

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

***STATUS EPILEPTICUS* INDUZIDO POR
MARINOBUFOGENINA, UMA SUBSTÂNCIA
ISOLADA DAS GLÂNDULAS PAROTÓIDES DO
Bufo paracnemis Lutz 1925**

RITA MARIA DANTAS NOGUEIRA

**Fortaleza- CE
2000**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

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

***STATUS EPILEPTICUS* INDUZIDO POR
MARINOBUFOGENINA, UMA SUBSTÂNCIA
ISOLADA DAS GLÂNDULAS PAROTÓIDES DO
Bufo paracnemis Lutz 1925**

RITA MARIA DANTAS NOGUEIRA

Tese apresentada à coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho

**Fortaleza-Ce
2000**

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

Esta tese foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Farmacologia, outorgado pela Universidade Federal do Ceará e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Setorial desta Instituição.

Data da defesa: 04 de outubro de 2000

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho
(Prof. Orientador)

Prof^a. Dra. Gisela Costa Camarão

Prof.Dr. Carlos Alberto Gonçalves da Silva Jared

Prof. Dr. Carlos Maurício de Castro Costa

Prof. Dr. Bruno Andrade Cardi

Ao Cleto pelo companheirismo, incentivo, apoio e presença sempre constantes.

Aos nossos filhos Adriana, Cleto, Fabiano e Eveline que mui especialmente souberam compreender que os momentos de ausência no convívio eram necessários para a realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmãos pelo estímulo e confiança em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Krishnamurti de Moraes Carvalho pela confiança, amizade e valiosa participação em todo o processo de nossa formação científica e, em especial, por seus incentivos constantes e orientação segura no decorrer da tese.

Aos ilustres Doutores da Banca Examinadora pela gentileza em aceitar o convite e pelas sugestões acrescidas à nossa tese.

Ao prof. Dr. Esper Abrão Cavalheiro pela orientação de parte da tese realizada no laboratório de Neurologia Experimental, UNIFESP, SP.

Ao Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira pela grandiosa colaboração na determinação da estrutura química, no Laboratório de Química Orgânica e Inorgânica, UFC, CE.

Aos colegas de Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pela compreensão e colaboração .

À Prof^a. Dr^a. Gisela Costa Camarão pela sincera amizade e incentivos constantes.

À CAPES, à Fundação Cearense de Apoio à Pesquisa (FUNCAP), e ao CNPq pelo suporte financeiro.

A todos os demais: pós-graduandos, funcionários, técnicos, bolsistas e estagiários que gentilmente contribuíram para a realização deste trabalho.

*“ A mente que se abre a uma idéia jamais
retorna ao seu tamanho original”*

Albert Einstein (1879-1955)

RESUMO

O principal enfoque desta pesquisa direcionou-se no sentido de isolar uma substância com forte poder convulsivante, presente nas secreções obtidas das glândulas parotóides do sapo *Bufo paracnemis*, Lutz, determinar sua estrutura química e realizar estudos farmacológicos centrais deste composto. Através de processos de fracionamento, utilizando o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), acoplado a uma coluna preparativa C-18 de fase reversa (shim-pack prep. ODS 2,5 x 30 cm), obtivemos essa substância pura em grandes quantidades. Sua estrutura química foi elucidada através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear. Trata-se de um esteróide cardiotônico, um Bufadienolídeo, contendo um anel esteróide clássico, acoplado a um grupo lactônico, denominado Marinobufogenina (14 β -15 β - epoxi - 3 β - dihidroxi - 20, 22 - bufadienolídeo). Nossos resultados, baseados em análise comportamental e eletrográfica, mostraram efeitos centrais induzidos pela administração sistêmica de Marinobufogenina em ratos e em camundongos. Os animais apresentaram severos efeitos neutóxicos, tais como movimentos circulares, automatismos gustatórios, taquipnéia, clonias de cabeça e de patas, tremores, convulsões tônico-clônicas generalizadas, *status epilepticus* e morte. A DL50 de Marinobufogenina foi de 10,5 a 61,5 mg/kg para camundongos e de 25,0 a 2,0 mg/kg para ratos, ambos por via intraperitoneal. A administração de Marinobufogenina também foi efetiva através de outras vias (subcutânea, oral, endovenosa, intramuscular). A forte atividade convulsivante dessa substância é dose-dependente e doses de 5,0 mg/kg para camundongos e de 20,0 mg/kg para ratos, ambos por via

intraperitoneal, já evidenciam alterações comportamentais que evoluem para convulsões tônico-clônicas generalizadas, acompanhadas do registro eletroencefalográfico que apresenta descargas epiléticas no córtex e hipocampo. Marinobufogenina induziu o aparecimento de crises convulsivas culminando em *status epilepticus* que persistiu por mais de uma hora. Observou-se uma redução das convulsões em aproximadamente 80% dos animais tratados com Diazepam (10,0 e 12,5 mg/kg, i.p.), enquanto no registro eletroencefalográfico as crises epiléticas permaneceram em alguns dos animais submetidos a esse tratamento. O Fenobarbital (50 mg/kg, i.p.) não bloqueou as crises comportamentais induzidas por Marinobufogenina. A Fenitoína foi capaz de reverter as convulsões tônico-clônicas generalizadas em todos os animais do grupo, sugerindo uma ação através de envolvimento na alteração de cátions monovalentes. Estudos bioquímicos e eletrofisiológicos mais aprofundados deverão ser realizados para confirmar essa hipótese. Nossos resultados sugerem que a Marinobufogenina pode constituir-se numa ferramenta farmacológica para o desenvolvimento de um modelo experimental de epilepsia, uma vez que preencheu requisitos importantes, tais como : i) demonstrou a presença de atividade epileptiforme nos registros eletroencefalográficos; ii) as crises convulsivas foram bloqueadas por anticonvulsivantes como o Diazepam e Fenitoína, requisito essencial para a avaliação do efeito de novas drogas a serem utilizadas no tratamento da epilepsia.

