

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
JULIANA COSTA FERREIRA

**O PAPEL EXERCIDO PELA CATALASE SOBRE A
MORFOLOGIA DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL
DE RATOS SUBMETIDOS À EPILEPSIA DO LOBO
TEMPORAL INDUZIDA PELA PILOCARPINA**

Mogi das Cruzes, SP
2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
JULIANA COSTA FERREIRA

**O PAPEL EXERCIDO PELA CATALASE SOBRE A
MORFOLOGIA DA FORMAÇÃO HIPOCAMPAL
DE RATOS SUBMETIDOS À EPILEPSIA DO LOBO
TEMPORAL INDUZIDA PELA 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.

Orientador: Prof. Dr. Fulvio Alexandre Scorza

Mogi das Cruzes, SP
2006

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu avô Ruy, pessoa de extrema sabedoria e de uma grandeza inigualável. Com sua vivência, guia os passos dos que o procuram e, com seu carinho, está de mãos dadas com os meus sonhos.

Obrigada, meu anjo da guarda, meu amigo, meu apoio. Que sua luz seja sempre enorme. Amo você vovô!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Renato e Beth, pela presença constante, a mão amiga, o amor, o carinho, e também pela educação e minha formação moral, espiritual e profissional, tornando nossa união cada dia maior. Amo vocês.

Ao meu irmão Renatinho, amigo de todos as horas, um ser especial, um cúmplice, um verdadeiro irmão. Estarei sempre com você.

Ao Rodrigo, forma de amor sincera e pura. O destino foi capaz de tornar você a minha vida. Te amo sempre.

A Deus, a base de minha existência, arquitando o Universo de uma forma única, onde me sinto sempre em paz.

Ao professor Dr. Fulvio Alexandre Scorza, pela dedicação, atenção, apoio e amizade. De imensa sabedoria, com seus conhecimentos me ensinou a perseverança, conquista e paciência.

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 e Roberta Monterazzo Cysneiros, pelo apoio técnico-ciêntifico e pela atenção.

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

A Vanessa Abílio, do Departamento de Farmacologia da UNIFESP/EPM, pelo ensinamento e auxílio na realização deste trabalho. Obrigada pelo carinho.

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

Aos amigos Rodrigo de Maio Almeida, Pauline Maria Rangel e Helio Martucci Neto. Vocês foram especiais, pessoas em quem sempre me apoiei e confiei. Sentirei saudades da convivência diária, mas acredito que essas amizades não têm prazo de validade.

Aos amigos do Laboratório de Neurociência (LANEC): Jaque, Mônica, Serginho, Rude, Cássia, Márcio, Aninha, Carla, Dri, Elisa, Fabiano e Leandro pelo apoio e carinho, em especial ao Diego e Aline pela colaboração, atenção e amizade.

Aos amigos do NPT: Talie, Rosane, Ronald, Fernandinho, Maurício, Sérgio, Kleber, Ale, Jack, Bi, Carlinhos, Falconi, Gabi, Sandrinho, Terigi, Andréia, Ivan, Barata, Celso, Vivi, Paula, Marcelo, José Augusto e Bel, pelo apoio, companheirismos e ajuda sempre prestada.

À Fabiane, pela atenção, dedicação, carinho e antes de tudo a amizade. Pessoa que admiro e tenho eterna gratidão.

Aos professores, funcionários e estagiários do NPT, pela dedicação, ensinamento e apoio.

À FAEP e CNPq, pelo apoio financeiro.

A autora

“O caminho da sabedoria é não ter medo de errar, não esquecer a própria essência, lembrar que é melhor ser do que ter e que as coisas simples são mais extraordinárias.”

Paulo Coelho

RESUMO

Objetivo: avaliar o papel exercido pela catalase na morfologia da formação hipocampal de animais submetidos ao *status epilepticus* (SE). **Métodos:** No experimento I, foi realizada a contagem neuronal da formação hipocampal. Os ratos Wistar foram divididos em três grupos para comparação. Grupo (a) controle; (b) ratos que receberam pilocarpina (350mg/kg i.p.) e evoluíram para SE; (c) ratos que receberam pilocarpina e aminotriazol (250mg/kg i.p.) três horas antes e evoluíram para SE. As crises foram interrompidas após duas horas com diazepam (10 mg/Kg i.p.). Os animais foram perfundidos após 90 dias e seus cérebros processados para análise histológica através do método de Nissl. No experimento II, foi realizada a análise bioquímica, através da dosagem da catalase da região hipocampal. Os animais foram divididos em quatro grupos. (a) grupo controle, (b) ratos que receberam pilocarpina e evoluíram para SE, (c) animais que receberam aminotriazol, (d) ratos que receberam aminotriazol e três horas depois foram injetados com pilocarpina e evoluíram para o SE. Os animais foram decaptados 2 horas após, retirada a estrutura hipocampal bilateral, realizada a dosagem da catalase e comparação entre os grupos. **Resultados:** Ocorreu uma redução no número de células dos animais que apresentaram SE; já os animais que foram pré-injetados com aminotriazol, a redução no número de células só foi observada nas subáreas de CA3 e hilo do giro denteado, quando comparados ao grupo controle. No experimento em que foi dosada a enzima catalase, não foram encontrados resultados estatisticamente significativos. **Conclusão:** É evidenciada a morte neuronal em ratos com epilepsia, dentre uma das causas é citado o estresse oxidativo, podendo ser mais observado nas subáreas de CA3 e hilo do giro denteado.

Palavras-Chave: Catalase, Epilepsia, Estresse Oxidativo.

ABSTRACT

Objective: to evaluate the paper practiced for catalase in the hippocampal morphology formation of animals submitted to the status epilepticus (SE). **Methods:** In experiment I, the neuronal counting of the hippocampal formation was carried through. The Wistar rats were divided into three groups for comparison. Group (a) control group; (b) rats that had received pilocarpine (350mg/kg i.p.) e had evolved to SE; (c) rats that had received pilocarpine and aminotriazole (250mg/kg i.p.) three hours before and had evolved to SE. The crises had been interrupted two hours after with diazepam (10 mg/Kg i.p.). The animals were perfused after 90 days and its brains processed for histological analysis through the method of Nissl. In experiment II, the analysis was carried through biochemist, through the dosage of catalase in hippocampus. The animals were divided into four groups. (a) control group, (b) rats that had received pilocarpine and evolved to SE, (c) animal that had received aminotriazole, (d) rats that had received aminotriazole and three hours later were injected with pilocarpine and had evolved to SE. The animals were beheaded 2 hours after, removed the bilateral hippocampal structure, carried through the dosage of catalase and compared the groups. **Results:** A reduction in the cell number of the animals occurred that had presented SE; the animals that were pre-injected with aminotriazole, it was observed a reduction in the cells number in the subareas of CA3 and hilus when compared with the control group. In the experiment where catalase was dosed, they had not founded a statistically significant result. **Conclusion:** The neuronal death in rats with epilepsy is evidenced, where one of the causes is cited oxidative stress, it was more observed in subareas of CA3 and hilus.

