

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

PAULINE MARIA RANGEL

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LOVASTATINA SOBRE
A FORMAÇÃO HIPOCAMPAL DE ANIMAIS SUBMETIDOS
AO MODELO DE EPILEPSIA INDUZIDO POR
PILOCARPINA**

Mogi das Cruzes, SP

2005

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PAULINE MARIA RANGEL

**EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE LOVASTATINA SOBRE
A FORMAÇÃO HIPOCAMPAL DE ANIMAIS SUBMETIDOS
AO MODELO DE EPILEPSIA INDUZIDO POR
PILOCARPINA**

Dissertação de Mestrado apresentada à comissão de pós-graduação do mestrado em Engenharia Biomédica da Universidade de Mogi das Cruzes, para a obtenção do título de mestre em Engenharia Biomédica.

Prof. Orientador: Dr. Fulvio Alexandre Scorza

Mogi das Cruzes, SP
2005

DEDICATÓRIA

À Deus, a quem louvarei incessantemente pelas maravilhas feitas em mim, pois ainda antes que eu existisse, já me conhecia, me consagrou e traçou todo o caminho da minha vida.

À meus pais José Geraldo e Gláucia, dádivas de Deus, por me amarem e apoiarem nas decisões, por acreditarem e investirem em meus estudos, me formando moralmente, espiritualmente e profissionalmente.

À meus irmãos Tiago e Mateus, pelo amor, carinho e atenção dedicada.

À vovó Apenina, mesmo sem entender a dimensão da ciência, ora e torce por meu êxito.

Ao vovô Piluca (*in memmoriám*), exemplo de homem, de trabalho árduo, do qual os frutos puderam fazer dos meus estudos realidade! Saudade eterna.....

À vovó Nina, 91 anos, que em sua idade avançada, me ensina a vencer, mostrando que o tempo nos faz cada vez mais fortes.

Ao vovô Antônio (*in memmoriám*), mesmo sem conhecê-lo, mas sabendo de sua fé, creio que intercede por mim!

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Fulvio Alexandre Scorza, que orientou este trabalho, por todo o inegável conhecimento e domínio da ciência, pela dedicação, paciência e ensinamento para me formar profissionalmente, exemplo de pesquisador e ser humano íntegro. Serei eternamente grata!

Aos coordenadores do curso de Mestrado em Engenharia Biomédica da UMC, Prof^a Dr^a Annie France Frère Slaets e Prof^o Dr Jean Jacques Bonvent, pelo apoio, carinho e dedicação.

Aos professores: Ricardo Mario Arida, Marly de Albuquerque, Roberta Monterazzo Cysneiros, pelo apoio técnico-ciêntífico.

Ao Professor Dr. Éspér A. Cavalheiro, chefe do Departamento de Neurologia Experimental da UNIFESP/EPM, por apoiar e permitir a realização dos experimentos.

Aos professores do NPT: Marcelo, Márcia, Paulo, Henrique, Saulo, Magali, Fumagalli, Kaline, Heloisa, Miriam, pela dedicação ao ensino.

À técnica de histologia do Departamento de Neurologia Experimental da UNIFESP/EPM, Hilda S. Reis, pela paciência e dedicação à este trabalho.

Ao amigo Rodrigo de Maio Almeida, exemplo a ser seguido, homem culto, dedicado, sensato, fiel, todos os adjetivos seriam poucos para expressar minha admiração por você. Obrigado por tudo!

À amiga Juliana Costa Ferreira, companheira, prestativa, amiga leal que nunca mediu esforços para me ajudar e esteve desde o início sempre presente. Obrigado Jú!

Aos amigos do Laboratório de Neurociência (LANEC): Leandro, Jaque, Mônica, Sérgio G., Cássia, Márcio, Aninha, Carla, Dri pelo apoio e carinho, em especial ao Diego Basile Colugnatti pela colaboração neste trabalho.

Aos amigos do NPT: Rodrigo, Talie, Rosane, Ronald, Fernandinho, Maurício, Sérgio, Kleber, Pimenta, Ale, Jack, Bi, Dani, Carlinhos, Falquinho, Gabi, Sandrinho, Helinho, Terigi, Thiago, Rafa, Pedro, Andréia, Ivan, Barata, Júlio, Celso, Cláudio, Vivi, Paula, Marta, Marcelo, pelo apoio, companheirismo e animadíssima convivência!

Aos alunos e funcionários do Departamento de Neurologia Experimental da UNIFESP/EPM, pelo carinho e atenção.

Aos funcionários, estagiários e técnicos do NPT: Fabiane, Teresinha, Viviane, Wagner e Débora por serem tão prestativos e tornarem viável o nosso trabalho!

À todos que direta ou indiretamente apoiaram este trabalho.

À FAEP e CNPq pelo apoio financeiro.

Que Deus abençoe a todos!

A autora

***Para conseguir sua maturidade o
homem necessita de um certo
equilíbrio, entre estas três coisas,
talento, educação e experiência.
(Santo Agostinho)***

RESUMO

Rangel, P. M.; Scorza, F. A. **Efeito da administração de lovastatina sobre a formação hipocampal de animais submetidos ao modelo de epilepsia induzido por pilocarpina.** 2005. 40f. Dissertação de Mestrado – Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2005.

Objetivo: O objetivo do nosso estudo foi caracterizar a capacidade da lovastatina em prevenir a perda de neurônios e o brotamento supragranular hipocampal no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina. **Métodos:** Ratos adultos Wistar foram divididos em 4 grupos: (A) ratos controles que não receberam pilocarpina nem lovastatina (n=10); (B) ratos controles que receberam somente lovastatina (n=10); (C) ratos que receberam somente pilocarpina (n=10); (D) ratos que receberam pilocarpina e lovastatina (n=10). Após a administração de pilocarpina (350mg/kg, i.p.), somente ratos que evoluíram para o *status epilepticus* foram incluídos em nosso estudo. A atividade epiléptica foi interrompida com uma injeção de diazepam (10 mg/kg, i.p.) após 4h do início do SE. Os ratos tratados com lovastatina receberam duas doses de 20mg/kg via esofágica, imediatamente e 24 h após o SE. Sete dias após o SE induzido pela pilocarpina, 05 animais de cada grupo foram perfundidos e seus cérebros processados para análise histológica através do método de Nissl. Por outro lado, o restante dos animais foram perfundidos e seus cérebros processados para análise histológica através do método de neo-Timm 60 dias após o SE. **Resultados:** A contagem celular da formação hipocampal mostrou uma significativa perda celular nos animais que receberam pilocarpina e apresentaram SE (CA1= 26.8 ± 13.67 ; CA3= 38.1 ± 7.2 ; hilus= 43.8 ± 3.95) quando comparados com animais pertencentes ao grupo controle (Grupo A: CA1= 53.2 ± 9.63 ; CA3= 63.5 ± 13.35 ; hilus= 59.08 ± 10.24 ; Grupo B: CA1= 74.3 ± 8.16 ; CA3= 70.1 ± 3.83 ; hilus= 70.6 ± 5.10). O número de células neuronais na região CA1 do hipocampo de ratos que apresentaram SE e receberam lovastatina (44.4 ± 17.88) foi estatisticamente maior quando comparado com animais que somente apresentaram SE. Os animais que receberam somente pilocarpina e os que receberam pilocarpina e lovastatina apresentaram brotamento supragranular das fibras musgosas. **Conclusões:** A lovastatina exerce um papel neuroprotetor na atenuação do dano cerebral após o SE, no entanto, não é capaz de prevenir o brotamento supragranular das fibras musgosas.

Palavras-chave: epilepsia, pilocarpina, lovastatina, hipocampo.

ABSTRACT

Rangel, P. M.; Scorza, F. A. **The effect of lovastatin administration on hippocampal formation of rats submitted to pilocarpine model of epilepsy.** 2005. 40f Master Science Thesis – University of Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 2005.