ABSTRACT

The main focus of this research was the isolation of a substance with a strong convulsant action from the secretions of the toad *Bufo paracnemis*, Lutz, parotid glands, determination of its chemical structure and its behavioral and electrographic effects on central nervous system. This substance was purified in large amounts using a reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC), with a C-18 preparative column (shim-pack prep. ODS 2,5 x 30 cm). Its chemical structure was elucidated using high resolution Nuclear Magnetic Resonance analysis, allowing its identification as a steroid of the bufodienolide type, already known in the literature as Marinobufagin (14 β -15 β -epoxy-3 β ,5 β -dihydroxy-20,22-bufadienolide). Our results based on behavioral and electrographic analysis showed central effects induced by systemic administration of Marinobufagin in rats and mice. The animals presented severe neurotoxic effects as circle-like movements, tachypnea, mild tremor of the head, a whole body tremor, myoclonic movements of the fore or hindlimbs, tonic-clonic seizures and death. Marinobufagin DL₅₀ was 10.5 \pm 1.5 mg/kg for mice and 25.0 \pm 2.0 mg/kg for rats, both through intraperitoneal injection. This strong convulsant activity is dose-dependent and 5.0 mg/kg doses for mice and 20.0 mg/kg for rats, both intraperitoneal (IP), already showed behavioral changes that evolved to generalized tonic-clonic seizures. Marinobufagin

induced seizures that ended up in *status epilepticus* that lasted more than an hour. Seizures decreased in almost 80% of the animals treated with Diazepam (10.0 and 12.5 mg/kg, IP) even though some of these animals continued to show seizures in the electrographic recordings. Phenobarbital didn't block seizures induced by Marinobufagin. Phentoin was able to block generalized tonic-clonic seizures in all animals of the group, suggesting an action involving changes in monovalent cations. Our results suggest that Marinobufagin could represent a pharmacological tool for the development of an epilepsy experimental model, since it had fulfilled the following requirements: i) showed epileptiform activity in electrographic recordings; ii) seizures were blocked by anticonvulsant drugs such as Diazepam and Phentoin, an essential requirement for the evaluation of the effects of new drugs to be used in epilepsy treatment.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1 EPILEPSIA OU EPILEPSIAS ?

1.1.1 Considerações gerais	1
1.1.2 Histórico	6
1.1.3 Terminologia e classificação das epilepsias	8
1.1.4 Tratamento das epilepsias	13
1.1.5 Modelos experimentais das epilepsias	27
1.1.6 Modelo da Pilocarpina	31

1.2 ANFÍBIOS

1.2.1 Características gerais	35
1.2.2 Glândulas secretórias da pele de anfíbios	37
1.2.3 Conteúdo da secreção glandular	39
1.2.4 Família <i>Bufo</i> – <i>Bufo paracnemis</i>	41
1.2.5 Bufadienólídeos	43
1.2.6 Marinobufogenina	46
1.2.7 Potencial Terapêutico de Toxinas Animais	47

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais	54
2.2 Objetivos Específicos	55

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais de Laboratório	57
3.1.2 Aparelhos	57
3.1.3 Drogas e Reagentes	58

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Extração	59
3.2.2 Purificação em HPLC com coluna preparativa	59
3.2.3 Determinação do grau de pureza com coluna analítica	62
3.2.4 Determinação da Estrutura Química	62
3.2.5 Toxicidade aguda e DL ₅₀	63
3.2.6 Procedimentos cirúrgicos	64
3.2.7 Registro da atividade elétrica	66
3.2.8 testes com anticonvulsivantes	67
3.2.9 Análise Estatística	68

4. RESULTADOS

4.1 Purificação em HPLC	70
4.2 Determinação do grau de pureza	70
4.3 Determinação da Estrutura Química do Marinobufogenina	72
4.4 Toxicidade aguda e DL ₅₀	77
4.5 Alterações comportamentais e eletroencefalográficas	77
4.6 Ação de Anticonvulsivantes	95