Key words: catalase, epilepsy, oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: fotomicrografia da formação hipocampal	32
Figura 2: gráfico do número de células na região CA1	33
Figura 3: gráfico do número de células na região CA3	33
Figura 4: gráfico do número de células na região Hilo	33
Figura 5: gráfico da dosagem da catalase	34

SUMÁRIO

1 Introdução	11
1.1 Epilepsia	11
1.2 Epilepsia do lobo temporal	14
1.3 Modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina	15
1.4 Morte celular	17
1.4.1 Morte celular por necrose	17
1.4.2 Morte celular por apoptose	18
1.4.3 Estresse oxidativo.....	19
1.4.4 Catalase.....	20
2 Justificativa.....	22
3 Objetivo.....	22
4 Material e Métodos	23
4.1 Animais	23
4.2 Ética dos procedimentos experimentais.....	23
4.3 Drogas envolvidas	23
4.4 Indução do modelo de epilepsia pela pilocarpina	24
4.5 Experimento I	24
4.5.1 Grupos experimentais	24
4.5.2 Análise histológica	25
4.5.3 Método de Nissl	25
4.5.4 Contagem neuronal	26
4.6 Experimento II	27
4.6.1 Grupos experimentais	27
4.6.2 Dosagem da catalase em cérebro	27
4.7 Análise dos dados	28
5 Resultados	30
5.1 Análise comportamental	30
5.2 Análise qualitativa	30
5.3 Análise quantitativa	31
6 Discussão.....	35
7 Conclusão.....	38
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 Introdução

1.1 Epilepsia

Os pacientes com epilepsia sempre sofreram preconceito entre os seres humanos. Com a evolução da ciência em epilepsia, muitas manifestações como crises convulsivas, caráter ictal e perda de controle volitivo, obtiveram-se novas explicações. A partir de século XIX, se tornou possível caracterizar a relação existente entre crise convulsiva e alterações do Sistema Nervoso.

A epilepsia é a doença neurológica crônica grave mais comum, que acomete indivíduos independentemente de aspectos étnicos, climáticos ou regionais, com alta incidência e prevalência, provocando grandes repercussões nos aspectos sócio-econômicos (OSUNTOKUN et al., 1987; LI et al., 1985).

O termo epilepsia se refere a um distúrbio da atividade cerebral caracterizada pela ocorrência periódica e espontânea da atividade elétrica altamente sincronizada, acompanhada de manifestações comportamentais, que podem apresentar uma grande variedade de sinais clínicos devido ao caráter focal da atividade epilética. Uma vez desencadeada, essa descarga excessiva pode propagar-se para outras regiões cerebrais incorporando-as à atividade epilética (Mc NAMARA, 1994).

A epilepsia é caracterizada pela presença de crises epiléticas, que são fenômenos clínicos transitórios, decorrentes da descarga excessiva e sincronizada da rede neuronal. As manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes dependem das regiões envolvidas, podendo o paciente apresentar desde um simples sinal motor focal até crises motoras generalizadas. Essas crises podem surgir espontaneamente ou serem desencadeadas por situações como febre, distúrbio eletrolítico, intoxicação e alterações vasculares (PEDLEY et al., 1997).

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; Mc NAMARA, 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, têm 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 à 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).

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).

A primeira proposta para a classificação das crises epiléticas foi anunciada em 1969 por Henri Gastaut, baseada em critérios clínicos, eletroencefalográficos, substrato anatômico, etiologia e idade da ocorrência das crises. Novas técnicas, como a vídeo-eletroencefalografia e

os registros poligráficos só foram possíveis com a revisão da classificação sugerida por Gastaut (ILAE, 1985).

A Liga Internacional contra a Epilepsia publicou a Classificação Internacional das Epilepsias e Síndromes Epilépticas. As crises epiléticas podem ser classificadas em parciais e generalizadas. As crises parciais por sua vez, são divididas em parciais simples e complexas. A crise parcial, pode generalizar-se secundariamente. Dentro desta classificação, as crises parciais simples têm caráter focal, iniciando-se em um sítio cortical com preservação da consciência. As crises parciais complexas são as mais frequentemente observadas na clínica, com presença de sinais focais de origem límbica e são geralmente acompanhadas de alterações da consciência desde o início, com ou sem presença de automatismo, estes orofaciais, acompanhados de embotamento da consciência e geralmente se iniciam no lobo temporal (ILAE, 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, crise mioclônicas e tônico-clônica são exemplo de crises generalizadas. Uma crise de ausência é caracterizada por uma interrupção da atividade, acompanhada de olhar fixo para o infinito com duração de 5 a 15 segundos, seguida do retorno à atividade normal. A crise mioclônica consiste em breves abalos musculares, semelhante 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 frequente é que o paciente apresente um período inicial de atividade tônica seguido por um período de atividade clônica (ILAE, 1981).

As manifestações comportamentais das crises epiléticas são ditadas pelas funções normalmente exercidas pelas regiões corticais nas quais a crise começou, por exemplo, 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. Pode-se também citar que 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. É importante ressaltar que um paciente pode apresentar mais de um tipo de crise epilética (ILAE, 1989).

1.2 Epilepsia do Lobo Temporal

A epilepsia do lobo temporal é a forma mais comum de síndrome epiléptica, 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, em que 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% dos pacientes (ILAE, 1981; MATTSON et al., 1985; PEDLEY et al., 1997).

1.3 Modelo de epilepsia induzido pela pilocarpina

A ausência de modelos experimentais adequados das epilepsias dificultou o estudo sistemático da sua fisiopatogenia. Este fato justificou a procura pelo desenvolvimento de modelos experimentais que simulassem o quadro observado nos humanos. Uma vez que as epilepsias humanas apresentam crises recorrentes e, na maioria das vezes, ocorrem de forma espontânea, os modelos crônicos se revestem de maior importância por mimetizarem, mais adequadamente, a condição humana servindo, portanto, para uma maior caracterização fisiopatológica e para avaliação de drogas antiepilépticas (LEITE et al., 1990).

A administração sistêmica de pilocarpina (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. Essas alterações evoluem progressivamente para crises generalizadas, atingindo o estado de mal epiléptico que produz alterações patológicas cerebrais difusas (TURSKI ,1983a e 1983b; TURSKI et al., 1984).

Aproximadamente após 30 minutos à injeção da pilocarpina, 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 a 8 minutos e evoluem para o

Na análise histopatológica do período crônico deste 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 epiléptico 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 Morte Celular

Vários insultos cerebrais, tais como a isquemia, o traumatismo crânio-encefálico e a epilepsia, podem causar morte neuronal, através de dois fenômenos distintos: necrose e apoptose. (WALKER et al., 1988).

