}) e para a constante de dissociação (K_d) foram expressos em femtomoles por miligrama de proteína e nM, respectivamente. A concentração de proteína foi determinada segundo o método de Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

8.3. Soluções reagentes

As seguintes soluções reagentes foram empregadas nessa técnica:

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

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

↳ Solução estoque de atropina

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

↳ Tampão fosfato de sódio

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

↳ Coquetel de cintilação

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

9. Determinação da densidade dos Receptores Dopaminérgicos

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

↳ Receptores D₁-símile

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

↳ Receptores D₂-símile

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

9.1. Método para os receptores dopaminérgicos (RD₁ e RD₂)

9.1.1. Método

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

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

9.1.2. Procedimento experimental

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

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

Após incubação a 37 °C durante 60 minutos, a reação foi terminada por filtração a vácuo através de filtros Whatman GF/B. Os discos de papel

de filtro foram lavados três vezes com 4 mL de solução salina 0,9% gelada, secos a 60 °C por no mínimo 2 h e colocados em frascos de vidro (*vials*) contendo 3 mL de um coquetel de cintilação líquida contendo tolueno.

A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-6500 com a eficiência de 61%. O *binding* específico foi calculado como *binding* total menos o *binding* não-específico feito na presença de dopamina 100 μM ou butaclamol 10 μM , respectivamente para os receptores D_1 e D_2 .

Os resultados para a densidade máxima de receptores (B_{max}) e para a constante de dissociação (K_d) foram expressos em femtomoles por miligrama de proteína e nM, respectivamente. A concentração de proteína foi determinada segundo o método de Lowry e colaboradores (1951), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

9.1.3. Soluções reagentes

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

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

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

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

↳ Tampão Tris-HCl

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

↳ Tris HCl modificado

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

↳ Mianserina

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

↳ **Dopamina (cloridrato de dopamina)**

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

↳ **Butaclamol (Cloridrato de butaclamol)**

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

↳ **Coquetel de cintilação**

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

10. Dosagem de proteína

10.1. Método

A quantidade de proteína em homogenatos de cérebro foi determinada a 25°C utilizando albumina sérica bovina com padrão, de acordo com o método previamente descrito por Lowry et al., 1951, que emprega duas reações de formação de cor para analisar a concentração proteica fotometricamente.

Inicialmente é feita uma reação de biureto de baixa eficiência na qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor azulada na presença de ligações peptídicas. Esta cor biureto é característica de todas as proteínas e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa de ensaio.

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

10.2. Soluções reagentes

↳ Reagente A

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

↳ Reagente B

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

↳ Reagente C

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

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

1:1 em água bidestilada.

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

1 mg/mL em água bidestilada.

11. Determinação de monoaminas e metabólitos com HPLC

11.1. Método

Para a determinação dos níveis de catecolaminas, foi utilizado o equipamento de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) (**Figura 2**). 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 um outro soluto que seja mais rapidamente adsorvido. Então, a separação dos solutos é

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

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

11.2. Procedimento Experimental

Os animais foram decapitados 1h e 24h após a administração de pilocarpina 400 mg/Kg e, imediatamente, tiveram seus cérebros dissecados sob gelo. O CE foi utilizado para preparar homogenatos a 10%. Os tecidos cerebrais foram sonicados em ácido perclórico (HClO_4) por 30 s e centrifugados por 15 minutos em centrífuga refrigerada a 15.000 rpm. Uma alíquota de 20 μl do sobrenadante foi, então, injetada no equipamento de HPLC (Figura 2), para a análise química.

Para a análise das monoaminas, uma coluna CLC-ODS(M) com comprimento de 25 cm, calibre 4,6 mm e diâmetro da partícula de 3 μm , da

Shimadzu-Japão, foi utilizada. A fase móvel utilizada foi composta por tampão ácido cítrico 0,163M, pH 3,0, contendo ácido octanosulfônico sódico, 0,69 M (SOS), como reagente formador do par iônico, acetonitrila 4 % v/v e tetrahydrofurano 1,7 % v/v.

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

11.3. Soluções Reagentes

↳ Fase Móvel

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

↳ Ácido Perclórico 0,1 M

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

↳ Padrões

Os padrões foram preparados em uma concentração final de 4 ng de DA, 5-HT, DOPAC, HVA e 5-HIAA (Sigma, MO, EUA) (**Figura 3**). A partir da altura ou área dos picos desses padrões, as amostras foram calculadas no programa *Microsoft Excel* em um computador PC e os resultados expressos em ng/g de tecido

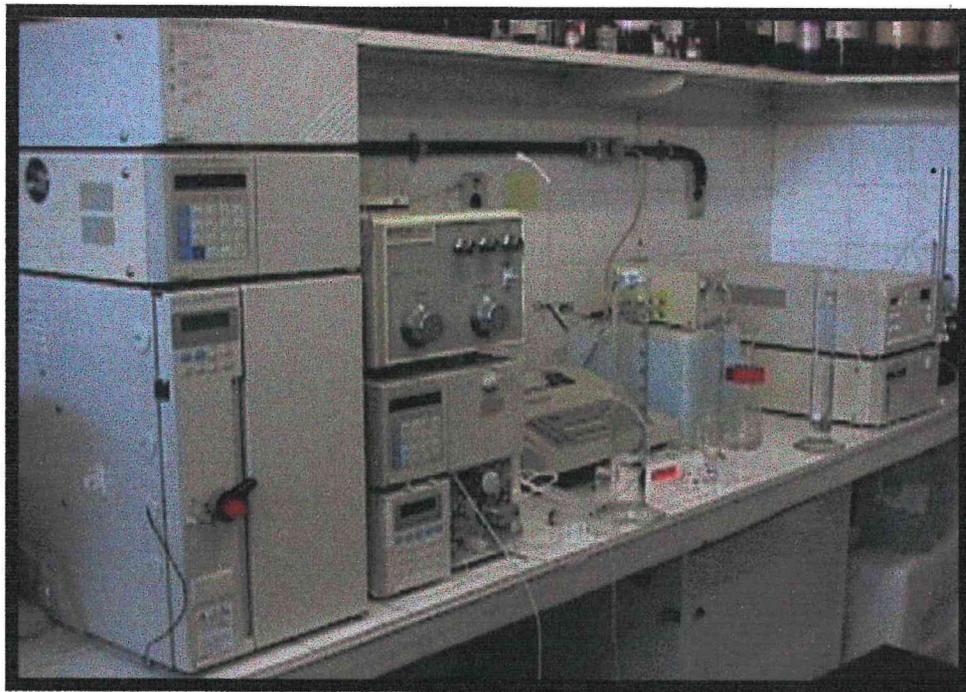


Figura 2 - Aparelho de HPLC com detecção de fluorescência e eletroquímica. Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFC.

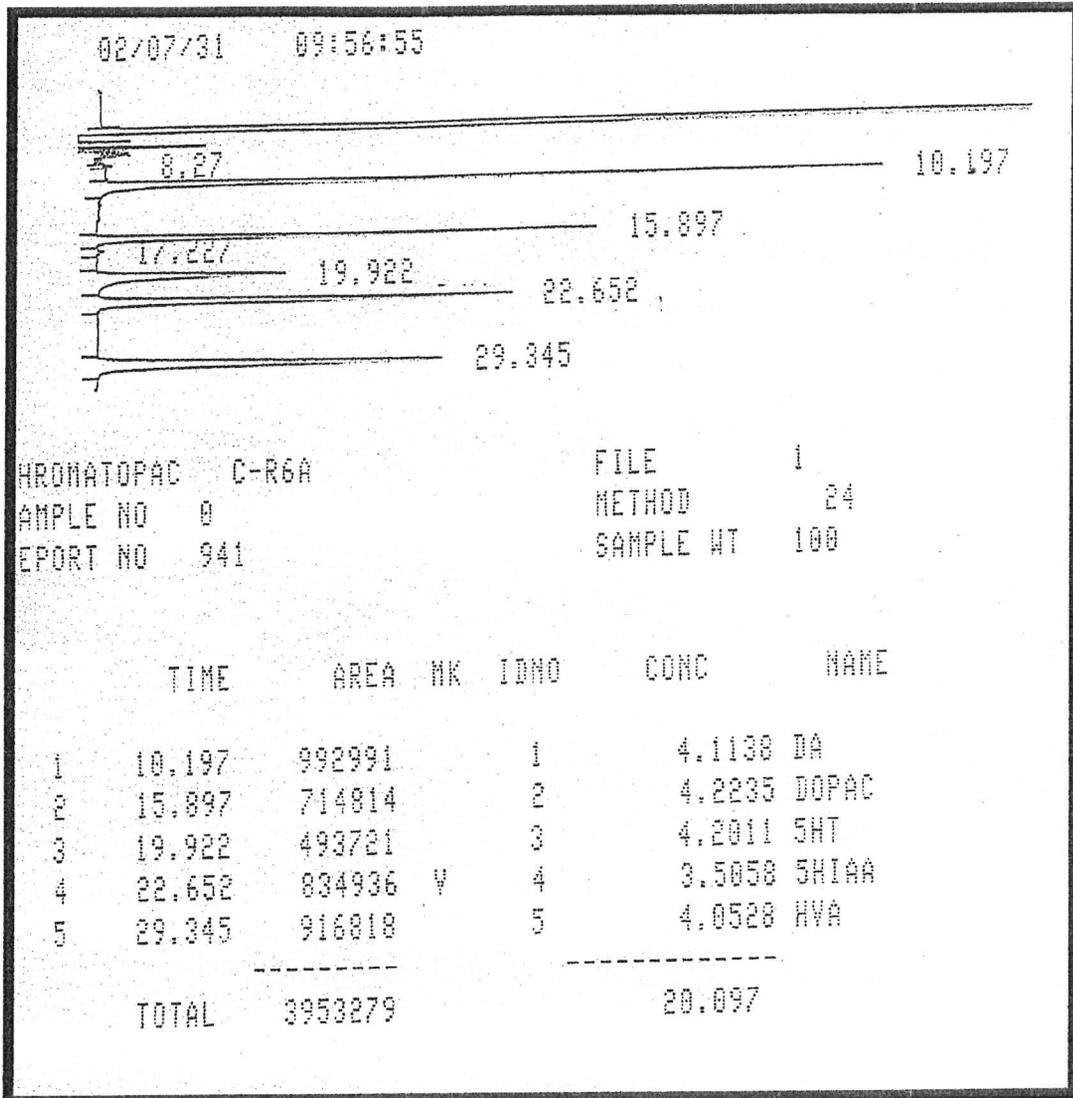


Figura 3 – Modelo de Cromatograma padrão das monominas (DA, 5-HT) e metabólitos (DOPAC, 5-HIAA e HVA), obtido através do aparelho de HPLC com detecção de fluorescência e eletroquímica do Laboratório de Neurofarmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia-UFC.

12. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi acompanhada por um computador PC, utilizando o programa *Instar*. Para os dados paramétricos, o teste "t" de Student-Neuman-Keuls foi utilizado para comparação das médias de dois grupos e a Análise de Variância como *post hoc* para comparações múltiplas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. Estudo comportamental

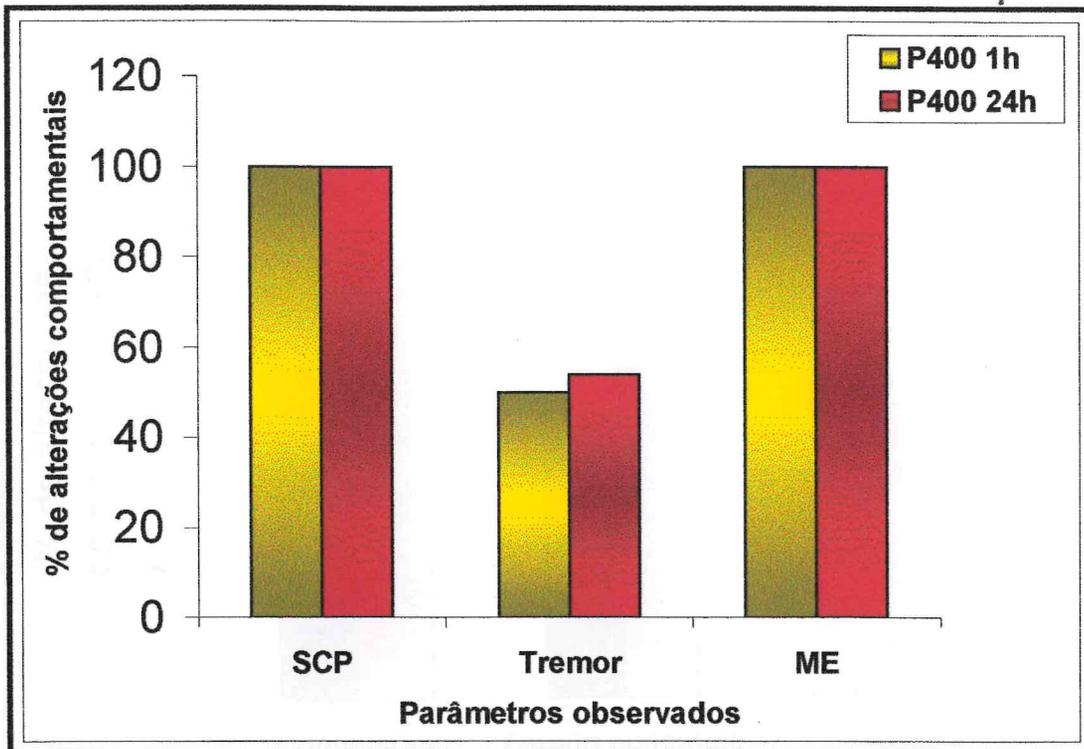
1.1. Comportamento de ratas adultas observadas durante 1h e 24h após administração de pilocarpina.

Os estudos comportamentais foram realizados como descrito anteriormente. Os resultados são apresentados como a percentagem das alterações dos parâmetros comportamentais observados no número de animais em parênteses.

Todos os animais adultos tratados com dose elevada de pilocarpina (400 mg/kg, s.c; $n=60$), durante 1 hora de observação, apresentaram sinais colinérgicos periféricos, tais como, miose, piloereção, cromodacriorréia, salivação, diarreia, diurese, e também movimentos estereotipados, envolvendo o aumento da atividade de roer, coçar, mastigar e *wet-dog shakes* (ato de sacudir – semelhante a um cachorro molhado). Os tremores ocorreram em 50% (30) e as convulsões em 58% (35) que apareceram nos 20 minutos iniciais, sendo instalado o estado de mal epilético logo em seguida, em 50% (30) dos animais, não havendo nenhuma morte nesse grupo (**Figura 1 e 2**).

Por sua vez, durante o período de 24 horas de observação, todos os animais (60) apresentaram também sinais colinérgicos periféricos e movimentos estereotipados, e 54% (32) de tremor. As convulsões ocorreram em 75% (45) dos animais, que progrediram para o estado de mal epilético em 75% (45) dos animais. Houve cerca de 63% (37) de morte nesse grupo ($n = 60$) (**Figura 1 e 2**).