Objective: The aim of our study was to further characterize the capacity of lovastatin to prevent hippocampal neuronal loss and supragranular sprouting of rats submitted to pilocarpine model of epilepsy. **Method:** Adult male Wistar rats were divided into four groups: (A) control rats, received neither pilocarpine nor lovastatin (n=10); (B) control rats, received just lovastatin (n=10); (C) rats that received just pilocarpine (n=10); (D) rats that received pilocarpine and lovastatin (n=10). After pilocarpine injection (350mg/kg, i.p.), only rats that displayed continuous, convulsive seizure activity were included in our study. Seizure activity was monitored behaviorally and terminated with an injection of diazepam (10 mg/kg, i.p.) after 4 h of convulsive SE. The rats treated with lovastatin received two doses of 20mg/kg via an oesophagic probe immediately after and 24 hours after SE. Seven days after pilocarpine-induced SE, 05 animals of each group were perfused and their brains were processed for histological analysis through Nissl method. On the other hand, the rest of animals were perfused and their brains were processed for histological analysis through neo-Timm method 60 days after SE. **Results:** The cell counts in the Nissl-stained sections performed within the hippocampal formation showed a significant cell loss in rats that received pilocarpine and presented SE (CA1= 26.8 ± 13.67 ; CA3= 38.1 ± 7.2 ; hilus= 43.8 ± 3.95) when compared with control group animals (Group A: CA1= 53.2 ± 9.63 ; CA3= 63.5 ± 13.35 ; hilus= 59.08 ± 10.24 ; Group B: CA1= 74.3 ± 8.16 ; CA3= 70.1 ± 3.83 ; hilus= 70.6 ± 5.10). The average neuronal cell number of CA1 subfield of rats that present SE and received lovastatin (44.4 ± 17.88) was statically significant increased when compared with animals that just presented SE. The neo-Timm staining of hippocampal formation has shown suragranular sprouting of the mossy fibers in rats that received just pilocarpine and the rats that received pilocarpine and lovastatin **Conclusions:** Lovastatin exert a neuroprotective role in the attenuation of brain damage after SE, however, is not able to prevent supragranular sprouting.

Key words: epilepsy, pilocarpine, lovastatin, hippocampus

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
1.1 Epilepsia.....	9
1.2 Epilepsia do Lobo Temporal.....	12
1.3 Modelo experimental de epilepsia induzido pela pilocarpina.....	13
1.4 Estatinas.....	14
2 OBJETIVO.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 Animais.....	17
3.2 Substâncias químicas envolvidas.....	17
3.3 Ética dos procedimentos experimentais.....	17
3.4 Modelo de epilepsia induzido pela Pilocarpina.....	17
3.5 Grupos experimentais.....	18
3.6 Preparação da Amostra.....	19
3.7 Método de Nissl.....	19
3.8 Método Timm.....	20
3.9 Contagem Neuronal.....	20
3.10 Análise dos Dados.....	21
4 RESULTADOS.....	22
4.1 Análise Comportamental.....	22
4.2 Análise Qualitativa.....	23
4.3 Análise Quantitativa.....	23
5 DISCUSSÃO.....	28
6 CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
ANEXO A.....	39

1 Introdução

1.1 Epilepsia

Desde os tempos mais remotos a epilepsia tem intrigado a humanidade. O caráter ictal, as manifestações convulsivas, a perda do controle volitivo e o desconhecimento por parte do paciente de todo o ocorrido durante o evento convulsivo suscitavam explicações mágicas. Inicialmente, as explicações das crises epiléticas tiveram como base a possessão do paciente por deuses ou demônios. Essa visão religiosa foi, em parte, responsável pelo estigma e preconceito que os pacientes portadores de epilepsia sofreram e continuam sofrendo nos dias atuais. Só no século XIX, com os trabalhos de Sommer, foi possível caracterizar a relação entre crises convulsivas e lesões localizadas no Sistema Nervoso Central (SNC).

Em função de suas características fisiopatogênicas, as epilepsias acometem os indivíduos independente de aspectos étnicos, climáticos ou regionais. No entanto, em decorrência de sua alta incidência e prevalência, provocam grandes repercussões nos aspectos sócio-econômicos (OSUNTOKUN et al., 1987; LI et al., 1985).

Os estudos da prevalência e da incidência das epilepsias encontrados na literatura apresentam índices com grande variabilidade. Têm sido descritos valores para prevalência entre 0,9 e 57 casos / 1.000 habitantes e para a incidência entre 26 e 190 casos / 100.000 habitantes, porém essas variações são resultantes de problemas metodológicos durante as investigações. Os problemas metodológicos mais comuns são: utilização de diferentes critérios diagnósticos, de classificação e diferentes métodos de seleção de casos e definições de epilepsia (HAUSER; KURLAND, 1975; SANDER ; SHORVON, 1985; McNAMARA, 1994; JALLON et al., 1997).

Apesar desses problemas, as informações obtidas nessas investigações indicam que as epilepsias continuam sendo um problema de saúde pública maior nos países em desenvolvimento. Os dados disponíveis indicam que a prevalência em países da África, América Latina e Ásia chega a ser 4 a 5 vezes maior que em países industrializados (O.M.S., 1978). Essa constatação é altamente preocupante, uma vez que esses países enfrentam grandes

dificuldades econômicas, tem baixo investimento em áreas sociais aliadas a um alto grau de subemprego e desemprego.

As altas taxas de incidência e prevalência das epilepsias nos países em desenvolvimento afetam a economia a medida em que aumentam os custos econômicos diretos da doença, provenientes dos gastos médicos (drogas e hospitalizações) e gastos não médicos (cuidados residenciais e transporte para o hospital). Ao mesmo tempo, aumentam os custos econômicos indiretos decorrentes da perda de produção econômica por desemprego, licença médica ou morte prematura (ROBINSON, 1993). Como exemplo, na Argentina o custo médio das drogas antiepilépticas (DAE) é 25% mais alto que nos Estados Unidos e 145% mais alto que na Europa. Por outro lado, as novas DAE são 86% mais caras que nos Estados Unidos e 55% mais caras que na Europa (KOCHEN, 1996).

A alta incidência das epilepsias nos países em desenvolvimento é decorrente da deficiente assistência pré-natal e maternal, alto índice de prematuridade, desnutrição, traumas durante o parto, convulsões febris da infância e de infecções, particularmente as decorrentes de parasitismo (SANDER; SHORVON, 1985; FERNANDES et al., 1992).

O termo epilepsia se refere a um distúrbio da atividade cerebral caracterizada pela ocorrência periódica e espontânea de atividade elétrica altamente sincronizada, acompanhada de manifestações comportamentais. Dado o caráter freqüentemente focal do gerador da atividade epiléptica, os pacientes podem apresentar uma grande variedade de sinais clínicos. Uma vez desencadeada, essa descarga excessiva pode propagar-se para outras regiões cerebrais incorporando-as à atividade epiléptica. Além desse aspecto, um mesmo paciente pode apresentar formas diferentes de crises epilépticas. Esse fato dificultou o estudo sistemático das epilepsias tanto do ponto de vista epidemiológico quanto clínico e experimental (McNAMARA, 1994).

As crises epilépticas são fenômenos clínicos transitórios, decorrentes da descarga excessiva e sincronizada da rede neuronal. Essas crises podem surgir espontaneamente ou ser desencadeadas por situações como: febre, distúrbio eletrolítico, intoxicação e alterações vasculares. As manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes dependem das regiões envolvidas, podendo o paciente apresentar desde um simples sinal motor focal até crises motoras generalizadas. Neste caso, o paciente perde a consciência e apresenta atividade motora intensa acometendo toda a musculatura estriada (PEDLEY et al., 1997).

Quando a crise é acompanhada de atividade motora é denominada de crise convulsiva. Essa atividade motora pode assumir formas tônicas, indicando contrações musculares mantidas, ou clônicas, sob a forma de contrações musculares intermitentes. No entanto, o paciente pode apresentar uma crise com perda da consciência sem sinais convulsivos (PEDLEY et al., 1997).

A primeira proposta para a classificação das crises epiléticas foi anunciada em 1969 por Henri Gastaut, baseada em critérios clínicos, eletrencefalográficos, substrato anatômico, etiologia e idade de ocorrência das crises.

A introdução de técnicas novas, como a vídeo-eletrencefalografia e os registros poligráficos, exigiu, no entanto, a revisão da classificação proposta por Gastaut. Diversas reuniões internacionais foram realizadas com especialistas desde então, culminando, em 1981, com a publicação da Classificação Internacional das Crises Epiléticas (COMMISSION, 1981).

As crises epiléticas foram então classificadas em: parciais e generalizadas. As crises parciais por sua vez foram divididas em parciais simples e complexas. As crises parciais simples têm caráter focal, iniciando em um sítio cortical com preservação da consciência. As manifestações comportamentais das crises epiléticas são ditadas pelas funções normalmente exercidas pelas regiões corticais nas quais a crise começou, isto é, uma crise com origem no córtex motor se manifesta com atividade motora clônica da parte do corpo controlada pela região cortical de origem da crise. Da mesma forma, uma crise com origem no giro pós-central provoca o surgimento de sinais somestésicos na parte do corpo correspondente à zona de recepção cortical sensorial. A crise parcial pode, no entanto, generalizar-se secundariamente quando, então, se acompanhará de perda da consciência e da presença ou não de sinais convulsivos generalizados. As crises parciais complexas por sua vez são caracterizadas pela presença de sinais focais de origem límbica e são geralmente acompanhadas de alterações da consciência desde o início, com ou sem a presença de automatismos (COMMISSION, 1981).

