



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

**EFEITOS DO LEVETIRACETAM NO MODELO DE CONVULSÕES
INDUZIDAS POR PILOCARPINA EM CAMUNDONGOS**

ALINE DE ALBUQUERQUE OLIVEIRA

Fortaleza-CE

2005

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

ALINE DE ALBUQUERQUE OLIVEIRA

**EFEITOS DO LEVETIRACETAM NO MODELO DE CONVULSÕES INDUZIDAS
POR PILOCARPINA EM CAMUNDONGOS**

Fortaleza-CE

2005

Aline de Albuquerque Oliveira

Efeitos do levetiracetam no modelo de convulsões induzidas por pilocarpina em camundongos

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

Orientadora:

Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles

Fortaleza

2005

O45e Oliveira, Aline de Albuquerque

Efeitos do levetiracetam no modelo de convulsões induzidas por pilocarpina em camundongos / Aline de Albuquerque Oliveira – Fortaleza, 2005.

128f : il.

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

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

1.Levetiracetam. 2.Pilocarpina. 3.Convulsões- quimioterapia.I.

Título.

CDD 615.78

Aline de Albuquerque Oliveira

Efeitos do levetiracetam no modelo de convulsões induzidas por pilocarpina em camundongos

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

Aline de Albuquerque Oliveira

Data da aprovação: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marta Maria de França Fonteles

Orientadora da Dissertação

Profa. Dra. Francisca Cléa Florenço de Sousa
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – UFC

Profa. Dra. Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos
Instituto Superior de Ciências Fisiológicas/ Curso de Medicina – UECE

A Deus, razão da minha existência,
que me dá forças e ilumina meus
caminhos.

À minha querida mãe, Lucíola, pela dedicação e apoio, e ao meu pai, Edson, não mais presente entre nós, mas vivo nos nossos pensamentos.

**“ Senhor,
Fazei-me um instrumento de vossa paz.
Onde houver ódio, que eu leve o amor,
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão,
Onde houver discórdia, que eu leve a união,
Onde houver dúvidas, que eu leve a fé,
Onde houver erro, que eu leve a verdade,
Onde houver desespero, que eu leve a esperança,
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria,
Onde houver trevas, que eu leve a luz.
Ó Mestre... Fazei que eu procure mais consolar do que ser consolado,
Compreender do que ser compreendido,
Amar do que ser amado,
Pois é dando que se recebe,
É perdoando que se é perdoado,
É morrendo que se vive para a vida eterna...”**

Autor desconhecido

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. *Marta Maria de França Fonteles*, minha orientadora e alguém que representa muito do que eu gostaria de ser. Muito obrigada pela compreensão, exemplo, apoio, incentivo, dedicação e amizade.

Às Profas. Dras. *Francisca Cléa Florenço de Sousa e Silvânia Maria Mendes de Vasconcelos* o meu sincero agradecimento pelo enriquecedor convívio e por, prontamente, terem aceito o convite para participar da minha banca examinadora.

À Profa. Dra. *Glauce S. de Barros Viana*, por quem tenho grande admiração, pela sua colaboração preciosa e pela acolhida no Laboratório de Neurofarmacologia.

À *Viviane da Silva Nascimento* pela valiosa ajuda na realização deste trabalho, além da amizade e confiança.

Ao *Rivelilson Mendes Freitas* pela ajuda imprescindível, obrigada por tudo!

Ao meu noivo, *Lourival Costa e Silva Neto*, por tudo que representa na minha vida e pelo amor compartilhado todos os dias!

À *minha mãe, meus avós, tias-avós, tios e primos* que me deram apoio e incentivo, não somente durante o curso de mestrado, mas em toda a vida!

Aos alunos de iniciação científica *João Paulo, Márcia e Francisco Noé*, pela presteza e disposição em ajudar (a participação de vocês foi muito valiosa!).

À turma do Laboratório de Neurofarmacologia e aos amigos e professores do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, em especial: Lissiana, Carlos Renato, Carla Thiciane, Hélio, Danielle, Cícero, João Paulo, Flávio, Patrícia, Emanuelle, Vera, Letícia, Kalyne e Juvênia, pela ajuda, direta ou indireta, e pela amizade.

Às técnicas Vilani e Jaqueline, que me ajudaram em vários momentos desse trabalho.

O meu sincero agradecimento à Coordenação do Curso de Pós-Graduação e aos demais colegas de pós-graduação que me acompanharam durante esse período de realização do curso de Mestrado.

Aos meus amigos, por estarem presentes em tantos momentos, bons ou difíceis, tornando minha vida mais feliz!

À CAPES, pelo apoio financeiro, essencial para realização desse trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|--|-------|
| LISTA DE TABELAS | xv |
| LISTA DE QUADROS | xvi |
| LISTA DE FIGURAS | xvii |
| RESUMO | xx |
| ABSTRACT | xxii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | xxiii |
| INTRODUÇÃO | 1 |
| 1. Considerações gerais | 1 |
| 2. Levetiracetam | 3 |
| 2.1. Descrição | 3 |
| 2.2. Apresentação | 4 |
| 2.3. Farmacocinética | 4 |
| 2.4. Eficácia | 5 |
| 2.4.1. Eficácia como tratamento adjuvante das convulsões parciais em adultos | 5 |
| 2.4.2. Eficácia em crianças | 6 |
| 2.4.3. Eficácia em convulsões generalizadas | 6 |
| 2.5. Tolerabilidade | 6 |
| 2.6. Outras indicações | 7 |
| 2.7. Estudos em andamento | 7 |
| 3. Epilepsia | 7 |
| 3.1. Classificação das crises epiléticas | 7 |
| 3.1.1. Crises epiléticas parciais | 8 |
| 3.1.2. Crises epiléticas generalizadas | 9 |
| 3.2. Fisiopatologia da epilepsia | 11 |
| 3.2.1. O sistema colinérgico muscarínico e a epilepsia | 11 |
| 3.2.2. O sistema dopaminérgico e a epilepsia | 15 |
| 3.2.3. Outros neurotransmissores e a epilepsia | 19 |
| 3.3. Modelos experimentais de epilepsia | 21 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.4. | Modelo colinérgico de convulsão | 24 |
| 3.5. | As áreas cerebrais e o modelo de epilepsia induzido por pilocarpina | 28 |
| 3.6. | Espécies reativas derivadas do oxigênio (Eros) e a epilepsia | 29 |
| 3.6.1. | Radicais livres e “espécies reativas de oxigênio” | 29 |
| 3.6.2. | Sistemas de defesa antioxidante | 30 |
| 3.6.3. | Estresse oxidativo e epilepsia | 32 |
| 4. | Ações do levetiracetam nos modelos experimentais de epilepsia | 32 |

| | |
|------------------|----|
| OBJETIVOS | 35 |
|------------------|----|

| | |
|---------------------------|----|
| MATERIAL E MÉTODOS | 36 |
|---------------------------|----|

| | | |
|------|---|----|
| 1. | Animais | 36 |
| 2. | Preparação das drogas | 36 |
| 2.1. | Levetiracetam | 36 |
| 2.2. | Pilocarpina | 36 |
| 2.3. | Oxotremorina | 36 |
| 2.4. | Atropina | 37 |
| 3. | Tratamento dos grupos experimentais | 37 |
| 4. | Estudo comportamental | 37 |
| 4.1. | <i>Alterações comportamentais após indução de convulsões e estado epilético pela administração de pilocarpina</i> | 37 |
| 4.2. | Teste dos tremores induzidos por oxotremorina (avaliação dos efeitos colinérgicos) | 38 |
| 5. | Material utilizado nos experimentos | 39 |
| 6. | Dissecação das áreas cerebrais em estudo | 40 |
| 7. | Determinação da densidade de receptores muscarínicos ($M_1 + M_2$, M_1 e M_2 -símile) | 42 |
| 7.1. | Método | 42 |
| 7.2. | Procedimento experimental | 42 |
| 7.3. | Soluções reagentes | 43 |
| 8. | Determinação da densidade dos Receptores Dopaminérgicos | 44 |
| 8.1. | Método | 45 |

| | | |
|-------|---|----|
| | | 13 |
| 8.2. | Procedimento experimental | 45 |
| 8.3. | Soluções reagentes | 46 |
| 9. | Dosagem de proteína | 48 |
| 9.1. | Método | 48 |
| 9.2. | Soluções reagentes | 48 |
| 10. | Determinação da Atividade Acetilcolinesterásica (AChE) | 49 |
| 10.1. | Método | 49 |
| 10.2. | Soluções reagentes | 50 |
| 11. | Determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) | 50 |
| 11.1. | Método | 50 |
| 11.2. | Soluções reagentes | 51 |
| 12. | Determinação da produção de nitrito | 52 |
| 12.1. | Método da preparação da curva-padrão | 52 |
| 12.2. | Procedimento experimental | 52 |
| 12.3. | Solução reagente | 52 |
| 13. | Determinação da atividade da catalase | 53 |
| 13.1. | Método | 53 |
| 13.2. | Procedimento experimental | 53 |
| 13.3. | Soluções reagentes | 53 |
| 14. | Determinação da concentração da glutathiona reduzida (GSH) | 54 |
| 14.1. | Método | 54 |
| 14.2. | Procedimento experimental | 54 |
| 14.3. | Soluções reagentes | 55 |
| 15. | Análise estatística | 56 |
| | RESULTADOS | 57 |
| 1. | Estudo comportamental | 57 |
| 1.1. | Alterações comportamentais induzidas por pilocarpina em camundongos pré-tratados ou não com levetiracetam (LEV) | 57 |
| 1.2. | Efeitos do pré-tratamento com LEV nos tremores induzidos por oxotremorina | 59 |

| | |
|---|-----|
| | 14 |
| 2. Estudo neuroquímico | 61 |
| 2.1. Densidade de receptores muscarínicos ($M_1 + M_2$ -, M_1 - e M_2 - símile) em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com levetiracetam e administrados ou não com pilocarpina | 61 |
| 2.2. Densidade de receptores dopaminérgicos (D_1 - e D_2 - símile) em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com levetiracetam e administrados ou não com pilocarpina | 65 |
| 2.3. Efeitos do LEV200 sobre a atividade da acetilcolinesterase em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400 | 70 |
| 2.4. Efeitos do LEV200 sobre a produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400 | 73 |
| 2.5. Efeitos do LEV200 sobre a produção de nitrito em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400 | 76 |
| 2.6. Efeitos do LEV200 sobre a atividade da catalase em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400 | 79 |
| 2.7. Efeitos do LEV200 sobre a concentração da glutatona reduzida (GSH) após a administração de P400 em hipocampo e corpo estriado de camundongos | 82 |
| DISCUSSÃO | 85 |
| CONCLUSÕES | 98 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 100 |

LISTA DE TABELAS**RESULTAD****OS**

| | | |
|------------------|--|----|
| Tabela 1- | Efeitos do LEV nas alterações comportamentais e convulsões induzidas por P400 em camundongos | 58 |
| Tabela 2- | Efeitos do LEV na intensidade dos tremores induzidos por oxotremorina | 60 |
| Tabela 3- | Efeitos do LEV200, administrado antes das convulsões induzidas por P400, sobre a densidade (fentomoles/mg de proteína) de receptores colinérgicos muscarínicos em hipocampo de camundongos | 62 |
| Tabela 4- | Efeitos do LEV200, administrado antes das convulsões induzidas por P400, sobre a densidade (fentomoles/mg de proteína) de receptores dopaminérgicos em hipocampo de camundongos | 66 |

LISTA DE QUADROS**INTRODUÇÃO**

| | | |
|------------------|--|----|
| Quadro 1- | Classificação dos diferentes tipos de crises epiléticas | 10 |
| Quadro 2- | Precusores e enzimas envolvidas na síntese e na metabolização da acetilcolina (ACh), e metabólitos formados | 12 |
| Quadro 3- | Localização dos receptores muscarínicos no Sistema Nervoso Central (SNC) e segundos mensageiros | 13 |
| Quadro 4- | Efeitos da estimulação colinérgica sobre os níveis dos segundos mensageiros | 14 |
| Quadro 5- | Precusores e enzimas necessárias para a síntese de dopamina (DA), enzimas metabolizadoras e metabólitos formados | 17 |
| Quadro 6- | Localização no Sistema Nervoso Central (SNC) dos receptores dopaminérgicos e segundos mensageiros | 18 |
| Quadro 7- | Modelos experimentais de epilepsia | 23 |

MATERIAL E MÉTODOS

| | | |
|------------------|---------------------------------------|----|
| Quadro 1- | Parâmetros comportamentais observados | 38 |
|------------------|---------------------------------------|----|

xvii

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

| | | |
|------------------|--------------------------------------|---|
| Figura 1- | Estrutura molecular do levetiracetam | 4 |
|------------------|--------------------------------------|---|

MATERIAL E MÉTODOS

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1- | Dissecação cerebral mostrando a retirada do encéfalo | 40 |
| Figura 2- | Dissecação cerebral mostrando a retirada do hipocampo | 41 |
| Figura 3- | Dissecação cerebral mostrando a retirada do corpo estriado | 41 |

RESULTADOS

| | | |
|------------------|--|----|
| Figura 1- | Curva dose-resposta do LEV: Efeito sobre as latências de convulsão e morte induzidas pela administração de P400 | 59 |
| Figura 2- | Efeitos do LEV200 sobre a densidade de receptores colinérgicos muscarínicos em hipocampo de camundongos tratados ou não com P400 | 63 |
| Figura 3- | <i>Plot</i> de Scatchard representativo e Curva de saturação de <i>binding</i> – [³ H]-NMS | 64 |
| Figura 4- | Efeitos do LEV200 sobre a densidade de receptores dopaminérgicos em hipocampo de camundongos tratados ou não com P400 | 67 |
| Figura 5- | <i>Plot</i> de Scatchard representativo e curva de saturação de <i>binding</i> – [³ H]-SCH 23390 | 68 |
| Figura 6- | <i>Plot</i> de Scatchard representativo e curva de saturação de <i>binding</i> – [³ H]-espiroperidol | 69 |
| Figura 7- | Efeitos do LEV200 sobre a atividade da AChE em hipocampo de camundongos durante as convulsões induzidas por P400 | 71 |
| Figura 8- | Efeitos do LEV200 sobre a atividade da AChE em corpo estriado de camundongos durante as convulsões induzidas por P400 | 72 |

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 9- | Verificação da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) após a administração de P400 em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com LEV200 | 74 |
| Figura 10- | Verificação da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) após a administração de P400 em corpo estriado de camundongos pré-tratados ou não com LEV200 | 75 |
| Figura 11- | Verificação da produção de nitrito após administração de P400 em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com LEV200 | 77 |
| Figura 12- | Verificação da produção de nitrito após administração de P400 em corpo estriado de camundongos pré-tratados ou não com LEV200 | 78 |
| Figura 13- | Atividade da catalase, após a administração de P400, em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não LEV200 | 80 |
| Figura 14- | Atividade da catalase, após a administração de P400, em corpo estriado de camundongos pré-tratados ou não LEV200 | 81 |
| Figura 15- | Efeito do LEV200 sobre a concentração de glutathione reduzida (GSH) em hipocampo de camundongos tratados ou não com P400 | 83 |
| Figura 16- | Efeito do LEV200 sobre a concentração de glutathione reduzida (GSH) em corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400 | 84 |

RESUMO

EFEITOS DE LEVETIRACETAM NO MODELO DE CONVULSÕES INDUZIDAS POR PILOCARPINA EM CAMUNDONGOS. ALINE DE ALBUQUERQUE OLIVEIRA. Orientadora: Marta Maria de França Fonteles. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-graduação em Farmacologia. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, UFC, 2005.

O levetiracetam (LEV) é uma nova droga antiepiléptica, com eficácia na terapia adicional das convulsões parciais e em vários modelos experimentais de convulsão, inclusive nas convulsões induzidas por pilocarpina em roedores. Objetivando investigar se o mecanismo de ação anticonvulsivante do LEV está relacionado a alterações no sistema colinérgico muscarínico, camundongos machos adultos receberam injeções de LEV uma hora antes da administração de agonistas muscarínicos. O pré-tratamento com LEV (30, 50, 100 ou 200 mg/Kg, i.p.) aumentou significativamente as latências de convulsão, de *status epilepticus* e de morte no modelo de convulsões induzidas por pilocarpina, 400 mg/Kg, s.c. (P400). O pré-tratamento com LEV (200 mg/Kg, i.p., LEV200) levou à ausência de convulsões em 53% (20/38) dos animais; reduziu a ocorrência de *status epilepticus* em 58% (22/38); aumentou a latência de morte em 116% comparada ao grupo P400; protegeu 61% (23/38) dos animais da morte e, ainda, reduziu a intensidade dos tremores induzidos por oxotremorina (0,5 mg/kg, i.p). Ensaio de *binding* com [³H]-N-metilescopolamina em hipocampo mostraram que o pré-tratamento com LEV200 reverte a *downregulation* dos receptores muscarínicos de acetilcolina, induzida por P400, normalizando a densidade desses receptores. Todavia, ensaios para subtipos específicos de receptores muscarínicos revelaram que a administração de P400 ou LEV200, isoladamente, resulta em *downregulation* dos subtipos M₁ e M₂, respectivamente. A ação agonista-símile do LEV nos receptores pré-sinápticos inibitórios M₂, observada no presente estudo, poderia contribuir para explicar a redução nos tremores induzidos por oxotremorina e o retardo na instalação das convulsões induzidas por P400, através da atenuação da atividade neuronal mediada pelos receptores M₁. Ensaio de *binding* com [³H]-espiroperidol demonstraram uma *downregulation* dos receptores dopaminérgicos D₂, induzida pela administração isolada de LEV200. Embora esse efeito tenha sido revertido na presença de P400, talvez possua alguma influência na ação protetora oferecida por LEV200, considerando que a estimulação desses receptores reduz a intensidade das convulsões induzidas pela pilocarpina. Objetivando investigar se o efeito protetor demonstrado pelo LEV envolve propriedades antioxidantes, análises neuroquímicas foram realizadas em hipocampo e corpo estriado. A administração de P400 aumentou a ocorrência de peroxidação lipídica no hipocampo, considerado principal foco de instalação das convulsões provocadas por agentes colinérgicos, demonstrando e confirmando o envolvimento de espécies deletérias na injúria cerebral produzida por esse modelo de convulsões. O pré-tratamento com LEV200 reverteu esse efeito, fornecendo indícios de uma atividade antioxidante dessa droga. Nossos estudos também mostraram uma diminuição da produção de nitrito e estabilização da atividade da catalase no hipocampo e corpo estriado e o aumento dos níveis de glutathiona reduzida no hipocampo, decorrentes do tratamento com LEV antes de P400. A ação antioxidante do LEV foi evidenciada em várias etapas envolvidas no processo de dano oxidativo, sugerindo um novo mecanismo através do qual essa droga poderia exercer seus efeitos protetores.

ABSTRACT

xxii

EFFECTS OF LEVETIRACETAM ON PILOCARPINE-INDUCED SEIZURES IN MICE. ALINE DE ALBUQUERQUE OLIVEIRA. Supervisor: Marta Maria de França Fonteles. Master degree's thesis. Graduation Course in Pharmacology. Department of Physiology and Pharmacology- UFC, 2005.

Levetiracetam (LEV) is a new antiepileptic drug effective as adjunctive therapy for partial seizures and in experimental models of seizures, including pilocarpine-induced seizures in rodents. Objectifying to clarify if anticonvulsant activity of LEV occurs near cholinergic muscarinic alterations, adult male mice received LEV injections before muscarinic agonists' administration. Pretreatment with LEV (30, 50, 100 or 200 mg/Kg, i.p.) increased the latency of seizures, latency of *status epilepticus* and latency of death on the seizure model induced by pilocarpine, 400 mg/Kg, s.c. (P400). LEV (200 mg/Kg, i.p., LEV200) pretreatment abolished seizures in 53% (20/38) of the animals; reduced *status epilepticus* appearance in 58% (22/38); increased death's latency in 116% compared to P400 group; protected 61% (23/38) of the animals from death and also reduced the intensity of tremors induced by oxotremorine (0,5 mg/kg, i.p). [³H]-*N*-methylscopolamine binding assays in mice hippocampus showed that LEV200 pretreatment reverts the downregulation on muscarinic acetylcholine receptors (mAChR), induced by P400 administration, bringing back these density values to control ones (0,9% NaCl, i.p.). However, subtype-specific binding assays revealed that P400 and LEV200 alone treatments results in M₁ and M₂ subtypes decrease, respectively. The agonist-like behavior of LEV200 on the inhibitory M₂ mAChR subtype, observed in this work, could contribute to explain the reduction on oxotremorine-induced tremors and the delay on pilocarpine-induced seizures, by an increase in the attenuation of neuronal activity mediated by the M₁ receptors. [³H]-spiroperidol binding assays also showed a downregulation of dopaminergic D₂ receptors, induced by LEV200 alone treatment. Although this effect was reverted on P400 presence, maybe it posses some influence on LEV200 protective effect, since the stimulation of these receptors can reduce the intensity of pilocarpine induced-seizures. Objectifying to investigate if LEV' mechanism of action also involves anti-oxidant proprieties, neurochemical analysis were carried out in hippocampus and striatum and showed that P400 produced an increased lipid peroxidation in hippocampus, main epileptogenic focus on cholinergic agents induced-seizures, demonstrating and confirming the involvement of free radical oxygen injury in the P400 induced brain injury. However, LEV200 pretreatment abolished this increase, bringing lipid peroxidation levels back to normal values, suggesting an anti-oxidative property of LEV. Our finds also showed a decrease of nitrite levels and stabilization of catalase activity in hippocampus and striatum, beyond an increase on reduced glutathione levels on hippocampus, induced by LEV200 treatment before P400 administration. In this way, the anti-oxidative action of LEV was showed in several stages involved on oxidative injury, suggesting a novel mechanism of its protector effects.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACh**- Acetilcolina
AChE- Acetilcolinesterase
AMPC- Adenosina monofosfato cíclico
ANOVA- Análise de variância
Bmax- Número máximo de receptores
BSA- Bovine seric albumine
CAT- Catalase
D₁ e D₂- Receptores dopaminérgicos do tipo 1 e 2
DA- Dopamina
DOPAC- Ácido 3, 4 dihidroxifenilacético
EROs – Espécies reativas derivadas do oxigênio
EUA - Estados Unidos da América
GABA- Ácido gama aminobutírico
GSH-Px - Glutathione peroxidase
GSH-Rd - Glutathione reductase
GSH – Glutathione reduzida
[³H]-NMS – [³H] N- metilscopolamina
5-HT- 5- Hidroxitriptamina (serotonina)
5-HT₁ e 5-HT₂ – receptor serotoninérgico dos tipos 1 e 2
i.p. - Intraperitoneal
Kd- Constante de dissociação
LEV- Levetiracetam
LEV200- Levetiracetam, 200mg/Kg, i.p.
M₁ e M₂ - Receptores muscarínicos do tipo 1, 2, 3, 4 e 5
NE- Noradrenalina
NMDA- N- metil- D- aspartato

NO – Óxido nítrico

M₁ – Receptores muscarínicos M₁

M₂ – Receptores muscarínicos M₂

MDA - Malonildialdeído

P400- Pilocarpina, 400mg/Kg, s.c.

SCP- Sinais colinérgicos periféricos

s.c.- Subcutâneo

SE – *status epilepticus*

SNC- Sistema Nervoso Central

SOD – superóxido dismutase

INTRODUÇÃO

1. Considerações gerais

A epilepsia, transtorno cerebral mais freqüente na população geral, é uma síndrome complexa, de etiologia diversa e caracteriza-se por crises recorrentes e espontâneas, decorrentes de descargas anormais e desordenadas de células nervosas, numa parte do cérebro ou em seu todo. DeLorenzo et al (2001) demonstraram, ainda, que a atividade convulsiva pode ocorrer após a perda suficiente e duradoura de neurônios. Os mecanismos envolvidos no aparecimento desta atividade elétrica exacerbada são bastante variados, podendo ser deflagrados de diferentes maneiras, o que torna o estudo desta doença extremamente difícil.

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

Estima-se que o número de novos casos por ano está em torno de dois milhões em todo o mundo (Beaglehole et al., 1996). Pelo menos 50% dos casos começam na infância ou adolescência, pelo aumento na vulnerabilidade a infecções do sistema nervoso central (meningite), acidentes (traumatismos do crânio) e doenças como sarampo, varicela e caxumba, cujas complicações podem causar crises epiléticas. O problema também poderá se manifestar com o envelhecimento e suas complicações vasculares (Leonard et al., 1994).

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

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

Desta forma, novos medicamentos antiepiléticos eficazes são necessários para melhorar a qualidade de vida de muitas pessoas acometidas pela epilepsia e o estudo de drogas anticonvulsivantes com baixa toxicidade, poucos efeitos colaterais e grande potencial terapêutico pode contribuir sobremaneira para o tratamento da epilepsia, melhorando a qualidade de vida e restabelecimento físico e mental dos portadores dessa doença em todo o mundo. Substâncias com propriedades anticonvulsivantes têm sido exaustivamente estudadas na tentativa de se conhecer drogas com eficácia para tipos específicos de convulsão, bem como os mecanismos controladores do aparecimento dessas convulsões (Turski et al., 1987; Fisher, 1989). Neste contexto, insere-se o levetiracetam (LEV, Keppra®), uma nova droga antiepilética, quimicamente relacionada ao piracetam, que já foi registrada em 46 países como terapia adjunta das convulsões parciais, com ou sem generalização secundária, em adultos com epilepsia (Bialer et al., 2004).

Estudos têm demonstrado que o tratamento com LEV resulta em boa tolerabilidade, além de um significativo aumento na qualidade de vida dos pacientes, reduzindo a preocupação com as convulsões (Cramer et al., 2000). Observações experimentais demonstram que o LEV oferece potente proteção contra convulsões epiléticas numa

variedade de modelos animais de epilepsia (Löscher e Hönack, 1993), dentre estes, o modelo de convulsões e estado epiléptico induzidos por pilocarpina, que se assemelha em muitos aspectos à epilepsia lobo-temporal humana, que é particularmente resistente aos medicamentos anticonvulsivantes, representando um grande problema na terapêutica (Turski et al., 1987). No entanto, o mecanismo de ação do LEV ainda não foi elucidado e muitos estudos, envolvendo diferentes modelos de epilepsia, vêm sendo realizados na tentativa de esclarecê-lo.

2. Levetiracetam

2.1. Descrição

O levetiracetam (Keppra[®], LEV) é uma nova droga antiepiléptica, quimicamente relacionada ao piracetam (um agente nootrópico). Enquanto piracetam e outras drogas que melhoram a função cognitiva apresentam pouca ou nenhuma atividade anticonvulsivante, o levetiracetam apresenta grande eficácia na terapia adicional das convulsões parciais, com ou sem generalização secundária e foi, recentemente, aprovado para o tratamento dessas convulsões em adultos com epilepsia (Cereghino et al., 2000; Shorvon et al., 2000; Hovinga, 2001; Nash e Sangha, 2001; Bialer et al., 2004). Embora extensas investigações experimentais e clínicas venham sendo realizadas como o objetivo de identificar o mecanismo através do qual essa droga exerce seus efeitos anticonvulsivantes, seu mecanismo preciso de ação permanece não esclarecido. Sabe-se, no entanto, que sua ação não parece estar ligada a nenhum dos principais mecanismos conhecidos para drogas antiepilépticas convencionais, que seriam a facilitação GABAérgica, inibição dos canais de Na⁺ ou dos canais de Ca²⁺ ativados por baixa voltagem (Marini et al., 2004).