1.4.1 Morte Celular por Necrose

Necrose é o termo que define a soma das alterações morfológicas indicadoras de morte celular, causada pela ação degradadora progressiva de enzimas, podendo afetar grupo de

Um fenômeno interessante da morte celular por necrose se dá quando não há energia suficiente para manter os gradientes iônicos, ocorrendo então o colapso do potencial de membrana dos neurônios. Neste sentido, a despolarização de corrente resulta na liberação de uma quantidade exacerbada do neurotransmissor excitatório glutamato nas fendas sinápticas (KAUPPINEN et al., 1988a; KAUPPINEN et al., 1988b). A recaptura de glutamato por transportadores de alta afinidade encontrados próximos as células gliais e neurônios também é prejudicada pela deficiência de energia. Com este processo, ocorre o aumento excessivo de glutamato nas sinapses, induzindo a hiperexcitação. Recebendo o nome de excitotoxicidade, este processo é caracterizado por episódios convulsivos com prolongada hiperexcitação causando a morte dos neurônios hiperexcitados. (MARTIN et al., 1998; CHOI, 1992; CHEN et al., 2002).

1.4.2 Morte Celular por Apoptose

O termo apoptose é definido pela morte celular programada. A definição original de apoptose foi baseada em critérios morfológicos incluindo encolhimento, condensação, formação de bolhas das membranas citoplasmáticas e nucleares e brotamento de fragmentos celulares. O estudo da apoptose é realizado por várias técnicas, porém as mais utilizadas são *in situ* terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end Labeling (TUNEL) de DNA fragmentado, algumas vezes em combinação com uma coloração para DNA, em seções de tecido e eletroforese em gel de agarose de DNA fragmentado de amostras de tecido homogeneizadas (BENZON et al., 2002). Dentre vários fatores, o estresse mitocondrial produzido por prolongada despolarização, o estresse oxidativo e a abertura dos poros de transição estão envolvidos com a apoptose (REED, 1998).

O estresse mitocondrial ocorre devido a maior parte dos radicais livres ser produzida dentro da mitocôndria. A principal função atribuída à mitocôndria é promover energia à célula, sendo que mais de 90% do ATP necessário aos diversos propósitos biológicos sejam produzidos por esta organela. Um dos processos de extrema importância é a função dos genes da família Bcl-2. Esses genes são determinantes na regulação da permeabilidade mitocondrial e sua função é bloquear as liberações mitocondriais de citocromo *c* em resposta a estímulos

estressores na mitocôndria. Na mesma família de genes, também estão presentes os genes Bcl-*sl*, Bcl-*w* e o gene Bax. (ZHANG et al.,1998; BENGZON et al.,2002).

A liberação do citocromo *c* da mitocôndria induz a morte celular por intermédio da ativação de proteinase aspartato-específica cisteinil (caspase). As caspases compreendem uma família de 14 proteases que, em seu estado proteolísado ativo, funcionam como indicadores e efetores da apoptose (FAHERTY et al., 1999). Sendo assim, sabe-se que, após as crises epiléticas, ocorre uma degeneração neuronal dependente de caspases. Em um trabalho com duas linhagens de camundongos, uma sensível e outra resistente à degeneração neuronal induzida por ácido cáínico, os níveis de caspase-3 ativada após crises epiléticas foram analisados. A caspase-3 ativada foi detectada 30 horas após a administração de ácido cáínico na linhagem sensível antes do aparecimento de picnose da marcação para TUNEL, permanecendo por 4 dias após a injeção de ácido cáínico. Na linhagem resistente, não houve evidência de picnose ou marcação para TUNEL, como também não foi detectada imunoreatividade para caspase-3 (BENGZON et al., 2002).

1.4.3 Estresse oxidativo

Paralelamente ao estresse mitocondrial, o estresse oxidativo ocorre quando há um aumento de espécies reativas de oxigênio, chamadas radicais livres. Dentre essas espécies reativas de oxigênio, podemos encontrar a hidroxila. (DORMANDY, 1989).

Os radicais livres podem se combinar com diversos componentes celulares, alterando sua função. Isso se torna crítico nas lesões oxidativas das membranas lipídicas e bases púricas e pirimídicas das moléculas de DNA. A lesão oxidativa em fosfolipídios é de especial importância, pois a ligação de radicais livres com ácidos graxos da bicamada lipídica pode reagir com um átomo de hidrogênio de uma dupla ligação, iniciando uma reação em cadeia. Este processo termina por produzir alterações estruturais na membrana celular e em seus componentes proteicos, levando a doenças através da morte ou alteração da função celular. Este fenômeno recebe o nome de peroxidação lipídica (BUTTERFIELD; MCGRAW, 1978; DORMANDY, 1989).

1.4.4 Catalase

Os elétrons não pareados em um orbital atômico ou molecular, em sistemas biológicos, são características específicas dos radicais livres, que podem ser formados durante a redução do oxigênio molecular para a formação de água (LOHR, 1991).

Ao receber um elétron, o oxigênio molecular forma o radical aniônico superóxido (O_2^-). Este radical pode sofrer uma reação de dismutação, catalisada pela enzima superóxido dismutase, forma o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (LOHR, 1991). O peróxido de hidrogênio na presença de metais de transição, como o ferro, o cobre e o manganês, pode participar de uma reação, formando o radical hidroxila ($\cdot OH$). Este radical hidroxila é a espécie mais reativa de oxigênio conhecida, que em grande quantidade danifica o Sistema Nervoso, causando morte celular (HALLIWELL, 2001; ARAGON et al., 1991).

Para proteger-se do potencial tóxico das espécies reativas de oxigênio, as células apresentam defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. Nas defesas enzimáticas, pode-se citar dentre outras a catalase, cuja função é catalisar a degradação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) (BAINS; SHAW, 1997; BENZI et al., 1989).

Nem sempre as defesas antioxidantes são suficientes para combater os efeitos deletérios dos radicais livres. Com isso, o desbalanço entre a produção de radicais livres e a ação das defesas antioxidantes pode resultar em uma lesão celular por estresse oxidativo (HALLIWELL, 2001).

Estudos têm sugerido uma importante função protetora da catalase nos processos oxidativos cerebrais, porém o tecido nervoso está m

A atividade catalítica desta enzima pode ser inibida, visto que o inibidor mais utilizado é o aminotriazol, que tem sua ação sobre átomos de ferro contidos na catalase, sendo necessária a presença do peróxido de hidrogênio, para que a inibição ocorra (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985).

2 Justificativa

Dentre os insultos cerebrais agudos, o *status epilepticus* causa a lesão de células do tecido nervoso através de diversos mecanismos, dentre eles o estresse oxidativo. Como o número de trabalhos já publicados sobre a neuroproteção enzimática na morte celular por estresse oxidativo é reduzido, a realização desta pesquisa justifica-se pela necessidade de saber se o número de células lesadas por tal mecanismo poderá sofrer redução pela ação antioxidante da catalase.

3 Objetivo

Avaliar o papel exercido pela catalase sobre a morfologia da formação hipocampal de ratos submetidos à epilepsia do lobo temporal induzida pela pilocarpina, através da administração de aminotriazol, o inibidor da catalase capaz de alterar sua atividade.