Nas crises generalizadas ocorre o envolvimento das regiões corticais de ambos os hemisférios desde o início da atividade epilética, sendo acompanhadas de perda da consciência. Crise de ausência, crises mioclônica e tônico-clônica são exemplos de crises generalizadas. Uma crise de ausência é caracterizada por uma interrupção da atividade,

acompanhada de olhar para o infinito com duração de 5 a 15 segundos, seguida do retorno à atividade normal. A crise mioclônica consiste de breves abalos musculares, semelhantes a choques, os quais podem ser confinados a uma extremidade ou generalizados. Uma crise tônica consiste de contração muscular sustentada, enquanto que uma crise clônica consiste de contrações musculares alternantes dos músculos flexores e extensores. O mais freqüente é que o paciente apresente um período inicial de atividade tônica seguido por um período de atividade clônica (COMMISSION, 1981).

As crises parciais complexas são as mais freqüentemente observadas na clínica. Caracterizam-se pela presença de automatismos, principalmente orofaciais, acompanhados de embotamento da consciência, e geralmente se iniciam no lobo temporal (COMMISSION, 1981).

Como mencionado anteriormente, um mesmo paciente pode apresentar mais de um tipo de crise epiléptica. Baseado nesse aspecto, bem como em outros fatores (etiologia e idade do início das crises) e nos achados eletrográficos, foi criada uma nova classificação das síndromes epilépticas (COMMISSION, 1989).

1.2 Epilepsia do Lobo Temporal

A forma mais comum de síndrome epiléptica é a epilepsia do lobo temporal, ocorrendo em cerca de 40% de todos os casos de epilepsias (HAUSER; KURLAND, 1975). A epilepsia do lobo temporal manifesta-se pela presença de crises parciais complexas, com ou sem generalização subsequente. Na grande maioria dos pacientes, o lobo temporal está acometido por lesões histologicamente demonstráveis e a sua ressecção pode eliminar completamente as crises convulsivas em 80 a 90 % dos pacientes (DODRIL et al., 1986).

O padrão histológico mais freqüentemente observado em tecidos ressecados de pacientes com epilepsia do lobo temporal é a chamada esclerose do Corno de Amon, caracterizada por acentuada perda de neurônios piramidais do hipocampo acompanhada de gliose. Em outros casos podem ser observados outros tipos de lesões como: neoplasias ou alterações vasculares (WOLF; WIESTLER, 1993; WOLF et al., 1994).

Outro aspecto importante da epilepsia do lobo temporal é a alta refratariedade ao tratamento, onde apenas 30% dos casos são controlados em monoterapia. Grande parte dos pacientes são obrigados a receber mais de uma medicação antiepiléptica, e mesmo assim, a melhora ocorre em apenas 11% desses pacientes (COMMISSION, 1981; MATTSON et al., 1985; PEDLEY et al., 1997).

1.3 Modelo Experimental de Epilepsia Induzido pela Pilocarpina

A ausência de modelos experimentais adequados das epilepsias dificultou o estudo sistemático da sua fisiopatogenia. Esse fato justificou a procura pelo desenvolvimento de modelos experimentais que simulassem o quadro observado nos humanos. Dentre esses modelos, se destacam aqueles que mimetizam a epilepsia do lobo temporal, sendo que o da pilocarpina ocupa um lugar de destaque.

A acetilcolina (Ach), as substâncias inibidoras da acetilcolinesterase e os análogos da Ach são agentes epileptogênicos efetivos quando administrados intracerebralmente (VOSU; WISE, 1975; COHEN et al., 1981; CAVALHEIRO et al., 1983; OLNEY et al., 1983; TURSKI et al., 1983a) ou sistematicamente (LUNDY; SHAW, 1983; TURSKI et al., 1983b).

A administração sistêmica de pilocarpina (PILO) (um agonista colinérgico muscarínico), em ratos e camundongos, numa dose de 350 a 380 mg/kg, desencadeia, seletivamente, uma seqüência de alterações comportamentais e eletrencefalográficas que se iniciam nas estruturas límbicas. Estas alterações evoluem progressivamente para crises generalizadas atingindo o estado de mal epiléptico que, por sua vez, produz alterações patológicas cerebrais difusas (TURSKI et al., 1983 a; 1984).

Na dose de 350 mg/kg, os animais apresentam crises motoras límbicas com intensa salivação, “rearing” (o animal permanece em pé apresentando clonias dos membros anteriores apoiado sobre as patas posteriores) e crises tônico-clônicas generalizadas. Tais crises ocorrem a cada 2-8 minutos e evoluem para o estado de mal epiléptico (*status epilepticus*), o qual perdurava em média 10 h. As primeiras 24 horas após a injeção da PILO caracterizam o período agudo do modelo. Em seguida, os animais recuperam gradativamente suas condições pré-droga, sem crises e sem alterações comportamentais aparentes, caracterizando o período

silencioso do modelo. Este período pode durar de 4 a 44 dias (média de 14, \pm 3.0 dias). Após este período, todos os animais sobreviventes passam a exibir crises epiléticas espontâneas e recorrentes que caracterizam o período crônico. Durante este período, os animais apresentam de 2 a 15 episódios críticos por mês (média de 2 a 3 crises por semana). As crises espontâneas são caracterizadas por automatismos faciais, clonias dos membros anteriores com elevação do corpo sobre os membros posteriores e perda de equilíbrio com convulsões generalizadas (CAVALHEIRO et al., 1991).

Do ponto de vista histopatológico, a análise realizada ao final do período agudo revela lesões no córtex olfatório, complexo amigdalóide, tálamo, neocórtex e substância negra. A formação hipocampal é a região mais lesada, com extensa degeneração das células piramidais nas camadas CA1 e CA3a, b, c. Observa-se ainda grande perda neuronal na região polimórfica do giro denteado (hilo) (TURSKI et al., 1983a).

Neste modelo, foi descrita a existência de brotamento supragranular das fibras musgosas do giro denteado ou *sprouting* (MELLO et al., 1993), semelhante àquele descrito em tecido cerebral epilético humano (BABB et al, 1987). Esses autores acreditam que com a perda de células hilares do giro denteado, os axônios das células granulares glutamatérgicas, que antes utilizavam essas células como alvo, passam então a fazer sinapse com seus próprios dendritos proximais, criando um circuito monossináptico excitatório e reverberante, facilitando a re-entrada do estímulo excitatório e o aparecimento de crises epiléticas.

1.4 Estatinas

As estatinas foram descobertas por Endo et al. (1976), ao serem isoladas a partir de uma colônia de *Penicillium Citrinium* e identificadas como inibidoras da biossíntese do colesterol. Foi estabelecido por Brown et al. (1978) que as estatinas atuam inibindo a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA) redutase. A compactina, depois denominada de mevastatina, foi a primeira estatina estudada em seres humanos, demonstrando um potencial terapêutico eficaz (YAMAMOTO et al., 1984). A primeira estatina desenvolvida e aprovada para uso em seres humanos foi a lovastatina, antes conhecida como mevinolina e isolada do *Aspergillus Terreus* (ALBERTS et al., 1980; BILHEIMER et al., 1983). Desde a aprovação da lovastatina pelo *United States Food and Drug Administration (FDA)* em 1987,

outras 5 estatinas foram aprovadas, sendo que duas destas, a pravastatina e a sinvastatina, são derivadas da lovastatina.

A lovastatina, um antibiótico fúngico usado no tratamento da hipercolesterolemia, é um inibidor competitivo da HMG-CoA (3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A redutase), a principal enzima regulatória da síntese do colesterol (GOLDSTEIN, 1994). Estudos recentes mostraram que as estatinas reduzem a resposta inflamatória vascular (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000), promove angiogênese (KUREISHI et al., 2000), modula a produção de citocina (PAHAN et al., 1997) e diminui o estresse oxidativo (AVIRAM et al., 1998). Surpreendentemente, trabalhos recentes demonstraram que as estatinas reduzem a extensão da lesão cerebral após um insulto isquêmico (SIRONI et al., 2003). Neste trabalho foi utilizado imagem por Ressonância Magnética para investigar a intervenção terapêutica desta droga em um modelo permanente de isquemia focal em ratos. A estatina administrada após a obstrução da artéria média cerebral, protegeu o tecido cerebral contra danos cerebrais agudos, e a segunda dose administrada 24 horas após, serviu para prevenir o crescimento da lesão. Assim as estatinas não somente previnem o insulto agudo (ENDRES et al., 1998), mas também é benéfico no tratamento do mesmo.