Em abril de 2000, os EUA tornaram-se o primeiro país a aprovar o LEV para o tratamento das convulsões parciais, seguido pela Suíça, em maio de 2000. Em setembro de 2000, a Comissão Européia (*The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*) autorizou a introdução do LEV no mercado de toda a União Européia, com base nas evidências de adequadas eficácia e segurança, apresentadas pelo Comitê das

Especialidades Farmacêuticas em junho do mesmo ano. LEV atualmente está disponível em 46 países, incluindo Argentina, Áustria, Bélgica, Bulgária, República Tcheca, Dinamarca, Finlândia, França, Alemanha, Grécia, Hong-Kong, Irlanda, Itália, Luxemburgo, México, Holanda, Noruega, Polônia, Singapura, África do Sul, Espanha, Suécia, Suíça, Reino Unido, Estados Unidos e Canadá (Menachem et al., 2003). Estudos recentes mostraram que, pela boa tolerabilidade e eficácia, LEV pode ser particularmente útil no tratamento de pacientes que não respondem ao tratamento com outros agentes antiepiléticos (Hovinga, 2001).

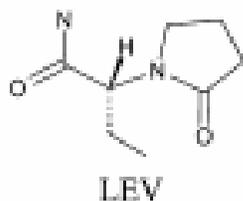


Figura 1 – Estrutura molecular do levetiracetam (Fonte: Bialer et al., 2004).

2.2. Apresentação

LEV é um pó branco, cristalino, com odor fraco, gosto amargo e bastante hidrossolúvel (104g/100mL). Está disponível na forma de comprimidos para administração oral, nas doses de 250, 500 e 750 mg e como solução oral a 10% (bioequivalente em relação aos comprimidos), que demonstrou ser uma alternativa bem tolerada para pacientes com dificuldades no ato de engolir (Bialer et al., 2004).

2.3. Farmacocinética

É rapidamente e quase completamente absorvido após administração oral, com picos de concentração plasmática após aproximadamente 1 hora. A biodisponibilidade oral não é afetada pela alimentação, liga-se fracamente às proteínas plasmáticas (menos de 10%) e seu volume de distribuição é próximo ao volume dos líquidos intra e extracelulares. Tem características farmacocinéticas favoráveis (boa biodisponibilidade, farmacocinética

linear, baixa ligação às proteínas plasmáticas) e baixo potencial de interação com outras drogas antiepilépticas (fenitoína, carbamezepina, ácido valpróico, fenobarbital, lamotrigina, gabapentina, primidona), não sendo necessário o ajuste da dosagem de LEV de acordo com a medicação concomitantemente prescrita para tratamento da epilepsia (Perucca et al., 2003). Do LEV administrado oralmente, 66% são excretados inalterados na urina. A principal via metabólica envolve hidrólise do grupo acetamida e não depende da enzima citocromo P450 hepática (Coupez et al., 2003). Os metabólitos não têm atividade farmacológica conhecida e são excretados pelos rins. A meia-vida plasmática é de aproximadamente 6-8h. Os aspectos farmacocinéticos do LEV têm se mostrado constantes e, independente da dose administrada, semelhantes aos observados em estudos previamente conduzidos em voluntários saudáveis e em pacientes com epilepsia (Perucca et al., 2003).

2.4. Eficácia

Estudos clínicos com portadores de epilepsia refratária caracterizada por episódios convulsivos com ou sem generalização secundária, apesar de um regime posológico estável e de, no máximo, dois fármacos, demonstraram um benefício clinicamente relevante proporcionado pelo LEV. Administrado como terapia adjuvante, em doses de 1000-3000 mg/dia, reduz significativamente a frequência de convulsões em pacientes com epilepsia parcial refratária, comparando com o placebo (Cramer et al., 2003).

2.4.1. Eficácia como tratamento adjuvante das convulsões parciais em adultos

Os dados de eficácia que resultaram na autorização da comercialização do LEV vêm sendo confirmados em diversos estudos e ensaios clínicos. De todos os pacientes que estavam em monoterapia com outro fármaco antiepiléptico antes da adição de LEV, 19,8% tornaram-se livres das convulsões após sua introdução no esquema posológico por, pelo menos, seis meses (Menachem et al., 2003). 65% de todos os pacientes (1422) tornaram-se totalmente livres das convulsões desde o primeiro até o último dia de tratamento ou final dos ensaios. A duração média do período sem convulsões foi 385 dias. A melhora na qualidade de vida (medida por QOLIE-31) se manteve estável por um longo prazo, após

tratamentos com duração de, em média, mais de 4 anos (Cramer et al., 2003). Em estudos de farmacologia clínica (fase IV) incluindo 1030 pacientes, 57,9% dos pacientes tiveram a frequência das convulsões diminuída em, pelo menos, 50%, enquanto 20% se tornaram livres das convulsões (Leppik et al., 2003). Em um grupo de pacientes (78) com idade acima de 65 anos, resultados similares foram observados, com 76,9 e 40% desses pacientes demonstrando 50 e 100% de resposta, respectivamente. Uma auditoria clínica recentemente publicada relatou 77% dos pacientes continuando o tratamento com LEV após um ano, com 26% de todos os pacientes não apresentando convulsões por um ano (Betts et al., 2003).

2.4.2. Eficácia em crianças

Um estudo prospectivo forneceu evidências preliminares da eficácia do LEV na população pediátrica contra diferentes tipos de convulsão, com 47% dos pacientes mostrando uma redução na frequência das convulsões de mais de 50%. LEV foi iniciado na dose de 10 mg/Kg/dia, sendo aumentada a cada 4 dias até uma dose máxima de 60 mg/Kg/dia (Lagae et al., 2003).

2.4.3. Eficácia em convulsões generalizadas

Estudo sugere que LEV possui eficácia no tratamento de pacientes com epilepsia idiopática generalizada (Krauss et al., 2003).

2.5. Tolerabilidade

Estudos de fase IV têm confirmado os achados de boa tolerabilidade nos estudos iniciais. Em pacientes idosos com desordens do Sistema Nervoso Central, o perfil de segurança do LEV se assemelha aos de pacientes mais jovens. Efeitos colaterais comportamentais associados ao LEV têm sido observados em incidência similar aos achados dos estudos clínicos iniciais, 10,1% e raramente (6,9%), levando a necessidade de interrupção do tratamento (Mula et al., 2003). Os efeitos colaterais mais frequentemente

observadas estão relacionados à ação central: astenia, sonolência e tonturas (*The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products-EMEA*, 2001). Estudos em modelos experimentais e estudos clínicos demonstraram que, ao contrário da maior parte das drogas antiepilépticas, LEV não exerce impacto negativo na função cognitiva (aprendizado) e na memória, mesmo em doses superiores às necessárias para ação anticonvulsivante (Lamberty et al, 2000).

2.6. Outras indicações

Em 2003, relatos de caso de uma pequena série de pacientes descreveram uma potencial eficácia do LEV em diversas desordens do Sistema Nervoso Central, incluindo o tratamento da espasticidade associada a esclerose múltipla, mioclonia, neuralgia pós-herpética refratária, discinesia tardia, mania aguda, etc. No entanto, ainda não foram realizados estudos controlados confirmando estas indicações (Bialer et al., 2004).

2.7. Estudos em andamento

Estudos estão em andamento para avaliar a eficácia do LEV em pacientes com convulsões generalizadas e a eficácia da sua utilização, como monoterapia, em pacientes com diagnóstico recente de epilepsia. Além disso, alguns estudos estão investigando a sua utilização no tratamento de outras desordens nervosas centrais (Bialer et al., 2004).

3. Epilepsia

3.1. Classificação das Crises Epilépticas

Crise epiléptica é definida como a manifestação excessiva e/ou hipsincrônica resultante da atividade epiléptica, autolimitada ou não, de neurônios cerebrais. Quando as mesmas não apresentam curso autolimitado são denominadas crises contínuas e configuram o quadro de estado epiléptico. O Estado epiléptico (EP) pode ser definido como uma crise duradoura, que não mostra sinais clínicos de interrupção após o tempo habitual da maioria

das crises recorrentes sem que a função do sistema nervoso central retorne ao período interictal (entre as crises convulsivas) (Engel, 2001).

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

As crises parciais ou focais, clínica e eletrencefalograficamente, são caracterizadas pela ativação de uma parte do cérebro, sendo subdividas em **crises parciais simples**, quando há preservação da consciência e **crises parciais complexas**, quando há comprometimento da mesma. **As crises generalizadas** são aquelas em que há envolvimento, desde o início, de amplas áreas de ambos os hemisférios cerebrais. São consideradas não classificáveis, as crises que não se enquadram nos dois subtipos acima (Engel, 2001).

3.1.1. Crises epiléticas parciais

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

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

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

3.1.2. Crises epilépticas generalizadas

- Crises tônico-clônicas: que podem se iniciar com um grito acompanhado de perda da consciência com queda ao solo, endurecimento do corpo e abalos musculares generalizados. Pode ocorrer perda de saliva com sangue devido à mordedura da língua, coloração arroxeadada dos lábios, respiração ruidosa, às vezes ocorre também aumento da micção. A duração é de poucos minutos e após a crise há sonolência, podendo acordar com vômitos, dor de cabeça e dores musculares.
- Crises tônicas: ocorre perda da consciência, queda ao solo, o corpo fica endurecido, com a respiração irregular, aumento da salivação, coloração arroxeadada da pele.
- Crises mioclônicas: tem como característica principal ser de curta duração e manifestar-se principalmente após o despertar, com movimentos bruscos de todo o corpo, semelhantes a um choque ou susto, principalmente nos membros superiores.
- Crises de ausência: a crise pode se manifestar como um desligamento com o ambiente externo, há interrupção da fala e das atividades motoras por alguns segundos, voltando logo a seguir à atividade que estava realizando antes da crise. Essas crises podem se repetir várias vezes ao dia, ocorrendo perda de consciência de forma parcial ou completa.
- Crises atípicas de ausência: caracterizada pela ocorrência de ataques com aparecimento e término mais rápidos do que o habitual para as crises de ausência, associados a um EEG mais heterogêneo.
- Crises atônicas: caracterizada pela perda do tônus postural, com inclinação da cabeça e queda devido à perda do equilíbrio.

O **Quadro 1** contém os três subgrupos de crises isoladas ou auto-limitadas, as contínuas, configurando o estado epiléptico, e os fatores precipitantes envolvidos nas crises reflexas, que podem desencadear crises focais ou generalizadas, além dos diferentes tipos de crises.

Quadro 1: Classificação dos diferentes tipos de crises epilépticas.

| <i>Crises autolimitadas</i> | |
|---|---|
| <i>Crises generalizadas</i> | <i>Crises focais</i> |
| <ul style="list-style-type: none"> - Crises tônico-clônicas; - Crises clônicas; - Crises tônicas; - Crises de ausências típicas e atípicas; - Crises de ausências mioclônicas; - Espasmos; - Crises mioclônicas; - Crises mioclonias palpebrias; - Mioclonias negativas; - Crises atônicas; - Crises reflexas nas síndromes de epilepsias generalizadas; | <ul style="list-style-type: none"> - Crises neonatais; - Crises focais sensitivo-sensoriais; - Crises motoras focais; - Crises gelásticas; - Crises hemiclônicas; - Crises secundariamente generalizadas; - Crises reflexas em síndromes de epilepsias focais; |
| <i>Crises contínuas</i> | |
| <i>Estado epiléptico generalizado</i> | <i>Estado epiléptico focal</i> |
| <ul style="list-style-type: none"> - Tônico-clônico; - Clônico; - Tônico; - Mioclônico; - Ausência; | <ul style="list-style-type: none"> - Parcial contínua; - Estado epiléptico límbico; - Estado hemiconvulsivo com hemiparesia; |
| <i>Fatores precipitantes envolvidos nas crises reflexas</i> | |
| <ul style="list-style-type: none"> - Estímulos visuais (luz intermitente); - Pensamento; - Música, leitura; - Alimentação; - Água quente; - Estímulos sensitivo-sensoriais e proprioceptivos; | |

Fonte: Engel, 2001.

3.2. Fisiopatologia da epilepsia

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

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

3.2.1. O sistema colinérgico muscarínico e a epilepsia

Diversos estudos sugerem o envolvimento do sistema colinérgico na epilepsia humana (Turski et al., 1983a; Jope et al., 1986; Hirsch et al., 1992; Nathanson et al., 1999; Michotte et al., 2000; Persinger et al., 2001). Este sistema tem como neurotransmissor a acetilcolina (ACh). A estimulação cerebral induzida pela ACh ocorre através da ativação dos receptores colinérgicos cerebrais. 99% destes são muscarínicos (M_1 , M_4 e M_5) e 1% nicotínicos (Pepeu et al., 1983; Elgoyhen et al., 2000). Assim, a maioria dos efeitos de ativação colinérgica no cérebro é provavelmente devido à estimulação dos receptores colinérgicos muscarínicos (RCM).

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

esquizofrenia (Davis et al., 1975; 1980). No fim de 1980, através de técnicas de biologia molecular, foram identificados 5 subtipos de RCM (M_1 , M_2 , M_3 , M_4 , e M_5) (Bonner et al., 1987; Liao et al., 1989; Nathanson et al., 1999). Esses receptores encontram-se distribuídos no SNC de forma diferenciada e divergem quanto ao mecanismo de ativação. Os subtipos M_1 , M_3 , e M_5 transmitem sinais através da mobilização de Ca^{++} no SNC (Fisher e Agranoff, 1987). Um determinado estímulo faz com que o receptor ative uma enzima efetora, a fosfolipase C (PLC), através de uma proteína G (Elgoyhen et al., 2000). A PLC promove uma cascata de eventos, finalizando com a produção de dois segundos mensageiros, o inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) e 1,2-diacilglicerol (DAG) que vão transmitir a informação do receptor para o interior da célula. Os subtipos M_2 e M_4 agem por inibição da adenilil ciclase (AC), diminuindo os níveis de AMPc (Ehlert et al., 1995). O **Quadro 2** sumariza as informações gerais sobre a acetilcolina e o **Quadro 3** sobre os receptores muscarínicos e o **Quadro 4** sobre os segundos mensageiros.

Quadro 2 - Precursores e enzimas envolvidas na síntese e na metabolização da acetilcolina (ACh), e metabólitos formados.

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

Fonte: Ehlert et al., 1995.

Quadro 3 – Localização dos receptores muscarínicos no Sistema Nervoso Central (SNC) e segundos mensageiros.

| SUBTIPOS DE RECEPTORES | LOCALIZAÇÃO NO SNC | SEGUNDOS MENSAGEIROS |
|-------------------------------|---|---|
| M₁ | ↑ hipocampo ↑ córtex frontoparietal ↑ caudado-putamen núcleo accumbens, amígdala | IP₃ + DAG |
| M₂ | ↓ cérebro | AMPC canais de K⁺ |
| M₃ | ↑ córtex ↑ hipocampo ↓ corpo estriado | IP₃ + DAG |
| M₄ | ↑ córtex ↑ hipocampo ↑ corpo estriado | AMPC |
| M₅ | ↓ menos do que 2% | IP₃ + DAG |

Abreviaturas:

(↑): alta densidade; (↓): baixa densidade; **IP₃**: trifosfato de inositol; **DAG**: diacilglicerol;
AMPC: adenosina monofosfato cíclico;

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

Quadro 4 - Efeitos da estimulação colinérgica sobre os níveis dos segundos mensageiros

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

Abreviaturas:

PI: metabolismo dos fosfoinositídeos;

AC: adenilil ciclase;

PG: proteína G;

PKC: proteína quinase C;

Fonte: Ehlert et al., 1995.

A administração periférica de altas doses do agonista muscarínico colinérgico pilocarpina produz convulsões em roedores (Turski et al., 1989; Marinho et al., 1997). O início dessas convulsões pode ser bloqueado pela atropina e atenuado pela inibição da atividade colinérgica endógena (Jope et al., 1986; 1992; Morrisett et al., 1987a; Marinho et al., 1997). Assim, o processo convulsivo, decorrente do tratamento de ratos com pilocarpina em doses convulsivas, parece depender da ativação dos receptores muscarínicos, podendo envolver o metabolismo dos fosfoinositídeos e sendo capaz de produzir lesões cerebrais e alterações comportamentais (Marinho et al., 1997; 1998).

A pilocarpina também altera os níveis do neurotransmissor colinérgico (associado às convulsões induzidas em ratos pela administração de agonistas colinérgicos,

principalmente pilocarpina, está o intenso aumento observado na síntese e liberação da ACh), podendo, ainda, produzir alterações nos níveis de outros neurotransmissores (noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e GABA), embora pouco se conheça sobre estas alterações (Michotte et al., 2000; DeLorenzo et al., 2000; Raol et al., 2001; Costa-Lotufo et al., 2002).

3.2.2. O sistema dopaminérgico e a epilepsia

Alguns estudos sugerem o envolvimento do sistema dopaminérgico na manutenção e/ou propagação da epilepsia humana (Marinho et al., 1997; 1998). A dopamina exerce seus efeitos biológicos por interagir com os receptores específicos. Esses receptores foram classificados originalmente segundo Keabian e Calne (1979), como receptores dopaminérgicos D₁ (D₁-símile) e D₂ (D₂-símile). Esses receptores realizam suas ações por se acoplarem e ativarem diferentes complexos de proteína G. O receptor D₁ interage com o complexo de proteína G_s, resultando em ativação da adenilil ciclase e um aumento nos níveis de AMPc intracelular. Os receptores D₂ interagem com um complexo de proteína G_i para inibir a produção de AMPc (Cooper et al., 1991; Civelli et al., 1993).

Estudos indicam que os receptores dopaminérgicos podem influenciar a função celular através de outros mecanismos, além de estimular ou inibir a adenilil ciclase. O receptor D₁ parece fazer também um efeito estimulatório no “turnover” dos fosfoinositídeos. Enquanto o receptor D₂, além de inibir a adenilil ciclase, aumenta a condutância para o K⁺ e modula o metabolismo dos fosfoinositídeos (Cooper et al., 1991; Civelli et al., 1993).

O avanço da biologia molecular (incluindo clonagem de genes) e o aperfeiçoamento de técnicas de radioligantes possibilitaram a identificação de quatro subtipos de receptores D₂ (D_{2c}, D_{2L}, D₃ e D₄) e um subtipo de receptor D₁ (D₅). O receptor D₂ foi dividido em dois subtipos: D_{2c} (curto) e o D_{2L} (longo), onde o D_{2L} se diferencia do D_{2c} por possuir 29 aminoácidos a mais na sua estrutura. Esses dois subtipos parecem ter uma farmacologia idêntica. Um terceiro subtipo de receptor D₂ determinado foi D₃,

encontrado em altos níveis em certas regiões do sistema límbico cerebral, enquanto, baixos níveis são observados no corpo estriado. O perfil farmacológico do subtipo D₃ é similar, mas não idêntico ao D₂. O mecanismo efetor do subtipo D₃ ainda não é conhecido (Cooper et al., 1991). O quarto subtipo de receptor D₂ recentemente clonado foi D₄. O gene desse receptor possui alta homologia para os genes dos receptores D₂ e D₃. As características farmacológicas desse subtipo lembram as do D₂ e D₃ e o mecanismo efetor do D₄ também é desconhecido (Civelli et al., 1993). O subtipo de receptor D₁ encontrado, chamado de D₅, é farmacologicamente similar ao receptor D₁, porém sua afinidade por agonistas endógenos (dopamina) é cerca de dez vezes maior. Similar ao D₁, o subtipo D₅ estimula a ativação da adenilil ciclase, sendo esse o seu mecanismo efetor. Localiza-se principalmente nas áreas límbicas (Sokoloff et al., 1995).

A ação da dopamina foi descoberta e interpretada através das suas interações com somente dois receptores. A descoberta de D_{2c}, D_{2L}, D₃, D₄ e D₅ imediatamente revelou a possibilidade de que a atividade desses novos receptores tenha sido disfarçada pelos receptores clássicos D₁ e D₂ (Civelli et al., 1993). Tendo em vista as dúvidas remanescentes quanto à nova classificação de receptores dopaminérgicos em D₁, D₂, D₃, D₄ e D₅, alguns pesquisadores preferem agrupar esses subtipos em D₁-símile e D₂-símile, já que as propriedades farmacológicas e estruturais desses subtipos clonados (D_{2c}, D_{2L}, D₃, D₄ e D₅) não são suficientemente divergentes daquelas já existentes (D₁ e D₂).

A dopamina está presente na maioria das regiões do SNC, sendo originada de longos axônios que partem da substância negra e área tegmentar ventral e inervam os núcleos da base, partes do sistema límbico e o córtex frontal (Kebabian e Calne, 1979). O sistema dopaminérgico compreende três vias neuronais principais: nigroestriatal, mesocorticolímbica, tuberoinfundibular. A via nigroestriatal está envolvida com disfunções extrapiramidais. Esta via é responsável por 75% da dopamina cerebral, sendo constituída por neurônios que se projetam da substância negra para o corpo estriado. A via nigroestriatal tem importante papel na locomoção (Civelli et al., 1993).

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

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

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

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

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

| SUBTIPOS DE RECEPTORES | LOCALIZAÇÃO NO SNC | SEGUNDOS MENSAGEIROS |
|-------------------------------|--|-----------------------------|
| D₁ | corpo estriado <i>núcleo accumbens</i> | ↑ AMPc |
| D₂ | corpo estriado <i>núcleo accumbens</i> substância negra área tegmentar ventral hipocampo | ↓ AMPc |
| D₃ | substância negra área tegmentar ventral <i>núcleo accumbens</i> hipocampo | ? |
| D₄ | córtex frontal hipocampo cerebelo | ? |
| D₅ | Hipocampo núcleo parafascicular do tálamo | ↑ AMPc |

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

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

3.2.3. Outros neurotransmissores e a epilepsia

Estudos sugerem o envolvimento do sistema GABAérgico na manutenção e/ou propagação da epilepsia humana. O sistema GABAérgico tem como neurotransmissor o ácido γ -amino butírico (GABA), um importante neurotransmissor inibitório cerebral (Luddens e Wisden, 1991). A estimulação inibitória induzida pelo GABA ocorre através da ativação de muitas vias GABAérgicas diferentes do sistema nervoso central (Isokawa, 1998). Os estudos mais detalhados das inervações GABAérgicas foram realizadas nas seguintes áreas cerebrais: cerebelo, córtex cerebral, hipocampo e corpo estriado.

O GABA exerce um efeito inibitório nas terminações nervosas pré-sinápticas em muitos locais do cérebro e no sistema nervoso periférico (por exemplo, terminações que liberam dopamina no estriado e simpáticas periféricas) (Luddens e Wisden, 1991). No fim de 1988, através de técnicas de biologia molecular, foram identificados 2 subtipos de receptores GABAérgicos (GABA_A e GABA_B). Esses receptores encontram-se distribuídos no SNC de forma diferenciada e divergem quanto ao mecanismo de ativação. O subtipo GABA_A exerce efeito inibitório pós-sináptico. Já, o subtipo GABA_B está localizado principalmente nos terminais pré-sinápticos e pertence à família dos receptores acoplados a proteína G e atuam através de segundos mensageiros intracelulares. Os detalhes desta transmissão ainda, não bem conhecidos, porém os resultados finais são uma condutância aumentada para o potássio (causando hiperpolarização da membrana) e inibição dos canais de cálcio voltagem-sensíveis, levando à inibição do transmissor (Bormann, 1988).

Alguns estudos indicam o envolvimento do sistema glutamatérgico na manutenção e/ou propagação da epilepsia humana (Ling et al., 2001). O sistema glutamatérgico tem como neurotransmissor o glutamato, que, juntamente com o aspartato, é um dos mais abundantes neurotransmissores excitatórios extremamente potentes sobre neurônios, em virtualmente todas as regiões do Sistema Nervoso Central. Devido as suas altas concentrações e larga distribuição estes aminoácidos influenciam todas as funções do sistema nervoso central. Por exemplo, podem contribuir para anormalidades associadas com a epilepsia, danos cerebrais característicos das desordens neurodegenerativas tais

como, doença de Huntington, doença de Alzheimer e doença de Parkinson, além das alterações associadas à isquemia cerebral, traumatismo cerebral e encefalopatia devido a SIDA (Meldrum et al, 1990).

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

O sistema serotonérgico parece estar também envolvido na manutenção e/ou propagação da epilepsia humana (Peroutka, 1988). Seu neurotransmissor, a serotonina (5-HT), tem importante efeito inibitório em muitas áreas do Sistema Nervoso Central (SNC) (Julius, 1991). A estimulação inibitória induzida pela 5-HT ocorre através da ativação de muitas vias em neurônios da rafe ou nas regiões da parte superior do tronco cerebral. A 5-HT está presente em fibras não-mielinizadas que inervam difusamente muitas regiões do SNC, mas a sua densidade de inervação é diferente para as áreas cerebrais (Peroutka, 1988). Os receptores serotonérgicos, principalmente o 5-HT₁ exercem efeitos predominantemente inibitórios e estão relacionados com o humor e o comportamento (Cooper et al., 1991). Acredita-se que a maioria dos efeitos de ativação serotonérgica no cérebro é provavelmente devido à estimulação dos receptores serotonérgicos do tipo 5-HT_{1A}.

Algumas pesquisas realizadas com diferentes modelos de convulsão sugerem, ainda, a participação do sistema noradrenérgico na epilepsia do lobo temporal em humanos (Cavalheiro et al., 1994; Shipley et al., 1999). O sistema noradrenérgico tem como neurotransmissor a noradrenalina (NE), que é um importante neurotransmissor excitatório e

inibitório (Cooper et al., 1991). As mais importantes funções comportamentais mediadas pelo sistema noradrenérgico são: sistema de recompensa e humor, estado de vigília, pressão sanguínea e regulação neuroendócrina (Attwell et al., 1993).

Os receptores noradrenérgicos são amplamente distribuídos em todo corpo e exercem inúmeras funções vitais no cérebro e no sistema nervoso autônomo (Forray et al., 1995). Existe, no entanto, um grande abismo entre os mecanismos neuronais e as respostas comportamentais e fisiológicas mediadas pelos neurônios noradrenérgicos e muitos estudos estão sendo realizados com o propósito de esclarecê-lo (Cooper et al., 1991).

3.3. Modelos experimentais de epilepsia:

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

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

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

A administração local ou sistêmica desses compostos resulta em um padrão de crise límbica duradoura bastante característica (*status epilepticus*), que após um período conhecido como silencioso (de 3 a 14 dias), leva o animal a apresentar crises espontâneas e recorrentes (Turski et al., 1983a). A lesão cerebral induzida pelo *status epilepticus* nesses modelos pode ser considerada como equivalente a um evento epileptogênico no ser humano, como, por exemplo, uma convulsão febril. No **Quadro 7** estão alguns modelos experimentais e sua relação com as diferentes formas de epilepsia no ser humano. Ao lado do modelo, entre parênteses, encontra-se o ano de sua descrição (Mello et al., 1986).

Quadro 7: Modelos experimentais de epilepsia

| MODELO EXPERIMENTAL (ANO DA DESCRIÇÃO) | TIPO DE EPILEPSIA | SITUAÇÃO |
|--|---|---------------------|
| <i>Injeção ou aplicação tópica de metais</i> | | |
| Cobalto (1960) | Epilepsia focal (1) | Semicrônico |
| Ácido túngstico (1960) | Epilepsia focal (1), grande mal | Agudo |
| <i>Estimulação química</i> | | |
| Penicilina (1945) | Pequeno mal mioclônico, epilepsia corticoreticular generalizada | Agudo |
| Estricnina (1900) | Crises com foco cortical | Agudo |
| Pentilenotetrazol (1960) | Pequeno mal e crises generalizadas | Agudo |
| Picrotoxina (1960) | Epilepsias do lobo temporal (2) | Agudo e crônico (2) |
| Bicuculina (1970) | Epilepsia de longa duração (2) | Agudo e crônico (2) |
| Substâncias colinomiméticas (1949) | Epilepsias focais e do lobo temporal | Agudo e crônico |
| Hidrazinas e piridoxais (1949) | Crises generalizadas | Agudo |
| Insulina (1940) | Crises metabólicas | Agudo |
| <i>Oxigênio hiperbárico (1943)</i> | Crises de grande mal | Agudo |
| <i>Modelos com predisposição genética</i> | | |
| Crise audiogênica em camundongo (1924) | Crises tônico-clônicas | Agudo |
| Fotossensibilidade genética (1966) | Crises centro-encefálicas | Agudo |
| <i>Estimulação elétrica</i> | | |
| Eletrochoque (1870) | Epilepsia focal | Agudo |
| <i>Kindling</i> (1969) | Crises parciais e generalizadas, pequeno mal e auras | Agudo e crônico |
| <i>Neurotoxinas</i> | | |
| Ácido cáinico (1970) | Epilepsia do lobo temporal | Agudo e crônico |

Legenda: (1) apesar de não produzir lesões crônicas; (2) quando aplicada na amígdala.