4 Material e Métodos

4.1 Animais

Para realizar o experimento deste trabalho foram utilizados ratos machos, da raça Wistar, adultos com aproximadamente 60 dias, pesando entre 200 a 260g, no início dos experimentos. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de São Paulo/ Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/ EPM). Foram alojados em gaiolas apropriadas com livre acesso à comida e à água no Biotério da Universidade de Mogi das Cruzes. Estes biotérios são mantidos a uma temperatura ambiente constante entre $21 \pm 1^\circ \text{C}$, e obedecem a um ciclo claro-escuro de 12 horas (claro: 7h – 19h).

4.2 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).

4.3 Drogas Envolvidas

As substâncias utilizadas neste trabalho foram: o cloridrato de pilocarpina (Merck S.A. Indústrias Químicas), a metil escopolamina (Da Sigma Chemica Co. USA), o aminotriazol (Da Sigma Chemica Co. USA) e o diazepam (Roche, Brasil).

4.4 Indução do Modelo de Epilepsia pela Pilocarpina

Para indução do *status epilepticus*, utilizamos o modelo da pilocarpina. A pilocarpina foi injetada intraperitonealmente (350mg/Kg) e os seus efeitos foram observados e classificados segundo a metodologia descrita por Turski et al. (1983 a).

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

4.5 Experimento I

Neste experimento foi realizada a análise morfológica da formação hipocampal através da contagem neuronal nas subáreas de CA1, CA3 e hilo do giro denteado na região do hipocampo dos grupos estudados.

4.5.1 Grupos Experimentais

a) Animais pertencentes ao grupo controle que receberam pilocarpina, porém não evoluíram para o *status epilepticus* (n = 4).

b) Animais que receberam pilocarpina e evoluíram para o *status epilepticus* (n = 4).

c) Animais que receberam pilocarpina e evoluíram para o *status epilepticus*. Neste grupo, todos os animais receberam aminotriazol (250mg/Kg; i.p.), 3 horas antes da injeção da pilocarpina. (n = 4).

Todos os animais submetidos ao *status epilepticus*, tiveram suas crises bloqueadas após 2 horas com a injeção intraperitonealmente de diazepam (10 mg/kg).

4.5.2 Análise Histológica

Todos os animais foram perfundidos após 90 dias do *status epilepticus*. O tecido cerebral foi retirado para que pudesse ser feita a análise histológica através do Método de Nissl.

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. Foi feito o puncionamento do ventrículo esquerdo com uma agulha e, através desta, foram infundidas as soluções para realizar a limpeza e a fixação do tecido cerebral, ocorrendo a drenagem através da secção dos átrios.

Para realizar a limpeza, a solução utilizada foi de salina tamponada 0,01M e em seguida, a fixação foi realizada com a solução fixadora de Paraformoldeído a 4%. Todas as soluções foram preparadas em tampão fosfato e pH 7,4. A infusão foi feita automaticamente pela bomba de perfusão.

Ao terminar a perfusão, os animais foram guilhotinados e o tecido cerebral de cada animal foi retirado da caixa craniana com o auxílio de uma goiva e colocado em uma solução crioprotetora de sacarose 30%. Estes foram cortados em séries, em secções de 20 µm de espessura no criostato.

4.5.3 Método de Nissl

O Método de Nissl consiste no coramento dos corpos celulares, através da substância Cresil Violeta. Este é um corante básico para que se possa evidenciar o citoplasma dos neurônios, conseqüentemente o Corpúsculo de Nissl, estrutura existente dentro do citoplasma. Essa coloração serve para indicar a viabilidade neuronal, condições dos corpos celulares dos neurônios, pois, na ocorrência de lesão neuronal, esses corpúsculos podem desaparecer, ocorrendo a chamada cromatólise.

Os cortes de 20 μm foram recuperados em lâminas e corados com Cresil Violeta pela técnica de Nissl, que consiste em reidratar os cortes em banhos de álcool em concentração decrescente (absoluto, 90%, 80% e 70%), permanecendo 5 minutos em cada concentração. Em seguida, as lâminas são banhadas em água destilada, a fim de retirar o excesso de álcool para não diluir o corante. Em seqüência, os cortes 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, banham-se novamente os cortes em água destilada, lavando-os rapidamente em diferentes concentrações de álcool, sendo clarificados com xileno. Para finalizar as lâminas, é colocada uma lamínula com um meio de montagem (Entelan).

4.5.4 Contagem Neuronal

A contagem neuronal foi realizada na formação hipocampal, especificamente nas áreas de CA1, CA3 e Hilo do giro denteado (MOURITZEN-DAM, 1982). Para cada animal, foram contadas células em três fatias dos dois hemisférios cerebrais, totalizando seis valores individuais por animal. Foram consideradas somente células com núcleos e nucléolos evidentes, pois os valores de células encontradas nos ratos controles foram utilizados como parâmetros, sendo assim, uma população de células normais de 100%. A contagem neuronal foi realizada por três examinadores, visto que dois não participaram diretamente do estudo. Após colhidos os resultados, obteve-se a média individual e total de cada área hipocampal.

4.6 Experimento II

Neste experimento foi realizada uma análise bioquímica através da dosagem da catalase. Esta dosagem foi realizada na região hipocampal dos animais pertencentes aos grupos estudados.

4.6.1 Grupos Experimentais

- a) Animais pertencentes ao grupo controle, que receberam salina, sofreram as mesmas manipulações e foram decapitados 2 horas após (n = 5);
- b) Animais pertencentes ao grupo que receberam apenas pilocarpina e evoluíram para o *status epilepticus* e foram decapitados 2 horas após (n = 5);
- c) Animais que receberam apenas aminotriazol (250mg/Kg i.p.) e foram decapitados 3 horas após (n = 5);
- d) Animais que receberam pilocarpina, evoluíram para o *status epilepticus*, neste grupo, os animais receberam aminotriazol 3 horas antes da injeção da pilocarpina e foram decapitados após 2 horas de *status epilepticus* (n = 5).

4.6.2 Dosagem da catalase em cérebro

O procedimento de dosagem permitiu quantificar a velocidade da atividade da catalase na decomposição do peróxido de hidrogênio, na região da formação hipocampal, conforme a técnica descrita por Adamo et al., (1989).

Imediatamente após a decapitação dos grupos controles e experimentais foi removida a estrutura do hipocampo de ambos os hemisférios cerebrais e armazenados a -80°C . Cada 1g de tecido foi homogeneizado com 3.0ml de Tampão PO_4 0.1 M e pH 7.0 diluído três vezes, posteriormente o tecido foi centrifugado durante 15 minutos a 3000rpm a uma temperatura 4 - 5°C . Foi coletado 100 μl do sobrenadante e colocado em um eppendorf e conservado em freezer; o restante foi centrifugado durante 20 minutos a 12.000rpm.

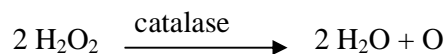
O preparo do meio de reação foi realizado com uma solução com 300 μl de H_2O_2 30%, Mili-Q e acrescentado 3 ml de tampão PO_4 50 mM pH 7.4.