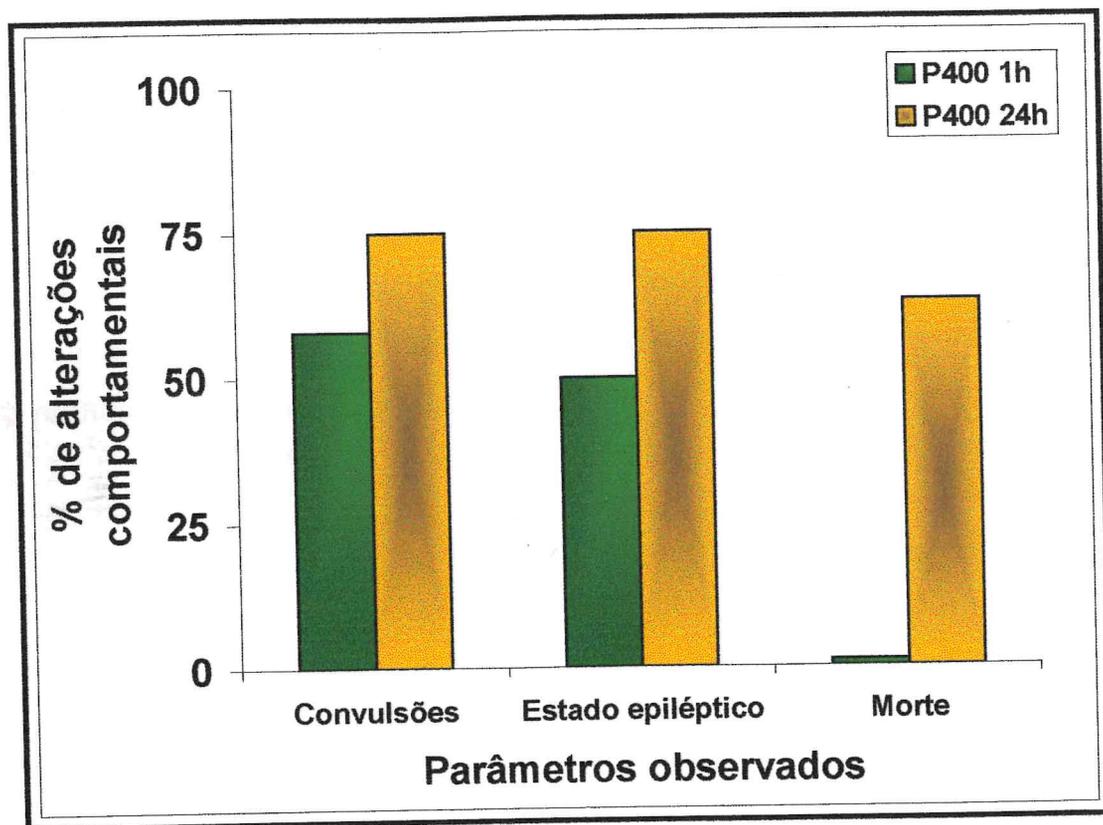
Figura 1 – Percentagem de animais adultos que apresentaram sinais colinérgicos periféricos, tremores e movimentos estereotipados após administração de pilocarpina 400 mg/Kg (P400)



Ratas Wistar fêmeas (250-280g, 2 meses) foram tratadas com uma única dose de pilocarpina (400 mg/Kg, s.c.; $n=60$) e os controles com salina 0,9% ($n=60$). Os animais foram observados durante de 1 e 24h.

- **SCP** - Sinais colinérgicos periféricos: miose, piloereção, cromodaciorréia, diarreia;
- **ME** - Movimentos estereotipados: coçar o nariz, lamber pata, mastigação, e *rearing* (ato de empinar-se).

Figura 2 – Percentagem de animais adultos que apresentaram convulsões, estado epiléptico, e mortalidade após administração de pilocarpina 400 mg/Kg (P400)



Ratas Wistar fêmeas (250-280g, 2 meses) foram tratadas com uma única dose de pilocarpina (400 mg/Kg, s.c.; $n=60$) e os controles com salina 0,9% ($n=60$). Os animais foram submetidos a um período de 1 e 24h de observação.

1.2. Latência das convulsões e de instalação do estado epiléptico em ratas adultas com 2 meses de idade tratadas com pilocarpina 400mg/Kg (P400).

A **tabela 1** apresenta a média \pm EPM da latência das convulsões e de instalação do estado epiléptico expressas em minutos. Nos animais adultos ($n=22$) observados após a administração da pilocarpina, a primeira convulsão ocorreu em torno de 35 minutos, que progrediu para a instalação do estado epiléptico após 32 minutos do aparecimento da primeira convulsão, não havendo, no entanto, morte dos animais até o final da primeira hora de observação.

Tabela 1: Latência das convulsões e de instalação do estado epiléptico em ratas com 2 meses de idade tratados com pilocarpina 400 mg/Kg

GRUPO	Latência da Convulsão (minutos)	Estado epiléptico (minutos)
Ratas adultas	$35 \pm 0,7$ (22)	$67 \pm 3,5$ (22)

Ratas Wistar (250-280g, 2 meses de idade) foram tratadas com uma única dose de pilocarpina (400mg/Kg, s.c.; $n=22$) e os controles com salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período total de 24h de observação e após esse período foram sacrificados. Os valores representam a média \pm EPM e o número de animais observados em parênteses.

Tabela 1: Latência das convulsões e de instalação do estado epiléptico em ratas com 2 meses de idade tratados com pilocarpina 400 mg/Kg

GRUPO	Latência da Convulsão (minutos)	Estado epiléptico (minutos)
Ratas adultas	$35 \pm 0,7$ (22)	$67 \pm 3,5$ (22)

Ratas Wistar (250-280g, 2 meses de idade) foram tratadas com uma única dose de pilocarpina (400mg/Kg, s.c.; $n=22$) e os controles com salina 0,9%. Os animais foram submetidos a um período total de 24h de observação e após esse período foram sacrificados. Os valores representam a média \pm EPM e o número de animais observados em parênteses.

2. Análise histopatológica de animais adultos com 2 meses de idade tratados com pilocarpina 400mg/Kg.

A Tabela 2 mostra a percentagem de animais com lesão cerebral observada em ratos adultos com 2 meses de idade, tratados com pilocarpina na dose de 400mg/kg. Os animais tratados com dose elevada de pilocarpina (400 mg/kg; P400; $n = 6-8$) apresentaram 0% e 81% de animais com lesão cerebral, para os grupos observados por 1 e 24h após a administração de P400, respectivamente.

Dos seis cérebros dos animais controles submetidos à análise histopatológica nenhum apresentou perda neuronal, gliose e degeneração vacuolar típica em nenhuma das áreas estudadas (Figura 3), como também nenhuma outra alteração histopatológica.

Os animais ($n=6$) que desencadearam convulsão, estado epiléptico e foram sacrificados após uma hora de observação não apresentaram alterações, apenas no hipocampo ocorreu uma vacuolização citoplasmática discreta nos neurônios em apenas um dos animais. Entretanto, para os oito cérebros dos animais que também apresentaram convulsão, estado epiléptico e foram sacrificados após uma 24h de observação e foram submetidos à análise histopatológica, seis apresentaram perda neuronal, gliose e degeneração vacuolar típica, afetando várias estruturas, tais como, hipocampo (60% de comprometimento), córtex fronto-parietal, entorrinal (56% de comprometimento para cada estrutura), corpo estriado, córtex piriforme e substância negra (55% para cada), tálamo (52%), área parasseptal (36%) e núcleo amigdalóide (42%).

As fotografias apresentando o corpo estriado dos ratos controles e P400 1h sem alterações são apresentadas na **Figura 3**, e o corpo estriado dos ratos controles sem alterações e as lesões evidenciadas em ratos adultos observados por 24 h (P400 24h) são vistas na **Figura 4**.

A **Tabela 3** mostra as estruturas cerebrais mais afetadas com a administração de pilocarpina 400mg/Kg que foram, em ordem decrescente de comprometimento, o hipocampo (60%), córtex fronto-parietal (56%) e entorrinal (56%), seguidos do córtex piriforme (55%), corpo estriado (55%) e substância negra (55%).

Tabela 2 – Percentagem de animais adultos (2 meses de idade) com lesão cerebral após tratamento com pilocarpina (400mg/Kg).

GRUPO	NÚMERO TOTAL DE ANIMAIS	NÚMERO DE ANIMAIS COM LESÃO	% DE ANIMAIS COM LESÃO
Controle	06	00	00
P400 1h	06	00	00
P400 24h	08	06	81

Ratas Wistar (250-280g, 2 meses de idade) foram tratadas com uma única dose de pilocarpina (400 mg/Kg, s.c.; $n=6-8$) e os controles com salina 0,9% ($n=6$). Os animais foram observados durante 1 e 24h após administração da pilocarpina e em seguida foram sacrificados. Os cérebros dos animais foram retirados 1 e 24h depois da administração para estudo histopatológico. O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada estrutura examinada. Os animais foram definidos como tendo lesão cerebral quando havia pelo menos 50% de alteração em uma ou mais estruturas.

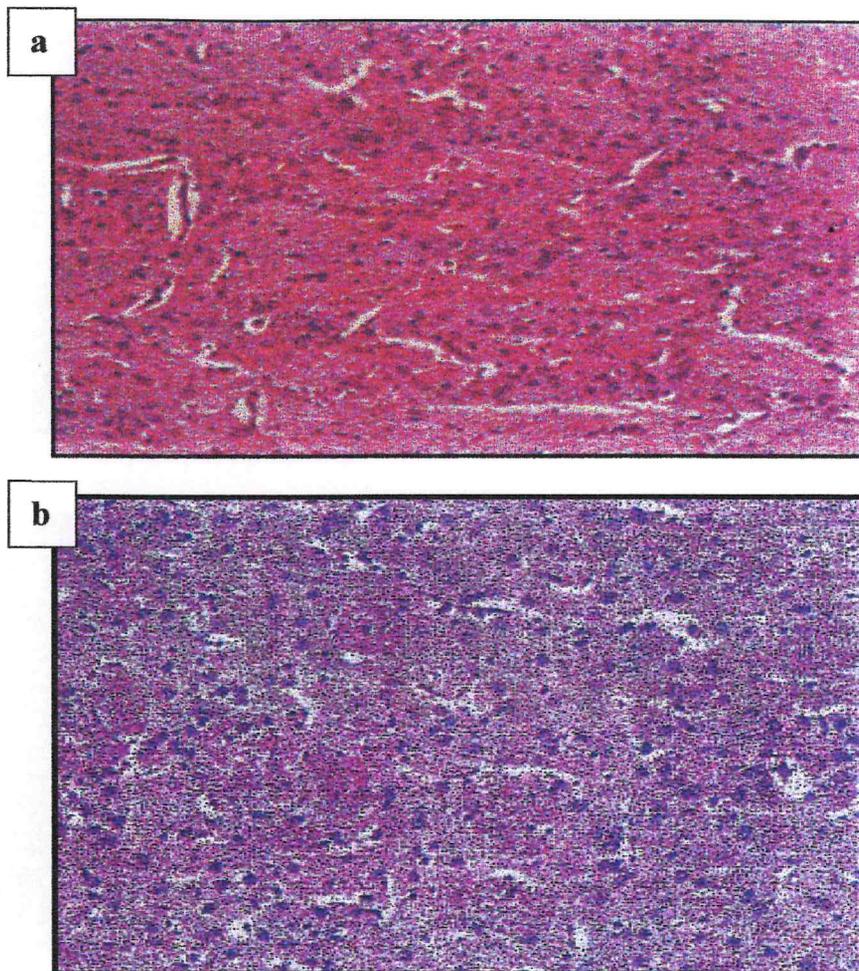


Figura 3:

a, Ausência de alterações histopatológicas em corpo estriado de ratos adultos observados por 1 h após administração de salina (NaCl 0,9%, s.c.; $n=6$) (Hematoxilina-Eosina X50).

b, Ausência de alterações histopatológicas em corpo estriado de ratos adultos observados por 1h após administração de P400 (pilocarpina 400mg/Kg, s.c.; $n=6$) (Hematoxilina-Eosina X50).

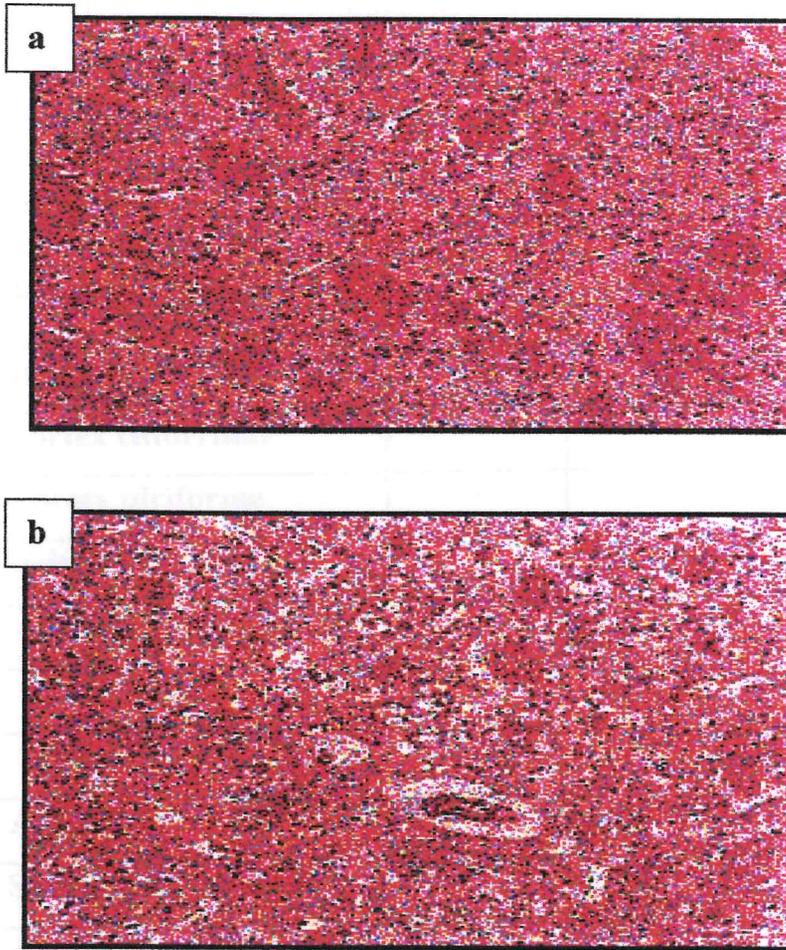


Figura 7

a, Ausência de alterações histopatológicas em corpo estriado de ratos adultos (2 meses de idade) que desencadearam convulsão, estado epiléptico e foram sacrificados 24h após a administração de salina 0,9% (NaCl 0,9%, s.c.; $n=6$) (Hematoxilina-Eosina X50).

b, Corpo estriado de ratos adultos que desencadearam convulsão, estado epiléptico e foram sacrificados 24h após a administração de P400 apresentando degeneração neuronal, gliose e vacuolização ($n=8$) (Hematoxilina-Eosina X50).

Tabela 3 – Percentagem de alterações histopatológicas em estruturas cerebrais de ratas adultas (2 meses de idade) tratados com P400.

% ALTERAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS			
Estruturas Cerebrais	Controle	P400 1h	P400 24h
Córtex frontal e parietal	-	-	56
Córtex entorrinal	-	-	56
Córtex piriforme	-	-	55
Núcleo amigdalóide	-	-	42
Corpo estriado	-	-	55
Tálamo	-	-	52
Hipocampo	-	-	60
Área parasseptal	-	-	36
Substância negra	-	-	55
Número total de animais	06	06	08
Número de animais com lesão	00	00	06

Ratas Wistar (250-280g, 2 meses de idade) foram tratadas com uma única dose de pilocarpina (400 mg/Kg, s.c.; $n=6-8$) e os controles com salina 0,9% ($n=6$). Os animais foram observados durante 1 e 24h após administração da pilocarpina e em seguida foram sacrificados. Os cérebros dos animais foram retirados 1 e 24h depois da administração para estudo histopatológico. O grau de lesão foi expresso através de uma escala percentual de 0 (nenhum) a 100 (total) para cada estrutura examinada. Os animais foram definidos como tendo lesão cerebral quando havia pelo menos 50% de alteração em uma ou mais estruturas (Peredery et al., 1992; Bureau et al., 1994).