Fonte: Queiroz et al, 2002.

3.4. Modelo colinérgico de convulsão

Em condições fisiológicas, a estimulação colinérgica induzida por ACh é importante para os processos cerebrais como memória e aprendizagem (Bartus et al., 1982). No entanto, altas concentrações de ACh, como ocorre depois de uma exposição por organofosforados, que são agentes anticolinesterásicos ou colinérgicos indiretos, apresentam intensos efeitos sobre a energia celular (Pazdernik et al., 1985; El-Etri et al., 1993) e metabolismo dos fosfoinositídeos (Flynn e Wecker, 1987; Marinho et al., 1998; Chamberlain et al., 2000). Essas mudanças estão associadas a uma hiperexcitação elétrica dos neurônios (Morrisett et al., 1987a,b) e, freqüentemente, são acompanhadas por convulsões (Piredda e Gale, 1985; Jope et al., 1987; Savolainen et al., 1988a,b; Turski et al., 1983a,b,c Morrisett et al., 1992).

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

A hipótese da participação do sistema colinérgico na propagação das convulsões é dada através de estudos demonstrando que lesões dos neurônios colinérgicos na substância inominata, inibem a produção de convulsões estimuladas eletricamente, na amígdala (Kimura et al., 1981). A atropina, um antagonista muscarínico, suprimiu a propagação das convulsões estimuladas na amígdala (Marinho et al., 1997), enquanto que, injeções locais de colinomiméticos intensificaram a atividade convulsiva hipocampal (Burchfield et al., 1979).

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

O lítio é capaz de potencializar *in vivo* a ação da fisostigmina, e ratos tratados com lítio e colinomiméticos apresentam convulsões (Samples et al., 1977; Davis e Hatoun, 1980). A administração de doses subconvulsivas de pilocarpina seguida por cloreto de lítio resulta em convulsões (Jope et al., 1986; Marinho et al., 1998). As alterações comportamentais dos animais que exibem convulsões com lítio-pilocarpina são semelhantes àquelas observadas com altas doses de pilocarpina (Clifford et al., 1987; Marinho et al., 1998).

O modelo de convulsões decorrentes da administração do agonista muscarínico pilocarpina em roedores assemelha-se, em muitos aspectos, à epilepsia “lobo-temporal”, “psicomotora” ou “límbica”, como, por exemplo, nos padrões eletroencefalográficos, comportamento e seqüelas morfológicas (Leite et al., 1990; Cavalheiro et al., 1991).

A epilepsia do lobo temporal humana é uma desordem crônica, freqüentemente associada a um estímulo inicial precipitante como estado epiléptico, trauma e convulsões febris prolongadas (Engel e Pedley, 1997). É um dos distúrbios neurológicos mais comuns, apresentando taxa de prevalência de 5% (DeLorenzo et al., 2001). Aproximadamente 30 a 50% dos pacientes epilépticos são sintomáticos, e esta condição pode ser adquirida através de *stress* ambiental (Aminof et al., 1980, DeLorenzo et al., 2000). Este tipo de epilepsia é particularmente resistente a medicamentos anticonvulsivantes, representando um grande problema na terapêutica (Turski et al., 1987).

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

✿ **Primeira fase:** período agudo, de 1 a 2 dias de duração que corresponde ao modelo de convulsões límbicas repetidas e estado epiléptico;

✿ **Segunda fase:** período sem convulsão (período silencioso), caracterizado por um progressivo retorno ao EEG e comportamento normal, compreendendo a duração de 4 - 44 dias;

✿ **Terceira fase:** período de convulsões espontâneas recorrentes, começando entre 5 - 45 dias depois da administração da pilocarpina e permanecendo por toda a vida do animal (Leite et al., 1990; Cavalheiro et al., 1991).

Na fase aguda podem ser identificados compostos com eficácia no tratamento da epilepsia refratária e/ou neuroproteção contra danos induzidos por convulsões sustentadas (Jope et al., 1986; Cavalheiro et al., 1987, Turski et al., 1987; Hirsch et al., 1992; Leite et al., 2002).

Vários estudos foram realizados utilizando esse modelo para entender a atividade convulsiva e o papel dos sistemas dos neurotransmissores nesse processo (Starr e Starr, 1993; Cavalheiro et al., 1994; Fujikawa, 1996; DeLorenzo et al., 2000; Freitas et al., 2003). Em geral, as convulsões parecem depender da ativação do receptor muscarínico, da alteração da atividade enzimática de alguns sistemas (Simonic et al., 2000; Naffah-Mazzacoratti et al., 2001; Liu et al., 2002), do metabolismo dos fosfoinositídeos (Marinho et al., 1998), como também da participação de outros sistemas de neurotransmissão (dopaminérgico (Kulkarni e George, 1996), serotoninérgico (Cavalheiro et al., 1995), GABAérgico (Loup et al., 1999; Costa-Lotufo et al., 2002) e glutamatérgico (Massieu et al., 1994; Chamberlain et al., 2000)), sendo, portanto, um modelo adequado para se investigar e esclarecer melhor a fisiopatologia das convulsões.

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

Os efeitos da pilocarpina sobre o sistema dopaminérgico são opostos de acordo com o tipo de receptor ativado. A ativação do receptor D_2 , mas não D_1 , tem atividade anticonvulsivante induzida por eletrochoque ou por pentilenotetrazol em roedores (Barone et al., 1990a,b). Al-Tajir et al (1990a,b,c) estudaram a expressão das convulsões motoras, e demonstraram que receptores D_1 e D_2 medeiam efeitos pró-convulsivantes e anticonvulsivantes em ratos tratados com pilocarpina, respectivamente. Cavalheiro et al (1994) mostraram que há um aumento na concentração e uma diminuição da taxa de metabolização da dopamina, sugerindo que a liberação de dopamina no hipocampo pode estar diminuída durante o estado epiléptico, período silencioso e no período crônico do processo convulsivo. El-Etri et al (1993) demonstraram efeitos contrários no *locus cereleus*, sugerindo que, após as convulsões e estado epiléptico, as alterações nos níveis dos neurotransmissores nas áreas cerebrais podem ocorrer de forma diferente.

As conseqüências da administração de pilocarpina sobre o sistema noradrenérgico hipocampal são semelhantes independente da fase da convulsão estudada. Foi verificada no modelo de epilepsia induzido por pilocarpina em alta dose, uma diminuição nos níveis da noradrenalina. Da mesma forma, foi vista uma redução no conteúdo deste neurotransmissor durante a convulsão parcial em roedores (Cavalheiro et al., 1994). Parece haver, ainda, algum tipo de interação com o sistema serotoninérgico, uma vez que a ativação do receptor serotoninérgico do tipo 5-HT₁ pode inibir a estimulação colinérgica (Peroutka, 1988), sendo, assim, um mecanismo compensatório para inibir ou cessar as convulsões.

A pilocarpina também altera os níveis de GABA no cérebro, onde sua concentração está aumentada após o estado epiléptico e diminuída após 24h da fase aguda das convulsões (El-Etri et al., 1993) e parece interagir de forma indireta com o sistema

glutamatérgico, uma vez que a ativação do receptor glutamatérgico do tipo NMDA pode está aumentada durante as convulsões em resposta ao estímulo colinérgico. Pode ocorrer um aumento da concentração do cálcio intracelular, havendo, em resposta a esse efeito, uma diminuição da resposta dos receptores GABA_A, que são capazes de inibir o aparecimento das convulsões quando estimulado por seus agonistas (Isokawa, 1998).

Dessa forma, o modelo de epilepsia induzido por pilocarpina em altas doses poderá auxiliar no esclarecimento das ações dos sistemas noradrenérgico, dopaminérgico, serotoninérgico, glutamatérgico e GABAérgico, que interagem de forma direta ou indireta com o sistema colinérgico no processo convulsivo.

3.5. As áreas cerebrais e o modelo de epilepsia induzido por pilocarpina

De uma maneira geral, as convulsões induzidas por pilocarpina podem produzir danos neuronais em diversas áreas e, especialmente, nas estruturas límbicas, causando perda neuronal no hipocampo, amígdala, córtex piriforme, córtex entorrinal, septum lateral, tálamo, neocórtex e substância negra, sugerindo o envolvimento de diferentes áreas durante o estabelecimento do processo epiléptico (Honchar et al., 1990; Turski et al., 1983a; Clifford et al., 1987; Marinho et al., 1997; Borelli et al., 2002). Além dessas áreas, outras estruturas mostraram também expressivos danos cerebrais, tais como: giro cingulado, giro dentado, transição amigdalóide-estriatal e tálamo interanteromedial após convulsões induzidas por pilocarpina (Bureau et al., 1994).

O hipocampo tem sido sugerido como sendo o sítio de origem da atividade convulsiva induzida por pilocarpina (Turski et al. 1983a,b). Outros achados sugerem como sítio inicial dessas convulsões, o pálido ventral ou *nucleo accumbens* (Clifford et al., 1987). Estudos eletroencefalográficos e autoradiográficos realizados posteriormente sugeriram ambas as áreas como locais de início das convulsões (Labandeira-Garcia et al., 1994; Kulkarni e George, 1995).

O corpo estriado, além de ser uma das áreas mais acometidas, pode estar relacionado de forma importante aos mecanismos de propagação e manutenção (epileptogênese) da convulsão (Marinho et al., 1998). Barone et al (1991) demonstraram que através da administração intracerebral em corpo estriado de agonistas dopaminérgico D₂ havia proteção com relação ao desenvolvimento de convulsão em ratos adultos, sugerindo também a participação dessa área cerebral nas convulsões límbicas.

O modelo de epilepsia com pilocarpina tem sido extensivamente analisado, uma vez que exhibe convulsões recorrentes espontâneas e pode esclarecer muitas das alterações vistas na epilepsia do lobo temporal. As mudanças histopatológicas observadas no hipocampo reproduzem muitas destas alterações em humanos, incluindo perda neuronal e remoção do tecido de sustentação do sistema nervoso (Mello et al., 1996; Avoli et al., 1994; Marinho et al., 1997).

A literatura registra danos morfológicos em diversas estruturas cerebrais após convulsão e estado epiléptico. As principais alterações que podem ser associadas ao processo convulsivo são: o alargamento dos ventrículos, deformação do giro dentado com moderada dispersão das células granulares e perda neuronal em diversas áreas (hipocampo, córtex cerebral, corpo estriado, córtex piriforme, amígdala, tálamo e área septal). A pilocarpina pode não ser capaz de produzir toxicidade aguda, mas sua administração pode acarretar neurodegeneração após o estado epiléptico (fase aguda) e convulsões recorrentes espontâneas (fase crônica) (Mello et al., 1996).

3.6. Espécies reativas derivadas do oxigênio (ERO) e a epilepsia

3.6.1. Radicais livres e “espécies reativas de oxigênio”

Os radicais livres têm sido implicados na toxicidade de numerosos agentes químicos e na patogênese de muitas doenças, tais como doenças inflamatórias, doença de Parkinson, de Alzheimer e epilepsia, dentre outras. A lista dessas doenças é cada vez maior e isso se deve, pelo menos em parte, ao fato de que essas moléculas reativas podem produzir a maior

parte das alterações teciduais identificadas em uma grande variedade de processos danosos. Muitas dessas alterações, porém, podem ser consequência e não causa do dano (Kehrer, 1993).

De maneira simples, um radical é qualquer espécie química independente, um átomo ou molécula altamente reativo, que contém um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica. Em geral, são instáveis e têm vida muito curta, devido à natureza livre de seus elétrons que os tornam hábeis a reagir com diversos compostos ou alvos celulares, de modo a obter uma maior estabilidade química conferida pelo emparelhamento de elétrons (Halliwell, 1994). A expressão “espécies reativas de oxigênio” (ERO) é usada para designar os agentes potencialmente patogênicos derivados do metabolismo do oxigênio (O_2): radicais livres e moléculas, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HClO) e outros, que, embora tenham grupos funcionais contendo oxigênio quimicamente reativo, não possuem elétrons desemparelhados e portanto, não são radicais (Ferreira e Matsubara, 1997).

O organismo humano está exposto a radicais livres e ERO geradas por radiações ionizantes, agentes tóxicos, poluentes ambientais, etc. Porém, as células são também capazes de produzir ERO, tais como: o peróxido de hidrogênio e os radicais superóxido, hidroxila e óxido nítrico. Visto que participam de reações essenciais para o organismo, as ERO são constantemente formadas e podem ser prejudiciais, quando sua produção foge do controle exercido por sistemas antioxidantes, endógenos de defesa (Sies, 1991).

3.6.2. Sistemas de defesa antioxidante

Em sistemas aeróbicos, é essencial o equilíbrio entre os agentes óxido-redutores (como as EROs) e o sistema de defesa antioxidante. Esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do oxigênio e também em situações não-fisiológicas, como a exposição da célula a xenobióticos que provocam a redução incompleta de O_2 . Para proteger o organismo humano, as células dispõem de sistemas de defesa, que incluem enzimas como: glutathiona reduzida (GSH), superóxido-

dismutase (SOD), catalase, glutationa-peroxidase (GSH-Px) e glutationa redutase (GSH-Rd) (Ferreira e Matsubara, 1997) e outros antioxidantes (Halliwell e Gutteridge, 1992).

A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (Scott et al., 1991). Pode ser encontrada no cérebro, sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado. Sua atividade é dependente de NADPH (Ferreira e Matsubara, 1997).

As GSH-Px são as principais enzimas responsáveis pela remoção de peróxido de hidrogênio gerado pelas SOD no citosol e mitocôndria e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois, às custas da conversão da GSH a GSSG (Ferreira e Matsubara, 1997). Elas promovem a redução de H_2O_2 , às custas de glutationa reduzida (GSH), para formar glutationa oxidada (GSSG) e água, de acordo com a seguinte reação:



A glutationa (GSH, L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina), um tripeptídeo formado por resíduos de glicina, cisteína e ácido glutâmico, existe em concentrações milimolares em todas as células humanas e desempenha outros papéis igualmente importantes no metabolismo de xenobióticos e na síntese de leucotrienos (Halliwell, 1994). A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro, oxigênio hiperbárico, radiações ionizantes e luz ultravioleta (Ferreira e Matsubara, 1997). Além disto, diminui a suscetibilidade à lesão renal decorrente da isquemia e reperfusão; atua como transportadora e reservatório da cisteína e participa da detoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. Pode ser requerida, ainda, para a síntese de DNA, de proteína e de algumas prostaglandinas (Shan et al., 1990).

3.6.3. Estresse oxidativo e epilepsia

O estresse oxidativo foi definido por Sies (1991) como "uma perturbação do equilíbrio: pró-oxidante – antioxidante, em favor do primeiro, a qual é potencialmente capaz de causar dano celular". Uma consequência desse desequilíbrio é a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular, processo denominado de lipoperoxidação. A ocorrência da lipoperoxidação pode comprometer a estrutura da membrana, danificando-a ou eventualmente causar completa destruição culminando com a morte celular (Halliwell, 1994; Ferreira e Matsubara, 1997).

O cérebro é mais vulnerável que outros tecidos, por que contém uma grande quantidade de lipídios e metais oxidáveis, e tem, em relação aos outros tecidos, menos mecanismos antioxidantes (Walz et al., 2000). O estresse oxidativo pode alterar dramaticamente a função celular e modificar a liberação e/ou síntese de outros compostos que podem estar relacionados com a morte neuronal induzida pela convulsão. Por isso, tem sido implicado em uma variedade de condições neurológicas agudas e crônicas, incluindo a epilepsia (Frantseva et al., 2000; Walz et al., 2000).

Foi sugerido que o dano neuronal após o estado epiléptico induzido por pilocarpina, seria resultante da produção exagerada de peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e superóxido decorrentes da disfunção mitocondrial (Boveris et al., 1986). A ligação entre a disfunção mitocondrial e a epilepsia é reforçada pelo fato de que alguns pacientes com epilepsia do lobo temporal apresentam deficiência mitocondrial no foco das convulsões (Kunz et al., 2000). Apesar dessas evidências, o envolvimento das EROs no mecanismo das convulsões epiléticas ainda não está bem esclarecido.

4. Ações do levetiracetam nos modelos experimentais de epilepsia

Embora tenha se mostrado destituído de atividade anticonvulsivante em dois modelos animais clássicos para estudo de drogas antiepiléticas (convulsões induzidas por eletrochoque máximo ou por pentilenotetrazol em roedores) (Löscher e Hönak, 1993), LEV

exerce atividade anticonvulsivante, com alto índice terapêutico, em vários modelos animais de epilepsia, incluindo convulsões induzidas por ácido cáinico ou pilocarpina em camundongos e ratos; modelos genéticos de epilepsia; e epilepsia induzida por *kindling*, que podem refletir os processos patológicos subjacentes a epilepsias parcial crônica e primária generalizada em humanos, sugerindo um amplo espectro de ação. (Löscher et al, 1998, 2000; Klitgaard, 1998, 2001, 2003; Glien et al, 2002; Motamedi et al, 2003).

Descobriu-se, inicialmente, a potente habilidade do LEV para proteger camundongos sensibilizados ao som de todas as fases da convulsão induzida por estímulos acústicos (Gower et al., 1995). Resultados obtidos com outros modelos animais de epilepsia revelaram proteção contra convulsões induzidas por estimulação postural em camundongos epiléticos (De Deyn et al., 1992), como também contra convulsões induzidas por estimulação acústica em ratos sensíveis ao som (Gower et al., 1995). Posteriores estudos revelaram potente proteção contra os efeitos secundários generalizados em convulsão focal induzida por pilocarpina em camundongos, e por pilocarpina e ácido cáinico em ratos (Klitgaard et al, 1998).

Um grande número de estudos tem demonstrado que o LEV não exerce nenhum tipo de efeito convencional sobre o sistema GABAérgico, embora exerça efeito anticonvulsivo em alguns modelos de convulsão que, sabidamente, envolvem alterações nesse sistema (Frazer et al, 1997; Sills et al, 1997; Rigo et al, 2000; Tong e Patsalos, 2001). Seu mecanismo de ação ainda não está claro, mas estudos demonstraram que o LEV não interfere na síntese ou metabolismo do GABA nem nas concentrações cerebrais de GABA, glutamato ou glutamina (Sills et al., 1997) e não está relacionado a modulação neuronal dos canais de Na^+ voltagem-dependentes ou canais de Ca^{2+} ativados por baixa voltagem (tipo T) (Zona et al., 2001).

Achados recentes também revelaram que LEV reduz a atividade dos canais de Ca^{2+} ativados por alta voltagem no hipocampo (Niespodziany et al., 2001), exerce um bloqueio seletivo dos canais de cálcio tipo N (Lukyanetz et al., 2002) e retarda as correntes de K^+ nos neurônios hipocampais (Madeja et al., 2003). Alguns estudos demonstraram, ainda, que

o LEV exerce uma modulação indireta da atividade dos canais ligados ao receptor GABA, antagonizando moduladores negativos de GABA_A (Poulain e Margineanu, 2002; Rigo et al., 2002). Segundo Klitgaard (2003), o LEV pode neutralizar alterações induzidas por convulsões nas concentrações de aminoácidos e de suprimir a sincronização do pico neuronal e explosão da atividade elétrica no hipocampo de ratos, sem afetar a excitabilidade neuronal normal.

Estudos de eletrofisiologia em diferentes modelos experimentais sugerem que o LEV exerce uma ação seletiva em vias anormais de atividade neuronal, o que, provavelmente, explica sua proteção seletiva em animais epiléticos com peculiar tolerabilidade. Essa ação seletiva em animais “epiléticos” diferencia LEV dos antiepiléticos clássicos e de novos agentes antiepiléticos, que demonstram efeitos equipotentes em animais normais e com epilepsia (Stratton et al., 2003).

LEV também induz menos alterações comportamentais em camundongos e ratos estimulados por *kindling*, revelando uma alta margem de segurança em modelos animais, tanto na epilepsia parcial como na primária generalizada. Além disso, experimentos com modelos de *kindling* sugerem que LEV possui propriedades antiepileptogênicas, bloqueando o desenvolvimento das convulsões causadas por estimulação da amígdala em ratos e camundongos, impedindo o desenvolvimento de estado epilético, revelando um potencial modificador da doença, à medida que o tratamento com esta droga durante o *kindling* pode produzir modificações duradouras, que podem alterar a sensibilidade da amígdala a estimulações focais subseqüentes ou generalização dessas convulsões focais. Esse efeito parece derivar de novos mecanismos de ação, que não envolvem uma interação convencional com alvos das drogas tradicionais, implicados na modulação da neurotransmissão inibitória ou excitatória, conferindo ao LEV um perfil distinto das outras drogas antiepiléticas e sugerindo que esta droga pode ser a primeira representante de uma nova classe de drogas antiepiléticas (Stratton et al., 2003). Até o momento, a influência da administração do LEV sobre as alterações cerebrais causadas pela pilocarpina ainda não foi elucidada completamente.

OBJETIVOS

Com o intuito de investigar as ações do levetiracetam (LEV) em modelo colinérgico de epilepsia e considerando os efeitos da sua pré-administração nas convulsões induzidas por pilocarpina (400 mg/Kg; P400) em camundongos, foram estabelecidos os seguintes objetivos:

- Realizar estudo comportamental dos animais tratados com LEV e/ou P400;
- Investigar o efeito do LEV sobre os tremores induzidos por oxotremorina;
- Determinar a densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos (M_1 - + M_2 -, M_1 - e M_2 -símile) e dopaminérgicos (D_1 - e D_2 -símile) em hipocampo de animais pré-tratados ou não com LEV e que apresentaram convulsão induzida por pilocarpina;
- Investigar a atividade da enzima acetilcolinesterase em hipocampo e corpo estriado;
- Determinar a taxa de peroxidação lipídica e produção de nitrito em hipocampo e corpo estriado;
- Verificar a atividade da enzima antioxidante catalase e níveis de glutatona reduzida (GSH) em hipocampo e corpo estriado.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, com peso variando de 25 - 30 g, provenientes do Biotério Central do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

Durante todos os experimentos, os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com no máximo 20 animais, em condições ambientais semelhantes, com ciclo claro / escuro alternado de 12 horas, com luzes acesas às 06:00h, recebendo ração padrão tipo Purina e água *ad libitum*.

2. Preparação das drogas

2.1. Levetiracetam

Levetiracetam (Keppra[®]), doação do laboratório UCB Pharma (Chemin du Foriest, Bélgica), foi dissolvido em solução salina 0,9%, obtendo-se uma concentração final de 20 mg/mL.

2.2. Pilocarpina

Cloridrato de pilocarpina (Sigma Chemical Co., USA) foi dissolvido em água bidestilada, obtendo-se concentrações finais de 100mg/mL e usada para induzir convulsões tônico-clônicas.

2.3. Oxotremorina

Oxotremorina (Sigma Chemical, Co, USA) foi dissolvida em água destilada e administrado na dose de 0,5 mg/Kg, via intraperitoneal, no teste da indução de tremores.

2.4. Atropina

Atropina (Sigma Chemical, Co, USA) foi dissolvida em água destilada e administrada na dose de 10 mg/Kg, i.p., como droga padrão de efeito anticolinérgico no teste dos tremores induzidos por oxotremorina.

3. Tratamento dos grupos experimentais

Os experimentos foram conduzidos entre 8:00 e 10:00 horas. Os animais receberam injeções intraperitoniais de levetiracetam (LEV), nas doses de 30, 50, 100 ou 200 mg/kg ou do veículo de dissolução dessa droga (solução salina - NaCl 0,9%). Após 60 minutos da última injeção de levetiracetam ou veículo, foi administrada pilocarpina na dose 400 mg/Kg, s.c. (P400). Outros dois grupos receberam apenas LEV 200 mg/Kg, i.p. (LEV200) ou salina 0,9% (controle).

Após a injeção de pilocarpina, os animais tratados e controles foram colocados em ambiente reservado para observação dos grupos pelo período de 1 hora (estudo comportamental). Os animais que não sobreviveram até o final do período de observação foram decaptados logo após a morte e os sobreviventes foram sacrificados por deslocamento cervical e decapitados logo após estudo comportamental. Hipocampo e corpo estriado foram imediatamente isolados, removidos sobre gelo e armazenados à -70°C para a realização dos estudos neuroquímicos.

4. Estudo comportamental

4.1. Alterações comportamentais após indução de convulsões e estado epiléptico pela administração de pilocarpina.

Os animais tratados e controles foram divididos em gaiolas contendo 5 a 10 animais e colocados em ambiente reservado, sendo feita a observação direta. Todos os grupos experimentais foram observados durante 1 hora após a última injeção da droga, de acordo

com o tratamento previsto. Os seguintes parâmetros foram observados: presença de sinais colinérgicos periféricos, convulsões motoras, instalação de estado epilético, número de mortes, latência de convulsão e latência de morte em cada grupo. O **Quadro 1** apresenta estes parâmetros juntamente com suas características. Depois desse período de observação, os animais foram utilizados para estudos neuroquímicos.

Quadro 1 - Parâmetros comportamentais observados

| Parâmetros | Características |
|--|---|
| 1. Sinais colinérgicos periféricos (SCP) | Miose, cromodacriorréia, piloereção, diarreia |
| 2. Convulsão | Tônico / clônica |
| 3. Estado epilético | Convulsões intermitentes |
| 4. N ^o de mortes | Determinado durante o período de 1 hora depois da última administração realizada |
| 5. Latência de convulsão | Intervalo de tempo em minutos entre a última injeção e o aparecimento da primeira convulsão |
| 6. Latência de morte | Intervalo de tempo em minutos entre a última injeção e a morte do animal |

Fonte: Adaptado de Turski et al., 1983a.

4.2. Teste dos tremores induzidos por oxotremorina (avaliação dos efeitos colinérgicos):

O experimento foi realizado segundo a técnica descrita por Fukuzaki et al. (1999): LEV 200mg/Kg, i.p. (LEV200), salina 0,9% ou atropina (10 mg/Kg) foram administrados, intraperitonealmente, a camundongos, 30 min antes da injeção de oxotremorina (OXO). Os tremores foram visualmente avaliados (durante um minuto) em cada animal 10, 20 e 30

minutos após a administração de OXO (0,5 mg/kg, i.p.), usando uma escala proporcional de 0 a 3, como descrito por Coward (1977): 0 (sem tremores); 1 (tremores isolados e ocasionais); 2 (tremores moderados e intermitentes); 3 (tremores pronunciados e contínuos).

5. Material utilizado nos experimentos

- ◆ Agitador de tubos (modelo 251, FANEN, São Paulo, Brasil);
- ◆ Balança analítica (modelo H5, Mettler, Suíça);
- ◆ Banho maria (FANEN, modelo 102/1, SP, Brasil);
- ◆ Centrífuga refrigerada (modelo Eppendorf);
- ◆ Centrífuga (modelo J-21C, Beckman, CA, USA);
- ◆ Contador de Cintilação Líquida (modelo LS 6500, CA, USA);
- ◆ Cubetas para leitura em espectrofômetro (Sarstedt, Alemanha Oriental);
- ◆ Espectrofotômetro (Modelo Beckman DU, Fullerton, CA, USA) com medidor de absorvância digital e outros acessórios (acoplado ao sistema de modernização Gilford, Oberlin, Ohio, USA);
- ◆ Equipamento de Millipore para filtração a vácuo (Millipore apparatus, Bedford, MA, USA);
- ◆ Estufa de secagem e esterilização (modelo 315 SE FANEN, SP, Brasil);
- ◆ Filtros de fibra de vidro (GF/B Whatman, Maidstone, England);
- ◆ Frascos de vidro para contagem de cintilação (*vials*, Beckman, Fullerton, CA, USA);
- ◆ Guilhotina (Harvard, USA);
- ◆ Homogeneizadores (Bellico, USA);
- ◆ Micropipetas (H.E. Pedersen, Dinamarca)
- ◆ Medidor de pH, modelo B374 (Micronal, SP, Brasil);

6. Dissecação das áreas cerebrais em estudo

Os animais foram decapitados com uma guilhotina (Harvard, USA). Em seguida, os encéfalos foram rapidamente retirados e colocados sobre papel alumínio numa placa de petri com gelo para posterior dissecação das áreas cerebrais a serem estudadas (**Figura 1**).