5. DISCUSSÃO

5.1 Relevância fisiológica das secreções de anfíbios	108
5.2 Purificação	111
5.3 Toxicidade Aguda e DL ₅₀	112

5.4 Estrutura Química	114
5.5 Efeitos comportamentais e eletrográficas	115
5.6 Ação de anticonvulsivantes	120
6. CONCLUSÕES	128
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** Classificação das convulsões..... 17
- FIGURA 2** Exemplar do sapo *Bufo paracnemis*, Lutz, coletado no município de São Gonçalo do Amarante-Ce..... 60
- FIGURA 2A** Extração do veneno do *Bufo paracnemis* 61
- FIGURA 3** Perfil de eluição do extrato bruto extraído das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*, Lutz em HPLC durante uma hora 72
- FIGURA 4** Perfil de eluição da fração pura (Marinobufogenina) isolada do *Bufo paracnemis*, Lutz..... 73
- FIGURA 5** Efeito convulsivante de Marinobufogenina (10 mg/kg) dois minutos após administração intraperitoneal em camundongos *Swiss* . 74
- FIGURA 6** Estrutura química da Marinobufogenina isolada das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*, Lutz (14 β , 15 β - epoxi - 3 β , 5 β - dihidroxi 20, 22 – bufadienolide)..... 75
- FIGURA 7** (a) Espectro de RMN 2D (¹H,¹H) NOESY (500 MHz, Piridina-d₅) de Pico 3. (b) Estruturas com seta dupla numerada indicando correlação espacial observada no gs-NOESY..... 76

- FIGURA 8** Registro eletroencefalográfico ilustrando crises convulsivas induzidas por Marinobufogenina (5,0 mg/kg) em camundongos..... 83
- FIGURA 9** Registro eletroencefalográfico ilustrando a evolução de crise hipocampal desencadeada pela administração de Marinobufogenina (5,0 mg/kg, i.p.) em camundongo..... 85
- FIGURA 10** Evolução da atividade cortical obtida pela administração intraperitoneal de Marinobufogenina (5,0 mg/kg, i.p.) em camundongo.86
- FIGURA 11** Alterações eletroencefalográficas ilustrando descargas hipocampais após administração intraperitoneal de Marinobufogenina (5,0 mg/kg, i.p.) em camundongo..... 88
- FIGURA 12** Registro eletroencefalográfico demonstrando os efeitos convulsivantes da administração de Marinobufogenina (9,0 mg/kg, i.p.) em camundongo..... 89
- FIGURA 13** Alterações eletrocorticais induzidas por administração intraperitoneal de Marinobufogenina (40 mg/kg, i.p.), em rato..... 91
- FIGURA 14** Registro eletroencefalográfico ilustrando a seqüência de alterações observadas em vários tempos após a injeção intraventricular de 50 µl (=150µg) de Marinobufogenina em rato..... 93
- FIGURA 15** Registro eletroencefalográfico ilustrando o efeito do Diazepam (10,0 mg/kg, i.p.), administrado 30 minutos antes da injeção de Marinobufogenina (5,0 mg/kg, i.p.), em camundongo..... 94

FIGURA 16 Efeitos do Diazepam (DZP 10,0 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos..... 96

FIGURA 17 Efeitos do Diazepam (DZP 12,5 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos..... 98

FIGURA 18 Efeitos do Fenobarbital (FBT 50,0 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos..... 100

FIGURA 19 Efeitos do Fenitoína (FNT 50,0 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos.....103

FIGURA 20 Efeitos do Fenitoína (FNT 75,0 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos.....105

LISTA DE TABELAS

- TABELA 1** Alterações comportamentais observadas em camundongos tratados com Marinobufogenina, i.p., isolado das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*, Lutz.....79
- TABELA 2** Efeitos do pré-tratamento (30 min) do Diazepam (DZP 10,0 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB; 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos.....97
- TABELA 3** Efeitos do pré-tratamento (30 min) do Diazepam (DZP 12,5 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB; 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos.....99
- TABELA 4** Efeitos do pré-tratamento (45 min) do Fenobarbital (FBT; 50,0 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB; 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos.....101
- TABELA 5** Efeitos do pré-tratamento (60 min) de Fenitoína (FNT 50,0 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos.....104
- TABELA 6** Efeitos do pré-tratamento (60 min) de Fenitoína (FNT 75,0 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos.....106

LISTA DE ABREVIATURAS

MB	Marinobufogenina.
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência.
SNC	Sistema nervoso central.
i.p.	intraperitoneal.
SE	<i>status epilepticus</i> .
CX	Córtex.
HPC	Hipocampo.
EEG	Eletroencefalograma.
RMN	Ressonância Magnética Nuclear.
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy: Espectro de RMN bidimensional de interação dipolar $^1\text{H}, ^1\text{H}$.
Gs	Gradient selected: Espectro de RMN com seleção de gradiente para melhoramento da sensibilidade do experimento.
DZP	Diazepam.
FBT	Fenobarbital.
FNT	Fenitoína.
GABA	Ácido Gama-aminobutírico

**INTRODUÇÃO
E
REVISÃO DA LITERATURA**

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 EPILEPSIA ou EPILEPSIAS ?

1.1.1 Considerações gerais

O estudo da fisiologia e de patologias que afetam o sistema nervoso central (SNC), envolvendo psicose, esquizofrenia, distúrbios afetivos e epilepsias, têm constituído um desafio para a Ciência desde a antiguidade.

Durante muitos séculos, os cientistas, filósofos e médicos gregos acumularam um grande acervo de informações pragmáticas visando a manutenção da saúde do homem. No século V a.C. o explosivo desenvolvimento da Medicina grega foi refletido demoradamente e Hippocrates de Cós (460 – 370 a.C.) iniciou a tradição médica, procurando fazer, com objetividade, o registro de sintomas, libertando-os das práticas mágicas da medicina egípcia e babilônica.