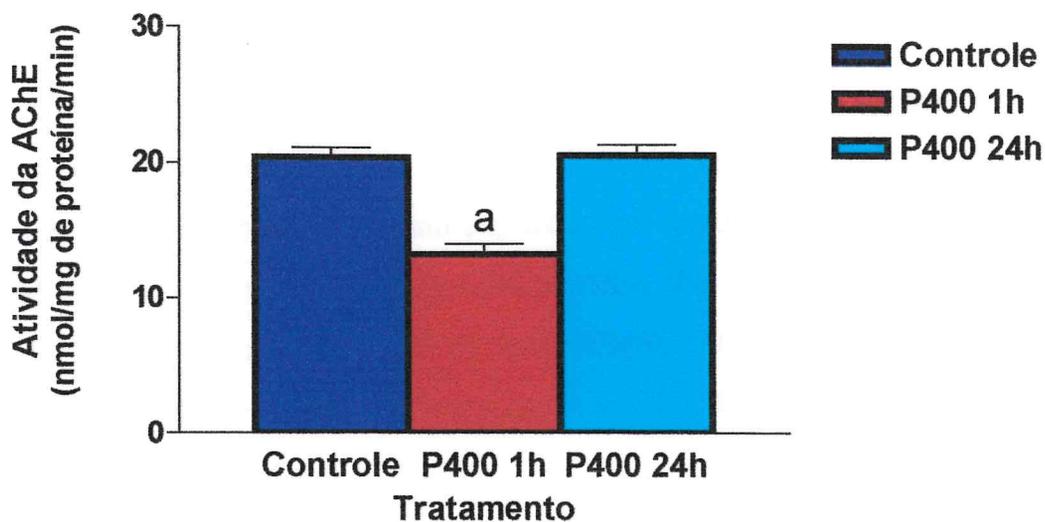
3. Estudos neuroquímicos

3.1. Efeitos da administração da pilocarpina 400mg/Kg sobre a atividade acetilcolinesterásica em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade.

Os resultados das determinações da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) em corpo estriado de ratas com 2 meses de idade tratadas com uma única dose de pilocarpina na dose de 400mg/Kg, s.c., e sacrificados 1h e 24h após a administração, foram expressos em nmoles/mg de proteína/minuto.

Foi observada uma diminuição de 35,2% (**controle** = $20,4 \pm 0,75$; **P400 1h** = $13,24 \pm 0,75$), [T(12) = 7,044; $p < 0,001$] da atividade da enzima no grupo de animais que apresentaram convulsões, estado epiléptico e foram sacrificados 1h após o tratamento. No grupo onde os animais foram sacrificados após 24 horas não foi verificada alteração significativa no valor da atividade acetilcolinesterásica (**controle** = $20,4 \pm 0,75$; **P400 24h** = $20,5 \pm 0,8$), [T(12) = 0,04265; $p = \text{N.S.}$] (**Figura 5**).

Figura 5 - Efeitos sobre a atividade da acetilcolinesterase (AChE) em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade tratados com pilocarpina 400 mg/Kg (P400).



Ratas Wistar (250-280g, 2 meses de idade) foram tratadas com uma única dose de pilocarpina (400 mg/Kg, s.c., $n=6$) e os controles com salina 0,9% ($n=8$). Os animais estudados apresentaram convulsão, estado epiléptico e foram sacrificados 1 e 24h após o tratamento. Os valores representam a média \pm EPM. A atividade da acetilcolinesterase foi determinada em 5 μ L de homogenato. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. a, quando comparado ao controle, ($p<0,05$).

3.2. Efeitos da administração da pilocarpina 400mg/Kg sobre a densidade dos receptores muscarínicos (M_1+M_2) e sobre a constante de dissociação (K_d) em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade.

Os resultados da densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos (M_1+M_2) (B_{max}) e da constante de dissociação do ligante específico aos receptores muscarínicos (K_d) em corpo estriado de ratos tratados com uma única dose de pilocarpina foram expressos em fentomoles/mg de proteína e nM, respectivamente, os valores apresentados abaixo representam a média \pm EPM e são mostrados na **tabela 4**, e a relação entre os efeitos produzidos e o período de observação, sobre o B_{max} e K_d podem ser vistos na **figura 6 e 7**.

Ocorreu uma *downregulation* no B_{max} de 77,5 e 37,0%, durante 1 e 24 h de observação, respectivamente (**controle** = $433,75 \pm 45,8$; **P400 1h** = $97,58 \pm 3,32$), [T(9) = 5,421; $p < 0,0004$], (**controle** = $433,75 \pm 45,8$; **P400 24h** = $273,50 \pm 40,9$), [T(9) = 2,333; $p < 0,0445$]. Observou-se, também, um aumento significativo no B_{max} de aproximadamente 180% em 24 h com relação ao grupo observado por 1 h (**P400 1h** = $97,58 \pm 3,32$; **P400 24h** = $273,50 \pm 40,9$), [T(6) = 4,285; $p < 0,0052$].

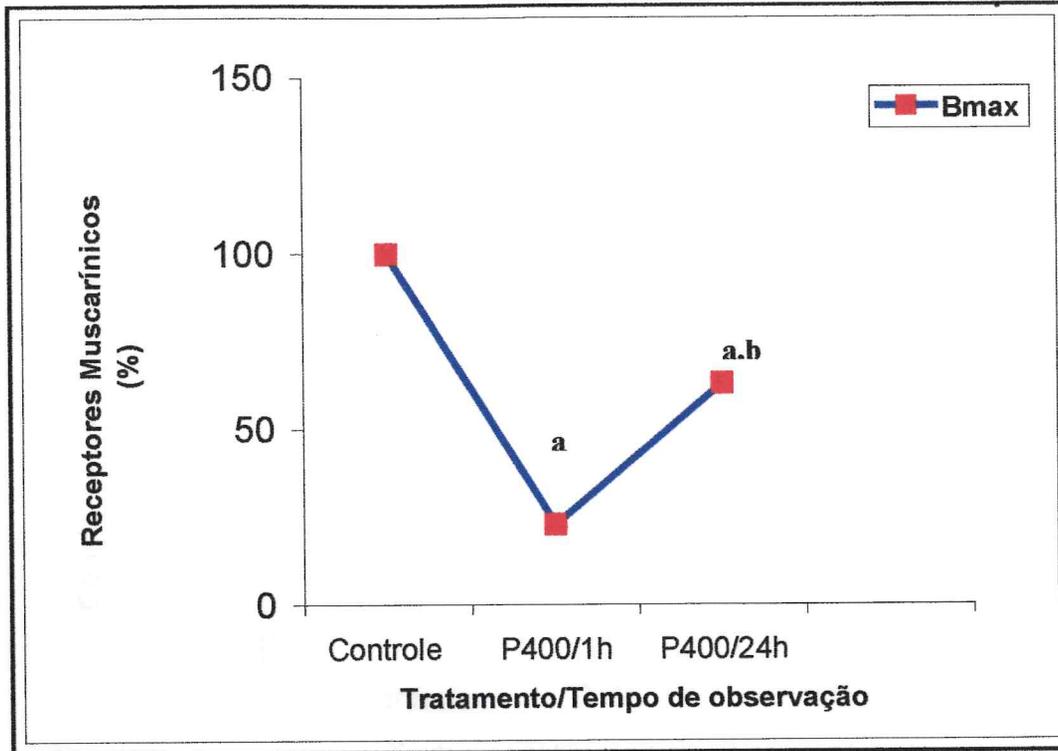
Com relação ao K_d , não houve alteração significativa entre o grupo de 1h e o controle (**controle** = $1,38 \pm 0,13$; **P400 1h** = $1,36 \pm 0,11$), [T(10) = 0,1195, $p = N.S.$], mas houve uma redução de 65,2 e 64,7% no valor da constante de dissociação no grupo observado por 24h, quando comparado aos grupos controle e 1h, respectivamente (**controle** = $1,38 \pm 0,13$; **P400 24h** = $0,48 \pm 0,11$), [T(10) = 4,350; $p < 0,0014$], (**P400 1h** = $1,36 \pm 0,11$; **P400 24h** = $0,48 \pm 0,11$), [T(6) = 5,438; $p < 0,0016$].

Tabela 4: Efeitos da pilocarpina 400 mg/Kg (P400) sobre a densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos (M_1+M_2) e sobre a constante de dissociação (Kd) em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade.

GRUPO	Bmax fmol/ mg de proteína	Kd nM
Controle	433,75 ± 45,8 (8)	1,38 ± 0,13 (8)
P400 1h	97,58 ± 3,32 (4) ^a	1,36 ± 0,11 (4)
P400 24h	273,50 ± 40,9 (4) ^{a,b}	0,48 ± 0,11 (4) ^{a,b}

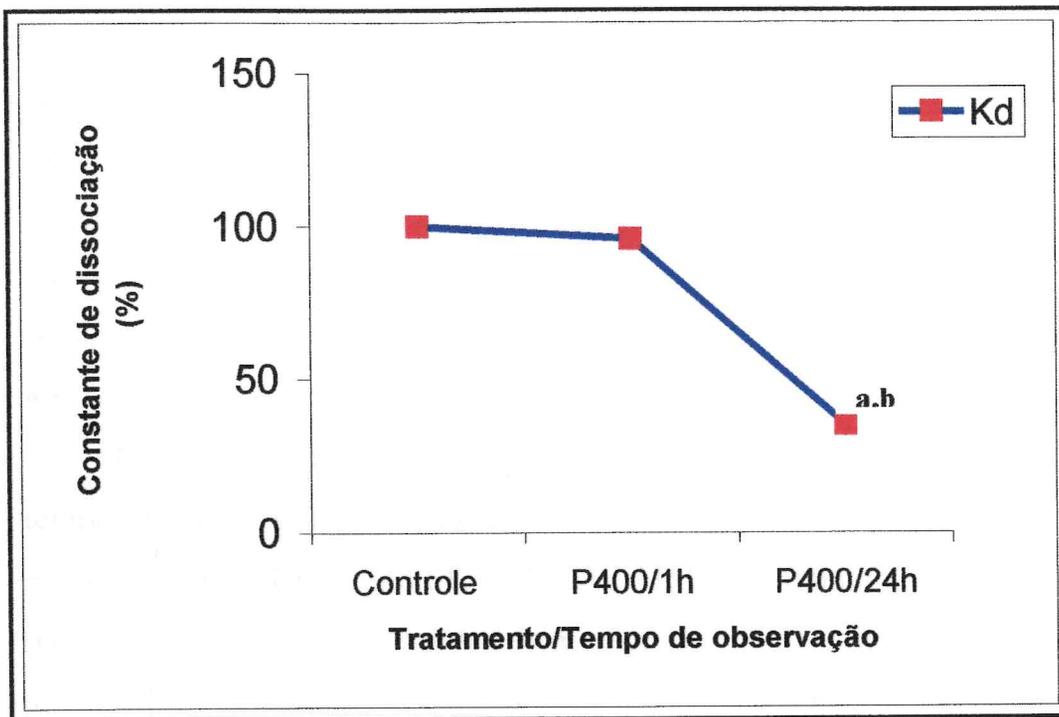
Ratas Wistar (250-280g, 2 meses de idade) foram tratadas com uma única dose de pilocarpina (400 mg/Kg, s.c.; $n=4$) e os controles com salina 0,9% ($n=8$). Os animais estudados apresentaram convulsão, estado epiléptico e foram sacrificados 1 e 24 h após o tratamento. Os valores representam a média ± EPM do número de animais entre parênteses. O $^3\text{H-NMS}$ foi utilizado como ligante. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. **a** e **b** quando comparado aos grupos controle e P400 1h, respectivamente ($p<0,05$).

Figura 6 - Percentagem do número de receptores muscarínicos (Bmax) em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade tratados com pilocarpina 400 mg/Kg (P400) relativo ao período de observação.



Ratas Wistar (250-280g, 2 meses de idade) foram tratadas com uma única dose de pilocarpina (400 mg/Kg, s.c.; $n=4$) e os controles com salina 0,9% ($n=8$). Os animais foram sacrificados após 1 e 24 h de observação. Os valores representam a percentagem da média \pm EPM do número de experimentos entre parênteses. O $^3\text{H-NMS}$ foi utilizado como ligante. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. **a** e **b** quando comparado aos grupos controle e P400 1h, respectivamente ($p<0,05$).

Figura 7 - Percentagem do valor da constante de dissociação (Kd) dos receptores muscarínicos em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade tratados com pilocarpina 400 mg/Kg (P400) relativo ao período de observação.



Ratas Wistar (250-280g, 2 meses de idade) foram tratadas com uma única dose de pilocarpina (400 mg/Kg, s.c.; $n=4$) e os controles com salina 0,9% ($n=8$). Os animais foram sacrificados após 1 e 24 h de observação. Os valores representam a média \pm EPM do número de experimentos entre parênteses. O $^3\text{H-NMS}$ foi utilizado como ligante. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. **a** e **b** quando comparado aos grupos controle e P400 1h, respectivamente ($p<0,05$).

3.3. Efeitos da administração da pilocarpina 400mg/Kg sobre a densidade dos receptores dopaminérgicos D₁ e sobre a constante de dissociação (Kd) em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade.

Os resultados da densidade dos receptores dopaminérgicos D₁-like (Bmax) e da constante de dissociação do ligante específico aos receptores dopaminérgicos D₁ (Kd) em corpo estriado de ratos tratados com uma única dose de pilocarpina foram expressos em fentomoles/mg de proteína e nM, respectivamente, os valores apresentados abaixo representam a média \pm EPM e são mostrados na **tabela 5**, e a relação entre os efeitos produzidos e o período de observação, sobre o Bmax e Kd podem ser vistos na **figura 8 e 9**.

Nenhuma alteração foi observada nos níveis de RD₁ nos diferentes tempos de observação do estudo em relação ao controle (**controle** = 346,18 \pm 21,39; **P400 1h** = 348,61 \pm 28,23), [T(10) = 0,06668; p = N.S.], (**controle** = 346,18 \pm 21,39; **P400 24h** = 353,48 \pm 13,07), [T(10) = 0,2264; p = N.S.]. Nem tão pouco quando feita à comparação entre os dois tempos de observação (**P400 1h** = 348,61 \pm 28,23; **P400 24h** = 353,48 \pm 13,07), [T(6) = 0,1555; p = N.S.].

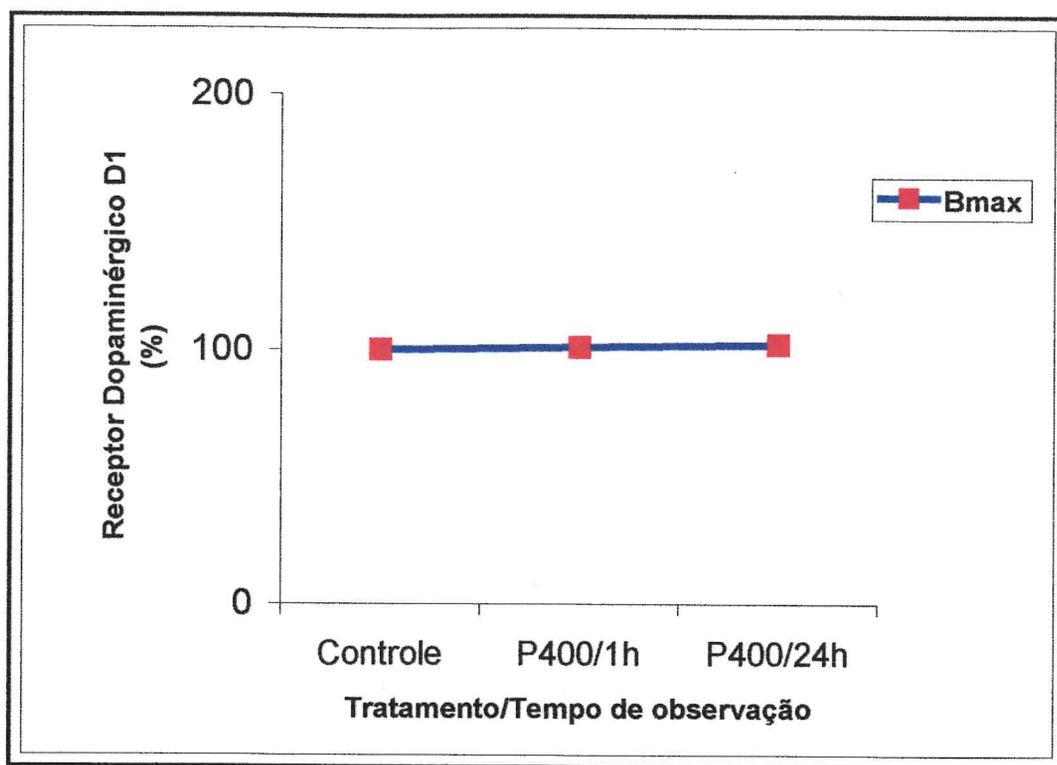
Com relação ao Kd houve uma redução significativa de 26% tanto no grupo de 1h como no de 24 h com relação ao controle (**controle** = 1,65 \pm 0,08; **P400 1h** = 1,22 \pm 0,02), [T(10) = 3,607, p < 0,0048], (**controle** = 1,65 \pm 0,08; **P400 24h** = 1,22 \pm 0,02), [T(10) = 3,620, p < 0,0047], e não houve alteração no valor da constante de dissociação entre os grupos de 1 h e 24h quando comparado entre si (**P400 1h** = 1,22 \pm 0,02; **P400 24h** = 1,22 \pm 0,02), [T(6) = 0,07077; p = N.S.].