Acompanhando a fissura sagital mediana, a camada cortical cerebral foi retirada das leptomeninges com o auxílio de uma pinça reta de microdissecação, a qual, progredindo delicadamente e tangencialmente aos ventrículos laterais, divulsionou o córtex em toda a sua extensão fronto-occipital. O córtex já divulsionado foi rebatido para os lados, expondo parte do hipocampo (**Figura 2**) que, com divulsionamento, foi descolado e retirado.

O corpo estriado foi isolado das estruturas circunjacentes por divulsionamento com uma tesoura de microdissecação, sendo a sua retirada orientada pelo diâmetro da porção tuberosa visível desses núcleos, após o rebatimento lateral do córtex (**Figura 3**).

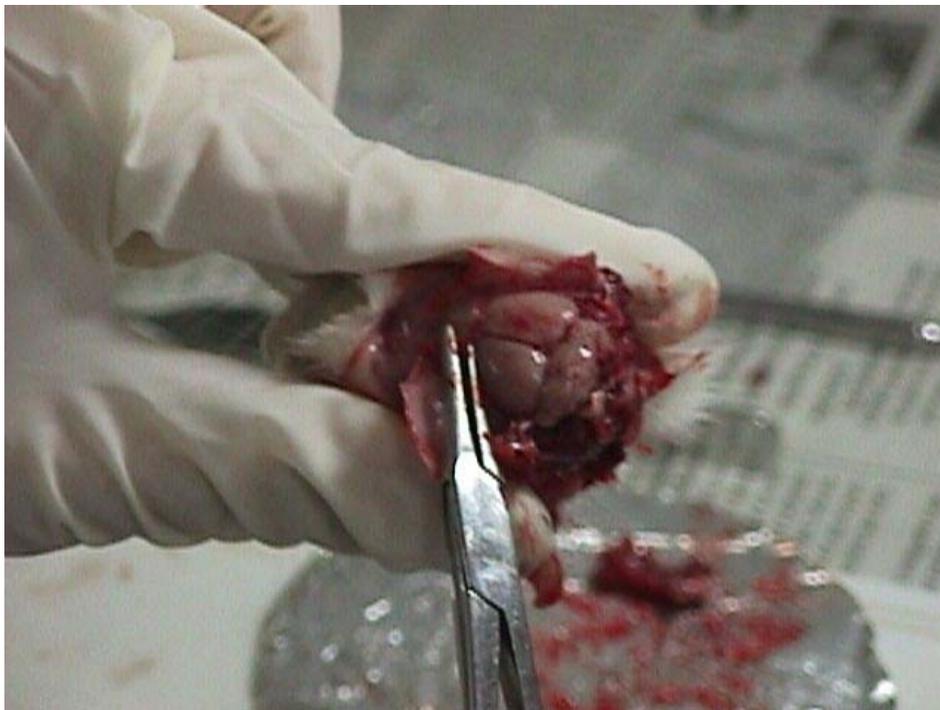


Figura 1 - Dissecação cerebral mostrando a retirada do encéfalo.



Figura 2 - Dissecação cerebral mostrando a retirada do hipocampo.

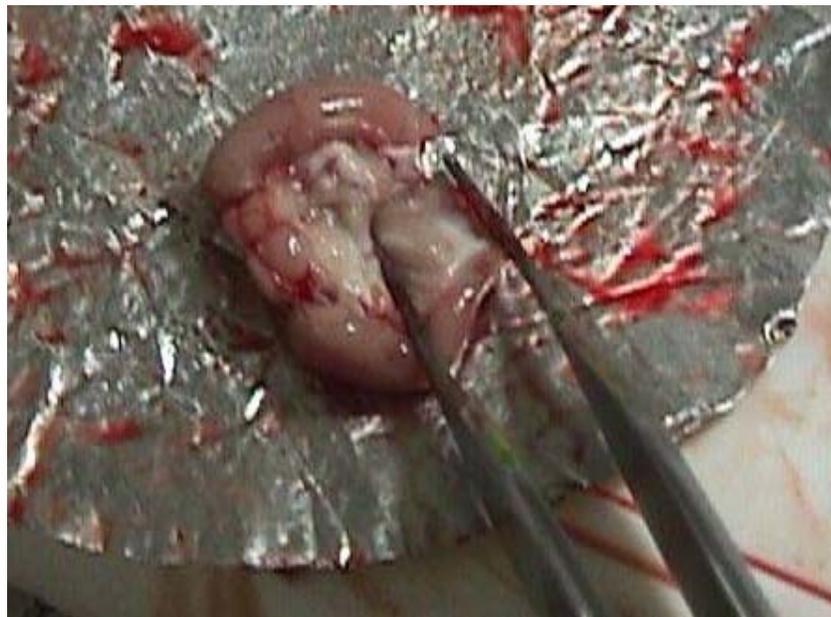


Figura 3 - Dissecação cerebral mostrando a retirada do corpo estriado.

Após o término da dissecação, hipocampo e corpo estriado foram colocados em papel de alumínio devidamente identificados, pesados e conservados a -70°C para uso posterior. Quando as áreas foram estocadas durante um certo período de tempo (no máximo

2 meses), os tecidos foram considerados como tendo a mesma viabilidade para experimentação daqueles que foram ensaiados imediatamente ou 24 h após a dissecação (Burke e Greenbaun, 1987; Fielder et al., 1987).

7. Determinação da densidade de receptores muscarínicos ($M_1 + M_2$ -, M_1 - e M_2 -símile)

7. 1. Método

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

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

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

7. 2. Procedimento experimental

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

Rapidamente, os homogenatos contendo 130 - 160 μg de proteína foram incubados em tampão fosfato de sódio contendo 2,38 nM de [^3H]-NMS, na presença ou na ausência de sulfato de atropina 12,5 μM em um volume final de 0,2 mL, para experimentos de pontos únicos. Para experimentos de saturação o ligante foi utilizado em concentrações que variavam entre 0,119 to 5,95 nM. Como [^3H]-NMS é um ligante não-específico dos receptores muscarínicos, pode ligar-se a todos os subtipos destes receptores (M_1 - + M_2 -símile). Assim, os ensaios de ligação para os subtipos específicos M_1 -símile e M_2 -símile foram realizados na presença de 100 μM de carbacol, para bloquear os sítios M_2 , e 40 μM de pirenzepina, para bloquear os sítios M_1 , respectivamente.

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

A radioatividade foi medida em um contador de cintilação líquida Beckman LS-6500. A ligação específica foi calculada como a ligação total menos a ligação não-específica feita na presença de atropina 12,5 mM. Os resultados foram expressos em fentomoles por miligrama de proteína. A concentração de proteína foi determinada segundo o método de Lowry et al (1951), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

7. 3. Soluções reagentes

As seguintes soluções reagentes foram empregadas nessa técnica:

➤ **Solução estoque de [^3H]-N-metil-escopolamina (^3H -NMS)**

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

➤ **Solução estoque de atropina**

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

➤ **Tampão fosfato de sódio**

NaH₂PO₄ (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) foi dissolvido em água bidestilada, para obter uma solução 150 mM e o pH foi ajustado para 7,4 com solução de HCl 1N (Merck, Rio de Janeiro, Brasil).

➤ **Coquetel de cintilação**

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

8. Determinação da densidade dos Receptores Dopaminérgicos

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

➤ **Receptores D₁-símile**

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

➤ **Receptores D₂-símile**

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

8. 1. Método

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

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

8. 2. Procedimento experimental

Logo após a dissecação da área cerebral em gelo, como mencionado anteriormente, foram feitos homogenatos a 10 % de hipocampo em tampão tris-HCl 50 mM, pH 7,4. Os homogenatos, contendo 50-100 µg de proteína, foram incubados em tampão tris-HCl modificado (50 mM, pH 7,4). No caso dos receptores D₁-símile, o tampão continha 2,82 nM de [³H]-SCH 23390 para experimentos de ponto único e 0,14 a 5,63 nM para experimentos de saturação. No caso dos receptores D₂-símile, o tampão continha 10 µM de mianserina (incubada por 30 minutos à temperatura ambiente) para bloquear os receptores serotoninérgicos, e 4,72 nM de [³H]-espiroperidol para experimentos de ponto único e 0,09 a 6,60 nM para experimentos de saturação.

Os respectivos ligantes foram incubados na presença e na ausência de dopamina 100 μM (durante 10 minutos), no caso dos receptores D_1 , ou butaclamol 10 μM , no caso dos receptores D_2 , sendo o volume final do ensaio de 0,2 mL. Após incubação a 37 °C durante 60 minutos, a reação foi terminada por filtração a vácuo através de filtros Whatman GF/B. Os discos de papel de filtro foram lavados três vezes com 4 mL de solução salina 0,9 % gelada, secos a 60 °C por no mínimo 2 h e colocados em frascos de vidro (*vials*) contendo 3 mL de um coquetel de cintilação líquida contendo tolueno.

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

Os resultados foram expressos em femtomoles por miligrama de proteína. A concentração de proteína foi determinada segundo o método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão.

8. 3. Soluções reagentes

As seguintes soluções reagentes foram empregadas nessa técnica:

- [^3H]-**espiroperidol** (114 Ci/mmol, Amersham Life Science, EUA)
5 μL de [^3H]-espiroperidol foram diluídos em tampão tris-HCl, pH 7,4, de forma a obter uma concentração final de 43,28 nM.

- [^3H]- **SCH 23390** (87 Ci/mmol, Amersham Life Science, EUA)
5 μL de [^3H]-SCH 23390 foram diluídos em tampão tris HCl, pH 7,4 de forma a obter uma concentração final de 11,5 nM

➤ **Tampão Tris-HCl**

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

➤ **Tris HCl modificado**

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

➤ **Mianserina**

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

➤ **Dopamina**

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

➤ **Butaclamol (Cloridrato de butaclamol)**

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

➤ **Coquetel de cintilação**

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

9. Dosagem de proteína

9. 1. Método

A quantidade de proteína em homogenatos de cérebro foi determinada a 25°C utilizando albumina sérica bovina com padrão, de acordo com o método previamente descrito (Lowry et al., 1951), que emprega duas reações de formação de cor para analisar a concentração proteica fotometricamente. Inicialmente é feita uma reação de biureto de baixa eficiência na qual os íons de cobre alcalino produzem uma cor azulada na presença de ligações peptídicas. Esta cor biureto é característica de todas as proteínas e fornece uma cor básica de fundo para a próxima etapa de ensaio.

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

9. 2. Soluções reagentes

As seguintes soluções reagentes foram empregadas nessa técnica:

➤ **Reagente A**

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

➤ **Reagente B**

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

➤ **Reagente C**

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

➤ **Reagente de Folin**

Ciocalteau - Fenol (Labordin, Piraquara, PR, Brasil) 1:1 em água bidestilada.

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

1 mg/mL em água bidestilada.

10. Determinação da Atividade Acetilcolinesterásica (AChE)

10.1. Método

A atividade acetilcolinesterásica foi determinada segundo Ellman et al (1961), tendo como princípio a medida da velocidade de produção de tiocolina, à proporção que a acetiltiocolina (ATC), utilizada como substrato, é hidrolisada. O acompanhamento é realizado pela reação contínua do tiol com o íon 5:5-ditiobis-2-nitrobenzoato (I) para produzir o ânion amarelo do ácido 5-tio-2-nitro-benzóico (II), cuja coloração é medida em 412 nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, o que permitiu leituras automáticas em sistema digital e forneceu maior sensibilidade.

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

10.2. Soluções Reagentes

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

↳ Tampão fosfato de sódio

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

↳ Solução de iodeto de acetilticolina

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

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

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

11. Determinação da produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS)

11. 1. Método

O grau de lipoperoxidação nas áreas cerebrais foi medido através da determinação dos níveis de TBARS, conforme o método de Huong et al (1998), seguindo o protocolo a seguir.

Foi preparado o homogenato a 10% em solução de cloreto de potássio (KCl) 0,15 M. Do homogeneizado 0,25 mL foram colocados em tubos de ensaio, adicionados 0,5 mL de tampão fosfato de potássio monobásico 50 mM, pH 7,4 e 0,25 mL do sistema catalisador da formação de radicais livres. Após incubação dessa mistura a 37° C, por 30 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de solução de ácido tricloroacético a 10%. Em seguida, a mistura foi submetida à centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi separado e acrescido de 0,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,8%. Após a agitação, essa mistura foi mantida em um banho de água

fervente (95-100°C) por 15 min., a seguir resfriada em banho de gelo por alguns minutos e posteriormente tomada para leitura em espectrofotômetro a 532 nm. Os resultados foram expressos em micromol de malonildialdeído (MDA) por mg de proteína.

➤ **Curva-padrão de malonildialdeído (MDA)**

A partir da solução padrão de MDA (6mols), foram preparadas as soluções a 0,627; 1,247; 2,463; 4,8; 9,16 e 16,77µmol. O branco foi feito com água destilada. A leitura da absorbância foi feita a 532nm para determinação da equação da curva-padrão de MDA.

11. 2. Soluções reagentes

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

➤ **Solução de Cloreto de potássio**

EDTA (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 521,1mg em 70 mL de água bidestilada, para preparar EDTA 0,2M. Em seguida foi retirado 30 mL desta solução inicial e acrescido mais 270 mL de água bidestilada.

➤ **Tampão Fosfato**

NaH₂PO₄H₂O (Reagen, Rio de Janeiro, Brasil) 50mM em água bidestilada, pH 7,4.

➤ **Solução de ácido tricloroacético**

ATC (Sigma, MO, EUA) 10 mL mais 90mL de água bidestilada.

➤ **Solução de ácido tiobarbitúrico (TBA)**

TBA (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 50mg em 50mL de água bidestilada.

12. Determinação da produção de nitrito

12. 1. Método da Preparação da Curva-Padrão

Foi pesado 7mg de NaNO_2 e dissolvido em 10 mL de água bidestilada (estoque-10mM) foi feita as diluições em série (10 e 20x), ficando 1mM, 100 μM , 10 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM , 0,625 μM , 0,312 μM . Foi feita uma equação da reta para o cálculo das concentrações do teste (Green et al., 1981).

12. 2. Procedimento Experimental

Em um tubo branco foi adicionado 500 μL do reagente e 500 μL de água destilada, em um outro tubo teste foi adicionado 500 μL do reagente e 500 μl do homogenato de tecido a 10% em água destilada. Foi feita a leitura em espectrofotômetro a 560nm e os resultados expressos em nM.

12. 3. Solução reagente

A seguinte solução reagente foi empregada nessa técnica:

➤ **Solução de NaNO_2 (10mM)**

NaNO_2 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 7mg em 10mL de água bidestilada.

Em seguida, foi procedida a filtração e degaseificação, e posteriormente adição de 20 mL de acetonitrila (Carlo Erba Reagenti, MI, Itália) e 10 mL de tetrahidrofurano (Sigma, MO, EUA) para um volume final de 500 mL.

13. Determinação da atividade enzimática da Catalase (CAT)

13. 1. Método

A atividade da catalase tem como princípio a medida da velocidade de produção de O_2 e H_2O à proporção que a H_2O_2 , utilizado como substrato é hidrolisado, de acordo com Maehly e Chance (1954) e Chance e Maehly, (1955).

A atividade da enzima é medida em 230 nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA, o que permitiu leituras automáticas em sistema digital e forneceu maior sensibilidade. A atividade enzimática é medida através da leitura da variação da absorbância por minuto, durante 6 minutos e os resultados expressos em $\mu M/min/\mu g$ de proteína.

13. 2. Procedimento Experimental

Foi preparado o meio da reação com H_2O_2 (18 mL) mais Tampão Tris HCl 1M, EDTA 5 mM pH 8,0 (1,0 mL) e H_2O Milli Q (0,8 mL). Em seguida foi colocado na cubeta de quartzo 980 μL do meio de reação mais 20 μL do homogenato a 10%.

E feita à leitura durante 6 min a temperatura de $37^\circ C$ em espectrofotômetro a 230nm. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry et al (1951).

13. 3. Soluções reagentes

As seguintes soluções reagentes foram empregadas nessa técnica:

➤ **Tampão Tris HCl 1M, EDTA 5 mM, pH 8,0**

12,11 g de Trisma Base (1 M) e 0,19 g de EDTA (5 mM) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e diluídos em 100 mL de água Mill-Q. O pH foi acertado com HCl 1 M.

➤ **H₂O₂ para meio de reação**

10 µL de peridol 30% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) diluídos em 10 mL de água Mill-Q (qsp).

14. Determinação da concentração da glutathiona reduzida (GSH)

14. 1. Método

A determinação da concentração da GSH basea-se na reação do reagente de Ellman, o 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) com o tiol livre originando um dissulfeto misto mais ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. A medida do produto de reação formado é feita por leitura da absorbância a 412 nm, conforme descrito anteriormente por Sedlak e Lindsay (1988).

14. 2. Procedimento Experimental

Preparou-se o homogenato a 10% das áreas cerebrais a serem estudadas, em EDTA 0,02 M, em seguida foi retirado 400 µL desse homogenato e adicionado 320 µL de água destilada e mais 80 µL de ácido tricloroacético a 50%.

O material foi agitado e centrifugado a 3000 rpm por 15 min. Em seguida foi recolhido 400 µL do sobrenadante e acrescido 800 µL de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e mais 20 µL de DTNB 0,01 M e após 1 minuto da reação foi feita a leitura da coloração em 412 nm, através de um espectrofotômetro Beckman DU, acoplado a um sistema de modernização da Gilford, USA, o que permitiu leitura automáticas em sistema digital e forneceu maior sensibilidade. A concentração da glutathiona reduzida foi expressa em nanograma de GSH por grama de tecido.

➤ **Curva-padrão de Glutation (GSH)**

A partir da solução padrão de GSH (1mg/mL), foi preparado 4 mL (em triplicata) de soluções a 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL. O branco foi feito com água destilada (4 mL) e a cada tudo das soluções de GSH foi acrescentado 4 mL de tampão Tris HCl 0,4 M (pH 8,9). Adicionou-se ainda a cada tubo 0,1 mL de DTNB (0,01M) e feita a leitura da absorbância a 412 nm após 1 min da adição do DTNB, e determinada a equação da curva padrão de GSH.

14. 3. Soluções reagentes

Foram utilizadas as seguintes soluções reagentes:

➤ **Solução de ácido etilenodiaminotetracético**

EDTA (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 521,1 mg em 70 mL de água bidestilada, para preparar EDTA 0,2M. Em seguida foi retirado 30 mL desta solução inicial e acrescido mais 270 mL de água bidestilada.

➤ **Tampão Tris-HCl**

14,352 gramas de Tris-HCl (Trizma base, Sigma, Brasil) foram diluídos em 30 mL de EDTA 0,2 mM, mais 300 mL de água bidestilada, obtendo-se uma concentração de 0,4 M. O pH foi ajustado com solução HCl 0,1 N (MERCK, Rio de Janeiro, Brasil) para pH 8,9.

➤ **Solução de ácido 5:5-ditiobis-2-nitrobenzoato**

DTNB (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 39,6mg em 10 mL de metanol absoluto.

➤ **Solução de ácido tricloroacético**

ATC (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 50 mL mais 50 mL de água bidestilada.

➤ **Solução de Glutation**

GSH (Sigma, St. Louis, MO, EUA) 50 mg em 50 mL de água bidestilada.

15. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi acompanhada por um computador PC, utilizando o programa *Prism* 3.0. A análise de Variância (ANOVA) foi utilizada para comparação das médias de dois grupos e o teste Student Newman Keuls como teste *post hoc* para comparações múltiplas. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

1. Estudo comportamental

1.1. Alterações comportamentais induzidas por pilocarpina em camundongos pré-tratados ou não com levetiracetam (LEV).

Poucos minutos após a administração de pilocarpina, 400mg/Kg, i.p. (P400) os animais mostraram sinais colinérgicos periféricos (miose, piloereção, cromodacriorréia, diarreia, tremores), e movimentos estereotipados, seguidos por convulsões motoras límbicas em 100% (40/40) dos animais tratados. O processo convulsivo persistiu e progrediu para *status epilepticus* (estado epilético) em 90% (36/40) desses camundongos, levando à morte de todos os animais (**Tabela 1**). A administração de LEV, i.p., 60 min antes de P400, aumentou a latência de convulsão em todas as doses testadas, de forma dose-dependente (**Tabela 1**), todavia, a dose de 200 mg/kg, selecionada para as análises seguintes, mostrou um aumento mais expressivo nas latências de convulsão e de morte comparado às demais doses, $P < 0,001$ (**Figura 1**); levou à ausência de convulsões em 53% (20/38) dos animais; reduziu a ocorrência de estado epilético em 58% (22/38); aumentou a latência de morte em 116% comparada ao grupo P400 e protegeu 61% (23/38) dos animais da morte (**Tabela 1**). Sinais colinérgicos periféricos e movimentos estereotipados permaneceram inalterados em todos os grupos pré-tratados com levetiracetam. Nenhum animal, dos grupos que receberam apenas salina isotônica ou apenas LEV apresentou atividade convulsiva.

Tabela 1 – Efeitos do LEV nas alterações comportamentais e convulsões induzidas por P400 em camundongos

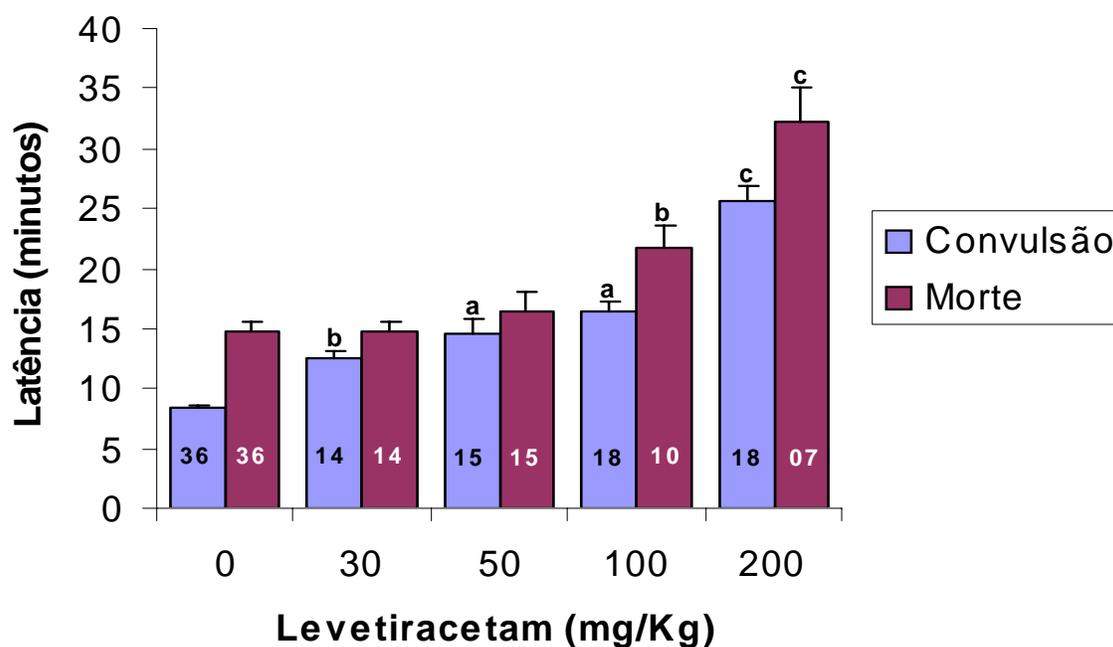
| LEV (mg/Kg) | N | Convulsão (%) | Latência de Convulsão (min) | Morte (%) | Latência de morte (min) | Estado epiléptico (%) |
|-------------|----|---------------|--------------------------------------|-----------|--------------------------------------|-----------------------|
| - | 40 | 100 | 8,45 ± 0,23 (n=36) | 100 | 14,87 ± 0,62 (n=36) | 90 |
| 30 | 14 | 100 | 12,52 ± 0,69 ^{a*} (n=14) | 100 | 14,74 ± 0,95 (n=14) | 100 |
| 50 | 15 | 100 | 14,58 ± 1,20 ^a (n=15) | 100 | 16,39 ± 1,62 (n=15) | 100 |
| 100 | 20 | 90 | 16,31 ± 0,90 ^a (n=18) | 55 | 21,71 ± 1,95 ^{a*} (n=11) | 55 |
| 200 | 38 | 47 | 25,58 ± 1,30* (n=18) | 39 | 32,20 ± 2,90* (n=15) | 42 |

Camundongos Swiss, machos, receberam salina 0,9% ou diferentes doses de LEV, i.p., 60 min antes de P400. Os animais foram observados durante 1 hora após a injeção de P400.

^a p < 0,01 comparado ao grupo controle; ^{a*} p < 0,05 comparado ao grupo controle;

* p < 0,001 comparado aos demais grupos (análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls).

Figura 1- Curva dose-resposta do LEV: Efeito sobre as latências de convulsão e morte induzidas pela administração de P400



Camundongos Swiss, machos, foram observados durante 1 hora após a injeção de P400, s.c. Salina 0,9%, ou LEV em diferentes concentrações, foram administrados, i.p., 1 hora antes da pilocarpina. As barras representam a média \pm E.P.M do n de animais representado no interior das barras. ^a $p < 0,01$ comparado ao grupo controle; ^b $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; ^c $p < 0,001$ comparado aos demais grupos (análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls).

1.2. Efeitos do pré-tratamento com LEV nos tremores induzidos por oxotremorina

O pré-tratamento com LEV, 200 mg/Kg, i.p. (LEV200) reduziu a intensidade dos tremores causados por oxotremorina, determinados segundo a escala proporcional de 0 a 3, descrita por Coward, 1977, em 48%, $p < 0,001$ (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Efeitos do LEV na intensidade dos tremores induzidos por oxotremorina

| Grupos | N | Média de intensidade dos tremores (escala Coward) |
|------------------------------|----|---|
| Oxotremorina | 13 | 2,64 ± 0,18 |
| Atropina | 05 | 0,00 ± 0,0 |
| Atropina + Oxotremorina | 10 | 0,00 ± 0,0 |
| Levetiracetam | 10 | 0,00 ± 0,0 |
| Levetiracetam + Oxotremorina | 12 | 1,37 ± 0,07* |

LEV 200, salina 0,9% ou atropina (10 mg/Kg) foram administrados, i.p, 30 min antes da injeção de oxotremorina (0,5 mg/kg, i.p.) em camundongos machos. Os tremores foram visualmente avaliados (durante 1 minuto) em cada animal 10, 20 e 30 minutos após a administração de OXO (0,5 mg/kg, i.p.), usando uma escala proporcional de intensidade, de 0 a 3, como descrito por Coward (1977): **0** (sem tremores); **1** (tremores isolados e ocasionais); **2** (tremores moderados e intermitentes); **3** (tremores pronunciados e contínuos). Foram obtidas as médias das 3 observações (10, 20 e 30 min) para cada animal dos diferentes grupos e estes resultados foram utilizadas p/ cálculo das médias finais de cada grupo. * $p < 0,05$ comparado ao grupo oxotremorina (análise estatística por ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls).

2. Estudo neuroquímico

2.1. Densidade de receptores muscarínicos ($M_1 + M_2$, M_1 - e M_2 - símile) em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com levetiracetam e administrados ou não com pilocarpina.