2 Objetivo

Além das propriedades farmacológicas altamente eficazes no tratamento da hipercolesterolemia, estudos recentes sugerem que as estatinas também são capazes de reduzir a resposta inflamatória, o estresse oxidativo e promover a angiogênese. Além disso, outros estudos mostram que as estatinas reduzem a lesão neuronal após um insulto cerebral agudo. Sendo assim, o objetivo do presente estudo é avaliar um possível papel neuroprotetor da lovastatina sobre a formação hipocampal de ratos submetidos ao modelo de epilepsia induzido por pilocarpina.

3 Material e Métodos

3.1 Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados ratos machos, da raça Wistar (n=40), 60 dias, adultos, pesando entre 200 e 250g no início dos experimentos. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo/Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM) e do Biotério da Universidade de Mogi das Cruzes e alojados em grupos de cinco ratos, em gaiolas apropriadas, onde tiveram livre acesso à comida e água. As condições destes biotérios obedeceram a um ciclo claro-escuro de 12 horas (claro: 7:00h - 19:00h), sendo a temperatura ambiente mantida constante entre $21 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.2 Substâncias Químicas Envolvidas

As drogas utilizadas neste trabalho serão discriminadas a seguir, de acordo com a procedência. Para obtenção do modelo experimental de epilepsia foi utilizado o cloridrato de pilocarpina (Merck S.A. Indústrias Químicas) e a metil escopolamina (Da Sigma Chemica Co.). O cloridrato de pilocarpina foi dissolvido em uma concentração de 40mg/ml enquanto que a metil-escopolamina em uma concentração de 0,4mg/ml. Para o tratamento dos animais submetidos ao *status epilepticus*, administramos lovastatina (Farmácia Millenium, São Paulo, Brasil) em uma concentração de 5mg/ml diluída em solução salina a 0,9%. Para bloquear as crises foi utilizado Diazepan (5mg/ml; Roche, Brasil).

3.3 Ética dos Procedimentos Experimentais

Os protocolos experimentais realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Manipulação e Experimentação Animal da Universidade de Mogi das Cruzes (CEMEA/UMC).

3.4 Modelo de Epilepsia Induzido pela Pilocarpina

Para obtenção de animais submetidos ao *status epilepticus* (período agudo do modelo) e com epilepsia (período crônico do modelo) foi utilizado o modelo da pilocarpina. No desenvolvimento deste trabalho administrou-se a dose de 350 mg/kg para todos os animais. Esta droga foi injetada intraperitonealmente e os seus efeitos foram observados segundo a metodologia descrita por Turski et al. (1983a) e apresentada na introdução deste estudo.

Todos os animais injetados com pilocarpina foram pré-tratados sub-cutaneamente com metil-escopolamina (1 mg/kg), 30 minutos antes da injeção de pilocarpina. A administração da metil-escopolamina tem por finalidade atenuar os efeitos periféricos provocados pela injeção de pilocarpina.

3.5 Grupos Experimentais

Para a análise do papel da lovastatina em animais submetidos ao *status epilepticus* (período agudo do modelo) e os com epilepsia (período crônico do modelo), o desenho experimental de nosso estudo apresentou os seguintes grupos:

- a) Animais pertencentes ao grupo controle que não receberam pilocarpina nem lovastatina (n=10).
- b) Animais pertencentes ao grupo controle que receberam apenas lovastatina em um horário matinal aleatório e 24 horas após o mesmo (20mg/kg; via esofágica; n=10).
- c) Animais submetidos ao *status epilepticus* que receberam apenas solução salina 0,9% (via esofágica; n=10).
- d) Animais submetidos ao *status epilepticus* que receberam lovastatina (20mg/kg; via esofágica; n=10) imediatamente após o aparecimento do SE e 24 horas após o mesmo.

Com exceção do grupo controle, os animais submetidos ao *status epilepticus*, tiveram suas crises bloqueadas após 4 horas com uma injeção intraperitoneal de diazepam (10mg/kg).

3.6 Preparação da Amostra

Após sete dias ao SE, cinco animais de cada grupo foram perfundidos e o tecido cerebral retirado para análise histológica através do Método de Nissl. Para a análise histológica pelo método de Timm, o mesmo foi realizado com os outros cinco animais de cada grupo, no entanto, os mesmos foram perfundidos e o tecido cerebral retirado após 60 dias ao *status epilepticus*.

Para a perfusão, os animais foram anestesiados com tionembutal 2,5% (Abbott). Após ter sido profundamente anestesiado, realizou-se a abertura de sua caixa torácica com a exposição do coração. O ventrículo esquerdo foi puncionado com uma agulha para que as soluções aí infundidas drenassem através da secção do átrio direito.

Durante a perfusão, os animais que foram sacrificados 07 dias após o *status epilepticus* (para realização do método de Nissl) receberam primeiro uma solução de Salina tamponada 0,01M e em seguida uma solução fixadora de Paraformoldeído à 4%. Já os animais sacrificados 60 dias após o SE (para realização do método de neo-Timm) receberam primeiro uma solução de Sulfeto de Sódio 0.1% e em seguida uma solução fixadora de Glutaraldeído 3%. Todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato e pH 7,4. A infusão foi feita automaticamente por uma bomba de perfusão (Masterflex).

Após este processo, retiramos o cérebro de cada animal da caixa craniana com uma goiva e o colocamos em uma solução crioprotetora de sacarose 30%. Os mesmos foram cortados de forma seriada em secções de 20µm (Método de Nissl) e 40 µm de espessura (Método Timm) em um criostato (Microm HM 505E).

3.7 Método de Nissl

O Cresil Violeta é um corante básico para que se possa evidenciar o citoplasma dos neurônios. Dentro do citoplasma há várias estruturas, incluindo os Corpúsculos de Nissl, que são compostos basicamente por RNA. Assim, esta coloração serve para indicar as condições do corpo celular dos neurônios, sendo que na ocorrência de lesão neuronal, esses corpúsculos

podem desaparecer, fenômeno este denominado cromatólise.

Os cortes de 20 μ m foram recuperados em lâminas e corados com cresil violeta pela técnica de Nissl, que consiste em desidratar os cortes em banhos de álcool em concentração decrescente, permanecendo 5 minutos em cada concentração. Em seguida, banha-se estes cortes em água destilada, a fim de retirar o excesso de álcool para não diluir o corante, feito isso, os mesmos são imersos em uma solução de cresil violeta (0,5%) dissolvido em solução de acetato tamponado em pH 3,8, permanecendo neste por mais 5 minutos. Imediatamente após este processo, banha-se novamente os cortes em água destilada, lavando-os rapidamente em diferentes concentrações de álcool, sendo clarificados com xileno. À partir disto, montam-se as lâminas utilizando lamínulas com um meio de montagem (entelan).

3.8 Método neo-Timm

Esta é uma modificação do tradicional método de Timm (SLOVITER, 1982), que intensifica, através da prata, a coloração específica de zinco. Este método produz uma melhor visualização das fibras musgosas (ricas em zinco), permitindo fácil observação da reorganização sináptica.

Após montadas as lâminas com os cortes de 40 μ m, as mesmas passaram por uma revelação em câmara escura, onde foram imersas em uma solução reveladora à 26°C. Essa solução consistia em 240ml de goma arábica, 9,4g de citrato de sódio, 10,2g ácido cítrico, 6,8 de hidroquinona e 425mg de nitrato de prata dissolvidos em 165ml de água destilada. Feito isso os tecidos foram desidratados e as lâminas cobertas por lamínulas, usando bálsamo do Canadá como meio de montagem.

3.9 Contagem Neuronal

A contagem dos neurônios realizou-se nas seguintes áreas hipocâmpais: CA1, CA3 e hilo do giro denteado, como reportado por Mouritzen-Dam (1982). Para cada animal, foram contados células em três cortes, ambos hemisférios direito e esquerdo, totalizando 6 valores individuais por animal. Foi aceito somente células com núcleos e nucléolos evidentes, sendo que os valores de células encontradas nos ratos controles foram utilizados como parâmetros, ou seja, uma população de células normais de 100%, vale a pena salientar que realizaram a

contagem neuronal dois examinadores que não participaram diretamente do estudo.