O método baseia-se no acompanhamento espectrofotométrico a 240nm da decomposição do peróxido de hidrogênio promovida pela catalase. A determinação da atividade enzimática deve ser realizada no intervalo de linearidade da variação da absorvância pelo tempo.

A absorvidade molar de H_2O_2 a 240nm é de $0,04\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. A partir da cinética da reação de decomposição do H_2O_2 e variação da absorvância por tempo, podemos estimar a atividade enzimática da catalase na amostra. A leitura é feita em 240nm e 30°C . Cada duplicata é lida durante 180 segundos em intervalos de 30 segundos.

Os resultados foram expressos em Unidades (U) por mg de proteína, onde 1 U é definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a hidrólise de H_2O_2 por minuto.

A reação catalizada pela catalase é a seguinte:



4.7 Análise dos Dados

Na avaliação dos dados, para concluir uma diferença estatística significativa na contagem neuronal e dosagem da catalase nas regiões do hipocampo dos animais, foi utilizada a análise de variância monofatorial (ANOVA), seguido do teste Tukey. Para cada um dos grupos experimentais, consideramos que há diferenças estatisticamente significativas entre os grupos se p for menor que 0,05, onde foram comparados média e desvio-padrão.

5 Resultados

5.1 Análise Comportamental

Primeiramente, os animais foram injetados com aminotriazol e não apresentaram alterações comportamentais. Após 3 horas, os mesmos foram injetados com pilocarpina e passaram a apresentar 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 a cada 2-8 minutos, culminando em estado de mal epiléptico dentro de 50-60 minutos. Descrita por Turski (1983), estes episódios caracterizam o período agudo do modelo experimental da pilocarpina, que perdura por aproximadamente 10 horas, quando os animais se tornavam irresponsivos aos estímulos ambientais, retornando gradativamente ao seu comportamento normal dentro de 24 horas. Neste estudo, os animais permaneceram em *status epilepticus* durante 2 horas e tiveram então suas crises bloqueadas com Diazepam (10mg/Kg) ou foram decapitados.

Os grupos experimentais que receberam apenas aminotriazol e os grupos controles não apresentaram alterações comportamentais.

5.2 Análise Qualitativa

As alterações morfológicas hipocampais em todos os grupos estudados no experimento I de nosso trabalho foram analisadas qualitativamente pelo processo de fotomicrografia. A figura 1A mostra a integridade celular nas subáreas CA1, CA3 e hilo do giro dentado da formação hipocampal dos animais pertencentes ao grupo controle. Os animais que receberam pilocarpina e evoluíram para o *status epilepticus*, apresentaram perda celular significativa nas subáreas hipocampais analisadas, CA1, CA3 e hilo do giro dentado (Figura 1B). Já os animais, que apresentaram *status epilepticus* e foram pré-injetados com

aminotriazol (o inibidor da catalase), também apresentaram uma perda celular em CA1, CA3 e hilo do giro dentado (Figura 1C).

5.3 Análise Quantitativa

A contagem neuronal foi realizada nas subáreas CA1, CA3 e hilo do giro dentado da formação hipocampal em todos os grupos estudados e está exposta nos gráficos (Figura 2, 3, 4). Os animais do grupo controle foram considerados parâmetros, tendo 100% de células íntegras na formação hipocampal (CA1 = $53,000 \pm 2,944$; CA3 = $54,000 \pm 1,732$ e hilo do giro dentado = $50,500 \pm 2,944$). Nos animais que receberam somente pilocarpina e evoluíram para SE, foi observada uma redução estatisticamente significativa no número de células de CA1 = $26,915 \pm 5,508$; CA3 = $33,500 \pm 3,536$ e hilo do giro dentado = $31,000 \pm 5,657$, quando comparados ao grupo controle. No entanto, os animais que foram submetidos ao SE e pré-injetados com aminotriazol, apresentaram uma redução estatisticamente significativa no número de células das subáreas CA3 e hilo do giro dentado (CA3 = $38,000 \pm 6,292$; hilo = $36,000 \pm 4,123$), o que não aconteceu na subárea CA1 = $40,000 \pm 6,397$, quando comparados aos animais do grupo controle.

No experimento II, onde foi realizada a dosagem da catalase na região do hipocampo, os resultados estão demonstrados no gráfico (Figura 4), visto que os animais do grupo a (animais que receberam salina) tiveram como resultado $474,8$ U/mg de proteína $\pm 113,56$ na dosagem da catalase. Os animais do grupo b (animais que receberam pilocarpina), obtiveram 593 U/mg de proteína $\pm 127,14$, do grupo c (animais que receberam aminotriazol) 502 U/mg de proteína $\pm 84,540$, e do grupo d (animais que receberam aminotriazol e três horas após foram injetados com pilocarpina), obtiveram como resultado da dosagem da catalase $620,25$ U/mg de proteína $\pm 106,37$, pois quando comparados os grupos, não foram obtidos resultados estatisticamente significativos.

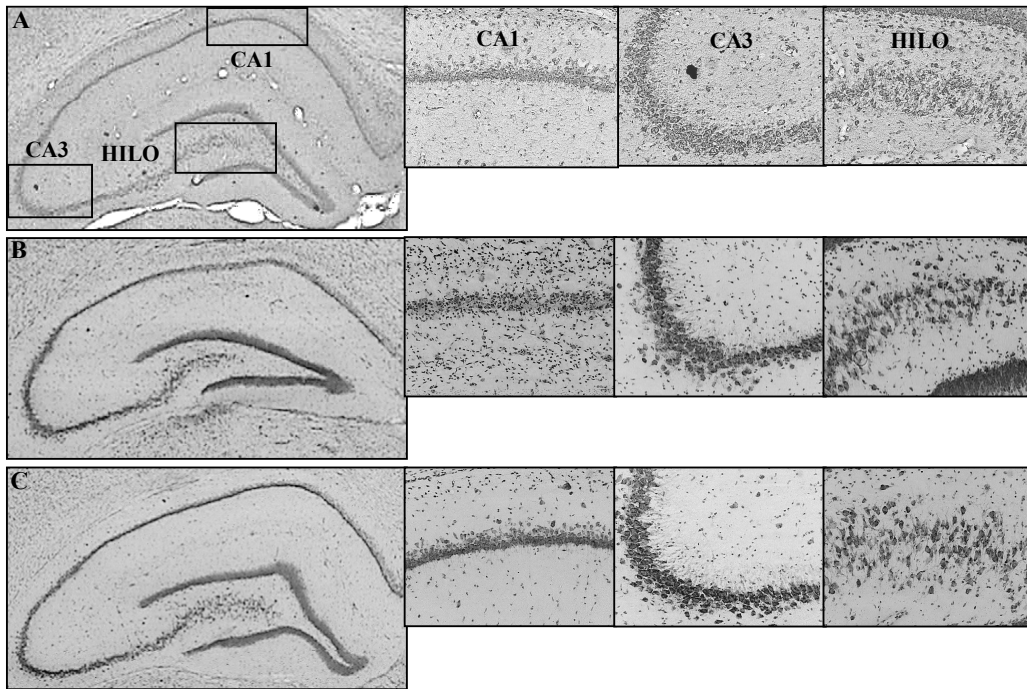


Figura 1: Fotomicrografia da formação hipocampal, corada pelo método de Nissl, onde: (A) ratos controles, (B) ratos que permaneceram em *status epilepticus* por 2 horas, (C) ratos que permaneceram em *status epilepticus* por 2 horas e foram pré-injetados com Aminotriazol.