O número de sítios de ligação para [3 H]-NMS foi determinado em membranas de hipocampo de camundongos dos seguintes grupos de tratamento: Controle (salina 0,9%); Levetiracetam, 200mg/Kg, i.p. (LEV200); pilocarpina, 400mg/Kg, s.c. (P400) e LEV200 + P400. Foram realizados experimentos de ponto único com base nas curvas de saturação e Scatchards representativos, com concentrações crescentes do ligante radioativo (**Figura 3**). Os resultados foram expressos em fentomoles/mg de proteína.

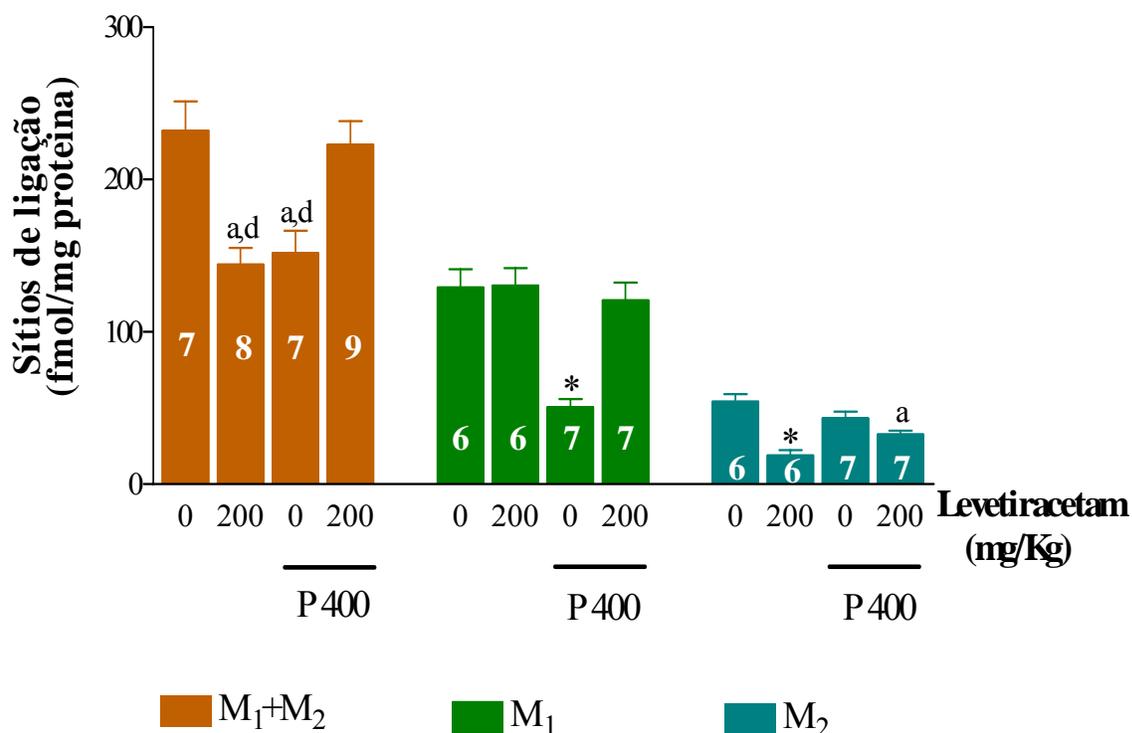
A administração de LEV200 antes de P400 acarretou em diferenças na densidade dos receptores muscarínicos (M_1+M_2) comparado ao grupo P400. O pré-tratamento com LEV200 reverteu a *downregulation* induzida por P400, trazendo a densidade desses receptores de volta a valores similares aos do grupo controle. De forma interessante, LEV200 e P400, quando administrados isoladamente, induziram diminuições de 38% e 34%, respectivamente, na densidade de M_1+M_2 , comparado ao controle. Em relação aos receptores M_1 , no grupo P400 ocorreu *downregulation* (aproximadamente 60%, $P<0,001$), comparado aos demais grupos. Os receptores M_2 , no entanto, sofreram *downregulation* apenas na presença de levetiracetam, tanto no grupo LEV200 como no LEV200+P400. Dessa forma, a administração de P400 ou LEV200, isoladamente, causou uma *downregulation* nos subtipos M_1 and M_2 , respectivamente (**Tabela 3 e Figura 2**).

Tabela 3 – Efeitos do LEV200, administrado antes das convulsões induzidas por P400, sobre a densidade (fentomoles/mg de proteína) de receptores colinérgicos muscarínicos em hipocampo de camundongos

| Grupo | M ₁ +M ₂ | M ₁ | M ₂ |
|---------------|-----------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| Controle | 232,20 ± 19,11 (7) | 129,01 ± 12,11 (6) | 54,03 ± 4,98 (6) |
| LEV200 | 144,20 ± 10,80 (8) ^{a,d} | 130,30 ± 11,61 (6) | 14,21 ± 1,74 (6)* |
| P400 | 151,70 ± 14,65 (7) ^{a,d} | 50,52 ± 05,39 (7)* | 43,15 ± 4,38 (7) |
| LEV200 + P400 | 222,80 ± 15,66 (9) | 120,50 ± 11,93 (7) | 32,63 ± 2,61 (7) ^a |

Camundongos Swiss, machos, foram administrados com levetiracetam, 200mg/Kg, i.p. (LEV200); com pilocarpina, 400mg/Kg, s.c. (P400) ou com LEV200, 60 min. antes de P400. O grupo controle recebeu salina 0,9%. Os animais foram decapitados após 1h de observação para remoção do hipocampo. Os ensaios de *binding* foram realizados com [³H]-NMS e as ligações não-específicas determinadas em presença de atropina. Os ensaios subtipo-específico para receptores M₁ e M₂ foram realizados na presença de carbacol, para bloquear M₂ e pirenzepina, para bloquear M₁, respectivamente. Médias ± EPM do n de animais entre parênteses. ^{a, d} p < 0,01 comparado aos grupos Controle e LEV200 + P400, respectivamente; * p < 0,001 comparado aos demais grupos (ANOVA seguido por Student-Newman-Keuls).

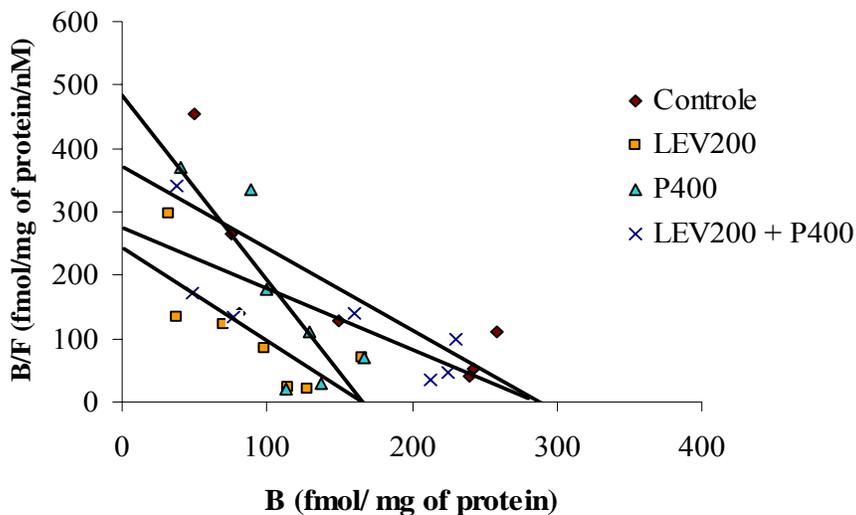
Figura 2- Efeitos do LEV200 sobre a densidade de receptores colinérgicos muscarínicos em hipocampo de camundongos tratados ou não com P400



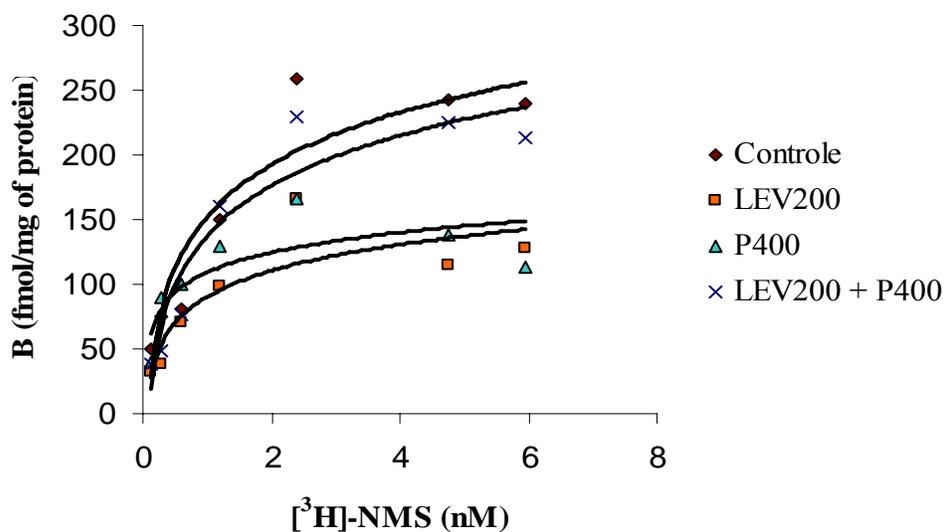
Sítios de ligação para [³H]-NMS (Receptores M₁+M₂, M₁ and M₂) em hipocampo de camundongos tratados ou não com LEV, 200 mg/Kg, i.p. (LEV 200), e administrados ou não com 400 mg/Kg, s.c. (P400). As barras representam média ± E.P.M do número de animais representados no interior destas. ^{a, d} p < 0,01 comparado aos grupos Controle e LEV200 + P400, respectivamente; * p < 0,001 comparado aos demais grupos (ANOVA seguido por Student–Newman-Keuls).

Figura 3- *Plot de Scatchard representativo e Curva de saturação de binding* [^3H]-NMS

A



B



Plot de Scatchard representativo (A) e curva de saturação (B) de *binding* para [^3H]-NMS (receptores muscarínicos: $M_1 + M_2$) em hipocampo de camundongos (Controle- $B_{\text{max}}= 288,30$, $K_d= 0,77$; LEV200- $B_{\text{max}}= 166,30$, $K_d= 0,68$; P400- $B_{\text{max}}= 165,40$, $K_d= 0,34$; LEV200 + P400- $B_{\text{max}}= 285,50$, $K_d= 1,04$).

2.2. Densidade de receptores dopaminérgicos (D₁- e D₂- símile) em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com levetiracetam e administrados ou não com pilocarpina.

O número de sítios de ligação para [³H]-SCH 23390 e [³H]-espiroperidol foi determinado em membranas de hipocampo de camundongos dos seguintes grupos de tratamento: Controle (salina 0,9%); Levetiracetam, 200 mg/Kg, i.p. (LEV200); pilocarpina, 400 mg/Kg, s.c. (P400) e LEV200 + P400. Foram realizados experimentos de ponto único com base nas curvas de saturação e Scatchards representativos, com concentrações crescentes dos ligantes radioativos (**Figuras 5 e 6**). Os resultados foram expressos em fentomoles/mg de proteína.

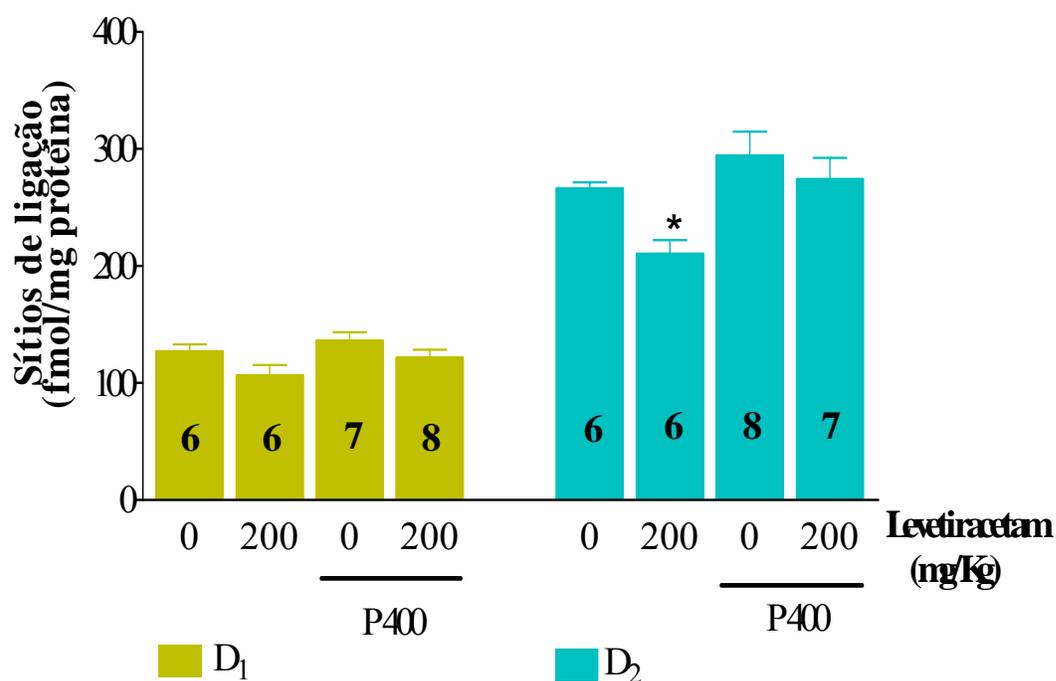
Ocorreu uma *downregulation* dos receptores D₂-símile no grupo LEV200, comparado aos demais. Observa-se, ainda, que a densidade de receptores dopaminérgicos (D₁ ou D₂) não sofreu alteração significativa na fase aguda do processo convulsivo induzido por P400, como também no grupo tratado com LEV200 antes de P400 (**Tabela 4 e Figura 4**).

Tabela 4 – Efeitos do LEV200, administrado antes das convulsões induzidas por P400, sobre a densidade (fentomoles/mg de proteína) de receptores dopaminérgicos em hipocampo de camundongos

| Grupo | D1 | D2 |
|---------------|-------------------|---------------------|
| Controle | 127,20 ± 6,08 (6) | 266,50 ± 5,24 (6) |
| LEV200 | 116,50 ± 8,83 (6) | 210,40 ± 11,76 (6)* |
| P400 | 136,10 ± 7,33 (8) | 294,60 ± 20,32 (8) |
| LEV200 + P400 | 121,60 ± 6,87 (8) | 274,30 ± 18,16 (7) |

Camundongos Swiss, machos, foram administrados com levetiracetam, 200mg/Kg, i.p. (LEV200); com pilocarpina, 400mg/Kg, s.c. (P400) ou com LEV200, 60 min. antes de P400. O grupo controle recebeu salina 0,9%. Os animais foram decapitados após 1h de observação para remoção do hipocampo. Os ensaios de *binding* foram realizados com [³H]-SCH23390 (receptores dopaminérgicos D₁) e [³H]-espiroperidol (receptores dopaminérgicos D₂) e as ligações não-específicas foram determinadas na presença de dopamina ou butaclamol, respectivamente. Na determinação de D₂ foi, ainda, usada mianserina, para bloquear receptores serotoninérgicos. Médias ± E.P.M do n de animais entre parênteses. * p < 0,05 comparado aos demais grupos (ANOVA seguido por Student–Newman-Keuls test).

Figura 4 - Efeitos do LEV200 sobre a densidade de receptores dopaminérgicos em hipocampo de camundongos tratados ou não com P400

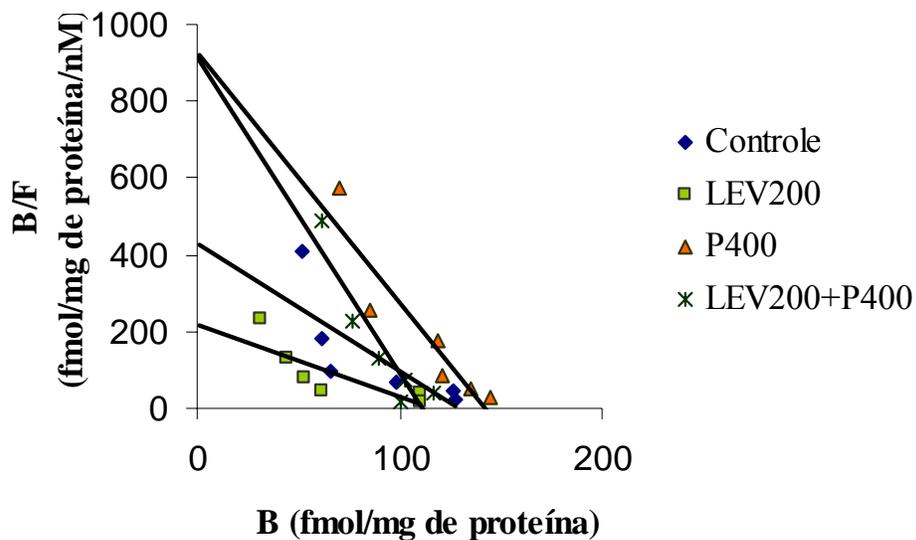


Sítios de ligação para [³H]-SCH23390 (receptores dopaminérgicos D₁) e [³H]-espiroperidol (receptores dopaminérgicos D₂) em hipocampo de camundongos tratados ou não com LEV, 200 mg/Kg, i.p. (LEV 200), e administrados ou não com 400 mg/Kg, s.c. (P400). As barras representam média ± E.P.M. do número de animais representados no interior destas.

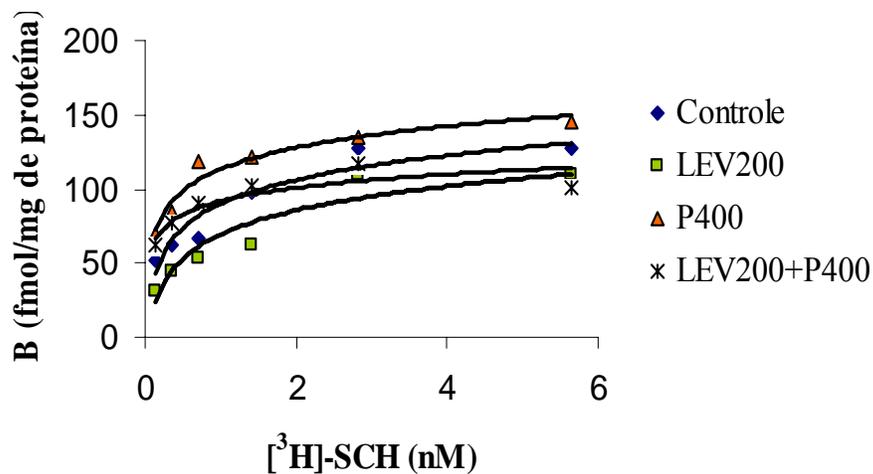
* P < 0,05 comparado aos demais grupos (ANOVA seguido por Student–Newman-Keuls test).

Figura 5 - *Plot de Scatchard representativo e curva de saturação de binding – [3H]- SCH 23390*

A



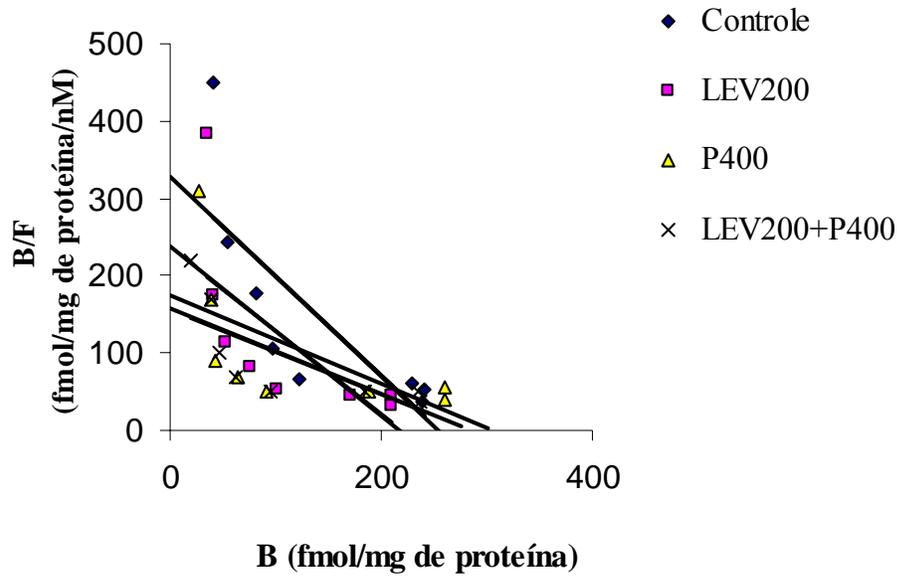
B



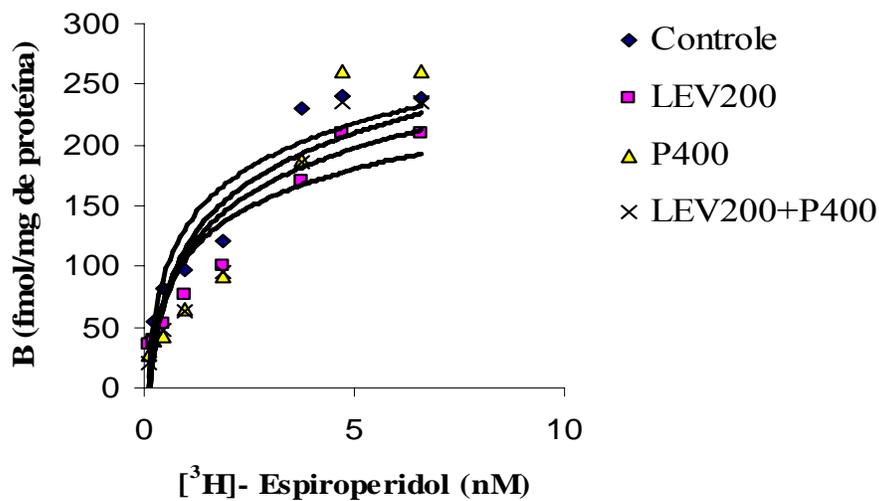
Plot de scatchard representativo (A) e curva de saturação (B) de binding para [3H]- SCH 23390 (receptores D₁) em hipocampo de camundongos (Controle- Bmax= 130,30 Kd= 0,30; LEV200- Bmax= 116,20, Kd= 0,45; P400- Bmax= 142,50, Kd= 0,15; LEV200 + P400- Bmax= 111,30, Kd= 0,12).

Figura 6 - *Plot de Scatchard representativo e curva de saturação de binding – [3H]- espiroperidol*

A



B



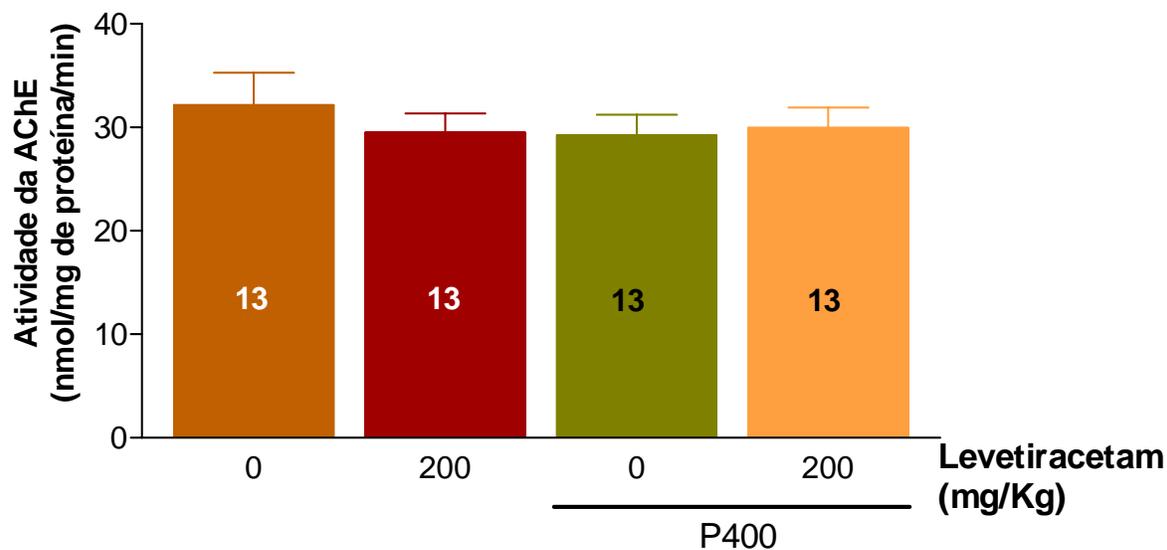
Plot de scatchard representativo e curva de saturação de binding para [3H]-espiroperidol (receptores D₂) em hipocampo de camundongos (Controle- B_{max}= 254,00 K_d= 0,77; LEV200- B_{max}= 218,90, K_d= 0,93; P400- B_{max}= 304,70, K_d= 1,76; LEV200 + P400- B_{max}= 284,00, K_d= 1,81).

2.3. Efeitos do LEV200 sobre a atividade da acetilcolinesterase em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400.

Os resultados das determinações da atividade enzimática da acetilcolinesterase (AChE) em hipocampo e corpo estriado de camundongos adultos, tratados ou não com LEV 200mg/Kg, i.p. (LEV200) antes da administração da pilocarpina 400mg/Kg, s.c. (P400) e sacrificados 1h após a administração de P400, foram expressos em nmoles/mg de proteína/minuto.

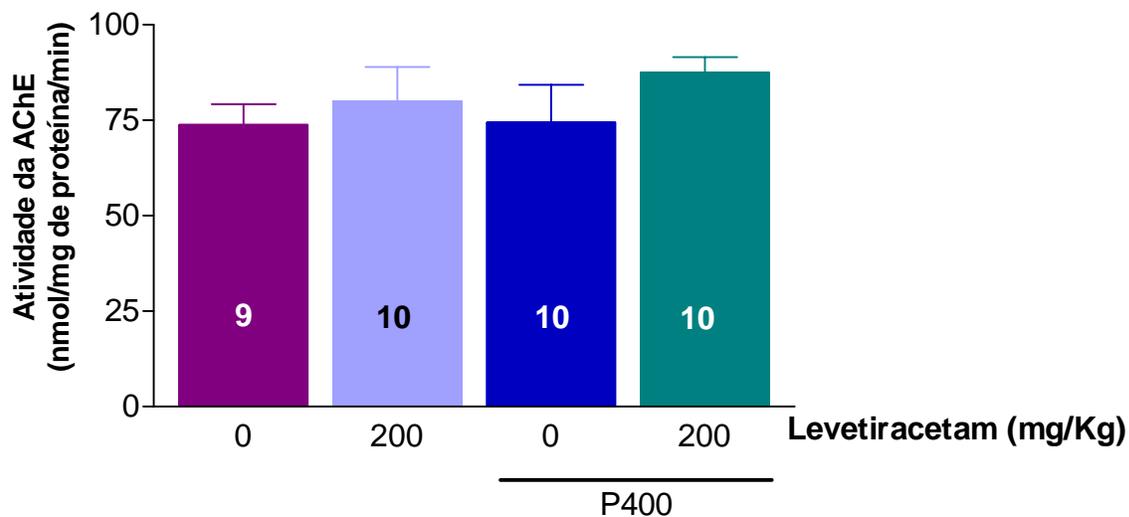
Nenhuma alteração significativa foi evidenciada no hipocampo ou corpo estriados dos animais pertencentes aos diferentes grupos de tratamento. Hipocampo: (**Controle** = $32,15 \pm 3,13$; **LEV200** = $29,48 \pm 1,85$; **P400** = $29,20 \pm 1,99$; **LEV200+P400** = $29,97 \pm 1,95$) (**Figura 7**); Corpo estriado: (**Controle** = $73,82 \pm 5,36$; **LEV200** = $79,96 \pm 8,97$; **P400** = $74,38 \pm 9,89$; **LEV200+P400** = $87,49 \pm 4,02$) (**Figura 8**).