3.10 Análise dos dados

Para determinar se há ou não diferença estatisticamente significativa entre o número de células neuronais do hipocampo dos animais dos diversos grupos, foi utilizado análise de variância monofatorial (ANOVA), seguido do teste Dunnett's. Para cada um dos grupos experimentais, consideramos que há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos se p for menor que 0,05.

4 Resultados

4.1 Análise Comportamental

Imediatamente após a administração de pilocarpina, os ratos apresentaram automatismos faciais associados à salivação moderada, acinesia e tremores generalizados. Após 15-25 minutos da injeção, estes comportamentos progrediram, originando crises motoras límbicas, em que os animais apresentavam intensa salivação, clonia das patas anteriores apoiados sobre as patas posteriores e finalmente quedas. Estas crises motoras começaram aproximadamente 30 minutos após a injeção, e recorreram à cada 2-8 minutos, culminando em estado de mal epiléptico dentro de 50-60 minutos. De acordo com a descrição feita por Turski (1983), destes episódios que caracterizam o período agudo do modelo experimental da pilocarpina, o estado de mal epiléptico perdurava por aproximadamente 10 horas, quando os animais tornavam-se irresponsivos aos estímulos ambientais, retornando gradativamente ao seu comportamento normal dentro de 24 horas. No entanto, em nosso estudo, os animais permaneceram em *status epilepticus* por 4 horas, quando tiveram suas crises bloqueadas com Diazepan (10mg/Kg).

Nos animais que não foram eutanasiados ao sétimo dia após o *status epilepticus*, pode-se observar os outros dois períodos do modelo da pilocarpina: período silencioso e período crônico.

O período silencioso em média 15 dias após a injeção da pilocarpina e foi caracterizado pela normalização das alterações comportamentais e eletrográficas.

Com o aparecimento da primeira crise espontânea e recorrente, deu-se início ao período crônico do modelo da pilocarpina. Do ponto de vista comportamental, o animal se mostrou imóvel, olhos fixos e discreta movimentação das vibrissas. Em seguida, apareceram movimentos mastigatórios, piscamento e salivação, acompanhados por abalos clônicos de um ou dos dois membros anteriores. O animal apresentou elevação do tronco sobre as patas posteriores concomitantemente as clonias das patas anteriores, com perda da postura e culminando finalmente, em uma crise generalizada do tipo tônico-clônica. Vale a pena salientar que estes eventos comportamentais perduraram em média 60 segundos. Sendo assim,

a partir dessa seqüência de eventos, o animal permaneceu apresentando crises espontâneas e recorrentes até o período estabelecido em nosso protocolo experimental para análise histológica.

4.2 Análise Qualitativa

Do ponto de vista morfológico, realizamos a análise qualitativa da formação hipocampal (precisamente as regiões CA1 e CA3 do hipocampo e hilo do giro dentado) de todos os animais avaliados em nosso estudo. Nos grupos de animais pertencentes aos grupos controles, notamos a integridade celular das regiões CA1 e CA3 do hipocampo e do hilo do giro dentado (Figura 1A e Figura 1B). Por outro lado, nos animais submetidos ao *status epilepticus* e que receberam solução salina, foi observada uma perda celular nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo e no hilo do giro dentado (Figura 1C). A estrutura hipocampal dos animais que evoluíram para o *status epilepticus* e que receberam lovastatina (Figura 1D), notamos, do ponto de vista qualitativo, uma citoarquitetura similar aos animais pertencentes ao grupo controle.

Com relação a neuroplasticidade, descrita no modelo da pilocarpina como a existência de brotamento supragranular das fibras musgosas do giro dentado ou *sprouting*, a coloração de neo-Timm revelou a presença de uma densa banda de grânulos de prata nos animais submetidos ao *status epilepticus* e que receberam solução salina (Figura 2C), bem como nos que evoluíram para o *status epilepticus* e que receberam lovastatina (Figura 2D). Em contrapartida, não evidenciamos essa marcação nos animais pertencentes aos grupos controles (Figura 2A e Figura 2B).

4.3 Análise Quantitativa

A Figura 3 mostra o gráfico da contagem neuronal realizada nas subáreas CA1, CA3 do hipocampo e do hilo do giro dentado. Nos animais que evoluíram para o *status epilepticus* e que foram tratados com solução salina, observamos uma redução significativa no número de células da formação hipocampal (**CA1**= 26.8 ± 13.67 ; **CA3**= 38.1 ± 7.2 ; **hilo**= 43.8 ± 3.95) quando comparados com animais pertencentes aos grupos controles (Grupo A: **CA1**= 53.2 ± 9.63 ; **CA3**= 63.5 ± 13.35 ; **hilo**= 59.08 ± 10.24 ; Grupo B: **CA1**= 74.3 ± 8.16 ; **CA3**= $70.1 \pm$

3.83; **hilo**= 70.6 ± 5.10). Interessantemente, os animais que evoluíram para o *status epilepticus* e administrados com lovastatina, verificamos uma preservação estatisticamente significativa das células na subárea CA1 do hipocampo (**CA1**= 44.4 ± 17.88) quando comparados com os animais que evoluíram para o *status epilepticus* e que receberam solução salina (**CA1**= 26.8 ± 13.67). Paralelamente, apesar da diferença não ser estatisticamente significativa, os animais que evoluíram para o *status epilepticus* e que foram tratados com lovastatina, pudemos notar uma tendência à proteção neuronal das regiões CA3 e do hilo do giro denteado (**CA3**= 50.14 ± 15.33 ; **hilo**= 52.20 ± 18.71) quando comparados com os animais que evoluíram para o *status epilepticus* e que receberam apenas solução salina (**CA3**= 38.1 ± 7.2 ; **hilo**= 43.8 ± 3.95).

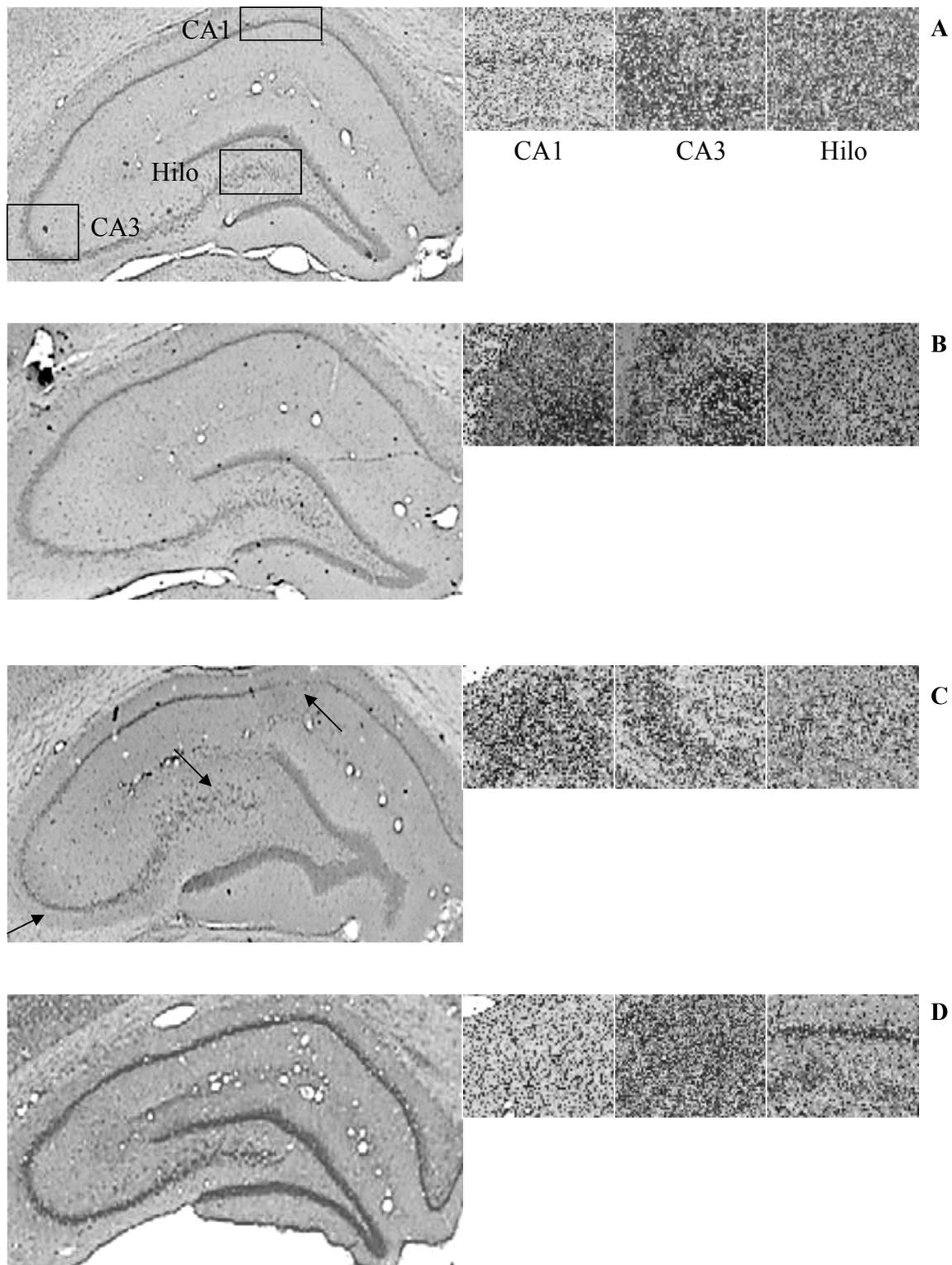


Figura 1 - Fotomicrografia da formação hipocampal com o método de Nissl mostrando: (A) ratos controles, (B) ratos que receberam lovastatina, (C) ratos que receberam somente pilocarpina, (D) ratos que receberam pilocarpina e lovastatina. Observe em C (flecha), uma perda de células nas subcamadas CA1, CA3 e hilo do giro dentado do hipocampo. Escala: 100 μ m.