Entre os povos primitivos, acreditava-se que as doenças eram castigos impostos por deuses e espíritos e o diagnóstico era determinar a ofensa cometida para aplicar a punição. O efeito dos medicamentos era atribuído à intervenção de forças divinas invocadas pelos sacerdotes ou feiticeiros que, através de rituais religiosos e mágicos, preparavam as poções medicamentosas que tinham o poder de curar.

O empirismo predominava na terapêutica humana, diversos meios eram empregados objetivando a cura: fumigações, sangrias, purgações, sucções, sudoríferos e ventosas, mas o homem continuava sem nenhuma outra alternativa a não ser aceitar as terapias disponíveis na época (Lyons & Petrucelli, 1987).

Hippocrates conseguiu, combatendo as superstições, tratar as doenças sobre outra ótica. Um exemplo foi a visão dos chamados “ataques epilépticos” demonstrando que eram uma disfunção cerebral e não uma ação da raiva dos deuses sobre os homens. Seus escritos compilados sob o título “Hippocratic Collection” ou “Corpus Hippocraticum” no século IV a.C. foram reunidos na Biblioteca de Alexandria. Além de princípios de Anatomia, Fisiologia, Patologia Geral, Prognósticos, Cirurgia, Ginecologia, Ética, encontram-se referências às doenças mentais de modo geral e estados emocionais de pacientes. O cérebro é reconhecido como um órgão do pensamento e sensação, o que é uma indicação de um alto estágio de entendimento (Lyons & Petrucelli, 1987).

“Os homens deveriam saber que nenhum outro lugar senão do cérebro vêm as alegrias, delícias, risos e divertimentos, tristezas, afeições, desespero e lamentações. E através dele, de maneira especial, adquirimos sabedoria e conhecimento, vemos e ouvimos, sabemos o que é certo ou errado, o que é bom ou mau, o que é doce e o que é insípido... E pelo mesmo órgão tornamo-nos loucos e delirantes, medos e temores nos assaltam, alguns à noite, outros durante o dia, sonhos e inoportunos transvios, preocupações inadequadas, ignorância das circunstâncias do presente, desabituação e inabilidade. Todas essas coisas nós sofremos através do cérebro quando ele não é sadio”.

(Hippocrates, 460-370 a.C.)

Doenças orgânicas, tais como epilepsia, *delirium tremens* e distúrbios mais sutis, depressão e ansiedade e até mesmo a origem dos sonhos já era discutida com perspicácia (Lyons & Petrucelli, 1987).

Nas últimas décadas foram obtidos avanços significativos por meio de técnicas cirúrgicas eficazes, métodos histoquímicos, imunológicos e de radioisótopos utilizados para mapear a distribuição de neurotransmissores centrais, sistemas enzimáticos e de seus

receptores. O uso da neuroimagem estrutural tem possibilitado um maior sucesso na avaliação diagnóstica e tratamento de diversas doenças.

A ressonância magnética nuclear (RMN) é um procedimento de imagem estrutural muito utilizado, ao lado da Tomografia Computadorizada. A tomografia por emissão de fóton único (SPECT- single photon emission computed tomography) é uma técnica de neuroimagem funcional aplicada para investigação complementar da RMN e de estudos na tomografia por emissão de pósitrons (PET) (Berkovick & Newton, 1998).

O PET permite mapear e estudar funções bioquímicas, fisiológicas, hemodinâmicas e farmacológicas em diferentes organismos. As aplicações clínicas e de pesquisas relativas à metodologia com PET tem aumentado continuamente. No cérebro, em particular, o PET tem sido aplicado para o estudo da utilização regional de glicose e oxigênio, fluxo sanguíneo, síntese protéica, captação e ligação de neurotransmissores (Silva et al., 1998).

A clonagem molecular também forneceu base importante para um maior entendimento de receptores, possibilitando assim uma abordagem terapêutica mais específica para tratar distúrbios do SNC. Apesar desses avanços, dos progressos das explorações para-clínicas, dos resultados obtidos da experimentação e até mesmo o conhecimento dos fatores genéticos que podem contribuir para a etiologia da epilepsia em cerca de 40% desses pacientes (Gardiner,

1999), os mecanismos responsáveis pelo fenômeno epiléptico não se encontram totalmente esclarecidos.

A Epilepsia é geralmente um termo usado no singular, muito embora a crise epiléptica não seja sinônimo de epilepsia e que as epilepsias ao passar por um processo evolutivo apresentam uma extrema variação. Reconhecer uma crise epiléptica não é evidente e classificá-la nem sempre é fácil. Integrá-la no seu contexto, isto é, determinar suas causas e conseqüências é ainda mais difícil (Loiseau & Loiseau, 1999).

O estado epiléptico tônico-clônico generalizado é uma emergência que coloca a vida em risco, requerendo imediato tratamento cardiovascular, respiratório, metabólico, assim como emergente terapia farmacológica, requerendo quase sempre o uso de drogas antiepilépticas (Porter & Meldrum, 1998).