Figura 7 – Efeitos do LEV200 sobre a atividade da AChE em hipocampo de camundongos durante as convulsões induzidas por P400



Atividade da AChE em hipocampo de camundongos Swiss adultos, tratados ou não com LEV, 200 mg/Kg, i.p. (LEV 200), e administrados ou não, após 60 minutos, com pilocarpina 400 mg/Kg, s.c. (P400). Os controles receberam salina 0,9% . Os animais foram submetidos a um período de 1h de observação. As barras representam média \pm EPM e número de animais está representado no interior destas. A atividade da acetilcolinesterase foi determinada em 5 μ L de homogenato. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*.

Figura 8 – Efeitos do LEV200 sobre a atividade da AChE em corpo estriado de camundongos durante as convulsões induzidas por P400



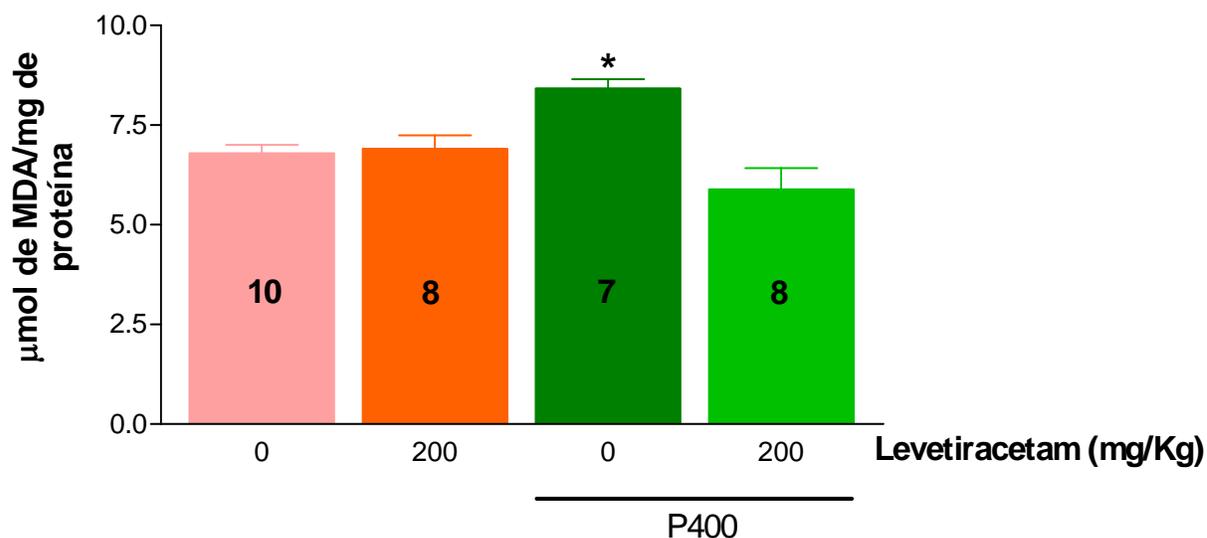
Atividade da AChE em corpo estriado de camundongos Swiss adultos, tratados ou não com LEV, 200 mg/Kg, i.p. (LEV 200), e administrados ou não, após 60 minutos, com pilocarpina 400 mg/Kg, s.c. (P400). Os controles receberam salina 0,9% . Os animais foram submetidos a um período de 1h de observação. As barras representam média \pm EPM e número de animais está representado no interior destas. A atividade da acetilcolinesterase foi determinada em 5 μ L de homogenato. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*.

2.4. Efeitos do LEV200 sobre a produção de substâncias ácidas reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400.

Os resultados da análise da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com levetiracetam 200mg/Kg, i.p. (LEV200), 60 minutos antes da administração de pilocarpina na dose de 400mg/Kg, s.c. (P400), e sacrificados 1h após a última administração, foram expressos em μmol de MDA (malonildialdeído)/ mg de proteína.

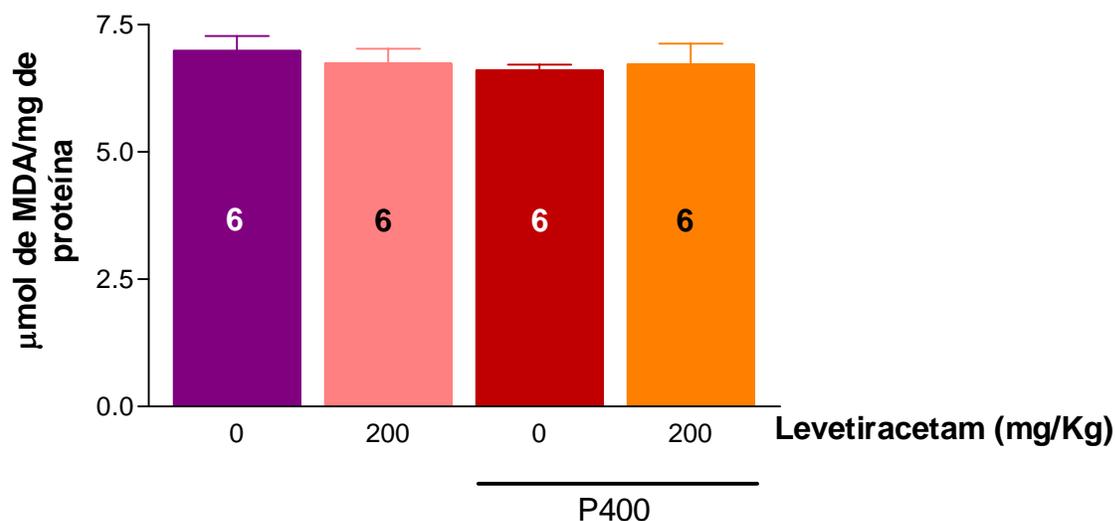
Um aumento significativo na concentração de MDA em relação aos demais grupos foi evidenciado no hipocampo dos animais tratados com pilocarpina. Esse aumento foi revertido pelo pré-tratamento com levetiracetam (grupo L200 + P400) (**Controle** = $6,79 \pm 0,22$; **LEV200** = $6,90 \pm 0,34$; **P400** = $8,41 \pm 0,24$; **LEV200+P400** = $5,89 \pm 0,54$) (**Figura 9**). Já no corpo estriado, nenhuma alteração significativa foi observada (**Controle** = $6,98 \pm 0,29$; **LEV200** = $6,73 \pm 0,29$; **P400** = $6,59 \pm 0,12$; **LEV200+P400** = $6,72 \pm 0,41$) (**Figura 10**).

Figura 9 - Determinação da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) após a administração de P400 em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com LEV200



Camundongos Swiss adultos foram tratados ou não com LEV, 200 mg/Kg, i.p. (LEV 200) e após 60 minutos com pilocarpina, 400mg/kg, s.c. (P400). Os controles receberam salina 0,9% . Os animais foram submetidos a um período de 1h de observação. Os valores representam a média \pm EPM, o número de animais está representado no interior das barras. Foi determinada a ocorrência de lipoperoxidação, com base na concentração de MDA, em homogenatos de hipocampo submetidos a condições (temperatura e oxigenação) controladas. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. * $p < 0,01$ comparado aos demais grupos.

Figura 10 - Verificação da produção de substâncias reativas com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) após a administração de P400 em corpo estriado de camundongos pré-tratados ou não com LEV200



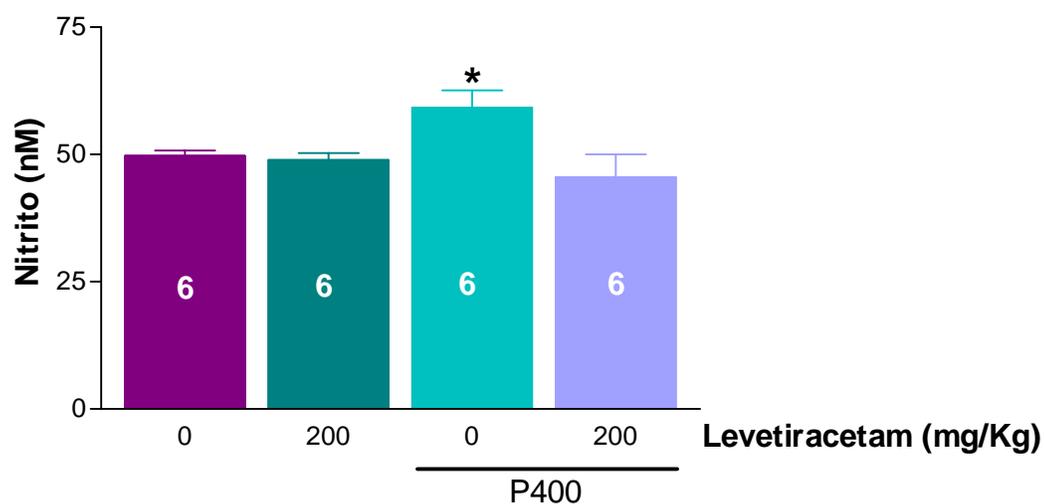
Camundongos Swiss adultos foram tratados ou não com LEV, 200 mg/Kg, i.p. (LEV 200) e após 60 minutos com pilocarpina, 400mg/kg, s.c. (P400). Os controles receberam salina 0,9% . Os animais foram submetidos a um período de 1h de observação. Os valores representam a média \pm EPM, o número de animais está representado no interior das barras. Foi determinada a ocorrência de lipoperoxidação, com base na concentração de MDA, em homogenatos de corpo estriado, submetidos a condições (temperatura e oxigenação) controladas. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*.

2.5. Efeitos do LEV200 sobre a produção de nitrito em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400.

Os resultados da verificação da produção de nitrito em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com levetiracetam 200mg/Kg, i.p. (LEV200), 60 minutos antes da administração de pilocarpina na dose de 400mg/Kg, s.c. (P400), e sacrificados 1h após a última administração, foram expressos em nM.

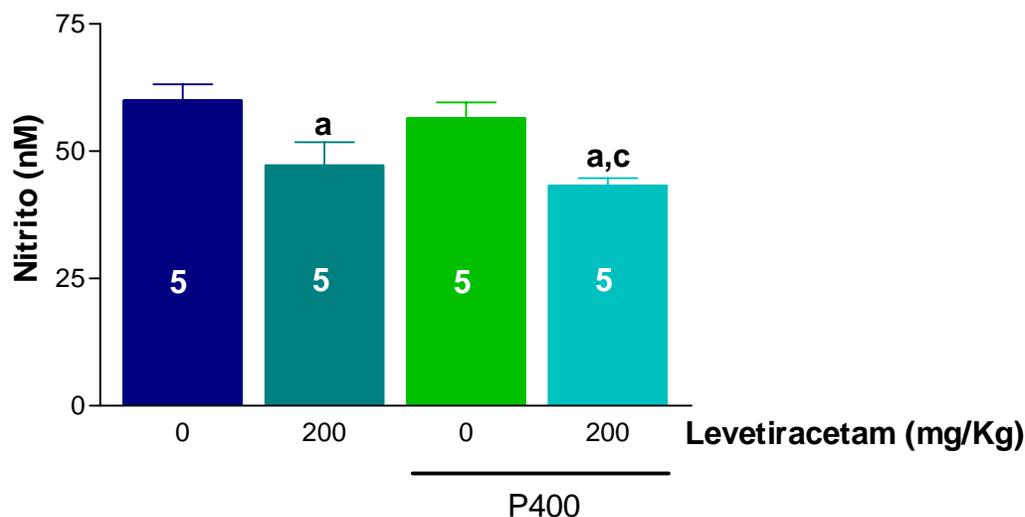
Um aumento significativo na concentração de nitrito foi evidenciado no hipocampo dos animais tratados apenas com pilocarpina em relação aos demais grupos. O pré-tratamento com levetiracetam (grupo LEV200 + P400) reverteu esse aumento (**Controle** = $49,73 \pm 1,04$; **LEV200** = $48,88 \pm 1,41$; **P400** = $59,18 \pm 3,42$; **LEV200+P400** = $45,53 \pm 4,48$) (**Figura 11**). No corpo estriado, ocorreu redução na concentração de nitrito no grupo tratado apenas com levetiracetam em relação ao grupo controle (salina) e no grupo que recebeu pilocarpina + levetiracetam em relação aos grupos tratados apenas com salina ou apenas com levetiracetam. Nenhuma alteração significativa foi observada no grupo tratado apenas com pilocarpina em relação ao controle (**Controle** = $59,95 \pm 3,23$; **LEV200** = $47,22 \pm 4,55$; **P400** = $56,47 \pm 3,10$; **LEV200+P400** = $43,22 \pm 1,50$) (**Figura 12**).

Figura 11 – Verificação da produção de nitrito após administração de P400 em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não com LEV200



Camundongos Swiss adultos foram tratados ou não com LEV, 200 mg/Kg, i.p. (LEV 200) e, após 60 minutos, com pilocarpina, 400mg/kg, s.c. (P400). Os controles receberam salina 0,9% . Os animais foram submetidos a um período de 1h de observação. Os valores representam a média \pm EPM, o número de animais está representado no interior das barras. A produção de nitrito foi determinada em 100 μ L de homogenato. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. * $p < 0,05$ comparado aos demais grupos.

Figura 12 – Verificação da produção de nitrito após administração de P400 em corpo estriado de camundongos pré-tratados ou não com LEV200



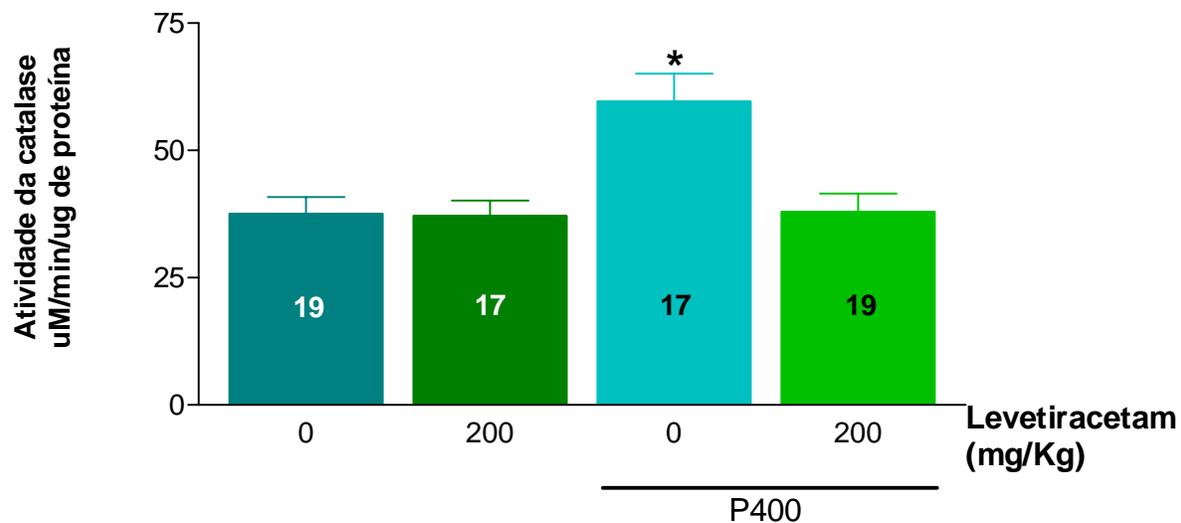
Camundongos Swiss adultos foram tratados ou não com LEV, 200 mg/Kg, i.p. (LEV 200) e, após 60 minutos, com pilocarpina, 400mg/kg, s.c. (P400). Os controles receberam salina 0,9% . Os animais foram submetidos a um período de 1h de observação. Os valores representam a média \pm EPM, o número de animais está representado no interior das barras. A produção de nitrito foi determinada em 100 μ L de homogenato. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. **a e c**, $p < 0,05$ comparado ao grupo controle (salina) e ao grupo P400, respectivamente.

2.6. Efeitos do LEV200 sobre a atividade da catalase em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400.

Os resultados da determinação da atividade enzimática da catalase em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com levetiracetam 200mg/Kg, i.p. (LEV200), 60 minutos antes da administração de pilocarpina na dose de 400mg/Kg, s.c. (P400), e sacrificados 1h após a última administração, foram expressos em $\mu\text{mol}/\text{minuto}/\mu\text{g}$ de proteína.

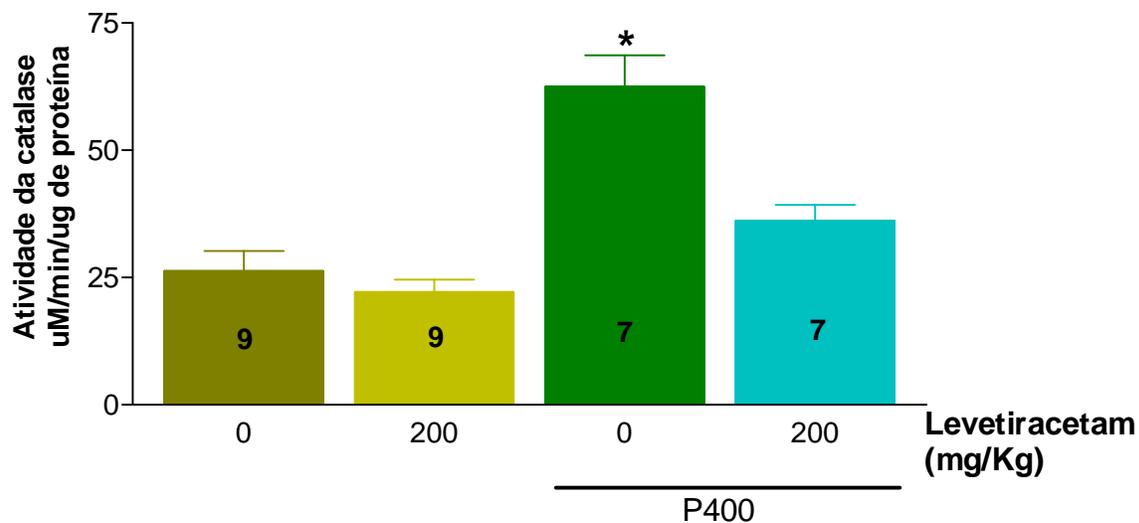
Foi observado um aumento significativo, em relação aos demais grupos, da atividade da catalase tanto em hipocampo como em corpo estriado dos animais tratados apenas pilocarpina. Em ambas as áreas, esse aumento foi revertido pelo tratamento com levetiracetam antes da pilocarpina (grupo L200+P400): Hipocampo (**Controle** = $37,56 \pm 3,26$; **LEV200** = $37,10 \pm 3,05$; **P400** = $59,62 \pm 5,46$; **LEV200+P400** = $37,88 \pm 3,63$); Corpo estriado (**Controle** = $26,30 \pm 3,92$; **LEV200** = $22,17 \pm 2,45$; **P400** = $62,48 \pm 6,18$; **LEV200+P400** = $36,13 \pm 3,16$) (**Figuras 13 e 14**).

Figura 13 - Atividade da catalase, após a administração de P400, em hipocampo de camundongos pré-tratados ou não LEV200



Camundongos Swiss adultos foram tratados ou não com LEV, 200 mg/Kg, i.p. (LEV 200) e, após 60 minutos, com pilocarpina, 400mg/kg, s.c. (P400). Os controles receberam salina 0,9% . Os animais foram submetidos a um período de 1h de observação. Os valores representam a média \pm EPM, o número de animais está representado no interior das barras. A atividade da catalase foi determinada em 20 μ L de homogenato. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. * $p < 0,01$ comparado aos demais grupos.

Figura 14 - Atividade da catalase, após a administração de P400, em corpo estriado de camundongos pré-tratados ou não LEV200



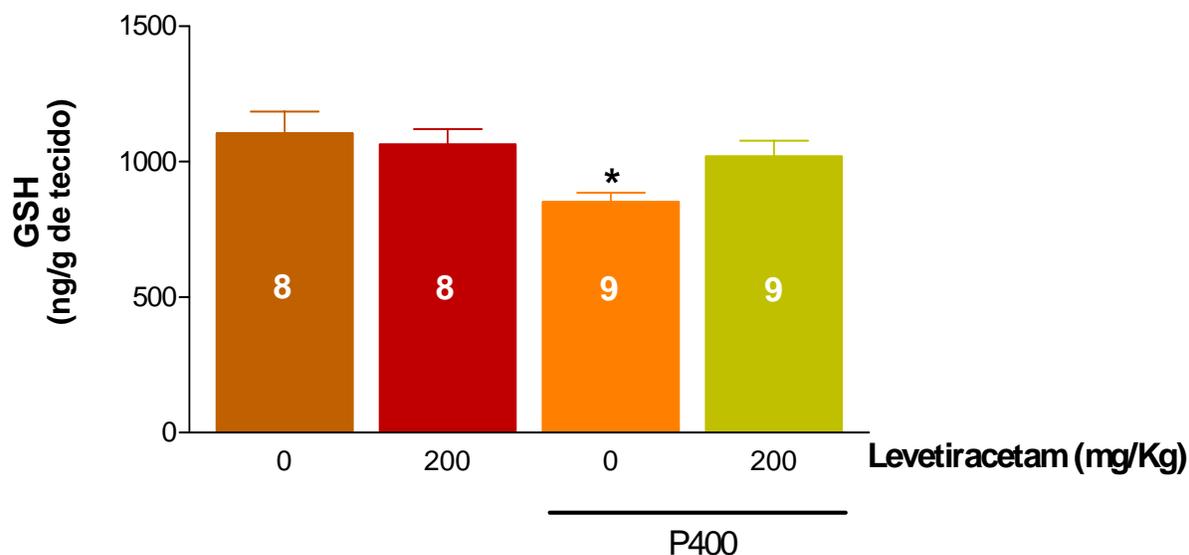
Camundongos Swiss adultos foram tratados ou não com LEV, 200 mg/Kg, i.p. (LEV 200) e, após 60 minutos, com pilocarpina, 400mg/kg, s.c. (P400). Os controles receberam salina 0,9% . Os animais foram submetidos a um período de 1h de observação. Os valores representam a média \pm EPM, o número de animais está representado no interior das barras. A atividade da catalase foi determinada em 20 μ L de homogenato. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. * $p < 0,001$ comparado aos demais grupos.

2.7. Efeitos do LEV200 sobre a concentração da glutathiona reduzida (GSH) após a administração de P400 em hipocampo e corpo estriado de camundongos.

Os resultados da determinação da concentração da glutathiona reduzida (GSH) em hipocampo e corpo estriado de camundongos tratados ou não com levetiracetam 200mg/Kg, i.p. (LEV200), 60 minutos antes da administração de pilocarpina na dose de 400mg/Kg, s.c. (P400), e sacrificados 1h após a última administração, foram expressos em ng/grama de tecido.

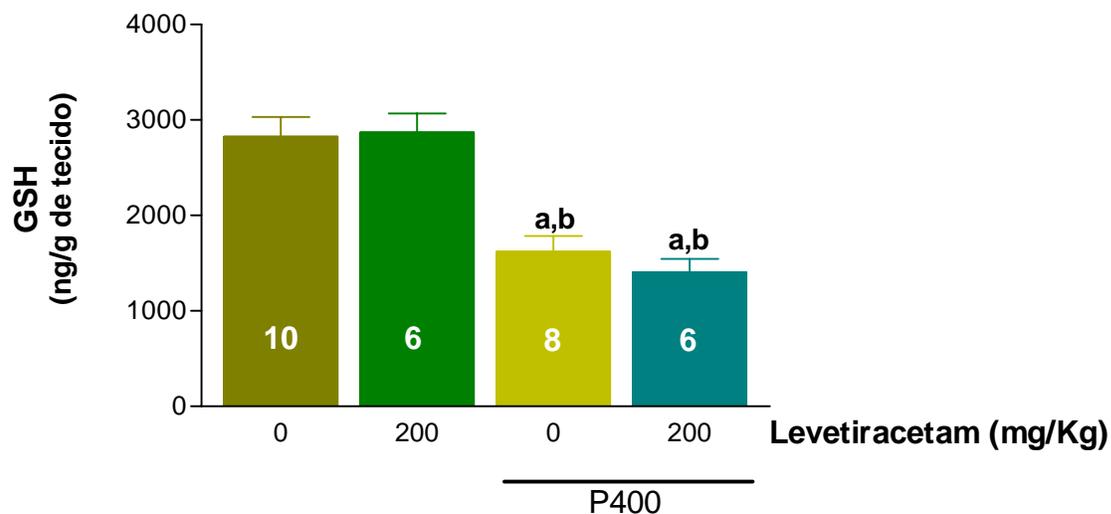
Foi constatada uma redução significativa na concentração de GSH no hipocampo dos animais tratados apenas com levetiracetam, em relação aos demais grupos. Essa redução foi revertida quando os animais foram tratados com levetiracetam antes da pilocarpina (**Controle** = $1104,00 \pm 81,42$; **LEV200** = $1063,01 \pm 56,65$; **P400** = $850,80 \pm 34,26$; **LEV200+P400** = $1020,00 \pm 57,86$) (**Figura 15**). No corpo estriado, houve redução na concentração de GSH em todos os grupos que receberam pilocarpina, não sendo esse efeito alterado pela pré-administração de levetiracetam (**Controle** = $2824,00 \pm 205,80$; **LEV200** = $2867,01 \pm 202,80$; **P400** = $1619,20 \pm 167,10$; **LEV200+P400** = $1404,10 \pm 140,03$) (**Figura 16**)

Figura 15– Efeito do LEV200 sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) em hipocampo de camundongos tratados ou não com P400



Camundongos Swiss adultos foram tratados ou não com LEV, 200 mg/Kg, i.p. (LEV 200) e, após 60 minutos, com pilocarpina, 400mg/kg, s.c. (P400). Os controles receberam salina 0,9% . Os animais foram submetidos a um período de 1h de observação. Os valores representam a média \pm EPM, o número de animais está representado no interior das barras. A concentração de GSH foi determinada em 200 μ L de homogenato. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. * $p < 0,05$ comparado aos demais grupos.

Figura 16– Efeito do LEV200 sobre a concentração de glutathiona reduzida (GSH) em corpo estriado de camundongos tratados ou não com P400



Camundongos Swiss adultos foram tratados ou não com LEV, 200 mg/Kg, i.p. (LEV 200) e, após 60 minutos, com pilocarpina, 400mg/kg, s.c. (P400). Os controles receberam salina 0,9% . Os animais foram submetidos a um período de 1h de observação. Os valores representam a média \pm EPM, o número de animais está representado no interior das barras. A concentração de GSH foi determinada em 200 μ L de homogenato. Para análise estatística foram usados ANOVA e teste t-Student-Neuman-Keuls como *post-hoc*. **a e b**, $p < 0,001$ comparados aos grupos controle (salina) e LEV200, respectivamente.

DISCUSSÃO

O foco epileptogênico dos pacientes com epilepsia do lobo temporal apresenta-se no hipocampo. Nesta área, neurônios piramidais estão envolvidos com o início da atividade convulsiva epiléptica e são lesionados por convulsões recorrentes (Wyss e Van Groen, 1995).

Análises comportamentais e eletroencefalográficas demonstraram que a administração sistêmica de pilocarpina em roedores induz convulsões com foco de início no sistema límbico, principalmente no hipocampo (Turski et al., 1983a). Essa atividade convulsiva torna-se secundariamente generalizada, sugerindo que este modelo mimetiza diversos aspectos das convulsões parciais complexas com generalização secundária em humanos. Essas convulsões generalizadas mostram-se resistentes a grande parte dos medicamentos anticonvulsivantes. O levetiracetam (LEV), um novo agente anticonvulsivante, no entanto, demonstra proteção significativa contra essas convulsões (Klitgaard et al., 1998).

Estudos recentes sugerem que o estresse oxidativo mitocondrial, pela geração de radicais livres, em consequência do *status epilepticus* induzido por agentes como a pilocarpina, pode resultar em dano oxidativo e lesões no DNA, que podem deixar o cérebro mais susceptível a convulsões epilépticas (Patel et al., 2004).