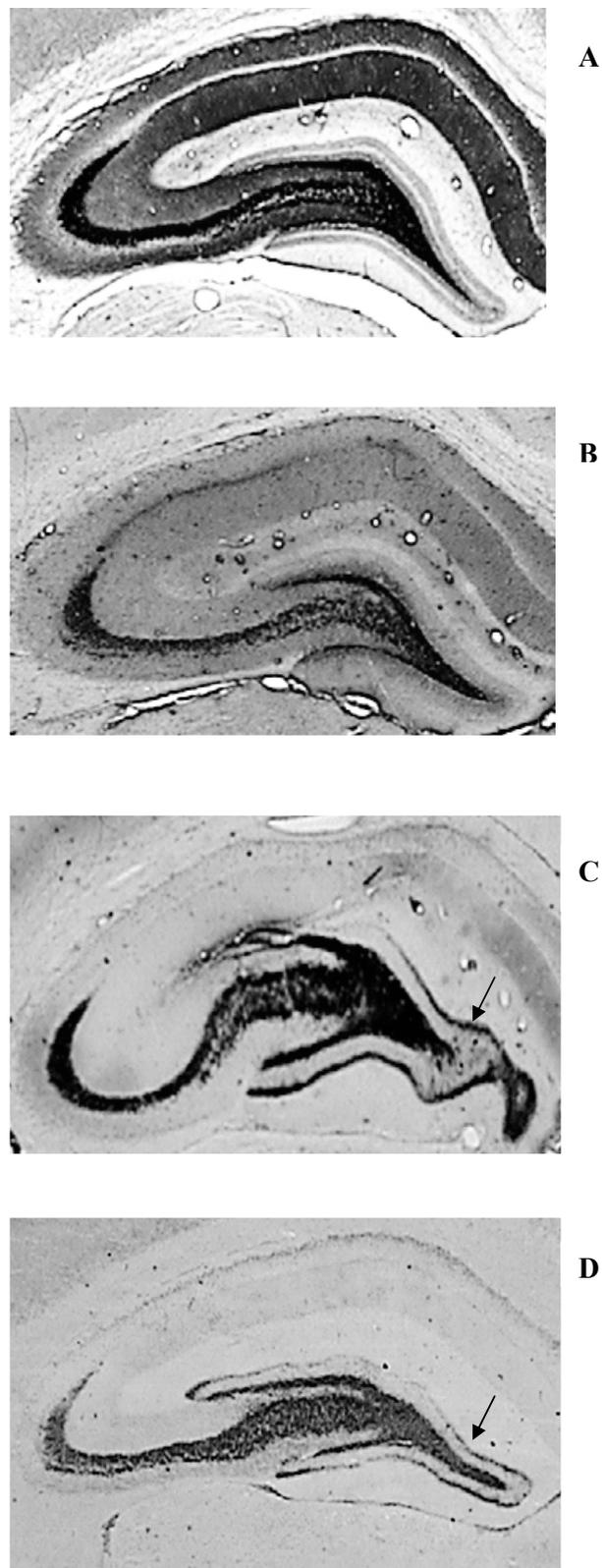


Figura 2 - Fotomicrografia da formação hipocámpal com o método de Timm mostrando: (A) ratos controles, (B) ratos que receberam lovastatina, (C) ratos que receberam somente pilocarpina, (D) ratos que receberam pilocarpina e lovastatina. Observe em C e D (flecha), a presença de reorganização sináptica no giro denteado do hipocampo. Escala: 100µm.

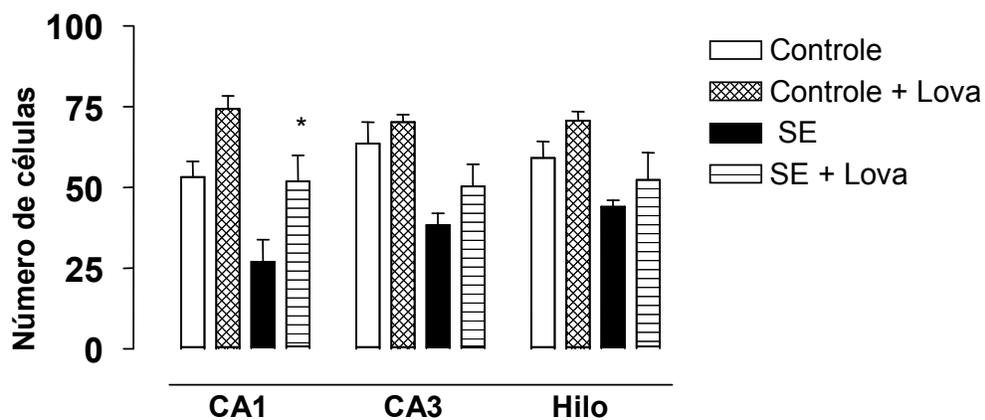


Figura 3 – Gráfico da Contagem de Células Neurais. Os dados representam as médias e erros padrão das médias da contagem de células neuronais de ratos controles, ratos controles que receberam lovastatina, ratos que receberam somente pilocarpina e ratos que receberam pilocarpina e lovastatina. Os dados foram analisados pela ANOVA, seguido do teste de Dunnett's. Perceba a redução do número de perda de células de CA1 de ratos que receberam pilocarpina e lovastatina quando comparados com ratos que receberam somente pilocarpina. Consideramos diferenças estatisticamente significativas se $P < 0,05$.

5 Discussão

Nosso trabalho teve por objetivo avaliar um possível papel neuroprotetor da lovastatina sobre a formação hipocampal de ratos submetidos ao modelo de epilepsia induzido por pilocarpina. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que a lovastatina é um agente neuroprotetor eficaz frente a um insulto cerebral agudo, pois a administração desse fármaco foi capaz de reduzir a morte neuronal na região de CA1 do hipocampo de ratos após o *status epilepticus* induzido pela pilocarpina.

Algumas hipóteses podem ser levantadas com o intuito de tentarmos explicar o efeito neuroprotetor da lovastatina após uma lesão cerebral aguda. Primeiramente, sabemos que as espécies reativas de oxigênio (ERO) são parte do metabolismo humano normal, no entanto, quando produzido em excesso, podem causar lesão tecidual, incluindo peroxidação de lipídeos, danos ao DNA e inativação enzimática (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000). As ERO são denominadores comuns em diversas condições neurológicas agudas (BONFOCO et al, 1995; GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000), as quais as epilepsias estão incluídas (BRUCE; BAUDRY, 1995; UEDA et al, 1997). No modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina, a lesão neuronal ocorre por um processo denominado excitotoxicidade (CAVALHEIRO et al, 1991) e a produção das ERO está envolvida com os mecanismos da excitotoxicidade glutamatérgica *in vitro* (BONFOCO et al, 1995) e *in vivo* (BRUCE; BAUDRY, 1995; UEDA et al, 1997; SCHULZ et al, 1995). Nesse sentido, foi demonstrado previamente que o tratamento com lovastatina inibe lesões neuronais desencadeadas por radicais livres (CHEN et al, 1997). Seguindo essa linha de pensamento, poderemos supor que esse efeito antioxidante das estatinas poderia explicar a neuroproteção hipocampal encontrada em nosso estudo.