Tabela 5 - Efeitos da pilocarpina 400 mg/Kg (P400) sobre o número de receptores dopaminérgicos D₁ e sobre a constante de dissociação (Kd) em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade.

GRUPO	Bmax fmol/mg de proteína	Kd nM
Controle	346,19 ± 21,40 (8)	1,65 ± 0,08 (8)
P400 1h	348,61 ± 28,43 (4)	1,22 ± 0,02 (4) ^a
P400 24h	353,48 ± 13,07 (4)	1,22 ± 0,02 (4) ^a

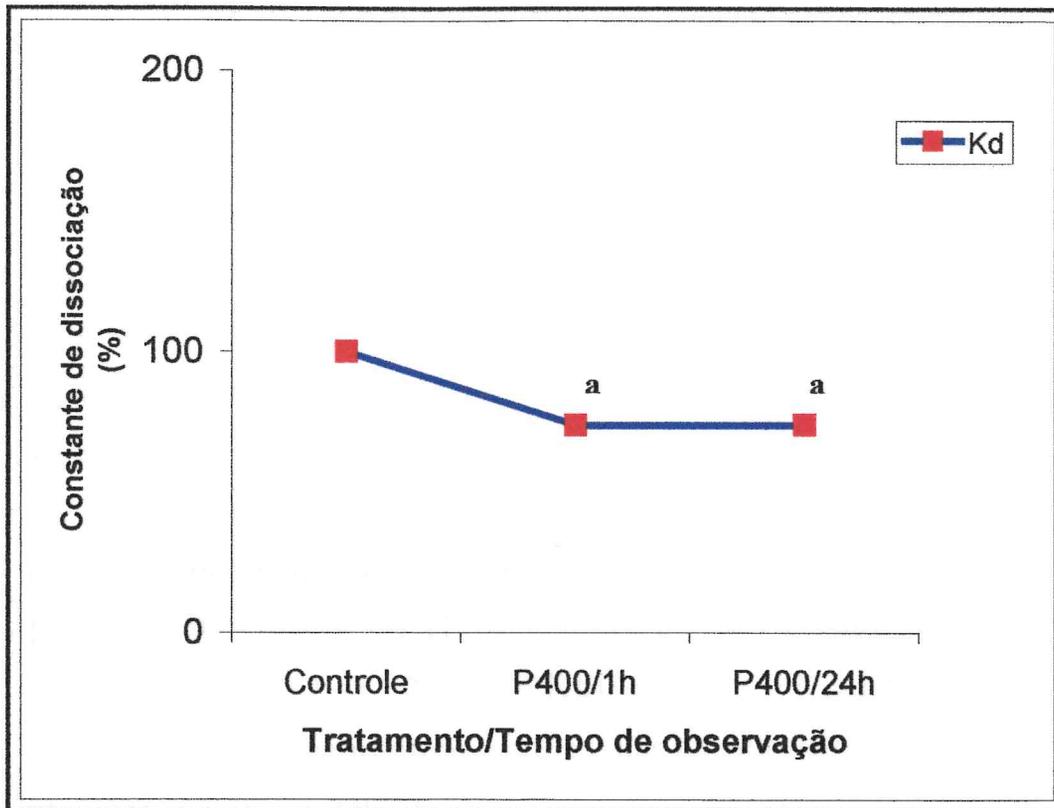
Ratas Wistar (250-280g, 2 meses de idade) foram tratadas com uma única dose de pilocarpina (400 mg/Kg, s.c.; $n=4$) e os controles com salina 0,9% ($n=8$). Os animais estudados apresentaram convulsão, estado epiléptico e foram sacrificados 1 e 24 h após o tratamento. Os valores representam a média ± EPM do número de experimentos entre parênteses. O ³H-SCH foi utilizado como ligante. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. **a**, quando comparado ao controle ($p<0,05$).

Figura 8 – Percentagem do número de receptores (B_{max}) dopaminérgicos D₁-like em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade tratados com pilocarpina 400mg/Kg (P400) relativo ao período de observação.



Ratas Wistar (250-280g, 2 meses de idade) foram tratadas com uma única dose de pilocarpina (400 mg/Kg, s.c.; $n=4$) e os controles com salina 0,9% ($n=8$). Os animais foram sacrificados após 1 e 24 h de observação. Os valores representam a percentagem da média \pm EPM do número de experimentos entre parênteses. O $^3\text{H-SCH}$ foi utilizado como ligante. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*.

Figura 9 –Percentagem do valor da constante de dissociação (Kd) dos receptores dopaminérgicos D₁-like em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade tratados pilocarpina 400mg/Kg (P400) relativo ao período de observação.



Ratas Wistar (250-280g, 2 meses de idade) foram tratadas com uma única dose de pilocarpina (400 mg/Kg, s.c.; $n=4$) e os controles com salina 0,9% ($n=8$). Os animais foram sacrificados após 1 e 24 h de observação. Os valores representam a percentagem da média \pm EPM do número de experimentos entre parênteses. O $^3\text{H-SCH}$ foi utilizado como ligante. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. **a**, quando comparado ao controle ($p<0,05$).

3.4. Efeitos da administração da pilocarpina 400mg/Kg sobre a densidade dos receptores dopaminérgicos D₂-like e sobre a constante de dissociação (Kd) em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade.

Os resultados da densidade dos receptores dopaminérgicos D₂-like (Bmax) e da constante de dissociação do ligante específico aos receptores dopaminérgicos D₂ (Kd) em corpo estriado de ratos tratados com uma única dose de pilocarpina foram expressos em fentomoles/mg de proteína e nM, respectivamente, os valores apresentados abaixo representam a média \pm EPM e são mostrados na **tabela 6**, e a relação entre os efeitos produzidos e o período de observação, sobre o Bmax e Kd podem ser vistos na **figura 10 e 11**.

Nenhuma alteração foi observada nos níveis de RD₂ nos diferentes tempos de observação em relação ao controle (**controle** = 378,4 \pm 23,4; **P400 1h** = 316,9 \pm 25,59), [T(14) = 1,404; p = N.S.], (**controle** = 378,4 \pm 23,4; **P400 24h** = 325,7 \pm 26,02), [T(16) = 1,384; p = N.S.], nem tão pouco quando foi feita a comparação entre os dois tempos de observação (**P400 1h** = 316,9 \pm 25,59; **P400 24h** = 325,7 \pm 26,02), [T(8) = 0,2272; p = N.S.].

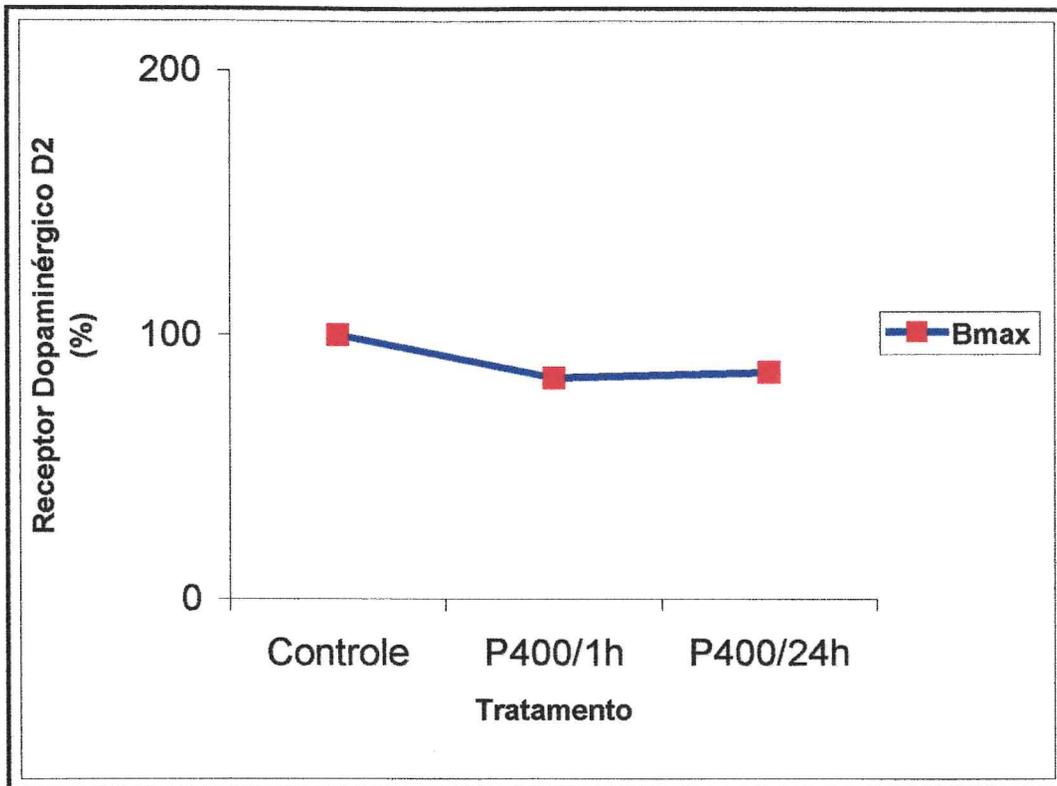
Com relação ao Kd, houve uma redução significativa de 55% e 79% para o grupo de 1 e 24 h, respectivamente com relação ao controle (**controle** = 3,19 \pm 0,48; **P400 1h** = 1,45 \pm 0,08), [T(8) = 2,920, p < 0,0193], (**controle** = 3,19 \pm 0,48; **P400 24h** = 0,67 \pm 0,03), [T(8) = 4,230, p < 0,0029], e houve também uma redução de 54,4% no Kd do grupo de 24h quando comparado ao grupo observado por 1 h (**P400 1h** = 1,45 \pm 0,08; **P400 24h** = 0,67 \pm 0,03), [T(6) = 8,331; p < 0,0002].

Tabela 6: Efeitos da pilocarpina 400 mg/Kg (P400) sobre o número de receptores dopaminérgicos D₂-like e sobre a constante de dissociação (Kd) em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade.

GRUPO	Bmax fmol/mg de proteína	Kd nM
Controle	378,4 ± 23,4 (12)	3,19 ± 0,48 (8)
P400 1h	316,9 ± 25,59 (4)	1,45 ± 0,08 (4) ^a
P400 24h	325,7 ± 26,02 (4)	0,67 ± 0,03 (4) ^{a,b}

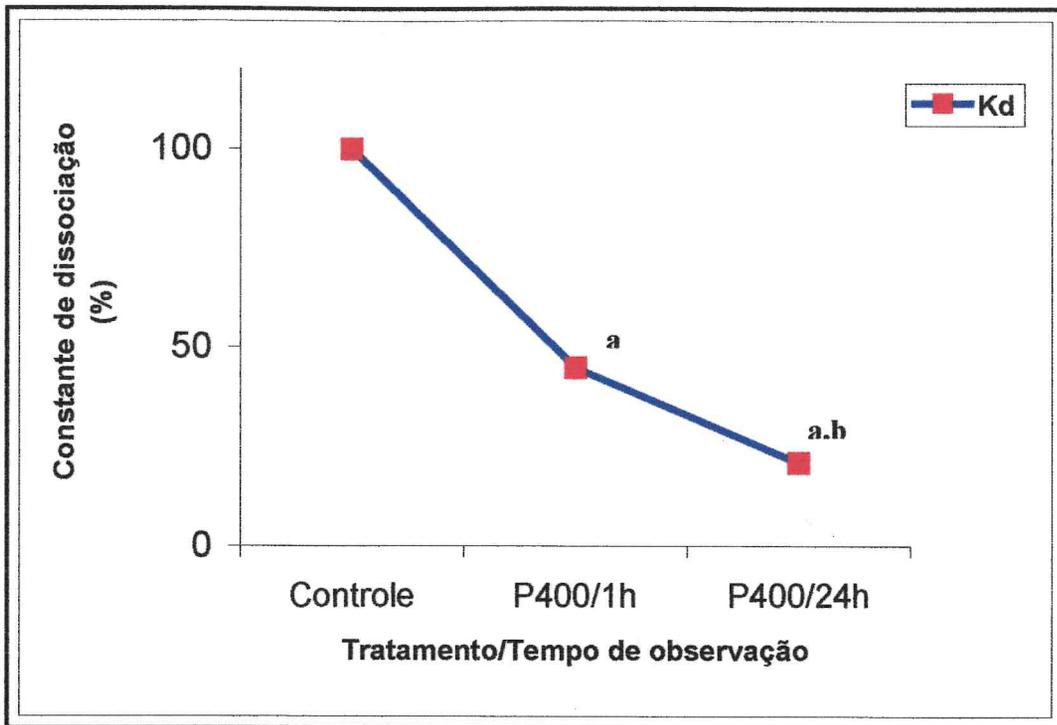
Ratas Wistar fêmeas (250-280g, 2 meses de idade) foram tratadas com uma única dose de pilocarpina (400 mg/Kg, s.c.; $n=4$) e os controles com salina 0,9% ($n=8-12$). Os animais estudados apresentaram convulsão, estado epiléptico e foram sacrificados 1 e 24h após o tratamento. Os valores representam a média ± EPM do número de animais entre parênteses. O ³H-espiroperidol foi utilizado como ligante. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. **a** e **b** quando comparado ao controle e P400 1h, respectivamente ($p<0,05$).

Figura 10 – Percentagem do número de receptores (Bmax) dopaminérgicos D₂-like em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade tratados com pilocarpina 400 mg/Kg (P400) relativo ao período de observação.



Ratas Wistar (250-280g, 2 meses de idade) foram tratadas com uma única dose de pilocarpina (400 mg/Kg, s.c., $n=4$) e os controles com salina 0,9% ($n=12$). Os animais foram sacrificados após 1 e 24 h de observação. Os valores representam a percentagem da média \pm EPM do número de animais entre parênteses. O ³H-espiroperidol foi utilizado como ligante. Para análise estatística foram usados teste t-Student-Neuman-Keuls e a ANOVA como *post-hoc*.

Figura 11 – Percentagem entre a constante de dissociação (Kd) dos receptores dopaminérgicos D₂-like em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade tratados com pilocarpina 400 mg/Kg (P400) relativo ao período de observação.



Ratas Wistar (250-280g, 2 meses de idade) foram tratadas com uma única dose de pilocarpina (400 mg/Kg, s.c.; $n=4$) e os controles com salina 0,9% ($n=8$). Os animais foram sacrificados após 1 e 24 h de observação. Os valores representam a percentagem da média \pm EPM do número de animais entre parênteses. O ³H-espiroperidol foi utilizado como ligante. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. **a** e **b** quando comparado ao controle e P400 1h, respectivamente ($p<0,05$).

3.5. Efeitos da administração da pilocarpina 400mg/Kg (P400) sobre as concentrações de monoaminas e seus metabólitos DA, DOPAC, HVA, 5-HT e 5-HIAA em corpo estriado de ratas com 2 meses de idade.

Os resultados das determinações dos níveis de monoaminas em corpo estriado de ratos tratados com uma única dose de pilocarpina (400mg/Kg; P400; s.c.) que apresentaram convulsões, estado epiléptico e sobreviveram durante a primeira hora de observação, sendo sacrificados após o período de observação, foram expressos em ng/g de tecido.