O “tabu” ligado à palavra epilepsia persiste em muitos casos, introduzindo uma carga suplementar sem justificativa à doença. Os pacientes epilépticos freqüentemente apresentam conflitos emocionais decorrentes de vários fatores: dificuldade de aceitar o diagnóstico; ser portador de uma doença crônica; receio do momento da crise convulsiva; limitações para executar determinadas atividades; dependência dos outros; luta contra os mitos em torno da doença. Ainda hoje a epilepsia se apresenta para muitos como um mal crônico, incurável, contagioso, o que causa infortúnio, isolamento social e discriminação aos portadores deste tipo de patologia.

1.1.2 Histórico

Grandes vultos da literatura e arte universais conviveram com a epilepsia, o que não impediu que, mesmo em meio ao desespero e à dor, fossem considerados gênios. A maioria deles transcendeu a doença, fazendo de suas obras uma exteriorização de sua genialidade.

Vários biógrafos e epileptologistas relatam a convivência dessas personalidades com a epilepsia e distúrbios semelhantes com seus feitos heróicos, superando tudo através da obstinação e criatividade. São citados Alexandre, o Grande; Júlio César, Joana D'Arc, Napoleão Bonaparte, D. Pedro I. A seguir serão referidos: Van Gogh, Dostoiévski, Flaubert e Machado de Assis.

Vincent Van Gogh, pintor holandês (1853-1890), um dos maiores nomes do impressionismo europeu, se descrevia como um epilético, embora permaneçam como motivo de discussão que outros distúrbios de comportamento como psicose-maníaco-depressiva estejam associados. Teve uma existência atormentada e doentia, alucinações visuais e auditivas que levaram-no à auto-mutilação, cortando a orelha, vindo a falecer aos 37 anos, murmurando, nos braços de seu irmão: “A tristeza não tem fim”.

Fiódor Mikháilovitch Dostoiévsky (1821-1881), escritor russo, registrou em seus diários, cartas e novelas, seus 35 anos de experiência com a moléstia. No romance “O Idiota” descreveu uma crise narrada pelo príncipe Míchkin: um curto estado extático, um relato de felicidade absoluta, seguido de acentuada melancolia e profundo sentimento de culpa, fazendo um detalhamento da epilepsia do lobo temporal, o que seria realizado no meio médico, cerca de 20 anos depois pelo neurologista inglês John Hughlings Jackson: a descrição de uma aura de êxtase que antecede o ataque epiléptico.

Dostoiévsky, considerado um dos líderes espirituais de seu país, escreveu “Os Irmãos Karamázov” dois meses antes de sua morte. Admitiu sua doença e escreveu: “Sim, eu tenho a doença das quedas, a qual não é vergonha para ninguém. E a doença das quedas não impede a vida”. Apresentou cerca de 400 crises epilépticas generalizadas convulsivas até sua morte por hemoptise, possivelmente decorrente da tuberculose.

Gustave Flaubert (1821-1880) é um dos maiores romancistas universais, precursor do realismo e criador do romance “Madame Bovary”. Flaubert era epiléptico, apresentando crises parciais simples que evoluíram para crises parciais complexas e/ou generalizadas secundárias. Recebeu todas as terapias disponíveis na época, como: exsanguinações, cataplasmas, infusões, hidroterapia e as drogas antiepilépticas disponíveis, como o brometo de potássio. Faleceu aos 59

anos de idade, apresentando congestão facial, não sendo diagnosticada nenhuma relação de conseqüência com a crise epiléptica.

Joaquim Maria Machado de Assis (1839-1908) também foi epiléptico, tinha vergonha de sua enfermidade, nunca lhe escrevia o nome, ocultando a doença até entre os amigos mais íntimos. Fez alusão, apenas de modo sucinto, a uma crise de sua inconfessável epilepsia, no conto Verba Testamentária (in “Relíquias da Casa Velha”). A epilepsia de Machado, como a de Flaubert, não prejudicou a qualidade e a quantidade de seu trabalho literário. Ao contrário, sua gigantesca obra é o triunfo pessoal sobre a doença e sobre si mesmo (Yacubian & Pinto, 1998).

1.1.3 Terminologia e Classificação das Epilepsias

O termo “crise” refere-se a uma mudança transitória de comportamento devido à descargas desordenadas, sincrônicas e rítmicas de populações de neurônios do sistema nervoso central. O termo “epilepsia” refere-se a uma desordem da função cerebral caracterizada pela periódica e imprevisível ocorrência de crises.

As manifestações comportamentais de uma crise são determinadas pelas funções normalmente atribuídas à região cortical onde a crise se inicia. Existe uma classificação mais recente, específica

sobre “síndromes epilépticas“ (Comission, 1989) como um conjunto de sintomas que freqüentemente ocorrem juntos e que incluem fatores como: tipo de crise, etiologia e tempo de início das crises (McNamara, 1994).

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

Nos últimos anos houve uma grande explosão de informações sobre as bases genéticas da epilepsia e síndromes epilépticas, ao mesmo tempo em que ocorreu um crescente entendimento da epilepsia humana. Surgiram vários modelos animais, o mapeamento dos genes da epilepsia, a análise da relação entre defeitos genéticos e mecanismos celulares desta patologia. Em 1999, Prasad e colaboradores sugerem a existência de diversos gens relacionados a cada uma das diferentes vias que levam à epilepsia (Prasad et al., 1999).