Dessa forma, o presente trabalho objetivou estudar os efeitos do LEV sobre as convulsões induzidas por pilocarpina (400mg/Kg, s.c; P400) em camundongos, através da análise das alterações comportamentais e neuroquímicas (incluindo efeito sobre sistemas de neurotransmissores, enzimáticos e aspectos envolvidos no estresse oxidativo) relacionadas à densidade de receptores muscarínicos (M_1 , M_2 e M_1+M_2 -símile) e dopaminérgicos (D_1 e D_2 -símile) no hipocampo, além da atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e catalase (CAT), dos níveis da glutatona reduzida (GSH), do conteúdo de nitrito e do índice de lipídio peroxidação em hipocampo e corpo estriado.

ESTUDOS COMPORTAMENTAIS E NEUROQUÍMICOS

Estudos prévios revelaram que o LEV apresenta espectro de ação amplo e diferenciado, tanto em modelos experimentais quanto no tratamento das convulsões em humanos (Gower et al, 1992; Löscher and Hönac 1993). Atualmente, diversas investigações foram realizadas, objetivando esclarecer o mecanismo de ação dessa droga. Resultados obtidos no presente estudo confirmam a atividade anticonvulsivante do LEV nas convulsões induzidas por P400, reportada em estudos prévios (Klitgaard et al, 1998, 2003; Glien et al., 2002), mostrando um aumento significativo na latência do início das convulsões e na latência de morte dos animais tratados, bem como, uma significativa redução na ocorrência das convulsões, *status epilepticus* e morte, decorrentes da administração de P400.

A análise comportamental e a elaboração de curvas dose-resposta para latências de convulsão e de morte permitiram observar uma proteção mais significativa na dose de 200 mg/Kg, que, portanto, foi escolhida para tratamento dos animais utilizados nos estudos neuroquímicos, considerando seu amplo efeito protetor e referências prévias da baixa toxicidade e alta margem de segurança do LEV (Klitgaard et al., 1998) e poucos efeitos adversos em roedores, mesmo em doses de até 1000 mg/Kg (Mazarati et al, 2004).

Sabe-se que a oxotremorina é capaz de induzir tremores, que são bloqueados pela atropina (Coward et al., 1977) e mediados, possivelmente, através da estimulação central do sistema colinérgico (Bebbington et al., 1996). O efeito protetor contra as convulsões induzidas por P400, somado à redução na intensidade dos tremores induzidos pela oxotremorina, sugere uma modulação do sistema colinérgico pelo LEV. Nesse contexto, ensaios de *binding* com [³H]-NMS foram realizados no hipocampo de camundongos tratados com LEV e/ou P400.

A ativação colinérgica é essencial para o início do processo convulsivo em modelos de epilepsia do lobo temporal, visto que estas convulsões podem ser bloqueadas pelo pré-tratamento com o antagonista muscarínico atropina (Marinho et al., 1998; De Bruin et al.,

2000). A pilocarpina exacerba a atividade colinérgica, provavelmente por influência direta, aumentando a ação da ACh circulante, modificando o *binding* dos receptores muscarínicos (Hruska et al., 1984) e diminuindo a atividade acetilcolinesterásica (Imperato et al., 1998).

Os fenômenos de *up* ou *downregulation* constituem exemplos de adaptações quantitativas cerebrais que ocorrem numa determinada via, em resposta a um certo estímulo (Hyman e Nestler, 1996). A *downregulation* dos receptores muscarínicos, mediada por agonistas, é um fenômeno já reportado em diversos estudos (Koppen e Kaiser, 2003). Existem vários relatos da ocorrência de dessensibilização aguda dos receptores muscarínicos em curto prazo (em minutos), induzida pelo tratamento com agonistas, envolvendo a fosforilação do receptor por proteínas quinases (Stope et al., 2003). A administração de P400, como esperado, causou *downregulation* dos receptores M₁+M₂. O pré-tratamento com LEV aboliu a *downregulation* induzida pela P400, levando à normalização da densidade desses receptores. Todavia, a administração do LEV sozinho, surpreendentemente, causou uma *downregulation* desses receptores quando comparado ao grupo controle (salina).

Várias evidências indicam que receptores acoplado a proteína G, incluindo receptores muscarínicos, podem adotar múltiplas conformações, que seriam geradas espontaneamente ou induzidas/estabilizadas pela interação do receptor com agonistas ou antagonistas clássicos (ortostéricos), os quais se ligariam ao sítio de ligação do agonista endógeno, bem como compostos alostéricos, os quais se ligariam a outros sítios no receptor (Koppen et al., 2003).

A ligação de moduladores alostéricos a sítios de ligação alostéricos leva a uma mudança na conformação do sítio de ligação clássico, o que, usualmente, resulta em mudança na afinidade do receptor para agonista e antagonista clássicos. Todos os subtipos de receptores muscarínicos são susceptíveis a modulação alostérica e as características dessa regulação são únicas para cada subtipo de receptor. (Koppen et al., 2003).

Em 1989, Wulfert et al demonstraram que o LEV foi capaz de induzir contração do íleo de cobais (numa preparação *in vitro*) e que esse efeito era inibido pela atropina e potencializado pela fisiostigmina, sugerindo uma facilitação da função colinérgica. Nossos resultados podem sugerir um tipo de modulação alostérica exercida pelo LEV sobre os receptores colinérgicos M_1+M_2 , desde que já se sabe que vários compostos (ex: estriçnina e alcurônio) podem modificar alostericamente a ligação de agonistas dos receptores muscarínicos, como carbacol, pilocarpina e oxotremorina, e que alguns desses moduladores alostéricos podem atuar como agonistas na ausência do agonista ortostérico desses receptores (Jakubik et al., 1997).

No entanto, os ensaios de *binding* seguintes mostraram uma *downregulation* nos sítios de ligação do subtipo M_1 de receptores muscarínicos apenas após o tratamento com a P400 sozinha, confirmando sua ação agonista em M_1 e o papel crucial, previamente estabelecido, dos receptores M_1 na instalação das convulsões no modelo de epilepsia induzida por pilocarpina (Turski et al., 1989; Hamilton et al., 1998; Eglen et al., 2001). A administração do LEV sozinho não alterou a densidade dos receptores M_1 . Os ensaios realizados nos receptores do subtipo M_2 , todavia, demonstraram que a ação agonista-símile do LEV (levando à *downregulation*) parece ser seletiva para o subtipo M_2 .

Segundo Eglen et al (2001) a ação estimulante da acetilcolina endógena sobre os receptores M_2 na musculatura lisa resulta em reversão do relaxamento induzido por AMPc, favorecendo, indiretamente, a contração. Ainda no mesmo trabalho, observou-se que camundongos *knockout* (com ausência da expressão do receptor, decorrente de modificação genética) para receptor M_2 apresentam uma redução na intensidade dos tremores induzidos pela oxotremorina (sugerindo a participação desse subtipo de receptores no mecanismo desses tremores) e uma pequena redução na potência de agonistas de receptores muscarínicos para induzir contração do músculo liso do íleo. Considerando a ação agonista-símile do LEV sobre os receptores M_2 , observada nos ensaios de *binding* do presente trabalho, uma competição (entre LEV e oxotremorina) por esses receptores poderia contribuir para a redução dos tremores induzidos pela oxotremorina nos animais pré-tratados com LEV.

A ativação dos receptores M_2 reverte a abertura dos canais de potássio por agonistas dos receptores beta adrenérgicos, diminuindo o relaxamento da musculatura lisa (*in vitro*) induzido pela ativação do sistema simpático (Kume et al., 1991). Interessantemente, Madeja et al (2003) demonstraram que LEV reduz a ativação dos canais de potássio voltagem-dependentes no hipocampo de ratos e cobaias, reduzindo a geração de potenciais de ação repetitivos, o que poderia contribuir para sua ação anticonvulsivante.

Os receptores M_2 podem atuar normalmente atenuando a atividade neuronal mediada pelos receptores M_1 . Essa atenuação pode ocorrer tanto pela ação pós-sináptica, reduzindo a responsividade dos receptores M_1 a agonistas como pela função auto-receptores, inibindo a liberação de ACh dos neurônios pré-sinápticos (Maslanski, et al., 1994). Dessa forma, um aumento na atividade dos receptores M_2 , induzido pelo LEV, poderia favorecer sua ação anticonvulsivante no modelo de convulsões em estudo. Estudos com outras drogas antiepilépticas (ex. valproato ou benzodiazepínicos) poderiam ser úteis para saber se esse efeito é seletivo para o LEV.

Recentemente, foi relatado que o LEV apresenta, além dos efeitos anticonvulsivantes, efeitos antihiperálgicos em modelos de dor neuropática (Ardid et al., 2003). A contribuição dos receptores M_2 na mediação central da antinocicepção já foi atestada em estudos que demonstraram uma redução nos efeitos analgésicos de agonistas muscarínicos injetados intracerebroventricularmente em camundongos *knockout* para receptores M_2 (Gomez, 1999; Wess et al., 2003). Dessa forma, a ação agonista-símile do LEV sobre os receptores M_2 poderia ser útil para explicar, pelo menos em parte, outros efeitos relacionados ao LEV, além da sua ação anticonvulsivante.

Burke et al (1990) demonstraram que, em camundongos tratados com pilocarpina, a estimulação e o bloqueio dos receptores dopaminérgicos do tipo D_1 agrava ou ameniza, respectivamente, a expressão das convulsões nesse modelo, enquanto a estimulação e o bloqueio de D_2 tem, exatamente, efeitos opostos. Outros estudos já haviam sugerido que ativação dos receptores dopaminérgicos centrais do tipo D_1 , pela administração sistêmica

de agonistas seletivos, aumentava a frequência e a severidade das convulsões induzidas por pilocarpina e que, por outro lado, ratos eram protegidos das convulsões induzidas por pilocarpina quando pré-tratados com agonistas dos receptores D₂ (Markstein et al., 1986). Além disso, Barone et al (1991) demonstram que antagonistas dos receptores D₂ facilitam as convulsões induzidas por lítio e pilocarpina.

Tais estudos sugerem que o sistema dopaminérgico tem uma importante participação no mecanismo de propagação das convulsões, observada através da potencialização dos efeitos convulsivantes decorrentes da estimulação dos receptores D₁, bem como pela redução na intensidade das convulsões através da ativação dos receptores D₂ (Barone et al., 1990a; 1992). Estas observações indicam que estes dois receptores dopaminérgicos parecem possuir efeitos opostos na regulação da atividade epiléptica.

A evolução das convulsões induzidas por pilocarpina inicia-se no hipocampo, desde que distúrbios na atividade eletrográfica são primeiramente detectados nesta região (Turski et al., 1989). Embora a inervação dopaminérgica no hipocampo seja escassa em comparação à densa projeção nigroestriatal (Ishikawa et al., 1982), existem crescentes evidências que a dopamina hipocampal pode exercer um importante papel regulatório no desenvolvimento das convulsões. La Grutta e Sabatino (1990) demonstraram que a estimulação elétrica da substância nigra (pars compacta) suprime os picos epileptiformes hipocampais induzidos por penicilina em gatos e que a dopamina liberada dos neurônios nigrohipocampais exerce seus efeitos antiepilépticos ativando os receptores D₂.

Receptores muscarínicos do tipo M₂ também atuam como heterorreceptores nas terminações dopaminérgicas centrais, interferindo na neurotransmissão dopaminérgica (Eglen et al., 2001). Em ratos, uma droga experimental (PTAC), agonista parcial dos receptores M₂-símile e antagonista dos receptores M₁-símile, exibiu efeitos antipsicóticos e induziu uma redução da neurotransmissão dopaminérgica no sistema límbico (Eglen et al., 2001).

Nesse contexto, considerando a influência da neurotransmissão dopaminérgica nas convulsões, foram realizados ensaios de *binding* em receptores dopaminérgicos no hipocampo, objetivando verificar possíveis alterações no comportamento desses receptores, decorrentes do tratamento com LEV e/ou P400.

Nossos resultados demonstraram uma ausência de variações significativas na densidade dos receptores D₁ entre os diferentes grupos de tratamento. Todavia, uma *downregulation* dos receptores D₂ foi observada nos animais tratados apenas com LEV. De acordo com Bozzi e Borrelli (2002) a sinalização mediada pelos receptores D₂ interfere nos efeitos neurotóxicos induzidos pelo aumento na neurotransmissão colinérgica. Esses autores caracterizam esse subtipo de receptor dopaminérgico como modulador geral essencial das convulsões epilépticas, exibindo um controle inibitório da atividade epiléptica cerebral em camundongos. Alam e Starr (1993) já haviam demonstrado que injeções focais de agonistas seletivos dos receptores D₂ no hipocampo aumentam significativamente o limiar das convulsões induzidas por pilocarpina. Dessa forma, a *downregulation* exercida pelo LEV sobre os receptores D₂, considerada um mecanismo compensatório, decorrente da ativação desses receptores na presença dessa droga, pode constituir uma outra via de modulação induzida pelo LEV, contribuindo para seu efeito anticonvulsivante no modelo em estudo, muito embora esse efeito seja revertido na presença de P400.

Um estudo realizado em roedores mostrou que a liberação de dopamina hipocampal diminui o limiar das convulsões induzidas por pilocarpina, pela ativação dos receptores D₁ (Starr, 1993). O fato de não ter sido observada alteração significativa na densidade dos receptores D₁ no presente estudo, mesmo no grupo tratado apenas com pilocarpina, pode ser explicado por uma possível alteração na afinidade, e não na quantidade, desses receptores na fase aguda do processo convulsivo. Nosso Scatchard representativo mostrou que a constante de dissociação (K_d) dos receptores D₁ foi reduzida à metade no hipocampo de camundongos tratados apenas com pilocarpina comparado ao controle e ao grupo tratado somente com com LEV, sugerindo um aumento na afinidade desses receptores pela dopamina no grupo tratado somente com pilocarpina. No entanto, outros Scatchards seriam necessários para verificar se esse efeito é, de fato, significativo.

Sabe-se que drogas anticolinesterásicas (colinérgica indiretas) também podem exercer efeitos excitatórios similares a agonistas colinérgicos exógenos (pilocarpina, carbacol e oxotremorina). Acredita-se que a diminuição do metabolismo da acetilcolina, pela diminuição ou bloqueio da atividade da acetilcolinesterase (AChE), pode facilitar a instalação da atividade epiléptica em virtude do aumento da concentração da acetilcolina endógena, que pode ativar diretamente o sistema colinérgico e, de forma direta ou indireta, pode induzir mudanças neuroquímicas em outros sistemas de neurotransmissão, dentre eles, o dopaminérgico, serotoninérgico, glutamatérgico e GABAérgico, uma vez que podem estar implicados durante o estabelecimento e desenvolvimento das convulsões límbicas (Imperato et al., 1998).

Nossos resultados, no entanto, demonstraram que não ocorrem alterações significativas na atividade acetilcolinesterásica em hipocampo e corpo estriado decorrentes do tratamento com LEV e/ou pilocarpina. Embora Freitas (2003b) tenha demonstrado uma redução na atividade da AChE no corpo estriado de ratos na fase aguda das convulsões induzidas por pilocarpina, essa alteração não parece evidente no cérebro dos camundongos, não havendo correlação possível entre os efeitos do LEV sobre o sistema colinérgico evidenciados no presente estudo e a atividade enzimática da AChE.

DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

A peroxidação lipídica pode ser produzida por danos na membrana celular e mitocondrial de diferentes células, inclusive neuronais (Patel et al., 2004) e, ainda, pode ser capaz de produzir outras alterações moleculares, através da inibição da enzima ATPase, que estão implicadas nos mecanismos dos receptores GABAérgicos e que podem ser importantes no processo convulsivo (Lees, 1991).

O modelo de epilepsia pela administração de pilocarpina pode induzir uma variedade de processos bioquímicos, incluindo a ativação de fosfolipases de membrana, proteases e nucleases. Os fosfoinosítídeos participam na transdução do sinal celular e

podem iniciar uma cascata de eventos que culminam na formação de segundos mensageiros, que podem estar envolvidos na atividade epiléptica durante a propagação dos efeitos convulsivantes nas demais áreas envolvidas no processo (Bruce e Baudry, 1995). As alterações no metabolismo dos fosfolipídios de membrana podem resultar também na liberação de diacilglicerol (DAG), eicosanóides, lipídios peróxidos e radicais livres.

Os radicais livres estão envolvidos em inúmeras condições patológicas e parece que, indiretamente, refletem nos mecanismos de defesa para o estresse oxidativo, como o aumento da atividade das enzimas removedoras dos radicais livres (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase); oxidação de lipídios e proteínas estruturais e alterações no nível de glutathione reduzida (GSH) (Ahlemeyer e Krieglstein, 2000). Assim, o estresse oxidativo pode participar dos mecanismos de inúmeras desordens neurológicas agudas e crônicas, inclusive da atividade epiléptica.

Modelos experimentais em roedores mostraram que o estresse oxidativo parece contribuir para a morte de células neuronais e gliais. Kim et al. (1997) demonstraram uma elevação de oxidação protéica e lipídica no hipocampo de animais após 4 e 24 horas da administração de ácido caínico. Freitas et al. (2004b) também mostraram níveis aumentados de peroxidação lipídica durante o período agudo das convulsões induzidas por pilocarpina em várias áreas cerebrais de ratos.

Nossos dados revelaram que no hipocampo, mas não em corpo estriado, a administração de pilocarpina produziu um aumento da peroxidação lipídica (expressa pelo aumento na concentração de MDA), confirmando o envolvimento de radicais livres na injúria cerebral, especialmente no hipocampo, induzida pelas convulsões decorrentes da pilocarpina. De maneira interessante, o pré-tratamento com LEV inibiu o aumento na peroxidação lipídica, induzido pela pilocarpina, no hipocampo, sugerindo uma ação antioxidante dessa droga no modelo em estudo, evidenciada pela estabilização dos níveis hipocámpais de MDA. Marini et al (2004) já haviam demonstrado que o LEV reduz o aumento níveis de MDA, induzido pela administração de ácido caínico, no córtex de ratos. Assim, continuamos os estudos dos efeitos do LEV, investigando outros aspectos

envolvidos na produção de radicais livres e EROs, a fim de investigar uma provável ação antioxidante.

EFEITO SOBRE A PRODUÇÃO DE NITRITO

A excessiva produção de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs), decorrente de excitotoxicidade, induz morte neuronal e diversas alterações neurológicas, que participam na etiologia de várias patologias, incluindo a epilepsia (Lipton e Rosenberg, 1994). As EROs, produzidas durante as convulsões e estado epiléptico, podem ativar os mecanismos envolvidos na excitotoxicidade glutamatérgica *in vitro* (Bonfoco et al., 1995) e *in vivo* (Shulz et al., 1995; Ueda et al., 1997).

A estimulação de receptores de glutamato induz a liberação de óxido nítrico (NO) neuronal (Nakaki et al., 2000). O NO desempenha um importante papel em praticamente todos os sistemas do organismo (Eiserich et al., 1998). Embora exerça diversas funções fisiológicas úteis, quando em excesso, o NO pode exercer efeitos nocivos. Em determinadas condições, o NO e o O_2^- podem interagir, resultando na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$), um produto extremamente tóxico. Esse composto é capaz de reagir com diversas moléculas: proteínas, lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, danificando-as. Além disso, seus prováveis produtos de decomposição, o radical OH^- e o dióxido de nitrogênio, dentre outros, têm semelhante potencial deletério (Radenovic et al., 2003).

O nitrito (metabólito estável do NO) pode ser associado com a fisiopatologia de várias doenças (Vanhatalo e Riikonen, 2001) e tem sido implicado em muitos mecanismos moleculares envolvidos nas convulsões, podendo modular uma cascata de efeitos excitotóxicos no SNC e participar do subsequente dano neuronal (Dalkara et al., 1994).

Estudos recentes relatam aumento na produção de nitrito em diversas áreas cerebrais, incluindo hipocampo e corpo estriado, em modelos de convulsões induzidas por pilocarpina ou ácido caínico (Radenovic et al., 2003; Freitas et al., 2004b). Nossos resultados demonstraram um aumento na produção de nitrito no hipocampo dos animais

tratados com pilocarpina, confirmando a participação desse metabólito no processo epiléptico. O pré-tratamento com LEV, todavia, reduziu a produção de nitrito no hipocampo, diminuindo, dessa maneira, os níveis de nitrito no foco epileptogênico. No corpo estriado, todavia, não foi verificado aumento significativo na produção de nitrito pelo tratamento com a pilocarpina, no entanto, a administração de LEV, sozinho, ou antes da pilocarpina, reduziu significativamente a concentração de nitrito nessa área em relação aos controles. Dessa forma, nossos dados revelam que os efeitos protetores do LEV contra as convulsões podem estar relacionados à diminuição nos níveis de nitrito, reforçando a ocorrência de efeito antioxidante nas áreas cerebrais envolvidas no processo convulsivo.

AÇÕES SOBRE A ATIVIDADE DA CATALASE

Os ânions superóxido (O_2^-), produtos da interação entre as moléculas de oxigênio e elétrons provenientes da cadeia transportadora nas mitocôndrias, são convertidos, por ação da SOD (superóxido desmutase), a peróxido de hidrogênio, que, por sua vez, é detoxificado pelas enzimas glutathione peroxidase (GSH-Px) e catalase (CAT). Essas enzimas constituem, assim, um sistema antioxidante endógeno, que atua prevenindo o dano neuronal induzidos pelos radicais livres e EROs (Remmen et al., 2004). O *status epilepticus* pode alterar esses sistemas antioxidantes, indicando uma resposta celular ao aumento dos radicais livres (Naffah-Mazzacoratti et al., 2001; Freitas et al., 2004a).

No presente estudo, foi observado um comportamento semelhante na atividade da CAT no hipocampo e no corpo estriado, com aumento significativo na atividade dessa enzima durante o processo convulsivo, provavelmente relacionado a maior liberação de radicais tóxicos nessas áreas. Ao investigar as ações do LEV, foi visto que o pré-tratamento dos animais, antes da indução do processo convulsivo, resultou em um efeito estabilizante da atividade da CAT, mantendo-a em níveis normais, tanto no hipocampo como no corpo estriado, sugerindo uma diminuição da produção de radicais livres na presença dessa droga e confirmando sua ação protetora contra as alterações bioquímicas induzidas pelo processo convulsivo.

EFEITOS SOBRE A CONCENTRAÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA

A glutathiona reduzida (GSH, L- γ -glutamil-L-cisteinil-glicina), presente em muitos tecidos de mamíferos, tem um importante envolvimento no estoque e transporte de cisteína e na defesa celular contra radicais livres, peróxidos e xenobióticos eletrofílicos. A GSH-Px converte a GSH em glutathiona oxidada (GSSG), na presença de peróxido de hidrogênio, que por sua vez é utilizada para a regeneração a GSH, por ação catalítica da glutathiona redutase (Raps et al., 1989; Philbert et al., 1991).

No cérebro, a GSH está localizada quase que exclusivamente nas células astrogliais, podendo também ser encontrada em terminais nervosos e em alguns neurônios (Raps et al., 1989; Philbert et al., 1991), e sua concentração é de, aproximadamente, 2 mM. A maior parte encontra-se no compartimento intracelular, na forma reduzida, e somente 1,2% ,ou menos, na forma oxidada (Rehncrona et al., 1980).

O poder antioxidante da GSH foi demonstrado pelo aumento da sobrevivência de 90% de ratos submetidos a hipóxia, podendo ser também útil na proteção contra o estresse oxidativo (Deneke & Fanburg, 1989). Nossos resultados mostraram uma depleção significativa do antioxidante endógeno GSH no hipocampo e corpo estriado, em consequência da administração de pilocarpina, confirmando, assim, o papel defensivo dessa molécula. No hipocampo, todavia, o pré-tratamento com LEV preveniu a perda de GSH, potencializando, dessa forma, o mecanismo de defesa antioxidante nessa área cerebral durante o processo convulsivo, efeito este que, certamente, contribuiu para a ação protetora dessa droga no modelo em estudo.

CONSIDERAÇÕES SOBRE OS EFEITOS ANTIOXIDANTES DO LEV

O desenvolvimento de alterações neurológicas, em geral, é acompanhado pela liberação de glutamato e está relacionado a inúmeros eventos fisiopatológicos, que são mediados pela sobrecarga de cálcio nas células neuronais (Doble, 1999; Meldrum, 2000). Esses eventos também envolvem ativação de lipases e proteases (com consequente dano da

membrana celular); ativação de óxido nítrico sintases indutíveis (que, juntamente com EROs, destroem lipídios); danos das proteínas de membrana e do DNA e aumento da liberação de ácido aracdônico, que inicia a formação de EROs (Marini et al., 2004).

O *status epilepticus* é considerado uma condição emergencial, onde as convulsões duram por um longo período e, se não controladas, levam à injúria neuronal (Cherlyee e Thomos, 1995). Os radicais livres e EROs parecem exercer papel fundamental na gênese dessa neurotoxicidade.

Evidências experimentais revelaram que o LEV é capaz de reduzir a atividade dos canais de Ca^{2+} ativados por alta voltagem (Niespodziany et al., 2001), além de exercer um bloqueio seletivo dos canais de cálcio tipo N (Lukyanetz et al., 2002) no hipocampo. Essa habilidade de bloquear o influxo de Ca^{2+} nas células poderia favorecer a ação do LEV contra o estresse oxidativo cerebral, evidenciada neste estudo.

A diminuição na produção de nitrito e estabilização da atividade da catalase em hipocampo e corpo estriado e, ainda, a significativa redução da peroxidação lipídica e o aumento nos níveis de glutathiona no hipocampo, evidenciados no presente estudo, revelaram que o LEV exerce um amplo efeito anti-oxidativo cerebral, que pode explicar, pelo menos em parte, as ações protetoras e anticonvulsivantes dessa droga.

Nossos resultados permitiram, ainda, estabelecer uma correlação entre a diminuição do estresse oxidativo e conseqüente proteção contra danos nas áreas cerebrais estudadas, envolvidas na instalação e propagação das convulsões, à medida que o pré-tratamento com LEV aumentou significativamente a latência para a instalação das convulsões e a latência de morte, além de inibir a instalação das convulsões em 53% dos animais e proteger 61% da morte. Todavia, mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos precisos através dos quais o LEV exerce seu efeito protetor contra o estresse oxidativo.

CONCLUSÕES

1. A administração de pilocarpina 400mg/Kg (P400) causou convulsões motoras límbicas em 100% dos animais tratados, que progrediram para *status epilepticus*, levando à morte. O pré-tratamento com levetiracetam (LEV) aumentou a latência de convulsão de forma dose-dependente e a dose de 200mg/kg, selecionada para tratamento dos animais utilizados nas análises seguintes, mostrou um efeito protetor mais acentuado, aumentando as latências de convulsão e de morte significativamente em relação às demais doses e protegendo 53% e 63% dos animais das convulsões e da morte, respectivamente. Sinais colinérgicos periféricos e movimentos estereotipados permaneceram inalterados em todos os grupos pré-tratados com levetiracetam;
2. LEV reduziu a intensidade dos tremores induzidos por oxotremorina, efeito esse que, somado à ação protetora contra as convulsões induzidas por P400, sugeriu uma possível ação moduladora do sistema colinérgico pelo LEV;
3. Os ensaios de *binding* em receptores muscarínicos demonstraram que o LEV reverte a *downregulation* induzida por P400, estabilizando a concentração desses receptores. Todavia, a administração do LEV isoladamente também causou uma *downregulation* de M_1+M_2 . No entanto, ensaios realizados para quantificação dos subtipos específicos de receptores muscarínicos demonstraram que somente os receptores M_1 sofrem *downregulation* na presença de P400, confirmando a importância desses receptores na instalação do processo convulsivo, ao passo que a ação agonista-símile do LEV se mostrou seletiva para o subtipo M_2 , efeito que, possivelmente, contribuiu para sua ação protetora contra as convulsões no modelo em estudo;

4. Os ensaios de *binding* em receptores dopaminérgicos demonstraram uma *downregulation* em D₂ na presença de LEV, efeito que pode exercer alguma influência sobre a ação protetora dessa droga, à medida que a ativação desses receptores está relacionada à diminuição da intensidade das convulsões em modelos colinérgicos, muito embora esse efeito tenha sido revertido na presença de P400. Nenhuma alteração significativa na densidade dos receptores D₁ foi evidenciada, sugerindo uma possível alteração na afinidade, e não na quantidade, desses receptores durante o processo convulsivo em estudo;
5. O tratamento com LEV e/ou P400 não resultou em nenhuma alteração significativa na atividade da acetilcolinesterase (AChE), fato que impossibilitou qualquer correlação entre as ações da P400 e do LEV no modelo em estudo e a ação dessa enzima;
6. A administração de P400 aumentou a ocorrência de peroxidação lipídica no hipocampo, considerado principal foco de instalação das convulsões provocadas por agentes colinérgicos, confirmando o envolvimento de espécies deletérias na injúria cerebral produzida por esse modelo de convulsões. O pré-tratamento com LEV reverteu esse efeito, normalizando a taxa de peroxidação lipídica e fornecendo indícios de uma atividade antioxidante do LEV nesse modelo de convulsões;
7. Foi observada uma diminuição da produção de nitrito e estabilização da atividade da catalase (CAT) no hipocampo e corpo estriado, bem como um aumento dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) no hipocampo, decorrentes do tratamento com LEV antes da P400. Assim, a ação antioxidante do LEV foi evidenciada em várias etapas envolvidas no processo de dano oxidativo, sugerindo um novo mecanismo através do qual essa droga poderia exercer seus efeitos protetores contra a injúria cerebral induzida pelas convulsões e *status epilepticus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLEMEYER, B., KRIEGLSTEIN, J. Inhibition of glutathione depletion by retinoic acid and tocopherol protects cultured neurons from staurosporine-induced oxidative stress and apoptosis. **Neurochem. Int.**, v. 6, p. 1-5, 2000.