A **Figura 12** apresenta uma redução nos níveis da dopamina de 40,0% (**controle** = 3465 ± 185 ; **P400 1h** = 2080 ± 392), [T(18) = 3,647; $p < 0,0018$], após uma hora de observação.

Com relação aos metabólitos da dopamina, houve uma diminuição nos níveis de DOPAC de 24,0 % (**controle** = 3144 ± 253 ; **P400 1h** = 2390 ± 243), [T(22)] = 2,120; $p < 0,0455$], e na concentração de HVA não houve alteração significativa (**controle** = 1221 ± 51 ; **P400 1h** = 1259 ± 183), [T(18) = 0,2553; $p = \text{N.S.}$], quando comparado ao grupo controle (**Figura 12**).

A serotonina quando determinada em ratos tratados com P400, apresentou uma diminuição significativa de 42% quando comparado ao controle (**controle** = 501 ± 23 ; **P400 1h** = 350 ± 64), [T(17) = 2,720; $p < 0,0146$]. Os níveis de seu metabólito 5-HIAA aumentaram em torno de 191% em relação ao controle (**controle** = 675 ± 46 ; **P400 1h** = 1966 ± 213), [T(15) = 6,248, $p < 0,0001$] (**Figura 13**).

Por sua vez, os ratos que apresentaram convulsões, estado epiléptico e que foram sacrificados após as 24h de observação, mostraram uma

redução também nos níveis da dopamina de 47%, quando comparado ao controle (**controle** = 3465 ± 185 ; **P400 24h** = 1717 ± 60), [T(16) = 2,805; $p < 0,0127$] (**Figura 12**).

Com relação aos metabólitos da DA, houve uma redução nos níveis de DOPAC de 40% (**controle** = 3144 ± 253 ; **P400 24h** = 1826 ± 268), [T(15)] = 2,814; $p < 0,0131$], e de 38,7% no HVA (**controle** = 1221 ± 51 ; **P400 24h** = 760 ± 127), [T(15) = 4,254; $p < 0,0007$], em relação ao controle (**Figura 12**).

Os níveis da 5-HT quando determinados em corpo estriado de ratos convulsivos demonstraram um decréscimo significativo de 40,5% quando comparado ao controle (**controle** = 501 ± 23 ; **P400 24h** = 298 ± 41), [T(14) = 2,340; $p < 0,0346$]. O metabólito 5-HIAA diminuiu em torno de 27% em relação ao controle (**controle** = 675 ± 46 ; **P400 24h** = 492 ± 87), [T(12) = 2,065, $p = \text{N.S.}$] (**Figura 13**).

Fazendo-se uma comparação entre os dois tempos de observação, verificou-se que os níveis de DA (**P400 1h** = 2080 ± 392 ; **P400 24h** = 1826 ± 268), [T(9) = 0,8309; $p = \text{N.S.}$], DOPAC (**P400 1h** = 2390 ± 243 ; **P400 24h** = 1826 ± 268), [T(16)] = 1,848; $p = \text{N.S.}$], HVA (**P400 1h** = 1259 ± 183 ; **P400 24h** = 760 ± 127), [T(11) = 2,021; $p = \text{N.S.}$] (**Figura 13**), e 5-HT (**P400 1h** = 350 ± 64 ; **P400 24h** = 298 ± 41), [T(11) = 0,5367, $p = \text{N.S.}$], não foram alteradas de forma significativa, no entanto, o metabólito da serotonina, o 5-HIAA sofreu uma redução de 77% nos animais observados por 24h com relação ao grupo de 1h (**P400 1h** = 1966 ± 213 ; **P400 24h** = 492 ± 87), [T(12) = 5,832, $p < 0,0001$] (**Figura 13**).

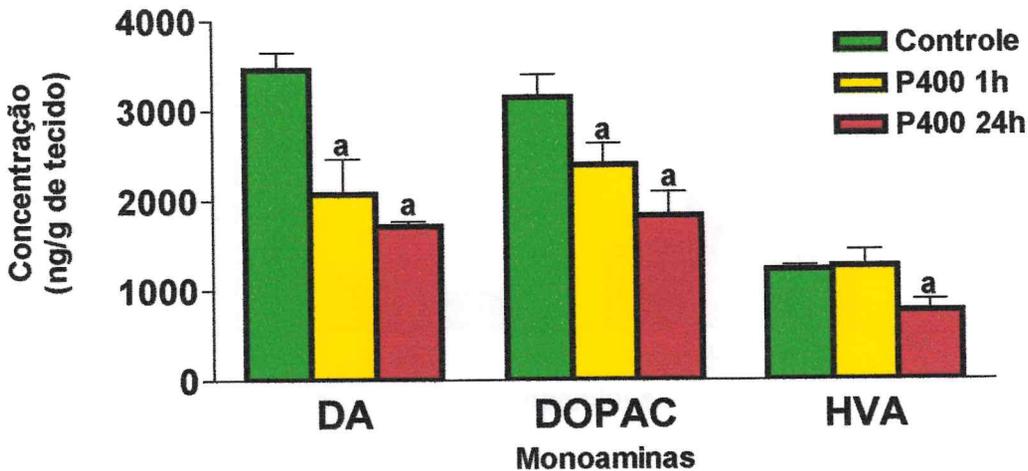
3.6. Efeitos da administração da pilocarpina 400mg/Kg (P400) sobre a taxa de metabolização das monoaminas DA e 5-HT em corpo estriado de ratas com 2 meses de idade.

A administração de pilocarpina não produziu em nenhum grupo experimental alterações na taxa de metabolização da DA, (**Controle** = $0,88 \pm 0,07$; **P400 1h** = $1,07 \pm 0,10$), [T(16) = 1,515, p = N.S.]; (**Controle** = $0,88 \pm 0,07$; **P400 24h** = $1,07 \pm 0,12$), [T(17) = 1,482, p = N.S.]; (**P400 1h** = $1,07 \pm 0,10$; **P400 24h** = $1,07 \pm 0,12$), [T(11) = 0,0383, p = N.S.] (**Figura 14**).

A taxa de metabolização da 5-HT nos animais sacrificados após 1h em relação ao controle aumentou significativamente (**Controle** = $1,31 \pm 0,04$; **P400 1h** = $5,29 \pm 0,62$), [T(14) = 7,286, p < 0,0001], enquanto que no grupo sacrificado após 24 h não houve alteração (**Controle** = $1,31 \pm 0,04$; **P400 24h** = $1,14 \pm 0,09$), [T(13) = 1,842, p = N.S.].

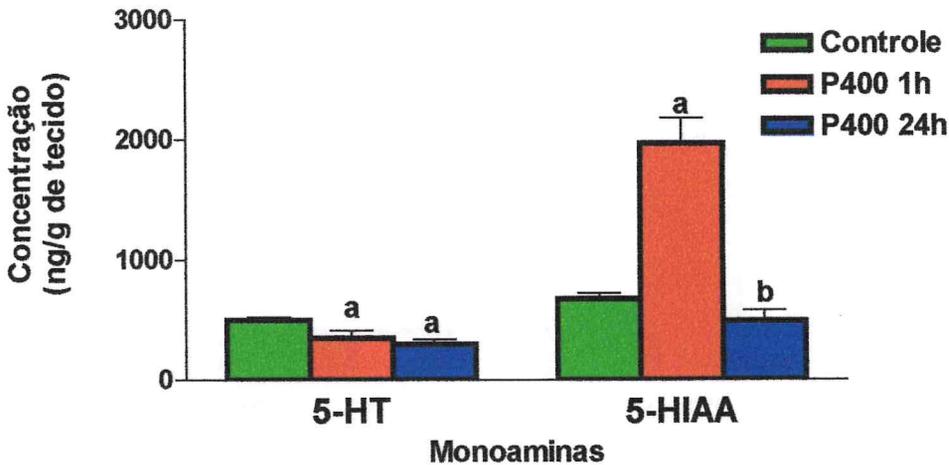
Fazendo-se uma comparação entre os dois tempos de observação verificou-se uma redução no valor da taxa de metabolização no grupo observado por 24h (**P400 1h** = $5,29 \pm 0,62$; **P400 24h** = $1,14 \pm 0,09$), [T(14) = 7,286, p < 0,0001] (**Figura 14**).

Figura 12 – Concentração dos neurotransmissores dopamina (DA) e seus metabólitos 3,4 ácido dihidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA) em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade tratados com pilocarpina 400 mg/Kg.



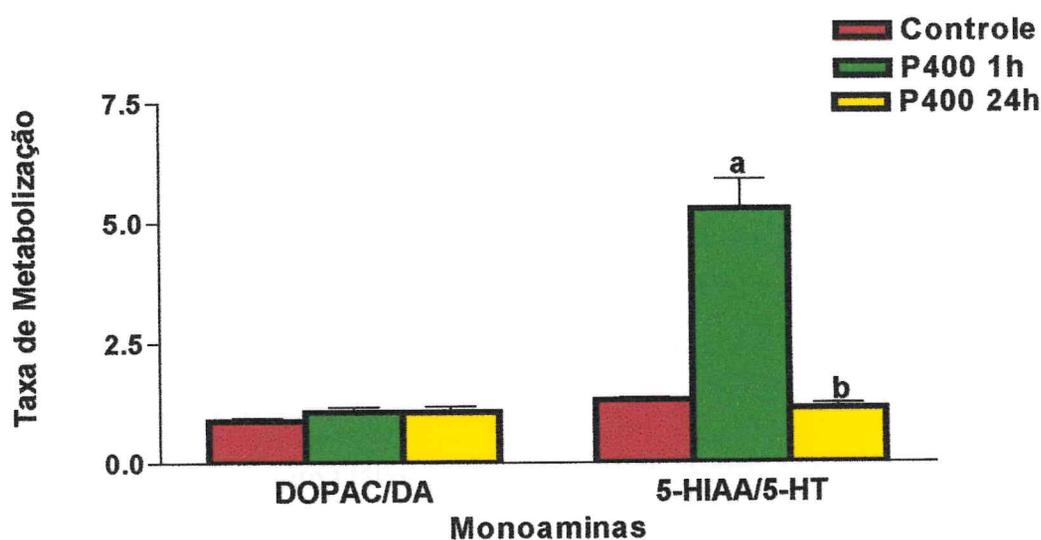
Ratas Wistar (250-280g), foram tratadas com uma única dose de pilocarpina 400 mg/Kg, s.c.; ($n=7$), e os controles com salina 0,9% ($n=13$). O neurotransmissor DA (dopamina) e seus metabólitos DOPAC (3,4 ácido dihidroxifenilacético), HVA (ácido homovanílico) foram determinados em HPLC. Os animais estudados apresentaram convulsão, estado epiléptico e foram sacrificados 1 e 24 h após o tratamento. Os valores representam a média \pm EPM do número de experimentos em parênteses. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. **a**, quando comparado ao controle, ($p<0,05$).

Figura 13 – Concentração dos neurotransmissores serotonina (5-HT), e seu metabólito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade tratados com pilocarpina 400 mg/Kg.



Ratas Wistar (250-280g), foram tratadas com uma única dose de pilocarpina 400mg/Kg, s.c.; ($n=6$), e os controles com salina 0,9% ($n=13$). O neurotransmissor 5-HT (serotonina), e seu metabólito 5-HIAA (ácido 5-hidroxiindolacético), foram determinados em HPLC. Os animais estudados apresentaram convulsão, estado epiléptico e foram sacrificados 1 e 24 h após o tratamento. Os valores representam a média \pm EPM do número de experimentos em parênteses. Para análise estatística, foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post hoc*. **a e b**, quando comparado aos grupos controle e P400 1h, respectivamente ($p<0,05$).

Figura 14 – Taxa de metabolização dos neurotransmissores dopamina (DA) e serotonina (5-HT), em corpo estriado de ratos com 2 meses de idade tratados com pilocarpina 400 mg/Kg.



Ratas Wistar (250-280g), foram tratadas com uma única dose de pilocarpina 400mg/Kg, s.c. ($n=6$), e os controles com salina 0,9% ($n=13$). O neurotransmissor DA (dopamina), e 5-HT (serotonina), foram determinados em HPLC. Os animais estudados apresentaram convulsão, estado epiléptico e foram sacrificados 1 e 24 h após o tratamento. Os valores representam a média \pm EPM do número de experimentos em parênteses. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. **a e b**, quando comparado aos grupos controle e P400 1h, respectivamente, ($p<0,05$).

DISCUSSÃO

O modelo de convulsão com pilocarpina em alta dose (400mg/Kg) em animais reproduz alterações comportamentais e eletroencefalográficas que são semelhantes à epilepsia do lobo temporal de humanos (Bem-Ari et al., 1980). Este modelo foi utilizado para estudar o envolvimento dos sistemas de neurotransmissores como moduladores da epileptogênese, como também para observar as alterações comportamentais, histopatológicas, e outros aspectos neuroquímicos relacionados com a fase aguda do processo convulsivo (Cavalheiro et al., 1994; Marinho et al., 1997 e 1998; Costa-Lotufu et al., 2002).

Este trabalho objetivou estudar as alterações comportamentais, histopatológicas e neuroquímicas (atividade acetilcolinesterásica, níveis de monoaminas DA, DOPAC, HVA, 5-HT, 5-HIAA, densidade máxima e a constante de dissociação dos receptores muscarínicos (M_1+M_2) e dopaminérgicos (D_1 e D_2), desencadeadas através da administração da uma única dose de pilocarpina (400mg/Kg, s.c; P400). Os animais que apresentaram convulsão, estado epiléptico e que foram sacrificados após 1 e 24 h da administração e foi enfatizado o estudo da epilepsia durante a fase aguda, no intuito de esclarecer o processo inicial da fisiopatologia das convulsões.

ESTUDOS COMPORTAMENTAIS

Turski e colaboradores (1983a) descreveram que imediatamente após a administração de pilocarpina, os ratos apresentavam persistentes mudanças comportamentais, incluindo acinesia inicial, ataxia, tremores, automatismos mastigatórios como mioclonia dos músculos faciais, e movimentos como os de um cachorro molhado, que persistiam de 10 a 15 minutos.

Estas alterações comportamentais prosseguem para convulsões motoras límbicas incluindo movimentos clônicos das extremidades superiores que ocorrem em aproximadamente 30 minutos após administração da pilocarpina e ainda pode desenvolver estado epilético no animal. As convulsões motoras límbicas foram definidas como contínuas quando ocorressem por um período maior que 30 minutos (Turski et al., 1986a;b; Marinho et al., 1997; Barone et al., 1990b; Segarra et al., 2002).

Cavalheiro e colaboradores (1994) observaram também que essas convulsões límbicas podiam persistir por aproximadamente 45 a 60 minutos, envolvendo estado epilético em 75% dos ratos convulsivos com retorno progressivo ao normal depois de 3-5 horas e remanescendo em maior parte dos animais. O estado epilético pode persistir por 12 horas e aproximadamente 30% dos ratos em estado epilético morrem durante este período.

Nosso estudo comportamental feito em animais tratados com uma única dose convulsiva de pilocarpina (400mg/Kg, s.c.; P400) apresentou as características descritas na literatura (Turski et al., 1987a;b; Marinho et al., 1997; Barone et al., 1990a; Clifford et al., 1985; Cavalheiro et al., 1999; Costa-Lotufo et al., 2002).

Todos os animais observados por 1 e 24h apresentaram sinais colinérgicos periféricos (miose, cromodacriorréia, piloereção, diarreia, salivação e diurese) e movimentos estereotipados (aumento das atividades de roer, coçar-se, mastigar e *wet-dog shakes* (ato de sacudir – semelhante a um cachorro molhado). Após 35 minutos da administração de pilocarpina 400mg/Kg, surgiram às convulsões motoras límbicas nos animais observados e, em seguida, as convulsões recorrentes foram instaladas em 50% (30) e 75% (45) dos animais, nos grupos P400 1h e 24h, respectivamente.