Atualmente, a definição do termo epilepsia está relacionada a um conjunto de entidades completamente distintas do ponto de vista etiológico e fisiopatológico (Fisher, 1989).

A maioria das entidades conhecidas como “epilepsias” correspondem a síndromes e não a doenças etiologicamente definidas (Comission,1985). Uma síndrome epiléptica é definida, segundo a classificação Internacional de Epilepsias e Síndromes Epilépticas, como um distúrbio epiléptico caracterizado por um conjunto de sintomas que usualmente se repetem de forma associada (Comission, 1989).

As crises epilépticas têm sido divididas em crises parciais, quando iniciadas focalmente no sítio cortical, e crises generalizadas quando há envolvimento maciço do córtex dos dois hemisférios desde o princípio.

As manifestações comportamentais de uma crise são determinadas pelas funções normalmente atribuídas à região cortical onde a crise se inicia. Por exemplo, uma crise iniciada no córtex motor é manifestada através de espasmos clônicos das partes do corpo controladas pela região cortical de origem.

Uma crise parcial simples é associada à preservação da consciência. Uma crise parcial complexa é associada a um prejuízo da consciência. A maioria das crises parciais complexas são originadas nos lobos temporais. As crises de ausência, mioclônica e tônico-clônica são exemplos de crises generalizadas.

A crise de ausência é caracterizada pela parada súbita das atividades associada a olhar fixo, durante cerca de 30 segundos e seguido de uma volta abrupta ao comportamento normal.

Uma crise mioclônica consiste de uma breve contração dos músculos, como choques, podendo ser restrita à parte de uma extremidade ou generalizada. Uma crise tônica consiste de uma contração muscular mantida, enquanto uma crise clônica é caracterizada por períodos alternados de contração e relaxamento muscular; crises tônico-clônicas geralmente envolvem grupos de músculos ao longo do corpo, são associadas à perda de consciência e duram aproximadamente de 30 a 60 segundos. Um paciente propenso freqüentemente exibe tipos múltiplos de crise, em episódios epiléticos diferentes (McNamara, 1994).

Segundo a Comissão de Classificação Internacional das Epilepsias e Síndromes Epiléticas da Liga Internacional contra a Epilepsia, utilizam-se dois critérios principais para diferenciar os tipos de

Epilepsia: o primeiro separa as epilepsias generalizadas das que cursam com crises parciais ou focais; o segundo separa as epilepsias secundárias ou sintomáticas das idiopáticas ou primárias e das criptogênicas (Comission, 1989; Dreifuss, 1990).

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

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

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

A crise pode ser “não-epiléptica”, como por exemplo, decorrente do eletrochoque ou convulsivantes químicos, ou “epiléptica” quando ocorre sem indução aparente (McNamara, 1994).

1.1.4 Tratamento das epilepsias

A epilepsia afeta cerca de 0.5% da população mundial. Antes da descoberta de drogas antiepilépticas, o tratamento da epilepsia consistia em trepanação, aplicação de ventosas e no uso de medicamentos obtidos de ervas e extratos animais.

Em 1857, Sir Charles Locock relatou a eficácia do brometo de potássio na epilepsia. Em 1912, o Fenobarbital foi usado pela primeira vez e, nos 25 anos seguintes, 35 análogos do Fenobarbital foram estudados como anticonvulsivantes. Em 1938, descobriu-se que a Fenitoína era eficaz contra convulsões experimentais em gatos. Entre

1935 e 1960 foram relatados progressos no desenvolvimento de modelos experimentais e 13 novas drogas foram lançadas (Porter e Meldrum, 1998).

O tratamento farmacoterapêutico longo de epilepsias é baseado na administração de drogas com toxicidade potencial. Dentre os princípios do tratamento estão: a contínua avaliação da razão risco-benefício; o uso de drogas antiepilépticas moderadamente e por curtos períodos, tanto quanto possível, e o uso de drogas mais específicas para o tipo de crise a ser tratada. Apesar da escolha da droga ser determinada pelo tipo de crise, considerações como tratar ou não tratar, por quanto tempo tratar, e sob que circunstâncias a terapia deve continuar, dependem em grande parte do conhecimento e não de apenas do prognóstico da síndrome em consideração.

O conhecimento acerca da condição pode ajudar no aconselhamento genético e na posterior elaboração de informações que podem levar à localização dessa condição no genoma humano e, finalmente, à identificação das alterações. Tal conhecimento conduzirá ao desenvolvimento de terapêuticas mais racionais, buscando a eliminação de anormalidades bioquímicas (Dreifuss, 1990).

O diagnóstico da epilepsia é estabelecido a partir da história do paciente, da natureza da convulsão e do padrão eletroencefalográfico.

A Eletroencefalografia é uma técnica que mapeia a atividade elétrica no cérebro por meio de eletrodos instalados na cabeça. O eletroencefalograma (EEG) tem relevância tanto na pesquisa básica quanto na clínica. Tornou-se um instrumento precioso no diagnóstico, classificação e tratamento medicamentoso em pacientes epiléticos, além de auxiliar na seleção de casos com indicação cirúrgica.