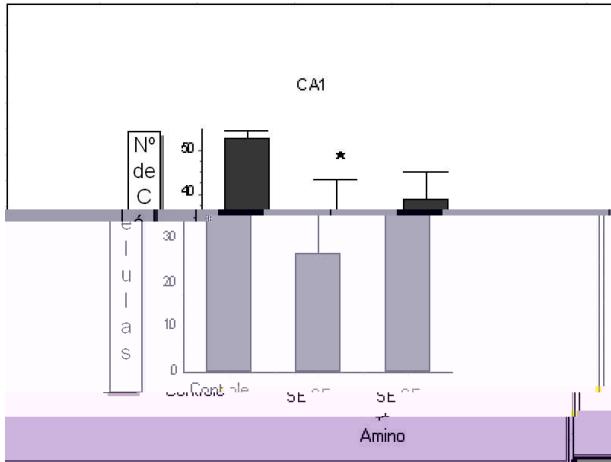


Figura 2: gráfico de contagem neuronal na região CA1

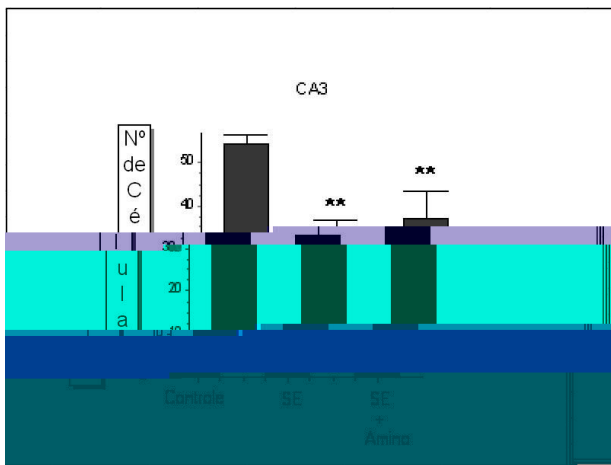


Figura 3: gráfico de contagem neuronal na região CA3

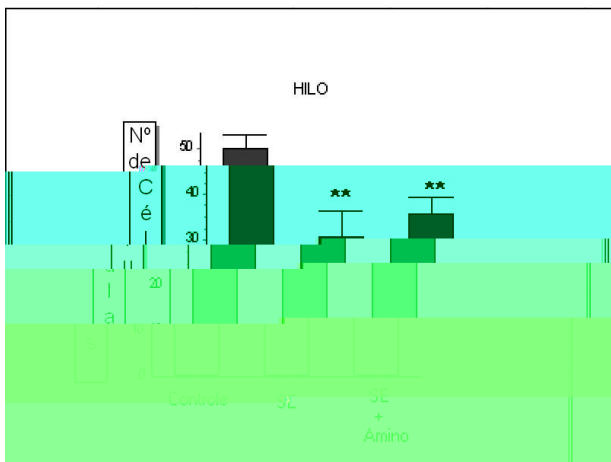


Figura 4: gráfico de contagem neuronal na região do HILO

Dosagem de catalase

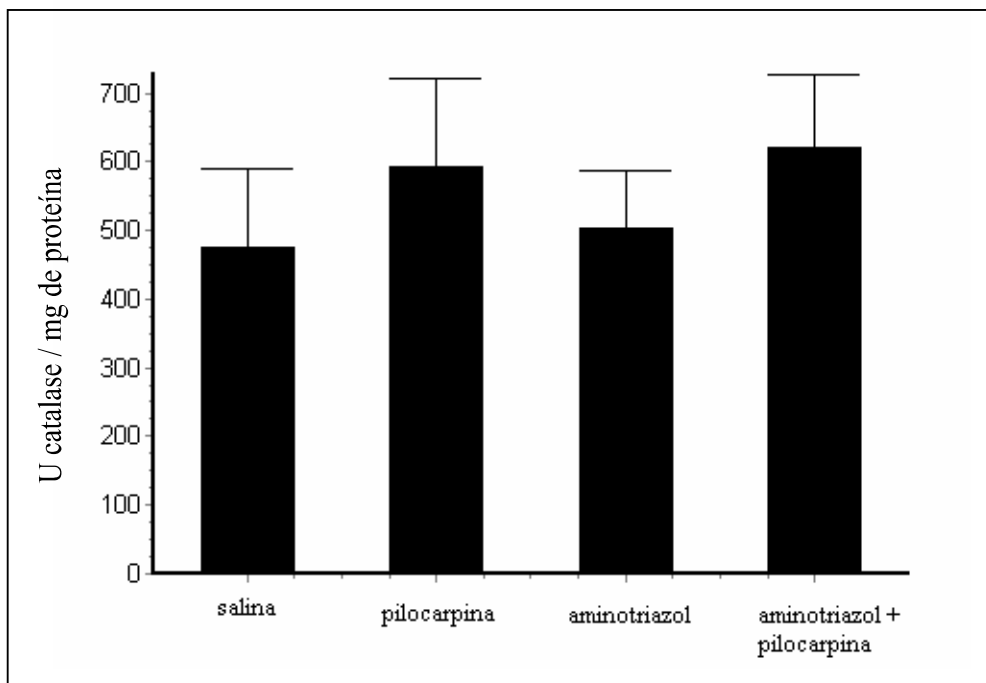


Figura 5: Gráfico da dosagem de catalase. Os dados representam as médias e desvio-padrão da dosagem de catalase na estrutura hipocampal dos ratos controle, que receberam pilocarpina, dos ratos que receberam apenas aminotriazol e dos ratos que receberam aminotriazol e pilocarpina. Os dados foram analisados pela ANOVA, seguido do teste de Tukey. Consideramos diferenças estatisticamente significativas se $P < 0,05$.

6 Discussão

Este trabalho teve como objetivo avaliar o papel da catalase, enzima responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio, frente ao insulto cerebral em ratos, caracterizado pelo estado de mal epiléptico induzido pela pilocarpina. Para isso, foi administrado aminotriazol, o qual se apresenta como um inibidor da catalase, o que nos permitiu visualizar o papel desta enzima frente ao processo de morte celular presente na fase aguda deste modelo de epilepsia.