No grupo de 1h nenhum animal morreu, enquanto que, no grupo observado durante 24h, 38 (63%) animais morreram. Estas observações são semelhantes às características comportamentais expressas por Clifford e colaboradores (1987) que determinaram um percentual de 81% dos animais com estado epiléptico, bem como Jope et al., 1986, Cavalheiro et al., 1996; Turski et al., 1983a, Marinho et al., 1997.

Observa-se, portanto, que no processo convulsivo há um aumento significativo no número de morte dos animais com relação ao período de tempo da fase aguda, mostrando uma possível relação entre o tempo e o número de mortes dos animais durante o desenvolvimento do processo convulsivo.

Nossos resultados também mostraram que as convulsões eram induzidas em 35 minutos, bem como o estado epiléptico era instalado em torno de 1h, de acordo com o que já havia sido previamente descrito para animais com a mesma idade por Turski et al., 1983a,b,c.

ESTUDOS HISTOPATOLÓGICOS

A literatura relata que as convulsões induzidas por pilocarpina, produzem danos neuronais, especialmente nas estruturas límbicas, causando perda neuronal no hipocampo, amígdala, córtex piriforme, córtex entorrinal, septum lateral, tálamo, neocórtex e substância negra (Honchar et al., 1983 e 1990; Turski et al., 1983a; Clifford et al., 1987).

Neste trabalho, vários animais observados, do ponto de vista comportamental, foram distribuídos para o estudo histológico, sendo detectada lesão cerebral, vacuolização e gliose nos grupos tratados com pilocarpina (400mg/Kg) e observados durante 24h, indicando a participação do sistema colinérgico nesse processo. As estruturas cerebrais mais afetadas com a administração de pilocarpina 400 mg/Kg foram, em ordem decrescente de acometimento, o hipocampo, córtex fronto-parietal e entorrinal, seguidos do córtex piriforme, corpo estriado e substância negra para o período de 24h de observação.

Nosso estudo mostrou uma alta percentagem de lesão cerebral após administração da pilocarpina, nos animais que apresentaram convulsão, estado epiléptico e foram sacrificados após 24h de observação.

Por sua vez, nos animais que apresentaram convulsão, estado epiléptico e foram sacrificados após 1h de observação, não foi vista nenhum tipo de alteração histopatológica cerebral, sugerindo, assim, que as lesões decorrentes do processo convulsivo, durante a primeira fase da epilepsia nos animais adultos podem não ocorrer de forma aguda, levando um certo tempo para serem observadas. Portanto, a atividade convulsiva em

humanos parece não provocar após o início da convulsão danos cerebrais imediatos.

Turski et al. (1983a,b) identificaram o hipocampo como sendo o sítio de origem da atividade convulsiva induzida por pilocarpina. Por outro lado, Clifford e colaboradores (1987) sugeriram como sítio inicial dessas convulsões, o pálido ventral ou núcleo *accumbens*. Estudos eletroencefalográficos e autoradiográficos (com 2-deoxiglicose), respectivamente, têm focalizado como local das convulsões induzidas por pilocarpina o núcleo *accumbens* e o hipocampo (Labandeira-Garcia et al., 1994; Kulkarni & George, 1995). Outro estudo encontrou também expressivos danos cerebrais no giro cingulado, giro dentado, na transição amigdalóide-estriatal e no tálamo interanteromedial (Bureau et al., 1994).

Tem sido sugerido que os animais tratados com pilocarpina que não convulsionam, não exibem lesão cerebral, e que as convulsões podem evocar necrose (Persinger et al., 1993). Devido a estas condições em nossos estudos histológicos somente foram utilizados animais que convulsionaram.

Nehlig e colaboradores (2001) observaram que nos animais em estado epiléptico ocorriam menos lesões no hipocampo após um tratamento crônico com a vigabatrina, por outro lado, esta droga GABA mimética não foi capaz de produzir efeito antiepileptogênico no modelo da epilepsia do lobo temporal induzido por lítio-pilocarpina (3mEq/Kg, i.p; 25mg/Kg, s.c.). Estes resultados sugerem uma possível interação direta e/ou indireta entre os sistemas colinérgico e GABAérgico. E ainda, mostram que a ativação da transmissão GABAérgica pode ser útil na diminuição das lesões em algumas áreas cerebrais; no entanto, não é capaz de impedir a instalação e/ou cessar a manutenção da atividade convulsiva.

Nossas observações, nesse contexto, concordam com aquelas apresentadas por vários pesquisadores (Turski et al., 1986a,b; Clifford et

al., 1987; Hirvonen et al., 1993; Marinho et al., 1997), que demonstraram que a pilocarpina sozinha, provoca mudanças histológicas em áreas cerebrais tais como: hipocampo, córtex entorrinal, neocórtex, amígdala, área septal, substância negra e tálamo.

Nos modelos animais que apresentam convulsões recorrentes espontâneas, entre eles, o modelo de epilepsia com pilocarpina, têm sido extensivamente analisado, por que as mudanças histopatológicas no hipocampo reproduzem muitas alterações vistas em humanos (epilepsia do lobo temporal), incluindo perda neuronal e remoção do tecido de sustentação do sistema nervoso (Mello et al, 1993 e 1996; Avoli et al., 1994; Marinho et al., 1997, De Bruin et al., 1999).

Mello e colaboradores (1996) observaram danos morfológicos através da coloração Nissl. Foi visto o alargamento dos ventrículos e um extenso dano no córtex piriforme e na amígdala. Os animais sofreram, ainda, deformação do giro dentado com moderada dispersão das células granulares, e também perda das células do tálamo. Houve também alterações como perda neuronal em outras áreas (córtex cerebral, corpo estriado e na área septal). A perda neuronal também foi observada no hipocampo com a formação de uma região diferenciada. A neurodegeneração foi vista nos animais que entraram em estado epilético, ou naqueles que apresentaram convulsões recorrentes espontâneas, mas não resultou em toxicidade aguda para a pilocarpina.

ESTUDOS NEUROQUÍMICOS

ESTUDOS DA ATIVIDADE ACETILCOLINESTERÁSICA (AChE)

Foi observada uma diminuição da atividade acetilcolinesterásica no corpo estriado de ratos sacrificados após 1h de observação, mas que apresentaram convulsão e estado epiléptico, já que no grupo observado por 24h a atividade enzimática praticamente se normalizou. Os efeitos da pilocarpina em nível enzimático, nos experimentos “*in vitro*”, revelou que no processo convulsivo a interferência na atividade da enzima, ocorre de forma aguda e a curto prazo, devido à ausência de alterações após 24h da administração da pilocarpina.

Cérebros de ratos, apresentam uma alta concentração de acetilcolinesterase (AChE), principalmente em neurônios do *striatum*, no núcleo lateral do tálamo, no tubérculo olfatório e no núcleo accumbens e, em outras áreas, a atividade acetilcolinesterásica apresenta-se em menor grau (Guyton & Hall, 1997).

Drogas agonistas colinérgicas, pilocarpina, podem reduzir a atividade da AChE no estriado de ratos adultos durante a primeira hora da convulsão, entretanto, este efeito não pode ser relacionado com a instalação da convulsão, uma vez que este efeito não ocorreu no grupo observado por 24h e um maior índice de convulsões foi observado também neste grupo.

Simonic e colaboradores (2000) demonstraram também, através do estudo das convulsões, utilizando o modelo lítio-pilocarpina (125mg/Kg + 30mg/Kg; i.p) alterações na atividade de outras enzimas, a saber: superóxido dismutase (SOD), glutathion peroxidase (GPX), glutamato

desidrogenase (GLDH), aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT), creatina kinase (CK), demonstrando que as convulsões e o estado epiléptico induzidos através dos modelos colinérgicos de convulsão, podem alterar também outros sistemas enzimáticos, além do colinérgico que pode estar relacionado diretamente a ativação do processo convulsivo e possivelmente interage com outros sistemas de neurotransmissão responsáveis pelas etapas de propagação e manutenção das convulsões.

Novos estudos são necessários para se avaliar de forma mais detalhada as alterações na atividade enzimática de diferentes sistemas, a fim de contribuir para o esclarecimento da fisiopatologia das convulsões límbicas.

**ESTUDOS DA DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE
MÁXIMA (B_{max}) DOS RECEPTORES MUSCARÍNICOS
(RM_1+RM_2) E DOPAMINÉRGICOS (RD_1 e RD_2)
E DAS CONSTANTES DE DISSOCIAÇÃO (K_d)
AOS LIGANTES**

O efeito da pilocarpina em alta dose, sobre a densidade máxima (B_{max}) dos receptores colinérgicos (M_1+M_2) e dopaminérgicos RD_1 -símile e RD_2 -símile e sobre a constante de dissociação (K_d) aos ligantes foram estudados em corpo estriado de ratas com 2 meses de idade que apresentaram convulsão e estado epiléptico.

Os pacientes com epilepsia do lobo temporal apresentaram o foco epileptogênico no hipocampo. Neurônios piramidais, no hipocampo, estão envolvidos com o início da atividade convulsiva epiléptica e são lesionados por convulsões recorrentes (Wyss & Van Groen, 1995). As vias estriatais parecem, também, estar envolvidas no processo convulsivo, modulando o limiar das convulsões no sistema límbico (Patel et al, 1986 e 1988; Turski et al, 1986a e 1987b,c, Costa-Lotufu et al., 2002).

Nossos resultados evidenciaram no corpo estriado de ratas convulsivas somente uma diminuição no número dos receptores muscarínicos, não havendo alteração na densidade máxima dos receptores dopaminérgicos D_1 e D_2 , após 1 e 24h do tratamento agudo com a pilocarpina. Através dos nossos estudos, pode-se confirmar a *downregulation* produzida por agonistas colinérgicos, já que foi observado este efeito sobre a densidade apenas dos receptores muscarínicos. De qualquer forma, não se pode excluir uma relação direta ou indireta entre os

sistemas colinérgico e dopaminérgico, devido às alterações observadas na constante de dissociação (K_d) e o ligante do sistema dopaminérgico, uma vez que nossos resultados demonstraram uma maior afinidade do ligante do sistema dopaminérgico pelo receptor, através da diminuição do valor do K_d .

Agonistas colinérgicos e anticolinesterásicos, reconhecidamente, promovem uma diminuição na densidade dos receptores colinérgicos (Dilsaver, 1984; El-Etri et al., 1993). A presença de *downregulation* após a administração de pilocarpina foi, provavelmente, decorrente do tratamento agudo, pois este fenômeno foi demonstrado depois do período de 1 e 24h de observação, sendo que ambos correspondem a fase aguda do processo convulsivo.

A *downregulation* dos receptores muscarínicos em todo o cérebro, ou no hipocampo e córtex cerebral, pode ser induzida por um anticolinesterásico ou por agonistas diretos como a pilocarpina (Dilsaver, 1984). Essa alteração ocorre de certa forma, rapidamente, pois, no caso, depois de 1h de observação e morte, em seguida, dos animais, esta diminuição foi observada.

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

Alternativamente, os efeitos da pilocarpina podem afetar a transmissão dopaminérgica. A pilocarpina aumenta a afinidade dos receptores D_1 (Al-Tajir et al., 1990a), aumentando a susceptibilidade para

os efeitos pró-convulsivantes da estimulação dos receptores dopaminérgicos D₁.

No entanto, nenhuma alteração na densidade dos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ foi detectada com a pilocarpina em alta dose no corpo estriado dos animais adultos. Somente uma diminuição foi vista na constante de dissociação do ligante aos receptores dopaminérgicos D₁ e D₂ no corpo estriado das ratas observadas por 1 e 24h após administração da pilocarpina, de maneira significativa, aumentando, assim, a susceptibilidade para os efeitos pró-convulsivantes e anticonvulsivantes mediados pelos receptores, respectivamente.

Experimentos de saturação não mostraram modificações significativas nos valores de K_d no *binding* do ³H-NMS no corpo estriado de ratos adultos tratados com pilocarpina em alta dose, quando observados por 1h; entretanto, para os animais que apresentaram convulsões, estado epiléptico e que foram sacrificados após 24h de observação, ocorreu uma diminuição significativa no valor de K_d, ocasionando um possível aumento da sensibilidade dos receptores muscarínicos à acetilcolina nestas condições.

No *binding* referente ao ligante ³H-SCH, no estriado, os valores de K_d foram diminuídos nos dois grupos analisados, indicando uma maior afinidade do ligante pelos sítios dopaminérgicos D₁, facilitando os efeitos pró-convulsivantes nos animais. Já no *binding* referente ao ligante ³H-espiroperidol, no estriado, os valores de K_d também foram diminuídos em todos os grupos analisados, indicando uma maior afinidade do ligante também pelos sítios dopaminérgicos D₂. Contudo, a diminuição da constante de dissociação foi bastante maior no grupo sacrificado após 24h de observação, demonstrando que é necessário um maior período de tempo para que ocorra uma alteração de forma mais drástica na afinidade pelo

ligante aos receptores RD₂, já que para os receptores RD₁ a alteração foi a mesma independente do tempo de observação. Na convulsão parece que a interação entre o sistema colinérgico e o dopaminérgico tende a influenciar mais o processo anticonvulsivante mediado pelos RD₂, talvez sendo uma resposta compensatória do próprio organismo.

Existe evidência de que há o envolvimento do sistema dopaminérgico no controle das convulsões e na excitabilidade do lobo frontal, observada através da evidência do limiar das convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol que é inversamente proporcional ao conteúdo de dopamina nigroestriatal. Portanto, a depleção da dopamina pode ser um bom índice de resistência as convulsões (Barone et al, 1991; Kulkarni et al., 1996).

De acordo com Kebabian et al. (1979) e Marinho et al. (1998) ainda é incerto como os receptores dopaminérgicos, D₁ e D₂, medeiam diferentes funções no SNC. Foi visto que agonistas dos receptores D₂, mas não de D₁, apresentam atividade anticonvulsivante em convulsões induzidas por eletrochoque e/ou por pentilenotetrazol em roedores (Loscher et al., 1986). Assim, acredita-se que a estimulação dos receptores D₁ pode reduzir o limiar da atividade convulsiva.

Barone e colaboradores (1990a) determinaram que, agonistas D₁, induzem atividade convulsiva generalizada, em um processo dose dependente. Assim, quanto maiores as doses de agonistas dopaminérgicos D₁ maior seria a propagação das convulsões. Observaram também que o aumento da dose provocava a instalação de forma mais rápida do estado epiléptico em ratos após o tratamento com pilocarpina em altas doses, portanto, quanto maior a dose de agonistas dopaminérgicos D₁, menor seria a latência das convulsões e o tempo necessário para o estabelecimento do estado epiléptico.

A estimulação de receptores D_1 , mas não de D_2 , desenvolvem comportamentos convulsivos em ratos tratados com pilocarpina, e o bloqueio das convulsões motoras límbicas pode ser feito através do uso de antagonistas do receptor D_1 (Barone et al., 1990b; Al-Tajir et al., 1991a e b). De acordo com os resultados encontrados por Warter e colaboradores (1988) sugere-se que os receptores D_1 podem controlar a propagação das descargas epilépticas através da modulação da liberação de GABA pela substância nigraestriatal.

Através dos dados da literatura observa-se que a ativação do sistema colinérgico pode induzir de maneira direta a ativação do sistema dopaminérgico no processo convulsivo, ocasionando ações excitatórias e inibitórias mediante os receptores D_1 e D_2 , respectivamente (Al-Tajir et al., 1990c), e ainda pode influenciar de forma indireta através dos receptores D_1 a liberação do neurotransmissor GABA, podendo alterar os seus efeitos inibitórios (Lousher and Czuczwar, 1986; Loup et al., 1999).

Barone e colaboradores (1990a) determinaram, também, que D_1 após ser ativado reduz o limiar da atividade convulsiva induzida pela pilocarpina. Este efeito pode ser prevenido através do bloqueio dos receptores D_1 . Portanto, acredita-se que os receptores D_1 podem estar localizados em estruturas cerebrais responsáveis pelo controle da propagação das convulsões.