Uma segunda hipótese que poderia explicar o papel neuroprotetor da lovastatina em nosso estudo está relacionado com o óxido nítrico (ON). Existe um forte argumento associando o ON ao fenômeno epiléptico, pois a ativação de aminoácidos excitatórios (ex. NMDA - *N-metil-D- aspartato*), conhecidos como agentes pró-convulsivantes (MELDRUM, 1984), é acompanhada pela formação de ON (GARTHWAITE, 1991). De fato, o papel do ON no fenômeno de epileptogênese tem sido verificado em uma série de estudos, sugerindo que o mesmo é uma substância endógena pró-convulsivante (DE SARRO et al, 1991;

MULSCH, 1994). Além do mais, alguns estudos tem mostrado que as estatinas são capazes de inibir a produção de ON no parênquima cerebral (PAHAN et al, 1997), indicando que as estatinas, secundariamente, podem exercer um papel anticonvulsivante, não promovendo assim, a lesão neuronal mediada pela liberação excessiva de glutamato (excitotoxicidade). Outra possibilidade é que a inibição do óxido nítrico sintetase endotelial (eONS) cerebral leva ao aumento da pressão arterial (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991), o qual pode afetar a excitabilidade do sistema nervoso central (FEWELL; JOHNSON, 1994). No entanto, foi demonstrado que as estatinas são capazes de super regular o eONS (LAUFS et al, 2000), podendo aumentar as respostas vasodilatadoras arteriais e diminuindo com isso, o limiar de disparo neuronal.

Os efeitos anti-inflamatórios das estatinas podem também contribuir para a neuroproteção verificada após o *status epilepticus* induzido pela pilocarpina observada em nosso estudo. As alterações patológicas que ocorrem na formação hipocampal após crises prolongadas tem início dentro de horas e causam alterações morfológicas que perduram por toda a vida. Além disso, alguns estudos tem associado as citocinas com as alterações patológicas hipocampais nas epilepsias (ROTHWELL, 1999; MINAMI; KURAISHI; SATOH, 1991). Interessantemente, Pahan et al (1997) mostraram que a lovastatina reduz a indução desses mediadores inflamatórios. Sendo assim, podemos supor que a lovastatina é um importante agente capaz de suprimir a resposta inflamatória após um insulto cerebral agudo.

Também podemos especular uma possível ação da lovastatina frente ao fenômeno da neurogênese. O processo de neurogênese no SNC de adultos tem sido descrito em muitas espécies, como crustáceos (HARZSCH et al., 1999), répteis (LOPEZ-GARCIA et al., 1988), anfíbios (POLENOY; CHETVERUKHIN, 1993), aves (NOTTEBOHM, 1989), roedores (ALTMAN, 1965), primatas (ECKENHOFF; RAKIC, 1989) e humanos (ERIKSSON et al., 1998). Dentre todas as espécies de mamíferos já estudadas, inclusive humanas, existem regiões onde se localizam células progenitoras mitoticamente ativas, capazes de gerar novos neurônios durante a fase adulta (ERIKSSON et al., 1998; GOLD et al., 1998). Essas regiões incluem os ventrículos, mais precisamente a zona subventricular dos ventrículos laterais (ZSV) e a formação hipocampal, especificamente a zona subgranular do giro dentado (ZSG), sendo esta última, o ponto de encontro da camada interna de células granulares do giro dentado com o hilo. Paralelamente, tem sido demonstrado nos últimos anos que o processo de

neurogênese no SNC do adulto sofre forte influência de uma grande variedade de estímulos. Nesse sentido, Parent e colaboradores (1997) demonstraram aumento sustentado da atividade mitótica na ZSG de ratos adultos e que se mantém do 3º ao 14º dia após o episódio inicial de *status epilepticus* induzido pela pilocarpina. (PARENT et al. 1997). Bengzon e et al. (1997) mostraram que apenas um estímulo no modelo do *kindling* (abrasamento) pode levar a um aumento significativo da neurogênese hipocampal e a injeção intracerebroventricular de ácido caínico também é capaz de aumentar a proliferação de células na região do giro denteado de ratos adultos (GRAY; SUNDSTROM, 1998). Nesse sentido, a análise quantitativa realizada em nosso trabalho reforça a hipótese de ocorrência do fenômeno da neurogênese através da administração da lovastatina, uma vez que nossos resultados mostraram que tanto os animais pertencentes ao grupo controle e que receberam lovastatina quanto os animais submetidos ao SE e que foram tratados com lovastatina apresentaram um aumento no número de células na região hipocampal quando comparados com os animais que não receberam lovastatina. Obviamente que essa hipótese deverá ser testada através de métodos eficazes e especificamente indicados para avaliar o fenômeno da neurogênese, no entanto, abre uma nova perspectiva de pesquisa em nossa área de atuação.

Finalmente, os resultados obtidos em nosso trabalho demonstraram que a lovastatina não foi capaz de inibir o *sprouting* nos animais com epilepsia. Como a neuroproteção observada em nosso estudo se restringe a região CA1 do hipocampo, neurônios estes que não participam do fenômeno do *sprouting*, é bastante justificável argumentar a razão pela qual a lovastatina não foi capaz de reverter esse fenômeno de neuroplasticidade cerebral.

6 Conclusão

Os resultados obtidos em nosso estudo demonstram que a administração de lovastatina reduziu a morte neuronal na região de CA1 do hipocampo de ratos após um insulto cerebral agudo, porém, em animais com epilepsia, este fármaco não foi capaz de reverter a reorganização sináptica hipocampal. Futuros estudos serão necessários para uma melhor compreensão dos possíveis mecanismos exercidos pela lovastatina durante a epileptogênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, A.W. et al. Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethyl-glutaryl -coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.77, p. 3957-3961, 1980.

ALTMAN J, DAS GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. **J Comp Neurol** v.124, p.319-335,1965.

AVIRAM, M. Atorvastatin and gemfibrozil metabolites, but not parent drugs, are potent antioxidants against lipoprotein oxidation. **Atherosclerosis** , v.138: p. 271-280, 1998.

BABB T. L. et al. Synaptic recurrent excitation of granule cells by mossy fibers in human epileptic hippocampus. **Neuroscience**, v. 42, p. 351-363, 1991.

BENZON J., KOKAIA Z., ELMER E., NANOBASHVILI A., KOKAIA M., LINDVALL O. Apoptosis and proliferation of dentate gyrus neurons after single and intermittent limbic seizures. **Proc Natl Acad Sci**. v.94, p.10432-10437, 1997.

BILHEIMER, D. W. et al. Mevinolin and colestipol stimulate receptor-mediated clearance of low density lipoprotein from plasma in familial hypercholesterolemia heterozygotes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.80, p.4124-4128, 1983.

BONFOCO E. et al. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. **Proc Natl Acad Sci**, v.92,p.7162-7166, 1995

BROWN, M. S. ; FAUST, J. R. ; GOLDSTEIN, J. L. Induction of 3 – hydroxy – 3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity in human fibroblasts incubated with compactin (ML236B) a competitive inhibitor of the reductase. **J. Biol. Chem.**,v.253, p.1121-1128, 1978.

BRUCE AJ, BAUDRY M. Oxygen free radicals in rat limbic structures after kainate-induced seizures. **Free Radic Biol Med.**,v.18, p.993-1002, 1995.

CAVALHEIRO, E. A. et al. Intracerebral cholinomimetics produce seizure-related brain damage in rats. **Brit. J.Pharmacol.** v.79, p.284, 1983.

CAVALHEIRO, E. A. et al. Long-term effects of pilocarpine in rats: Structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia.** v.32, p. 778-782, 1991.

CHEN L. et al. Preservation of endogenous antioxidant activity and inhibition of lipid peroxidation as common mechanisms of antiatherosclerotic effects of vitamin E, lovastatin and amlodipine. **J Am Coll Cardiol.** v.30, p.569-575, 1997.

COHEN, R. L.; MORLEY, B.J.; SNEAD, O.C. An EEG analysis of convulsive activity produced by cholinergic agents. **Progr. Neuro-Psychopharmacol.**, v. 5, p. 383-388, 1981.

COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Proposal for Revised Clinical and Electroencephalographic Classification of Epileptic Seizures. **Epilepsia.**, v. 22, p. 489-501, 1981.

COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. **Epilepsia.**, v. 30, p. 389-399, 1989.

De SARRO G.B. et al. Role of nitric oxide in the genesis of excitatory amino acid-induced seizures from the deep prepiriform cortex. **Fundam Clin Pharmacol.** v.5, p.503-511, 1991.

DODRILL, C. B et al. Multidisciplinary prediction of seizure relief from cortical resection surgery. **Ann Neurol**, v. 20, p. 2, 1986.