De fato, o tecido cerebral é mais suscetível ao estresse oxidativo por conter grande quantidade de lipídios oxidáveis, grande concentração de metais como o ferro e o cobre, além de apresentar, em relação aos outros tecidos, uma escassez de mecanismos anti-oxidantes. Também é sabido que durante o estado de mal epiléptico há uma grande produção de espécies reativas de oxigênio, provavelmente devido ao fenômeno de excito-toxicidade mediado pela liberação do neurotransmissor excitatório glutamato (BELLISSIMO et al., 2001).

Segundo Shivakumar e colaboradores (1991) o sistema nervoso contém algumas enzimas anti-oxidantes, entre elas a superóxido-dismutase e a glutathione peroxidase sendo que estas estão presentes em quantidades maiores do que a catalase. Este padrão de enzimas defensoras talvez confira ao cérebro uma maior eficiência em eliminar o íon superóxido e, ao contrário, uma maior dificuldade em eliminar o peróxido de hidrogênio. O acúmulo de peróxido de hidrogênio, por sua vez, pode ser um fator importante para o desencadeamento da produção do radical hidroxil, visto que o cérebro contém uma grande quantidade de ferro e cobre, os quais reagem com o peróxido de hidrogênio, produzindo o radical hidroxil, o qual é responsável pela peroxidação lipídica (CASTAGNE et al 1999).

Estes fatos podem explicar nossos resultados, uma vez que não encontramos diferenças significativas de morte celular e atividade da catalase quando comparamos o grupo de ratos submetidos ao modelo após a administração de aminotriazol e o grupo de animais somente submetidos ao modelo, pois, já que a catalase não se apresenta como o principal mecanismo anti-oxidante do cérebro, inibir a sua atividade (via aminotriazol) não acarretaria necessariamente em maior morte celular.

Em contrapartida, Freitas e colaboradores (2005) encontraram uma maior atividade da catalase em hipocampos de ratos submetidos ao modelo de epilepsia induzida pela pilocarpina. Sabe-se que a crise induzida pela pilocarpina provoca várias alterações de parâmetros relacionados à geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio. Uma elevação na formação de radicais livres pode acarretar no aumento compensatório de enzimas anti-oxidantes sendo que esta ação pode ser confirmada durante o estado de mal epiléptico no córtex frontal, hipocampo e estriado, sendo que este aumento pode até mesmo estar relacionado à modulação de enzimas relacionadas ao catabolismo das espécies reativas de oxigênio.

Em nosso trabalho, contudo, não encontramos diferença significativa na atividade da enzima catalase entre os grupos, o que não era esperado, visto que, mediante a administração de um inibidor da catalase, o que se esperaria era uma menor atividade desta neste grupo. Entretanto, sabe-se que a atividade da catalase é amplamente distribuída nos tecidos, sendo mais abundante no fígado, nos eritrócitos e no rim (PAUL; ENGSTEDT, 1958; LEHNINGER et al., 1995). Ademais, em tecidos normais a catalase dos eritrócitos pode ser bloqueada por inibidores, como a azida; já o aminotriazol é um inibidor seletivo da catalase, com efeito, principalmente, sobre o funcionamento hepático, renal e tireoideano, entretanto não se sabe sua ação na catalase presente nos eritrócitos (DARR; FRIDOVICH, 1986). Assim, se a catalase dos eritrócitos não tiver sido bloqueada pela droga, provavelmente exercerá ação no sistema nervoso, visto que este é bem irrigado; além disso, uma outra possibilidade possível é a de que haja produção de novas enzimas, as quais compensariam aquelas inibidas pela droga, já que a droga é dada em uma quantidade fixa e não se sabe se a mesma impede a produção de novas enzimas.

7 Conclusão

A lesão por estresse oxidativo devido a ausência da neuroproteção enzimática pela catalase, em animais submetidos ao *status epilepticus*, é evidenciada predominantemente nas sub-áreas de CA3 e hilo do giro denteado. Quando comparamos o grupo de animais que recebeu pilocarpina e evoluiu para *status epilepticus* com o grupo que recebeu aminotriazol e pilocarpina e evoluiu para *status epilepticus*, não obtivemos resultados estatisticamente significativo. Assim, futuros estudos serão necessários para melhor exatidão e compreensão da neuroproteção e morte celular.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ADAMO, A.M.; LLESUY, S.F.; PASQUINI, J.M.; BOVERIS, A. Brain chemiluminescence and oxidative stress in hyperthyroid rats. **Biochem. J.**, v. 263, p. 273-277, 1989.
- ARAGON, C.M.G.; ROGAN, F.; AMIT, Z. Dose- and time-dependent effect of na acute 3-amino-1,2,4-triazole injection on rat brain catalase activity. **Biochem. Pharmacol**, v. 42, p. 699-702, 1991.
- 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.
- BAINS, J.S.; SHAW, C.A. Neurodegenerative disorders in humans: the role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. **Brain Res. Brain Res Ver.**, v.25, p.335-358, 1997.
- BELLISSIMO, MI; AMADO, D; ABDALLA, DS; FERREIRA, EC; CAVALHEIRO, EA; NAFFAH-MAZZACORATTI, MG. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Res.** v. 46, p. 121-128, 2001.
- BENZON, J. et al. Neuronal apoptosis after brief and prolonged seizures. **Progress in Brain Research**, v.135, p.111-119, 2002.
- BENZI, G.; PASTORIS, O.; MARZATICO, F.; VILA, R.F. Age-related effect induced by oxidative stress on the cerebral glutathione system. **Neurochem. Res.**, v.14, p. 473-481, 1989.
- BUTTERFIELD, J.D.; MCGRAW, C.P. Effect of DPPD (diphenyl-para-phenylenediamine) on stroke and cerebral edema in gerbils. **Free radical pathology**, v. 9, p. 443-445, 1978.
- CASTAGNE, V; GAUTSCHI, M; LEFEVRE, K; POSADA, A; CLARKE, PG. Relationships between neuronal death and the cellular redox status. Focus on the developing nervous system. **Prog Neurobiol**, v. 59, p. 397-423, 1999.
- CAVALHEIRO,E.A. et al. Long-term effects of pilocarpine in rats: Structural damage of the brain tiggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia.** v.32, p. 778-782, 1991.
- CAVALHEIRO, E.A. The pilocarpine model of epilepsy. **The Italian Journal of Neurological Sciences**, v.16, p. 33-37,1995.
- CHEN, Z. et al. Excitotoxic neurodegeneration induced by intranal administration of kainic acid in C57BL/6 mice. **Brain Res**, v. 931, p. 135-145, 2002.
- CHOI, D.W. Excitatory cell death. **Journal of Neurobiol**, v. 23, p. 1261-1276, 1992.
- DANIEL, H; LOWENSTEIN, M.D.; BRAIN, K.; ALLDREDGE, P.D. *Status Epilepticus*. **The New England Jornal of Medicine**, v.12, p. 156-170, 1998.

DARR, D; I. FRIDOVICH. Irreversible inactivation of catalase by 3-amino-1,2,4 triazole. **Biochem. Pharmacol**, v. 35, p.36-42, 1986.