ALAM, A.M., STARR, M.S. Dopaminergic modulation of pilocarpine-induced motor seizures in the rat: The role of hippocampal D2 receptors. **Neuroscience**, v.53, p. 425-431, 1993.

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

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

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

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

ARDID, D., LAMBERTY, Y., ALLOUI, A., COUDORE-CIVIALE, M.A., KLITGAARD, H., ESCHALIER, A. Antihyperalgesic effect of levetiracetam in neuropathic pain models in rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 473, p. 27-33, 2003.

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

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

BARONE, P., PALMA, V., PARASHOS, S.A., CHASE, T.N., CAMPANELLA, C.L. Role of D1 and D2 dopamine receptors in pilocarpine-induced seizures, in: **Basal Ganglia III**. eds. M.B. Carpenter, G. Bernardi, G. Di Chiara and P. Stanzione. New York: Plenum Press, p. 568, 1990a.

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

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

BARONE, P., PALMA, V., DEBARTOLOMEIS, A., TEDESCHI, E., CICARELLI, G., CAMPANELLA, G. Dopaminergic regulation of epileptic activity. **Neurochem. Int.** v. 20, p. 245S-249S, 1992.

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

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

BEBBINGTON, A., BRIMBELCOMBE, R.W., SHAKESHAFT, D. The central and peripheral activity of acetylenic amines related to oxotremorine. **Br. J. Pharmacol.** V.26, p. 56-67, 1996.

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

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

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

BIALER, M., JOHANNESSEN, S.I., KUPFERBERG, H.J., LEVY, R.H., PERUCCA, E., TOMSON, T. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Seventh Eilat Conference (EILAT VII). **Epilepsy Research**, v. 61, p. 1- 48, 2004.

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

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

BORMANN, J. Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. **Trends Neurosci**, v.11, p. 112-116, 1988.

BETTS, T., YARROW, H., GREENHILL, L., BARRETT, M. Clinical experience of marketed Levetiracetam in an epilepsy clinic—a one year follow up study. **Seizure**, v. 12, n. 3, p. 136-140, 2003.

BOVERIS, A., CADENAS, E., REITER, R., CHANCE, B., JAMIESON, D. The relation of free radical production to hyperoxia. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 48, p. 703-719, 1986.

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

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

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

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

BURKE, K., CHANDLER, C.J., STARR, B.S., STARR, M.S. Seizure promotion and protection by D1 and D22 dopaminergic drugs in the mouse. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v.36, p. 729-733, 1990.

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

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

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

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

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

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

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

CEREGHINO, J.J., BITON, V., ABOU-KHALIL, B., DREIFUSS, F., GAUER, L.J., LEPPIK I. Levetiracetam for partial seizures: results of a double-blind, randomized clinical trial. **Neurology**, v. 55, p. 236-242, 2000.

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

CHANCE, B., MAEHLY, A.C. Assay catalases and peroxidases. **Methods Enzymol.**, v. 2, p. 764-768, 1955.

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

CHERTYEE, C.W.J., THOMOS, P.B. Status epilepticus. **Neurologic Clinics**, v. 13, p. 529-548, 1995.

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

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

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

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

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

COUPEZ, R., NICOLAS, J.M., BROWNE, T.R. Levetiracetam, a new antiepileptic agent: lack of in vitro and in vivo pharmacokinetic interaction with valproic acid. **Epilepsia**, v. 44, p. 171-178, 2003.

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

COWARD, D. M., DOGGETT, N. S., SAYERS, A, C. The pharmacology of N-carbamoyl-2-(2,6-dichlorophenyl)acetamidine hydrochloride (LON-954) a new tremorogenic agent. **Drug Res.**, v.27, p.2326–2332, 1977.

CRAMER, J.A., ARRIGIO, C., VAN HAMMER, H., BROMFIELD, E.B. Comparison between the QOLIE-31 and derived QOLIE in a clinical trial of Levetiracetam. **Epilepsy Res.**, v. 41, p. 29-38, 2000.

CRAMER, J.A., GENEVIÈVE VAN HAMMÉE AND THE N132 STUDY GROUP. Maintenance of improvement in health-related quality of life during long-term treatment with levetiracetam. **Epilepsy and Behavior**, v. 4, n. 2, p. 118-123, 2003.

DALKARA, T., YOSHIDA, T., IRIKURA, K., MOSKOWITZ, M.A. Dual role of nitric oxide in focal cerebral ischemia. **Neuropharmacology**, v. 33, p. 1447-1452, 1994.

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

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

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

DE DEYN P.P., D'HOOGHE, R., MARESCAU, B., PEI, Y.Q. Chemical models of epilepsy with some reference to their applicability in the development of anticonvulsants. **Epilepsy Res.**, v.12 (2), p.87-110, 1992.

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

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

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

DOBLE, A. The role of excitotoxicity in neurodegenerative disease: Implications for therapy. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 81, p. 163-221, 1999.

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

EGLIN, R.M., CHOPPIN, A., WATSON, N. Therapeutic opportunities from muscarinic receptor research, **TRENDS in Pharmacol. Sciences**, v. 22, p. 409-414, 2001.

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

EISERICH, J.P., PATEL, R.P., O'DONNELL, V.B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. **Mol. Aspects Med.**, v. 19, p. 221-357, 1998.

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

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

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

ENGEL, J.JR. ILAE COMMISSION REPORT. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: report of the ILAE Task Force on Classification and Terminology. **Epilepsia**, v. 42, n. 6, p. 796-80, 2001.

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Ver Ass Méd Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-8, 1997.

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

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

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

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

FORRAY, M.I., ANDRES, M.E., BUSTOS, G., GYSLING, K. Regulation of endogenous noradrenaline release from the bed nucleus of the stria terminalis. **Biochem Pharmac.**, v. 49, p. 687-692, 1995.

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

FRAZER, C.M., SILLS, G.J., BUTLER, E., THOMPSON, G.G., PATSALOS, P.N., BRODIE, M.J. Levetiracetam fails to influence GABA transport and metabolism in rat astrocyte culture. **Epilepsia**, v. 38, n. 3, p. 177, 1997.

FREITAS, R.M., FELIPE, C.F.B., NASCIMENTO, V.S., OLIVEIRA, A.A., VIANA, G.S.B., FONTELES, M.M.F. Pilocarpine-induced seizures in adult rats: monoamine content and muscarinic and dopaminergic receptor changes in the striatum. **Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.**, v. 136, p.103-108, 2003a.

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

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

FREITAS, R.M., SOUSA, F.C.F., VASCONCELOS, S.M.M., VIANA, G.S.B., FONTELES, M.M.F. Pilocarpine-induced status epilepticus in rats: lipid peroxidation level, nitrite formation, GABAergic and glutamatergic receptor alterations in the hippocampus, striatum and frontal córtex. **Pharmacol. Biochem. and Behaviour**, v. 78, p. 327-332, 2004b.

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

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

FUKUZAKI K, KAMENOSONO T, NAGATA R.. Effects of ropinirole on various parkinsonian models in mice, rats, and cynomolgus monkeys. **Pharmacol Biochem Behav**, V. 65 (3), P. 503–508, 2000.

GLIEN, M, BRANDT, C, POTSCHKA, H, LOSCHER, W. Effects of the novel antiepileptic drug Levetiracetam on spontaneous recurrent seizures in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. **Epilepsia**, v. 43, p. 350-357, 2002.

GOMEZA, J. Enhancement of D₁ dopamine receptor-mediated locomotor stimulation in M₄ muscarinic acetylcholine receptor knockout mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 96, p. 10438-10488, 1999.

GOWER, A.J., NOYER, M., VERLOES, R., GOBERT, J., WÜLFERT, E., UCB L059, a novel anticonvulsant drug: pharmacological profile in animals, **Eur.J.Pharmacol.**, v. 222, p. 193-203, 1992.

GOWER, A.J, HIRSCH, E., BOEHRER, A, NOYER, M, MARESCAUX C. Effects of levetiracetam, a novel antiepileptic drug, on convulsant activity in two genetic rat models. **Epilepsy Res.**, v. 22, n. 3, p.207-13, 1995.

GREEN, LC, TANNENBAUM, SR, GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. **Science**, v. 212, p. 56-58, 1981.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? **J. Lab. Clin. Med.**, v. 119, p. 598-620, 1992.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v. 344, p. 721-724, 1994.

HAMILTON, S.E., SCHLADOR, M.L., MCKINNON, L.A., CHMELAR, R.S., NATHANSON, N.M. Molecular mechanisms for the regulation of the expression and function of muscarinic acetylcholine receptors, **J. Physiology**, v. 92, p. 275-278, 1998.

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

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

HOVINGA, C.A. Levetiracetam: a novel antiepileptic drug. **Pharmacotherapy**, v. 21, n. 11, p. 1375-88, 2001.

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

HUONG, N. T., MATSUMOTO, K., KASAI, R., YAMASAKI, K., WATANABE, H. In vitro antioxidant activity of vietnamese ginseng saponin and its components. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 21, p. 978-981, 1998.

HYMAN, S. E. & NESTLER, E. J. Initiation and adaptation: a paradigm for understanding psychotropic drug action. **Am. J. Psychiatry**, v. 153, p. 2, 1996.

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

ISHIKAWA, K.T.O., McCAUGH, J.L. Evidence for dopamine as a transmitter in dorsal hippocampus. **Brain Res.**, p.222-232, 1982.

ISOKAWA, M. Modulation of GABA_A receptor-mediated inhibition by postsynaptic calcium in epileptic hippocampal neurons. **Brain Research**, v. 810, p. 241-250, 1998.

JAKUBIK, J., BACAKOVÁ, L., EL-FAKAHANY, E.E., TUCEK, S. Positive cooperative of acetylcholine and other agonists with allosteric ligands on muscarinic acetylcholine receptors, **Mol. Pharmacol.**, v. 52, p.172-179, 1997.

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

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

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

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

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

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

KEHER, J.P. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. **Crit. Rev. Toxicol.** , v. 114, n. 1, p. 21-48, 1993.

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

KIM, H., CHOI, D., JHOO, W., LEE, D., KOO, C., KIM, C. Aspalactone, a new antiplatelet agent, attenuates the neurotoxicity induced by kainic acid in the rat. **Life Sci.**, v. 61, p. 373-381, 1997.

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

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

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

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

KOPPEN, C.J.V., KAISER, B. Regulation of muscarinic acetylcholine receptor signaling, **Pharm. & Therap.**, v. 98, p. 197-220, 2003.

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

KUME, I.L., KOTLIKOLT, M.I. Muscarinic inhibition of single K channels in smooth muscle cells by a pertussis-sensitive G protein. **Am. J. Physiol.**, v. 261, p. 1204-1209, 1991.

KRAUSS, G.L., BETTS, T., ABOU-KHALIL, B., BERGEY, G., YARROW, H., MILLER, A. Levetiracetam treatment of idiopathic generalised epilepsy. **Seizure**, v. 12, n. 8, p. 617-620, 2003.

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

KUNZ, W.S., KUDIN, A.P., VIELHABER, S., BLUMEKE, J., ZESCHRATTER, W., SCHRAMM, J., BECK, H., ELGER, C.F. Mitochondrial complex I deficiency in the epileptic focus of patients with temporal lobe epilepsy. **Ann. Neurol.**, v. 48. p. 766-773, 2000.

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

LAGAE, L., BUYSE, G., DECONINCK, A., CEULEMANS, B. Effect of levetiracetam in refractory childhood epilepsy syndromes. **European Journal of Pediatric Neurology**, v. 7, n. 3, p. 123-128, 2003.

LA GRUTTA, V., SABATINO, M. Substantia nigra-mediated anticonvulsant action: a possible role of a dopaminergic component. **Brain Res.**, v.515, p.87, 1990.

LAMBERTY, Y., MARGINEANU, D.G., KLITGAARD, H. Absence of negative impact of levetiracetam on cognitive function and memory in normal and amygdale-kindled rats. **Epilepsy and Behavior**, v.(1), p.333-342, 2000.

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

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

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

LEPPIK, I., MORRELL, M., GODFROID, P., ARRIGO, C. Seizure-free days observed in randomized placebo-controlled add-on trials with levetiracetam in partial epilepsy. **Epilepsia**, v. 44, n. 10, p. 1350-1352, 2003.

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

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

LING, E.A., TANG, F.R., LEE, W.L., YANG, J., SIM, M.K. Expression of metabotropic glutamate receptor 1 α in the hippocampus of rat pilocarpine model of status epilepticus. **Epilepsy Research**, v. 46, p. 179-189, 2001.

LIPTON, S., ROSENBERG, P. A. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. **N. Engl. J. Med.**, v. 330, p. 613–622, 1994.

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

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

LÖSCHER, W., HÖNACK, D. Profile of ucb L059, a novel anticonvulsant drug, in model of partial and generalized epilepsy in mice and rats. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 232, p.147-158, 1993.

LÖSCHER, W., HÖNACK, D., RUNDFELDT, C. Antiepileptogenic effects of the novel anticonvulsant Levetiracetam UCB (L059) in the kindling model of temporal lobe epilepsy, **J. Pharmacol.**, v.284, p. 474-479, 1998.

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

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

LUDERS, H., ACHARYA, J., BAUMGARTNER, C., BENBADIS, S., BLEASEL, A., BURGESS, R., DINNER, D.S., EBNER, A., FOLDARY, N., GELLER, E., HAMER, H., HOLTHAUSEN, H., KOTAGAL, P., MORRIS, H., MEENCKE, H.J., NOACHTAR, S., ROSENOW, F., SAKAMOTO, A., STEINHOFF, B.J., TUXHORN, I., WYLLIE, E. Semiological seizure classification. **Epilepsia**, v. 39, p. 1006-1013, 1998.

LUKYANETZ, E.A., SHKRYL, V.M., KOSTYUK, P.G. Selective blocked of N-type calcium channels by Levetiracetam. **Epilepsia**, v. 43 (1), p. 9-18, 2002.

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

MADEJA, M., MARGINEANU, D-G., GORJI, A., SIEP, E., BOERRIGTER, P., KLIGAAD, H., SPECKMANN, E-J. Reduction of voltage-operated potassium currents by levetiracetam: a novel antiepileptic mechanism of action? **Neuropharmacology**, v. 45, p. 661-671, 2003.

MAEHLY, A.C., CHANCE, B. The assay catalases and peroxidases. **Methods Biochem. Anal.**, v. 1, p. 357-359, 1954.

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

MARINHO, M.M.F., SOUSA, F.C.F., BRUIN, V.M.S., VALE, M.R., VIANA, G.S.B. Effects of lithium, alone or associated with pilocarpine, on muscarinic and dopaminergic receptors and on phosphoinositide metabolism in rat hippocampus and striatum. **Neurochemistry International**, v. 33, p. 299-306, 1998.

MARINI, H., COSTA, C., PASSANITI, M., ESPOSITO, M., CAMPO, G.M., IENTILE, R., ADAMO, E.B., MARINI, R., CALABRESI, P., ALTAVILLA, D., MINUTOLI, L., PISANI, F., SQUADRITO, F. Levetiracetam protects against kainic acid-induced toxicity. **Life sciences**, v. 74, p. 1253-1264, 2004.

MARKSTEIN. R. M.P., SEILER. J.M., VIGOURET, S. URWYLER. A. E., K. DIXON. Pharmacologic properties of CY 208-243, a novel D1 agonist. **Progress in Catecholamine Research**, Part B, p. 59, 1986.

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

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

MAZARATI, A.M., BALDWIN, R., KLITGAARD, H., MATAGNE, A., WASTERLAIN, C.G. Anticonvulsant effects of levetiracetam and levetiracetam-diazepam combinations in experimental status epilepticus, **Epilepsy Res.**, v. 58, p. 167-174, 2004.

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

MELDRUM, B.S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain. Review of Physiology and Pathology. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1007-1015, 2000.

MELLO, L., BORTOLOTTI, Z.A., CAVALHEIRO, E.A. Modelos experimentais de epilepsia: uma revisão. **Neurobiol**, v. 49, p.231-268, 1986.

MELLO, L.E.A.M., DEL BEL, E.A., GOMES, E.L.T., OLIVEIRA, J.A.C., WAKAMATSU, H., CAIRASCO, N.G. Neuroethological and morphological (Neo-Timm staining) correlates of limbic recruitment during the development of audiogenic kindling in seizures susceptible Wistar rats. **Epilepsy Research**, v. 26, p. 177-192, 1996.

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

MENACHEM, B., ETAL. Evidence for sustained efficacy of levetiracetam as add-on epilepsy therapy. **Epilepsy Research**, v. 53, p. 57-64, 2003.

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

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

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

MOTAMEDI, M., NGUYEN, D.K., ZAATREH, M., SINGH, S.P., WESTERVELD, M., THOMPSON, J.L., MATTSON, R., BLUMENFELD, H., NOVOTNY, E., NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G., CAVALHEIRO, E.A., FERREIRA, E.C., ABDALLA, D.S.P., AMADO, D., BELLISSIMO, M.I. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase activities and the hydroperoxide concentration are modified in the hippocampus of epileptic rats. **Epilepsy Research**, v. 46, p. 121-128, 2001.

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

MULA, M., TRIMBLE, M.R., YUEN, A., LIU, R.S.N., SANDER, J.W.A.S. Psychiatric adverse events during levetiracetam therapy. **Neurology**, v. 61, n. 5, p. 704-706, 2003.

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

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

NAKAKI, T., MISHIMA, A., SUZUKI, E., SHINTANI, F., FUJII, T. Glufosinate ammonium stimulates nitric oxide production through *N*-methyl D-aspartate receptors in rat cerebellum. **Neurosci. Lett.**, v. 290, p. 209–212, 2000.

NASH, E.M.; SANGHA, K.S. Levetiracetam. **American Journal Of Health-System Pharmacy: AJHP**, v. 58, n. 13, p. 1195-1199, 2001.

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

NIESPODZIANY, I., KLITGAAD, H., MARGINEANU, D-G. Levetiracetam inhibits the high-voltage-activated Ca^{+} current in pyramidal neurons of rat hippocampal slices, **Neurosci. Lett.**, v. 306, p 5-8, 2001.

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

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

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

PATEL, M., LIANG, LI-PING. Mitochondrial oxidative stress and increased seizure susceptibility in SOD2-mice. **Free Radical Biology & Medicine**, v.6, p. 542-555, 2004.

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

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

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

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

PERUCCA, E., GIDAL, B.E., BALTES, E. Effects of antiepileptic comedication on levetiracetam pharmacokinetics: a pooled analysis of data from randomized adjunctive therapy trials. **Epilepsy Res.**, v. 53, p. 47-56, 2003.

PHILBERT, M. A., BEISWANGER, C. M., WATERS, D. K., REUHL, K. R., LOWNDES, H. E. Cellular and regional distribution of reduced glutathione in the nervous system of the rat: histochemical localization by mercury orange and *o*-phthaldialdehyde-induced histofluorescence. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 107, p. 215–227, 1991.

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

PORTER, R.J, ROGAWSKI, M.A New antiepileptic drugs: from serendipity to rational discovery. **Epilepsia**, v. 33, p. S1-6, 2002.

POULAIN, P., MARGINEANU, D.G. Levetiracetam opposes the action of GABA_A antagonists in hypothalamic neurons, **Neuropharmacology**, v. 42, p. 346-352, 2002.

QUEIROZ, C., LEITE, J., MELLO, L.E. Modelos experimentais em epilepsias. Cérebro e Mente, nº 04, Web, Internet, disponível em <http://www.comciencia.br>, 2002.

RADENOVIC, L., VASILJEVIS, I., SELAKOVIC, V., JOVANOVIC, M. 7-Nitroindazole reduces nitrite concentration in rat brain after intrahippocampal kainate-induced seizure. **Comparative Biochem. and Physiol.**, v. 135, p. 443-450, 2003.

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

RAPS, S. P., LAI, J. C. K., HERTZ, L., COOPER, A. J. L. Glutathione is present in high concentrations in cultured astrocytes but not in cultured neurons. **Brain Res.**, v. 493, p. 398-401, 1989.

REHNCRONA, S., FOLBERGROVA, J., SMITH, D. S., SIESJO, B. K. Influence of complete and pronounced incomplete cerebral ischemia and subsequent recirculation on cortical concentrations of oxidized and reduced glutathione in the rat. **J. Neurochem.**, v. 34, p. 477-486, 1980.

RELATÓRIO SOBRE SAÚDE MENTAL NO MUNDO. Organização Panamericana da Saúde - Organização Mundial de Saúde - ONU. World Health Report - WHO - Genève - Swiss who@who.int .Web, Internet, disponível em www.psiqweb.med.br/acad/oms1.html, 2001.

REMMEN, H.V., SABIA, W.Q.M., FREEMAN, G., ESTLACK, L., YANG, H., GUO, Z.M., HUANG, T.T., STRONG, S., LEE, S., EPSTEIN, C.J., RICHARDSON, A. Multiple deficiencies in antioxidant enzymes in mice result in a compound increase in sensitivity to oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, p. 1625-1634, 2004.

RIGO, J.M., NGUYEN, L., BELACHEW, S. Levetiracetam: novel modulation of ionotropic inhibitory receptors. **Epilepsia**, v. 41, n.7, p. 35, 2000.

RIGO, J.M., HANS, G., NGUYEN, L., ROCHER, V., BELACHEW, S., MALGRANGE, B., LEPRINCE, P., MOONEN, G., SELAK, I., MATAGNE, A., KLITGAARD, H. The anti-epileptic drug levetiracetam reverses the inhibition by negative allosteric modulators of neuronal GABA- and glycine –gated currents, **Br. J. Pharmacol.**, v. 136, p. 659-762, 2002.

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

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

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

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

SCOTT, M.D., LUBIN, B.H., ZUO, L., KUYPERS, F.A. Erythrocyte defence against hydrogen peroxide: prominent importance of catalase. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 118, p. 7-16, 1991.

SEDLAK, J. & LINDSAY, R. H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with ellman reagents. **Anal. Biochem.**, v. 25, p. 192-205, 1988.

SHAN, X., AW. T.Y., JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol. Ther.**, v. 47, p. 61-71, 1990.

SHIPLEY, M.T., GRIFF, E.R., ENNIS, M., EL-ETRI. Evidence for cholinergic regulation of basa, norepinephrine release in the rat olfactory bulb. **Neuroscience**, v. 9, n. 2, p. 611-617, 1999.

SHORVON, S.D., LÖWENTHAL, A., JANZ, D., BIELEN, E., LOISEAU, P. Multicenter double-blind, randomized, placebo-controlled trial with levetiracetam as add-on therapy in patients with refractory partial seizures. **Epilepsia**, v. 41, n. 9, p. 1179-1186, 2000.

SHULZ, J.N., HENSAHW, D.R., SIWEK, D., JENKINS, B.G., FERRANTE, R.J., CIPOLLONI, P.B., KOWALL, N.W., ROSEN, B.R., BEAL, M.F. Involvement of free radicals in excitotoxicity in vivo. **J. Neurochem.**, v. 64, p. 2239-2247, 1995.

SIES, H. Oxidative stress: introduction. In: Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **New York: Academic Press**, p. 15-22, 1991.

SILLS, G.S., LEACH, J.P., FRASER, C.M., FORREST, G., PATSALOS, P.N., BRODIE, M.J. Neurochemical studies with the novel anticonvulsant levetiracetam in mouse brain. **European Journal of Pharmacology**, v. 325, p. 35–40, 1997.

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

SIRVEN, J.I. Antiepileptic drug therapy for adults: When to initiate and how to choose. **Mayo Clin.Proc**, v. 77, n. 12, p.1367-65, 2002.

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

SPENCER, S.S. Levetiracetam efficacy in refractory partial-onset seizures, specially after failed epilepsy surgery, **Epilepsia**, v. 44, p. 211-214, 2003.

STARR, M.S. Regulation of seizure threshold by D1 versus D2 receptors. In *D1/D2 Dopaminergic Receptor Interactions* (J. Waddington, Ed.), **Academic Press**, New York, p. 235-269, 1993.

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

STOPE, M.B., KUNKEL, C., KORIES, C., SCHMIDT, M., MICHEL, M.C. Differential agonist-induced regulation of human M2 and M3 receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 2099-2105, 2003.

STRATTON, S.C., LARGE, C.H., COX, B., DAVIES, G., HAGAN, R.M. Effects of lamotrigine and levetiracetam on seizure development in a rat amygdala kindling model. **Epilepsy Res.**, v. 53, n. 1-2, p. 95-106, 2003.

THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS / COMITÊ DAS ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS - Relatório Europeu de Avaliação Público (EPAR)/ CPMP/1986/00- EMEA, Web, Internet, disponível em <http://www.eudra.org/emea.html>, 2001.

TONG, X., PATSALOS, P.N. A microdialysis study of the novel antiepileptic drug levetiracetam: extracellular pharmacokinetics and effect on taurine in rat brain. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, p. 867-874, 2001.

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

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

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

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

TURSKI, W.A., CAVALHEIRO, E.A., COIMBRA, C., BERZAGHI, M.P., IKONOMIDOU-TURSKI, C.I., TURSKI, L. Only certain antiepileptic drugs prevent seizures induced by pilocarpine. **Brain Res. Reviews**, v.12, p. 281-305, 1987.

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

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

VANHATALO, S., RIIKONEN, R. Nitric oxide metabolites, nitrates and nitrites in the cerebrospinal fluid in children with west syndrome. **Epilepsy Res.**, v. 46, p. 3-13, 2001.

WALZ, R., MOREIRA, J.C.F., BENFATO, M.S., QUEVEDO, J., SCHORER, N., VIANNA, M.M.R., KLAMT, F., DAL-PIZZOL, F. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpina of kainic acid in Wistar rats. **Neurosci. Lett.**, v. 291, p. 179-182, 2000.

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

WHITE, H. S. Clinical significance of animal seizure models and mechanism of action studies of potential antiepileptic drugs. **Epilepsia**, v. 38, p. 9-17, 1997.

WULFERT E, HANIN I, VERLOES R. Facilitation of calcium-dependent cholinergic function by ucb L059, a new "second generation" nootropic agent. **Psychopharmacol Bull.**, v.25(3), p. 498-502, 1989.

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

ZONA, C., NIESPODZIANY, I., MARCHETTI, C., KLITGAARD, H., BERNARDI, G., MARGINEANU, D.G. Levetiracetam does not modulate neuronal voltage-gated Na⁺ and T-type Ca⁺ currents. **Seizure**, v. 10, p.279-286, 2001.

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](#)