Nossos resultados mostraram que há uma possível participação dos receptores D_1 na propagação das convulsões, pois foi vista uma supersensibilidade dos receptores durante os dois períodos de observação nos animais convulsivos. Evidências indicam que a substância nigra é a principal estrutura cerebral envolvida na propagação e expressão das convulsões motoras (Lousher and Czuczwar, 1986). Foi observado que microinjeções de agonistas GABA reduzem as convulsões em modelos de

epilepsia, indicando que as projeções nigroestriatais GABA-érgicas inibem a propagação da atividade epiléptica (Loup et al., 1999).

A propagação da epilepsia focal pode ser inibida pela liberação de GABA, de fato doenças que ocasionam lesões dos neurônios nigroestriatais podem induzir convulsões (Turski et al., 1987). A substância negra é rica em receptores dopaminérgicos dos subtipos D₁ e D₂, assim, com o uso de antagonistas D₁ e agonistas D₂, poderia se tentar reduzir ou inibir a propagação da convulsão.

O modelo de epilepsia induzido por pilocarpina é bastante utilizado para se estudar a propagação da atividade epiléptica (Turski et al., 1983). A pilocarpina em alta dose produz convulsões, estado epiléptico e morte de uma grande parte dos animais, no entanto, no período de 1 h de observação não houve morte dos animais, possivelmente devido à falta de tempo suficiente para ativação completa e/ou propagação das convulsões de forma generalizada.

Estudos envolvendo o processo de ativação dos receptores colinérgicos muscarínicos, da enzima acetilcolinesterase e de outros componentes da transmissão colinérgica seriam importantes para esclarecer a participação desse sistema de forma direta ou indireta através interação com outros sistemas de neurotransmissão envolvidos na epilepsia, uma vez que já se sabe que o sistema colinérgico pode ser o responsável pela ativação das convulsões.

ESTUDOS DA DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DAS MONOAMINAS (DA e 5-HT) E SEUS METABÓLITOS (DOPAC, HVA e 5-HIAA)

O efeito da pilocarpina em alta dose, sobre os níveis das monoaminas DA, 5-HT, e seus metabólitos DOPAC, HVA e 5-HIAA, respectivamente, foi estudado em corpo estriado de ratas com 2 meses de idade.

Nossos resultados sugerem que as convulsões são ativadas pelo sistema colinérgico (Cardone et al., 1994), através da administração da pilocarpina em alta dose e isto tem sido confirmado pela literatura vigente (Turski et al., 1983a, Marinho et al., 1997;1998). Entretanto, vários sistemas de neurotransmissores, tais como: dopaminérgico, serotoninérgico, glutamatérgico, estão envolvidos na instalação e/ou propagação e manutenção das convulsões estabelecidas neste modelo de epilepsia. A dependência entre esses sistemas parece ser difícil de se mensurar, sendo esta, uma limitação dos nossos estudos para se esclarecer os mecanismos envolvidos na atividade epiléptica.

No presente trabalho, diferenças significativas no conteúdo das monoaminas foram evidenciadas no corpo estriado de ratas durante o desenvolvimento do estado epiléptico depois da indução de danos cerebrais em ratas por pilocarpina na dose de 400mg/Kg.

Houve uma diminuição nas concentrações dos neurotransmissores, DA e 5-HT, durante o estado epiléptico em ratos adultos sacrificados após 1 e 24 h de observação. Esses resultados sugerem que pode ter ocorrido um aumento na taxa de metabolização das monoaminas durante o estado epiléptico, e/ou somente uma diminuição na sua taxa de liberação.

A participação do sistema dopaminérgico na epileptogênese tem sido geralmente negligenciada, por que a DA não tem efeito no desenvolvimento de *kindling*, fenômeno em que a aplicação focal repetida de estímulos elétricos ou químicos, inicialmente subconvulsivos, resulta em intensas crises parciais e generalizadas (Goddard, 1967). Entretanto, o nível de DA é alterado durante as convulsões de origem genética (Jope et al., 1986). Por outro lado, agonistas dopaminérgicos como a apomorfina não induzem convulsões em camundongos (Anlezark and Meldrun, 1975).

Nenhuma alteração foi vista na taxa de metabolização da DA após 1 e 24h da fase aguda do processo convulsivo, no entanto, uma diminuição da concentração da DA nas mesmas condições de observação foi detectada sugerindo possivelmente, uma diminuição na taxa de síntese e/ou liberação da dopamina em corpo estriado de ratas convulsivas.

Por sua vez, a diminuição simultânea em nível de 5-HT e na taxa de metabolização detectada durante a fase aguda do processo convulsivo nas ratas sacrificadas após 24h possibilita também sugerir que ocorra uma diminuição na taxa de síntese e/ou liberação de serotonina em corpo estriado de ratas convulsivas, mas, é importante salientar que na primeira hora da convulsão ocorreu uma diminuição na concentração da 5-HT e um aumento da taxa de metabolização. Este fato pode justificar a necessidade de um maior período de tempo para uma interação entre os sistemas colinérgico e serotoninérgico, uma vez que os efeitos inibitórios na concentração e metabolização da 5-HT são mais proeminentes nos ratos convulsivos sacrificados após 24 h.

Durante a fase aguda das convulsões a concentração de DA e 5-HT diminuíram, sugerindo-se, assim, que mudanças nessas monoaminas poderiam ocorrer durante esta fase do modelo de epilepsia com pilocarpina,

sem descartar a hipótese de sua alteração também nos períodos silencioso e crônico, já que não foram ainda estudados nas mesmas condições.

El-Etri e colaboradores (1993) estudando também as convulsões em sua fase aguda, observaram que na primeira hora não havia alteração na concentração de DA e 5-HT, mas durante as 24h de observação, os autores determinaram um aumento tanto na concentração de DA quanto de 5-HT no *locus coeruleus* de ratos adultos convulsivos.

As ativações dos receptores serotoninérgicos do tipo 5-HT₁ podem produzir inibição da estimulação colinérgica (Peroutka, 1988). Logo, como a pilocarpina produz intensa estimulação colinérgica, a diminuição da 5-HT no corpo estriado de ratas convulsivas dificultaria a estimulação dos receptores 5-HT₁, sugerindo que a redução na concentração da serotonina facilitaria a manutenção das convulsões.

Conhece-se, que no modelo de *kindling* de epilepsia, a concentração de norepinefrina (NE) e da serotonina (5-HT) em hipocampo, diminui facilitando o desenvolvimento das convulsões em ratos (Cavalheiro et al, 1991; El-Etri et al., 1999). Nesse modelo um marcado incremento dos metabólitos da dopamina (DA) e 5-HT foi observado (El-Etri et al., 1993), sugerindo um aumento na taxa de produção dos neurônios monoaminérgicos imediatamente após a injeção sistêmica de ácido cáinico (KA) (Albala et., 1984).

O decréscimo nos níveis de norepinefrina (NE) e 5-HT foram descritos na epilepsia de origem genética em ratos (Jope et al., 1991). Estudos mostram que a atividade da enzima tirosina hidroxilase, a etapa limitante da síntese de NE, é incrementada durante as convulsões de origem genética, sugerindo a presença de um mecanismo compensatório para prevenir ou suprimir as convulsões. O déficit da atividade da enzima precede as convulsões, sendo a atividade anormalmente alta após as

convulsões. Os dados confirmam a idéia de que a relação inversa entre as convulsões e os níveis de monoaminas pode ser de origem genética (Jope et al., 1989).

Já se determinou que as concentrações de noradrenalina e de seu metabólito (5-HIAA) aumentam em todas as fases da epilepsia. A concentração da NE durante o período silencioso decresce e a sua taxa de metabolização foi semelhante ao dos controles (Cavalheiro et al., 1994). Infelizmente, não foi possível, nos nossos experimentos de determinação de neurotransmissores na situação de ratos convulsivos, detectar os níveis de NE.

Os dados de Cavalheiro e colaboradores, (1994), mostraram que há um aumento no conteúdo de DA, no hipocampo durante os períodos agudo, silencioso e crônico do processo convulsivo. Simultaneamente a metabolização da DA mensurada pela relação (DOPAC/DA) foi diminuída, indicando redução da metabolização da DA, durante estes três períodos.

Nossos dados em corpo estriado de ratas adultas mostraram uma diminuição na concentração e nenhuma alteração na taxa de metabolização da DA durante as convulsões e estado epiléptico (período agudo) nos ratos observados por 1 e 24h. Portanto, com relação aos achados obtidos para hipocampo por Cavalheiro et al. (1994) nossos dados são contraditórios para a área cerebral estudada, corpo estriado, mostrando uma diferente participação da DA no corpo estriado durante a fase aguda do processo convulsivo.

Cavalheiro e colaboradores (1994) observaram também um incremento na concentração hipocampal de 5-HT e na sua taxa de metabolização, mensurada através da taxa (5-HIAA/5-HT), durante o estado epiléptico. Nossos estudos demonstraram que no corpo estriado de ratas adultas, há uma redução na concentração de 5-HT em ambos os

períodos de observação, mostrando que a serotonina pode estar participando da propagação e manutenção das convulsões induzidas por pilocarpina.

Inúmeros estudos indicam claramente a importância das monoaminas e aminoácidos no fenômeno epilético, os mecanismos de como estes neurotransmissores influenciam as convulsões ainda não foram estabelecidos e são necessários mais estudos para o esclarecimento da participação das monoaminas e seus metabólitos nas convulsões.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nossos achados indicam que a ativação do sistema muscarínico está claramente envolvida nas alterações comportamentais e nas lesões cerebrais observadas, desde que a pilocarpina (400mg/Kg) em dose elevada produziu alterações do comportamento normal dos ratos e induziu danos cerebrais com alta intensidade no corpo estriado e em outras áreas cerebrais.

Com relação à atividade acetilcolinesterásica em corpo estriado de ratas adultas, foi detectada uma diminuição acentuada na atividade enzimática *in vitro* na primeira hora da fase aguda do processo convulsivo, enquanto que, nas 24 horas seguintes da mesma fase, houve uma tendência à normalização da atividade.

É possível que a *downregulation* dos receptores muscarínicos (M_1+M_2), vista no corpo estriado, tenha um papel nas lesões, pois, esse efeito foi evidente no grupo com pilocarpina que apresentou alterações em algumas estruturas cerebrais. Talvez ocorra uma interferência da pilocarpina direta e/ou indireta sobre a interação das vias colinérgicas e dopaminérgicas, no entanto, pouco se conhece sobre essa interação.

Os efeitos diretos da pilocarpina sobre a densidade de receptores colinérgicos (M_1+M_2) e dopaminérgicos (D_1 e D_2) não determinaram claramente o mecanismo do processo convulsivo. Ainda, não permitem uma afirmação concreta sobre a relação direta ou indireta ente os sistemas colinérgico e dopaminérgico.

Estudos utilizando um ligante específico para marcar receptores colinérgicos do tipo M_1 , como a pirenzepina, teriam sido convenientes. Maslanski et al. (1994) sugeriram um papel desses receptores M_1 nas

convulsões induzidas por pilocarpina (400 mg/Kg), e que os receptores M_2 seriam importantes na modulação da atividade neuronal. Estudos bioquímicos mostraram que os receptores M_1 estimulam fortemente a fosfolipase C (PLC) e elevam as concentrações de cálcio intracelular, enquanto, que os receptores M_2 fracamente estimulam a PLC e respostas mediadas por cálcio (Felder et al., 1990; Sandmann et al., 1991). Sendo assim, parece importante à realização de um estudo dos receptores colinérgicos muscarínicos M_1 e M_2 , de forma independente, objetivando conhecer melhor as suas ações no quadro epiléptico, como também os outros sistemas afetados que podem contribuir para as alterações comportamentais, histopatológicas e neuroquímicas no corpo estriado de ratos convulsivos.

Vários autores sugerem que o tratamento com doses elevadas de pilocarpina produz alterações comportamentais, eletroencefalográficas, metabólicas e neuropatológicas (Clifford et al., 1987; Persinger et al., 1988; Piredda & Galé; 1985; Paruszewski et al., 2001), sugerindo que o início, a propagação das convulsões e a atividade neurotóxica dependem pelo menos dos sistemas colinérgico e dopaminérgico nesse modelo de convulsão. Nossos estudos de detecção eletroquímica das monoaminas e seus metabólitos e dados da literatura sugerem também a participação do sistema serotoninérgico na propagação e/ou manutenção das convulsões. Embora sejam necessários estudos mais detalhados e aprofundados para a obtenção de dados conclusivos da participação isolada, do envolvimento e/ou da interação dos sistemas de neurotransmissores no mecanismo das convulsões.

Nossos resultados apontam para efeitos da pilocarpina sobre a ativação dos receptores muscarínicos. Uma ação da pilocarpina também

sobre a constante de dissociação do ligante aos receptores dopaminérgicos D_1 e D_2 estriatais pode ser implicada na convulsão e no estado epiléptico.

A identificação de alvos intracelulares para as ações da pilocarpina poderá fornecer subsídios para o desenvolvimento de novos e melhores agentes terapêuticos da epilepsia humana, como também avaliar os benefícios e efeitos colaterais dos tratamentos já existentes e, em consonância com os avanços da genética molecular, poderá facilitar o entendimento dos fatores que facilitam o aparecimento das convulsões.

CONCLUSÕES

1. A pilocarpina produz alterações comportamentais, tais como: sinais colinérgicos periféricos, movimentos estereotipados, tremores, convulsão, estado epiléptico e morte. Apresentando um aumento no percentual de tremores, convulsão, estado epiléptico e mortalidade com relação ao período de observação.
2. A pilocarpina induziu lesões em áreas cerebrais, como: hipocampo, córtex, substância nigra e talámo. E o corpo estriado também sofreu degeneração neuronal, gliose e vacuolização, apenas no período de 24h da fase aguda.
3. A pilocarpina altera a atividade acetilcolinesterásica no corpo estriado de ratas adultas apenas de forma aguda e drástica. Essa alteração parece ocorrer devido a uma menor síntese protéica ou uma modulação inibitória da atividade enzimática.
4. É possível que a *downregulation* dos receptores muscarínicos (M_1+M_2) no corpo estriado dos animais adultos participe no processo das lesões cerebrais, já que esse efeito foi observado nos animais que apresentaram lesões após tratamento com P400. Em adição, o tratamento não mostrou alteração na densidade dos receptores dopaminérgicos D_1 e D_2 , aumentando apenas a afinidade pelo ligante no corpo estriado. Talvez haja uma relação direta e/ou indireta dos sistemas colinérgicos e dopaminérgicos.

5. Foi vista uma redução na concentração de serotonina no corpo estriado dos animais tratados com P400, sugerindo uma participação direta e/ou indireta entre os sistemas colinérgico e serotoninérgico, possivelmente com o intuito de reduzir ou cessar as ações anticonvulsivantes mediadas pela 5-HT através dos receptores serotoninérgicos 5-HT₁, facilitando a manutenção das convulsões.

6. No modelo colinérgico com pilocarpina 400mg/Kg, sugere-se que a ativação do receptor muscarínico pode estar envolvida na origem da convulsão, e a propagação poderia ocorrer devido a um aumento na afinidade dos receptores dopaminérgicos D₁ e uma possível diminuição na concentração da serotonina, e as alterações que ocorrem em diferentes áreas cerebrais durante a fase aguda do processo convulsivo.

7. Observou-se os efeitos diretos da pilocarpina (400mg/Kg) em nível de concentrações das monoaminas e seus metabólitos, principalmente na dopamina e serotonina. Isto sugere, também, a participação das transmissões dopaminérgicas e serotoninérgicas nas convulsões. A concentração do HVA não se alterou de forma significativa na primeira hora, no entanto, no decorrer das primeiras 24h da fase aguda, houve uma diminuição expressiva da sua concentração. Por sua vez, a concentração do 5-HIAA aumentou na primeira hora e se normalizou durante as 24h de observação após o tratamento com P400.