DODRIL, C.B.; WILKUS, R.F.; OJEMANN, G.A.; WYLER, A.R. Multidisciplinary prediction of seizure relief from cortical resection surgery. **Ann. Neurol.** v.20,p. 2-12, 1986.

DORLAND, W.B. **Dorland's Illustrated Medical Dictionary.** v.28, p. 1148, Ed Manole, 1999.

DORMANDY, T.L. Free radicals pathology and medicine: a review. **J. R. Coll. Physicians Lond**, v. 23, p. 221-227, 1989.

FAHERTY, C.L.; XANTHODAKIS,S.; SMEYNE, R.J. Caspases-3-dependent neuronal death in the hippocampus following kainic acid treatment. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 70, p. 159-163, 1999.

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

FREITAS, R.M.; VASCONCELOS, S.M.; SOUZA, F.C.; VIANA, G.S.; FONTELES, M.M. Oxidative stress in the hippocampus after pilocarpine-induced status epilepticus in wistar rats. **FEBS J.**, v.272, p.1307-1312, 2005.

FREITAS, R.M.; NASCIMENTO, V.S.; VASCONCELOS, S.M.; SOUZA, F.C.; VIANA, G.S.; FONTELES, M.M. Catalase activity in cerebellum, hippocampus, frontal cortex and striatum after status epilepticus induced by pilocarpine in wistar rats. **Neuroscience Lett**, v.28, p. 1793-1797, 2004.

GALILI-MOSBERG, R.; GIL-AD, I.; WEIZMAN, A.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Haloperidol-induced neurotoxicity – possible implications for tardive dyskinesia. **J.Neural Transm.**, v.107, p. 479-490, 2000.

HALLIWELL, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. **Drugs and Aging**, v.18, p.685-716, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. **Lancet**, v.2, p.1095, 1985.

HAUSEN, W.A.; KURLAND, L.T. The epidemiology of epilepsy in Rochester, Minnesota, 1935 though 1937. **Epilepsia**, v.16, p. 1-66, 1975.

ILAE - International League Against Epilepsy. Commission on Classification and Terminology. The Proposal for revised Clinical and Electroencephalographic Classification of Epileptic Seizures. **Epilepsia**, v. 22, p. 489-501, 1981.

ILAE - International League Against Epilepsy. Commission on Classification and Terminology. Proposal for revised classification of Epilepsies and Epileptic Syndromes. **Epilepsia**, 26, v. 1, p. 268-278, 1985.

ILAE - International League Against Epilepsy. Commission on Classification and Terminology. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. **Epilepsia**, v.30, p. 389-399, 1989.

JALLON, P.; GOUMAZ, M.; HAENGELLI, C.; MORABIA, A. Incidence of first epileptic seizure in the canton of Geneva, Switzerland. **Epilepsia**, v.38, p. 547 – 552, 1997.

KAUPPINEN, R.A. et al. Glucose deprivation depolarizes plasma membrane of cultured astrocytes and collapses transmembrane potassium and glutamate gradients. **Neuroscience**, v.26, p.283-289, 1988a.

KAUPPINEN, R.A.; Mc MAHON, H.T.; NICHOLLS, D.C. Ca^{2+} - dependent and Ca^{2+} -independent glutamate release, energy status and cytosolic free Ca^{2+} concentration in isolated nerve terminals following metabolic inhibition: possible relevance to hypoglycaemia and anoxia. **Neuroscience**, v. 27, p. 175-182, 1988b.

LEHNINGER, A; NELSON, D.E; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**, v. 13, p.335-342. ed. Sarvier, 1995.

LEIST, M.; JAATTELA, M. Four deaths and a funeral; from caspases to alternative mechanisms. **Nature Rev Mol Cell Biol**, v. 2, p. 589-598, 2001.

LEITE, J.P.; BORTOLOTO, Z.A.; CAVALHEIRO, E.A.- Spontaneous recurrent Seizures in Rats: Na Experimental Model of Partial Epilepsy. **Neuroscience & Behavioral Reviews**, v.14, p. 511-517, 1990.

LI, S.C.; SCHOENBERG, B.S.; WANG, C.C.; CHEN, X.M.; ZHOU, S.S.; BOLIS, C.L. Epidemiology of epilepsy in urban areas of the People's Republic of China. **Epilepsia**, v.26, p. 391-394, 1985.

LOHR, J.B. Oxygen free radicals and neuropsychiatric illness. **Arch. Gen. Psychiat**, v.48, p. 1097-1106, 1991.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **Am J Pathol**, v. 146, p. 3-15, 1995.

MARTIN, L.J. et al. Neurodegeneration excitotoxicity, global cerebral ischemia, and target deprivation: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. **Brain Res Bull**, v. 46, p. 281-309, 1998.

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.

Mc NAMARA, J.O. Cellular and molecular basis of epilepsy. **J. Neurosci.**, v.14, p. 3413-3425, 1994.

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.

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

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

OSUNTOKUN, B.O.; ADEUJA, A.O .G.; NOTTIDGE, V.A . Prevalence of the Epilepsies in nigerian africans: A community – based study. **Epilepsia**, v. 28, p. 272-279, 1987.

PAUL, KG; ENGSTEDT, LM. Normal and abnormal blood catalase activity in adults. **Scand J Clin Lab Invest**, v. 10, p. 26-33, 1958.

PEDLEY, T.A.; SCHEVER, M.L.; WALCZAK, T.S. Epilepsia- In: **Merritt Tratado de Neurologia**, v. 9.ed. Guanabara Koogan, 1997.

REED, J.C. Bcl-2 family proteins. **Oncogene**, v.17, p. 3225-3236, 1998.

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

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.

SHIVAKUMAR BR, ANANDATHEERTHAVARADA HK, RAVINDRANATH V. Free radical scavenging systems in developing rat brain. **Int J Dev Neurosci**, v.9, p. 181-185, 1991.

TRUSKI, 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.

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

TURSKI, W.A.; CAVALHEIRO, E.A.; BORTOLOTTI, Z.A.; MELLO, L.E.M.; SCHWARZ, M.; TURSKI, L. Seizures produced by pilocarpine in mice: A behavioural, electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Research**, v. 321, p. 237-253, 1984.

VAN CRUCHTEN, S.; VAN DEN BROEK. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. **Anat. Histol. Embriol.**, v. 31, n. 4, p. 214-223, 2002.

WALKER, N.I. et al. Patterns of cell death. **Methods Achiev Exp Pathol**, v. 13, p. 18-54, 1988.

WOLF, H.K.; MULLER, M.B.; SPALE, M.; ZENTLER, J.; SCHRAMM, J.; WIESTLER, O.D. Ganglioma: a detailed histopathological and immunohistochemical analysis of 61 cases. **Acta Neuropathol**, v.88, p. 166-173, 1994.

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

ZHANG, L.X. et al. Apoptosis of hippocampal neurons after amygdala kindled seizures.
Brain Res Mol Brain Res, v. 55, p. 198-208, 1998.

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](#)