Hans Berger (1873-1941), psiquiatra alemão, em 1924, observou a atividade cerebral em um jovem de 17 anos, durante um procedimento neurocirúrgico para remoção de um tumor. A ausência regional da calota craniana nesse voluntário facilitou o registro. Após três décadas de estudo foi publicado o primeiro registro consistente da atividade elétrica cerebral em humanos com crânio íntegro. Após aprimoramento da técnica com a obtenção de vários traçados, Berger havia alcançado muito mais do que o simples registro da atividade elétrica cerebral. Seu legado inclui noções sobre o efeito do crânio na voltagem do EEG, desenvolvimento de diferentes tipos de eletrodos, além de valores normativos para os registros eletroencefalográficos e distribuição topográfica dos ritmos do eletroencefalograma. Em 1941, aos 68 anos, Berger suicidou-se, no auge de uma crise depressiva, após vitoriosamente introduzir um dos mais importantes instrumentos na pesquisa da atividade elétrica cerebral (Paola, 1998).

O tratamento farmacológico adequado depende do tipo de epilepsia e deve ser sempre iniciado com uma única droga e o seu uso otimizado antes da utilização de uma segunda droga. As propriedades farmacocinéticas e os efeitos adversos devem ser conhecidos a fim de se obter o máximo benefício terapêutico (Kerwin et al., 1999).

Geralmente o controle completo das crises é obtido em 50% dos pacientes e aproximadamente outros 25% podem melhorar significativamente (Rall & Schleifer, 1991). Para efeito de terapia é importante distinguir os principais tipos de epilepsia para selecionar melhor o tipo de fármaco para cada paciente, de acordo com o tipo de crise que ele apresenta (Kerwin et al., 1999).

É improvável que a grande variedade de crises epiléticas atinja êxito após tratamento com uma única droga. Além disso, mais de um mecanismo pode ser responsável pelas várias convulsões e as drogas úteis para um tipo de convulsão podem ocasionalmente agravar outros tipos. Uma versão resumida da classificação internacional das convulsões epiléticas é apresentado na **FIGURA 1**.

FIGURA 1 Quadro Classificação das Convulsões*

TIPO DAS CONVULSÕES		CARACTERÍSTICAS
I. Convulsões parciais (Convulsões focais e locais)	A. Convulsões parciais simples	Várias manifestações, sem diminuição da consciência, incluindo convulsões restritas a um único membro ou grupo muscular (<i>epilepsia motora jacksoniana</i>) distúrbios sensoriais específicos e localizados (<i>epilepsia sensorial jacksoniana</i>) e outros sinais e sintomas limitados, dependendo da área cortical específica causadora da descarga anormal.
	B. Convulsões parciais complexas	Ataques de comportamento confuso, com diminuição da consciência, com grande variedade de manifestações clínicas, associadas à atividade de EEG bizarra generalizada durante a crise, porém com evidência de anormalidades focais na região anterior do lobo temporal, em muitos casos mesmo no período inter-crisis.
	C. Convulsões parciais generalizadas secundariamente	
II. Crises Generalizadas (Convulsivas ou não-convulsivas)	A.1 Crises de ausência	Perda rápida e abrupta da consciência, associada a padrões pico-onda de três por segundo, de alta voltagem, bilateralmente sincrônicos no EEG, em geral com alguma atividade clônica motora simétrica, variando desde o piscar dos olhos até contrações de todo o corpo, algumas vezes sem nenhuma atividade motora.
	A.2 Crises atípicas de ausência	Ataques com aparecimento e término mais rápidos do que o habitual para as crises de ausência, associados a um EEG mais heterogêneo.
	B. Convulsões mioclônicas	Contrações clônicas isoladas, associadas a rápidos surtos de picos múltiplos no EEG.
	C. Convulsões clônicas	Contrações clônicas rítmicas de todos os músculos, perda da consciência e manifestações autônomas pronunciadas.
	D. Convulsões tônicas	Opistótono, perda da consciência e manifestações autônomas pronunciadas
	E. Convulsões tônicas-clônicas (<i>grande mal</i>)	Convulsões maiores, em geral uma seqüência de espasmos tônicos máximos de toda a musculatura corporal, seguidas por contrações clônicas sincrônicas e depressão prolongada de todas as funções centrais.
	F. Crises atônicas	Perda do tônus postural, com inclinação da cabeça ou queda.

* Modificado da proposta da Comissão para Classificação e Terminologia da Liga Internacional Contra a Epilepsia, 1981 (Rall & Schleifer, 1991).

A fisiopatologia das epilepsias atualmente é mal compreendida uma vez que a função anormal dos neurônios, ou de um grupo deles, responsável pelo surgimento das crises, em nenhum momento foi claramente identificada (McDonald & McLean, 1986), levando a crer que a epileptogênese envolve um complexo interativo de múltiplos fatores causais (Rall & Schleifer, 1991).

As buscas em torno de uma base neuroquímica para a epilepsia ainda são desapontadoras, embora haja algumas indicações, sobretudo de que parece ocorrer um “déficit” na transmissão inibitória, mediada por ácido gama-aminobutírico (GABA), glicina, taurina ou a hiperatividade de um transmissor excitatório, como o glutamato ou aspartato, ou ainda devido a propriedades elétricas anormais das células afetadas (Rang & Dale, 1993).