8. O conhecimento da fisiopatologia das convulsões, envolvendo a identificação dos mecanismos de instalação, propagação, manutenção, as áreas cerebrais e sistemas envolvidos durante o processo convulsivo poderão fornecer subsídios para o desenvolvimento de agentes terapêuticos mais eficazes e facilitar o conhecimento de fatores intrínsecos e extrínsecos responsáveis pelo desencadeamento da epilepsia.

9. Devido à complexidade do processo convulsivo, o tratamento da epilepsia necessita de estratégias que contemplem a multiplicidade de neurotransmissores envolvidos e a participação de mais de uma droga poderá ser necessária.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBALA, B.G., MOSHE, S.L., OKADA, R. Kainic acid-induced seizures: a developmental study. **Dev. Brain Res.**, v. 13, p. 139-148, 1984.

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

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., CHANDLER, C.J., STARR, B.S. Opposing effects of dopamine D₁ e 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. 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. Anticonvulsant effect of striatal dopamine D₂ receptor stimulation: dependence on cortical circuits. **Neuroscience**, v. 43, p. 51-57, 1991b.

AMINOF, M.J., SIMON, R.P. Status epilepticus. Causes, clinical features and consequences in 98 patients. **Amer J Med**, p. 657-666, 1980.

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.

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

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.

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.

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.

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

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

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

BEN-ARI, Y., TREMBLAY, E., RICHE, D., GHILINI, G., NAQUET, R. Electrographic, clinical and pathological alterations following systemic administration of kainic acid, bicuculdeoxyglucose or pentylenetetrazole: metabolite mapping using the deoxyglucose method with special reference to the pathology of epilepsy. **Neuroscience**, v. 6, p. 1361-1391, 1981.

BERRIDGE, M. J. Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. **Biochem. J.**, v. 220, p. 345-360, 1984.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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.

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

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

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

CHIU, E., AMES, D. Functional psychiatric disorders of the elderly. New York, Cambridge University Press, 1994.

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

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.

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

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

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

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

COOPER, J.R., BLOOM, F.E., ROTH, R.H. **The Biochemical Basis of Neuropharmacology**, 6th ed. New York: Oxford University Press. 1991.

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

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

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

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.

DeLORENZO, 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 Ca^{2+} -calmodulin-dependent kinase II activity in the rat. **Neuroscience**, v. 95, n. 3, p. 735-743, 2000.

DeLORENZO, R.J., CHURN, S.B., KOCHAN, L.D. Chronic inhibition of Ca^{2+} /Calmodulin Kinase II activity in the pilocarpine model of epilepsy. **Brain Research**, v. 875, p. 66-77, June 2000.

DeLORENZO, 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.

DISALVER, S.C. Lithium effects on muscarinic receptor binding parameters: a relationship to therapeutic efficacy. **Biol Psychiatry**, v. 19, p.1551-1565, 1984.

DOMBROWSKI, H.G., JERKINS, A.A., KAUFFMANN, F.C. Muscarinic receptor *binding* and oxidative activities in the adult rat superior cervical ganglion: effects of 6-hydroxydopamine and nerve growth factor. **Journal Neuroscience**, v. 3, n. 10, p. 1963-1970, 1983.

EHLERT, F.J., ROESKE, W.R., YAMAMURA, H.I. Molecular biology and brain distribution of subtypes of the muscarinic receptor. *In*: BLOOM, F.E., KUPFER, D.J. **Psychopharmacology**, New York: Raven Press, Ltda., 1995. Cap 10, p. 111-124.

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

EL-ETRI, M.M., ENNIS, M., GRIFFS, E.R., SHIPLEY, M.T. Evidence for cholinergic regulation of basal norepinephrine release in the rat olfactory bulb. **Neuroscience**, v. 93, n. 2, p. 611-617, 1999.

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

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

ERSPAMER, V. Serotonin distribution in tissues and fluids. In, *Availability, Localization and Disposition*. v. 1, Spectrum Publications, New York, p. 150-179, 1978d.

FELDER, C.C., DIETER, P., KINSELLA, J., TAMURA, K., KANTERMAN, R.Y.; AXELROD, J.A. transfected M₅ muscarinic acetylcholine receptor stimulates phospholipase A₂ by inducing both calcium influx and activation of protein kinase C. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 255, p. 1140-1147, 1990.

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

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

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

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

FRAGOSO-VELOZ, J., TAPIA, R. NMDA receptor antagonists protect against seizures and wet-dog shakes induced by 4-aminopyridine. **European Journal Pharmacology**, v. 221, p. 275-80, 1992.

FUJIKAWA, D.G., DANIELS, A.H., KIM, J.S. The competitive NMDA receptor antagonist CGP 40116 protects against status epilepticus-induced neuronal damage. **Epilepsy Research**, v. 17, p. 207-219, 1994.

FUJIKAWA, D.G. Neuroprotective effect of ketamine administered after status epilepticus onset. **Epilepsia**, v. 36, p. 186-195, 1995.

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

GAYTON, AC., HALL, JE. Tratado de fisiologia médica. 9 ed., Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 687-691, 1997.

GODDARD, G.V. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. **Nature**, v. 214, p. 1020-1023, 1967.

GOTTBERG, E.L., GRONDIM, READER, T.A. Acute effects of lithium on catecholamines, serotonin and their major metabolites in discrete brain regions. **J Neurosci Res**, v.22, p.338-345, 1989b.

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

HIRAMATSU, M., FUJIMOTO, N., MORI, A. Catecholamine level in cerebrospinal fluid of epileptics. **Neurochemical Research**, v. 7, p. 1299-1305, 1982.

HIRSH, E., BARAN, T.Z., SNEAD III, O.C. Ontogenic study of lithium-pilocarpine induced status epilepticus in rats. **Brain Research**, v. 583, p. 120-126, February 1992.

HIRVONEN, M. R., PALJARVI, L., SAVOLAINEN, K.M. Sustained effects of pilocarpine-induced convulsions on brain inositol and inositol monophosphate levels and brain morphology in young old male rats. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 122, n. 5, p. 290-299, May 1993.

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

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

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.

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, 1979b.

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

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

JOPE, R.S., MILLER, M.J., FERRARO, T.N., HARE, T.A. Chronic lithium treatment and status epilepticus induced by lithium and pilocarpine cause selective changes of amino acid concentration in rat brain regions. **Neurochemical Research**, v. 14, n. 9, p. 829-834, June 1989.

JOPE, R.S., GU, X. Seizures increase acetylcholine and choline concentrations in rat brain regions. **Neurochemical**, v. 16, p. 1219-1226, 1991.

JOPE, R.S., SONG, L., KOLASA, K. Inositol trisphosphate, cyclic AMP, and cyclic GMP in rat brain regions after lithium and seizures. **Biol. Psychiatry**, v. 31, p. 505-514, 1992.

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.

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

KIMURA, H., KANEKO, Y., WADA, J.A. Catecholaminergic and cholinergic systems and amygdaloid kindling. Kindling 2 (ed. Wada J.A.): p. 265-287. Raven Press. New York., 1981.

KING, G.A., BURNHAM, W.M. Effects of d-amphetamine and apomorphine in a new animal model of petit mal epilepsy. **Psychopharmacology**, v. 69, p. 281-285, 1980.

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

KULKARNI, S.K., GEORGE, B. Lithium-pilocarpine neurotoxicity: a potential model of status epilepticus. **Meth Fin Exp.Clin Pharmacol.**, v. 17, n. 8, p. 551-567, 1995.

KULKARNI, S.K., GEORGE, B. Protective effects of GABAergic drugs and other anticonvulsants in lithium-pilocarpine-induced status epilepticus. **Meth Fin Exp.Clin Pharmacol.**, v. 18, n. 5, p. 335-340, 1996.

LABANDEIRA-GARCIA, J.L., TOBIO, J.P., GUERRA, M.J. Comparison between normal developing striatum and developing striatal grafts using drug-induced Fos expression and neuron-specific enolase immunohistochemistry. *Neuroscience*, v. 60, n. 2, p. 399-415, 1994.

LEFKOWITZ, 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.

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

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

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, May 2001.

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

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

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.

LOTHMAN, E.W., COLLINS, R.C. Kainic acid induced limbic seizures: metabolic, behavioural, electroencephalographic and neuropathological correlates. **Brain Research**, v. 218, p. 299-318, 1981.

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

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

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.

MASLANSKI, J.A., POWELT, R., DEIRMENGIANT, C., PATELT, J. Assessment of the muscarinic receptor subtypes involved in pilocarpine-induced seizures in mice. **Neuroscience Letters**, v. 168, p. 225-228, 1994.

MASSIEU, L., RIVERA, A., TAPIA, R. Convulsions and inhibition of glutamate decarboxylase by pyridoxal phosphate- γ -glutamyl hydrazone in the developing rat. **Neurochemical Research**, v. 19, n.2, p. 183-187, 1994.

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

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

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.

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

MICHOTTE, Y., EBINGER, G., MANIL, J., KHAN, G.M., SMOLDERS, I. NMDA receptor-mediated pilocarpine-induced seizures: characterization in freely moving rats by microdialysis. **British Journal of Pharmacology**, v. 121, p. 1171-1179, 1997.

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.

MORI, A., HIRAMATSU, M., NAMBA, S., NISHIMOTO, A., OHMOTO, T., MAYANAGI, Y., ASAKURA, T. Decreased dopamine level in the epileptic focus. **Res. Commun. Chem. Path. Pharmac.**, v. 56, p. 157 - 164, 1987.

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.

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

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

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

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.

NEHLIG, A., MARESCAUX, C., FERRANDON, A., ANDRÉ, V. Vigabatrin protects against hippocampal damage but is not antiepileptogenic in the lithium-pilocarpine model of temporal epilepsy. **Epilepsy Research**, v. 47, p. 99-117, July 2001.

OHNO, M., YAMAMOTO, T., WATANABE, S. Blockade of hippocampal nicotinic receptors impairs working memory but not reference memory in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 45, p. 89-93, 1993.

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

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

ORMANDY, G.C., JOPE, R.S., SNEAD III, O.C. Anticonvulsant actions of MK-801 on the lithium-pilocarpine model of status epilepticus in rats. **Experimental Neurology**, v. 106, p. 172-180, 1989.

ORMANDY, G.C., JOPE, R.S. Pertussis toxin potentiates seizures induced by pilocarpine, kainic acid and N-methyl-D-aspartate. **Brain Research**, v. 553, p. 51-57, 1991a.

ORMANDY, G.C., SONG, L., JOPE, R.S. Analysis of the convulsant-potentiating effects of lithium in rats. **Experimental Neurology**, v. 111, p. 356-361, 1991b.

PARUSZEWSKI, R., STRUPISKA, M., STABLES, J.P., SWIADER, M., CZUCZWAR, S., KLEIRONK, Z., TURSKI, W. Amino acid derivatives with anticonvulsant activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 5, p. 629-631, May 2001.

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

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

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

PAZDERNIK, T.L., CROSS, R.S., GIESLER, M., SAMSON, F.E., NELSON, S.R. Changes in local cerebral glucose utilization induced by convulsants. *Neuroscience*, v. 14, p. 823-835, 1985.

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

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

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

PERSINGER, M.A., MAKAREC, K., BRADLEY, J.C. Characteristics of limbic seizures evoked by peripheral injections of lithium and pilocarpine. *Physiol. Behav.*, v. 44, p. 27-37, 1988.

PERSINGER, M.A., BUREAU, Y.R.J., KOSTAKOS, M., PEREDERY, FALTER, H. Behaviors of rats with insidious multifocal brain damage induced by seizures following single peripheral injections of lithium and pilocarpine. *Phys. & Behavior*, v. 53, p. 849-866, Dec. 1993.

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

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

QUESNEY, L.F. Dopamine and generalized photosensitive epilepsy. *In*: Morselli, P.L., Lloyd, K.G., Loscher, W., Meldrum, B.S., Reynolds E.H., Eds. Neurotransmitters, seizure and epilepsy. pp. 263-274, Raven Press, New York, 1981.

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.

SAFER, D.J., ALLEN, R.P. The central effects of scopolamine in man. **Biol. Psychiatry**, v. 3, p. 347-355, 1971.

SAMPLES, J.R., JANOWSKY, D.S., PECHINICK, D.S., JUDD, L.L. Lethal effects of physostigmine plus lithium in rats. **Psychopharmacology**, v. 52, p.307-309, 1977.

SANDMAN, J., PERALTA, E.G., WURTMANN, R.J. Coupling of transfected muscarinic acetylcholine receptor subtypes to phospholipase D. **Biol. Chem.**, v. 266, p. 6031-6034, 1991.

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

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

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

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

SEGARRA, A.C., MEJÍAS-APONTE, C.A., JIMÉNES-RIVERA, C.A. Sex differences in models of temporal lobe epilepsy: role of testosterone. **Brain Research**, v. 944, p. 210-218, February 2002.

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

SMITH, B.N., SHIBLEY, H. Pilocarpine-induced status epilepticus results in mossy fiber sprouting and spontaneous seizures in C57BL/6 and CD-1 mice. **Epilepsy Research**, v. 49, p. 109-120, January 2002.

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

SOKOLOFF, P., GIROS, B., SCHWARTZ, J.C. Novel dopamine receptors half a decade later. **Tips**, v. 16, p. 270-275, 1995.

SOKOLOFF, P., GIROSM B., MARTRESM M.P., BOUTHENET, M.L., SCHWARTZ, J.C., WATTS, V.J., LAWLER, C.P., GONZALES, A.J., ZHOU, Q.Y., CIVELLI, O., NICHOLS. D.E., MAILMAN, R.B. Spare receptors and intrinsic activity: studies with D₁ dopamine receptor agonists. **Synapse**, v. 21, p. 177-187. 1995.

SPREAFICO, R., SILVA, A.V., SANABRIA, E.R.G., CAVALHEIRO, E.A. Alterations of the neocortical GABAergic system in the pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: Neuronal damage and immunocytochemical changes in chronic epileptic rats. **Brain Research Bulletin**, v. 6487, n. 0, p. 1-5, April 2002.

STARR, M.S., STARR, B.S. Paradoxal facilitation of pilocarpine-induced seizures in the mouse by MK-801 and the nitric oxide synthesis inhibitor L-NAME. **Pharmacol. Biochem. and Behavior**, v. 45, p. 321-325, 1993.

STEPHEN, T.M., CORCORAN, M.E. Catecholamines and convulsions. **Brain Research**, v. 170, p. 497-507, 1979.

TUCEK, S. Regulation of acetylcholine synthesis in the brain. **Journal Neurochemical**, v. 44, p. 11, 1985.

TURSKI, W.A., CAVALHEIRO, E.A., SCHWARTZ, M., CZUCZWAR, S.J., KLEINROK, Z., TURSKI, L. Limbic seizures produced by

pilocarpine in rats: a behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav. Brain Res.**, v. 9, p. 315-335, 1983a.

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

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

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

TURSKI, 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, 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, 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., 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., MELDRUM, B.S., CAVALHEIRO, E.A., CALDERAZZO-FILHO, L.S., BORTTOLOTO, 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, L., CAVALHEIRO, E.A., BORTOLOTO, Z.A., IKONOMIDOU-TURSKI, C., KLEINROK, Z., TURSKY, W.A. Dopamine-sensitive anticonvulsant site in the rat striatum. **Journal Neuroscience**, v. 8, p. 4027-4037, 1988.

TURSKI, L., IKONOMIDOU, C., TURSKI, W.A., BORTOLOTO, 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.

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.

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.

WASTERLAIN, C.G., JONEC, V. Chemical kindling by muscarinic amygdaloid stimulation in the rat. **Brain Research**, v. 271, p. 311-335, 1983a.

WHITE, H.S., SKEEN, G.A., EDWARDS, J.A. Pharmacological regulation of astrocytic calcium channels: implications for the treatment of seizure disorders. **Prog Brain Res.**, v. 94, p. 77-87, 1992.

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

ZOUHAR, A., MARES, P., LISKOVA-BERNASDOVA, K., MUDROCHOVA, M. Motor and electrocorticographic epileptic activity induced by bicuculline in developing rats. **Epilepsia**, v. 30, p. 501-510, 1989.