ECKENHOFF M.F, RAKIC P. Nature and fate of proliferative cells in the hippocampal dentate gyrus during the life span of the rhesus monkey. **J Neurosci.** v.8, p. 2729-2747,1988.

ENDO, A.; KURODA, M.; TSUJITA, Y. ML-236A, ML-236B, ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by Penicillium Citrinum. **J. Antibiot.** (Tokyo), v. 29, p. 1346-1348, 1976.

ENDRESS, M.; LAUFS, U.; HUANG, Z. ; NAKAMURA, T.; HUANG, P.; MOSKOWITZ, M. A.; LIAO, J. K. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl

(HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. **Proc. Natl Acad Science USA.** v. 95, p.8880-8885, 1998.

ERIKSSON P.S, PERFILIEVA E., BJORK-ERIKSSON T., ALBORN A.M, NORDBORG C., PETERSON D.A, GAGE F.H. Neurogenesis in the adult human hippocampus. **Nature Med** v.4, p.1313-1317,1998.

FERNANDES, J.G. et al. Prevalence of epilepsy: The Porto Alegre study. **Epilepsia.**, v. 33, p. 132, 1992.

FEWELL J.E.; JOHNSON P. Acute increases in blood pressure cause arousal from sleep in lambs. **Brain Res.** v.311, p. 259-265, 1994.

GARTHWAITE J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. **Trends Neurosci.**, v.14, p.60-67, 1991.

GOLDSTEIN, M.R. Effects of lovastatin and pravastatin on coronary artery disease. **Am Intern Med.**, v. 120, p.811-812, 1994.

GOULD E., TANAPAT P., MCEWEN B.S., FLUGGE G., FUCHS E. Proliferation of granule cells precursors in the dentate gyrus of adult monkeys is diminished by stress. **Proc Natl Acad Sci.** v.95, p.3168-3171, 1998.

GRAY W., SUNDSTROM L. Kainic acid increases the proliferation of granule cell progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. **Brain Res** v.790, p.52-591998;.

GUTTERIDGE, M.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. **Ann N Y Acad. Sci.**, v. 899, p. 136-147, 2000.

HARZSCH S., MILLER J., BENTON J., BELTZ B. From embryo to adult: persistent neurogenesis and apoptotic cell death shape the lobster deutocerebrum. **J Neurosci.** v.19, p.3472-3485, 1999.

HAUSER, W. A.; KURLAND, L. T. The epidemiology of epilepsy in Rochester, Minnesota. **Epilepsia.**, v. 1, p. 1935 – 1968, 1975.

JALLON, P. et al. Incidence of first epileptic seizure in the canton of Geneva, Switzerland. **Epilepsia.**, v. 38, n. 5, p. 547-552, 1997.

KOCHEN, S. Cost of antiepileptic drugs. **Lancet.**, v. 347, p. 266, 1996.

KUREISHI, Y. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. **Nat. Med.**, v. 6, p. 1004-1010, 2000.

LAUFS, U. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. **Stroke** v.31, p.2442-2449, 2000.

LI, S.C. et al. Epidemiology of epilepsy in urban areas of the People's Republic of China. **Epilepsia.** , v. 26, p. 391-394, 1985.

LOPEZ-GARCIA C., MOLOWNY A., GARCIA-VERDUGO J.M., FERRER I. Delayed postnatal neurogenesis in the cerebral cortex of lizards. **Brain Res.** v.471, p.167-174, 1988.

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

MATTSON, R. H. et al. Comparison of carbamazepine, phenobarbital, phenytoin, and primidone in partial and secondarily tonic-clonic seizures. **N. Engl. J. Med.** v. 313, p. 145-151, 1985.

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

MELDRUM B.S. Amino acid neurotransmitters in new approaches to anticonvulsant drug action. **Epilepsia**, v.22, p.140-149, 1984.

MELLO, L. E. A. M. et al. Circuit mechanisms of seizures in the pilocarpine model of chronic epilepsy cell loss and mossy fiber sprouting. **Epilepsia**, v. 34, p.985-995, 1993.

MINAMI M, KURAISHI Y, SATOH M. Effects of kainic acid on messenger RNA levels of IL-1 beta, IL-6, TNF alpha and LIF in the rat brain. **Biochem Biophys Res Commun.** v.176, p.593-598, 1991.

MONCADA S.; PALMER R.M.J.; HIGGS A.S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev.**, v.43, p.109-142, 1991.

MOURITZEN-DAM, A. Hippocampal neurons loss in epilepsy and after experimental Seizures. **Acta Neurol. Scand.**, v. 66, p. 601-642, 1982.

MULSCH A. et al. Nitric oxide promotes seizure activity in kainate-treated rats. **Neuroreport** v. 21, p. 2325-2328, 1994.

NOTTEBOHM F. From bird song to neurogenesis. **Sci Am.** v.260, p.74-79, 1989.

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

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD – Aplicación de los progresos de las neurociencias en la lucha contra los trastornos neurológicos: Informe de un grupo de estudio de la OMS. **Serie de Informes Tecnicos.** p. 629, 1978.

OSUNTOKUN, B.O. et al. Prevalence of the epilepsies in nigerian africans: A community based study. **Epilepsia.**, v. 28, n. 3, p. 272-279, 1987.

PAHAN, K. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia and macrophages. **J. Clin. Invest.**, v.100, p. 2671-2679, 1997.

PARENT, J.M. et al. Dentate granule cell neurogenesis is increased by seizures and contributes to aberrant network reorganization in the adult rat hippocampus. **J Neurosci** 1997; 17: 3727-3738.

PEDLEY, T. A.; SCHEUER, M. L.; WALCZAK, T. S. – Epilepsia – In: **Merritt Tratado de Neurologia** – 9. ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan. 1997.

POLENOY A.L., CHETVERUKHIN, V.K. Ultrastructural radioautographic analysis of neurogenesis in the hypothalamus of the adult frog, *Rana temporaria*, with special reference to physiological regeneration of the preoptic nucleus. II. Types of neuronal cells produced. **Cell Tissue Res.** v.271, p.351-362, 1993.

ROBINSON, R. – Cost benefit analysis – **BMJ.**, v. 307, p. 924-926, 1993.

ROTHWELL N.J. Annual review prize lecture cytokines - killers in the brain? **J Physiol.** v.514, p.3-17, 1999.

SANDER, J.W.A.S.; SHORVON, S.D. – Incidence and prevalence studies in epilepsy and their methodological problems: A review. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.**, v. 50, p. 839-839, 1985.

SCHULZ J.B. et al. Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. **J. Neurochem.** v.64, p.2239-2247, 1995.

SIRONI, L. Treatment with statins after induction of focal ischemia in rats reduces the extent of brain damage. **Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.**, v. 23, p. 322-327, 2003.

SLOVITER, R. S. Possible functional consequences of synaptic reorganization in the dentate gyrus of kainate-treated rats. **Neuroscience Lett.**, v. 137, p. 91-96, 1982.

TURSKI, W. A. et al. Seizures produced by pilocarpine in mice: behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Res.**, v. 321, p. 237-253, 1984.

TURSKI, W.A. et al. Limbic seizures produced by pilocarpine in rats: Behavioural, electroencephalographic and neuropathological study. **Behav. Brain Res.**, v. 9, p. 315-335, 1983a.

TURSKI, W. A. et al. Intrahippocampal bethanechol in rats: behavioral, electroencephalographic and neuropathological correlates. **Behav. Brain Res.**, v. 7, p. 361-370, 1983b.

UEDA Y. et al Generation of lipid radicals in the hippocampal extracellular space during kainic acid-induced seizures in rats. **Epilepsy Res.**, v.26, p. 329-333, 1997.

VOSU, H.; WISE, R.A. - Cholinergic seizure kindling in the rat: comparison of caudate, amygdala and hippocampus. **Behav. Biol.**, v. 13, p.491-495, 1975.

WOLF, H.K.; WIESTLER, O.D. – Surgical pathology of chronic epileptic seizure disorders. **Brain Pathol.**, v. 3, p. 371-380, 1993.

WOLF, H.K. Ganglioglioma: a detailed histopathological and immunohistochemical analysis of 61 cases. **Acta Neuropathol.**, v. 88, p. 166-173, 1994.

YAMAMOTO, A. et al. Combined drug therapy-cholestyramine and compactin-for familial hypercholesterolemia. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol.**, v. 22, p. 493-497, 1984.

ANEXO A

Parecer do Comitê de Ética em Manipulação e Experimentação Animal da Universidade de Mogi das Cruzes (CEMEA/UMC)

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)