As drogas antiepilépticas atuam principalmente através de dois modos: por redução de excitabilidade elétrica das membranas celulares, possivelmente através de bloqueios dos canais de sódio ou por estímulo

da inibição sináptica mediada por GABA, agindo através de um estímulo da ação pós-sináptica do GABA, pela inibição da GABA-transaminase ou por drogas com propriedades GABA-agonistas diretas (Rang & Dale, 1993).

Várias drogas antiepilépticas encontram-se disponíveis. A maioria delas pode ser classificada em cinco grupos químicos semelhantes, por apresentarem em comum uma estrutura com anel heterocíclico similar: hidantoínas, barbitúricos, oxazolidinodionas, succinimidas, acetiluréias. São também muito utilizadas a carbamazepina, o ácido valpróico e os benzodiazepínicos, drogas que possuem estruturas distintas (Porter & Meldrum, 1998).

Além das drogas convencionais, alguns fármacos foram introduzidos recentemente no tratamento da epilepsia. Tais drogas foram desenvolvidas com certa fundamentação no seu mecanismo de ação, ao contrário das drogas convencionais que foram empiricamente descobertas (Guerreiro, M. M. & Guerreiro, C.A.M., 1998). Dentre elas destacam-se a Vigabatrina (VGB), Lamotrigina (LTG), Oxcarbazepina (OXC), Felbamato, Gabapentina, Topiramato, Tiagabina, Stiripentol e Zonisamida. Há outras drogas que se encontram em fases iniciais de ensaios clínicos, tais como Eterobarb, Ramacemida, Taltrimida e Levetiracetam.

Infelizmente as drogas usadas atualmente não apenas falham no controle das crises em alguns casos, mas podem causar efeitos

colaterais que variam desde pequeno dano ao SNC, até a morte por insuficiência hepática ou anemia aplástica. Alguns fármacos anticonvulsivantes mais utilizados serão descritos a seguir:

Fenitoína

Usada para todos os tipos de epilepsia, exceto crises de ausência. A Fenitoína produz um efeito estabilizador em membranas excitáveis de várias células (neurônios, miócitos), pode diminuir o fluxo de sódio durante o repouso, bem como o fluxo que ocorre durante o potencial de ação. Provavelmente seu efeito mais significativo é a capacidade de modificar o padrão das crises máximas por eletrochoque.

A baixa solubilidade em água e o caráter ácido alteram a velocidade e o teor de absorção da Fenitoína, administrada por via oral ou intramuscular. A meia-vida de absorção pode variar de 1 a 2,8 horas. A metabolização é principalmente hepática e menos de 5% de uma dose são eliminados em forma de fármaco inalterado (Leite, 1991).

Os efeitos tóxicos dependem da via de administração, do tempo de exposição e da dosagem, são eles: efeitos vestibulo-cerebelares, efeitos comportamentais, hiperplasia gengival, hirsutismo,

anemia megaloblástica, malformações fetais e reações de hipersensibilidade (Rall & Schleifer, 1991).

Outras Hidantoínas como a Mefenitoína, a Etotoína e a Fenamicida, são mais eficazes contra convulsões tônico-clônicas generalizadas e parciais. A incidência de reações graves (dermatite, anemia aplástica e hepatite) é maior para a Mefenitoína. A Etotoína é recomendável para pacientes hipersensíveis à Fenitoína, sendo necessário doses maiores. A Fenamicida é uma droga tóxica de último recurso para convulsões parciais refratárias.

Fenobarbital

É um fármaco eficaz para crises tônico-clônicas generalizadas e crises parciais. O Fenobarbital limita a disseminação da atividade da crise e também eleva o limiar para o seu aparecimento. A absorção dos barbitúricos após administração oral é completa, apesar de lenta. Parte do fármaco absorvida é eliminada por excreção renal (10 a 25%) e grande parte do fármaco é metabolizada no fígado por enzimas do microsoma (Leite, 1991). A atividade anticonvulsivante do Fenobarbital é relacionada à sua capacidade em reduzir as ações excitatórias do glutamato, bem como aumentar as ações inibitórias do GABA. A sedação é o efeito colateral mais importante deste fármaco e, com doses excessivas, podem ocorrer nistagmo e ataxia, irritabilidade e hiperatividade em crianças, além de agitação e confusão em idosos (Rall & Schleifer, 1991).

Trimetadiona

É o protótipo de fármacos úteis para crises de ausência. A absorção dos barbitúricos após administração oral é completa, apesar de lenta. Parte do fármaco absorvida é eliminada por excreção renal (10 a 25%) e grande parte do fármaco é metabolizada no fígado por enzimas do microsoma (Leite, 1991). A Trimetadiona eleva o limiar para as deflagrações de convulsão após a estimulação talâmica repetitiva, reduzindo a corrente de cálcio de baixo limiar (tipo T). O efeito adverso mais notável é a sedação, outros efeitos são turvação visual à luz forte (hemeralopia), reações dermatológicas, neutropenia, anemia aplástica e linfadenopatia (Porter & Meldrum, 1998).

Etossuximida

É particularmente eficaz contra as crises de ausência, sendo a droga de escolha para este tipo de epilepsia. A absorção da droga no trato gastrointestinal é completa. O pico de concentração plasmática após administração oral ocorre num intervalo de uma a sete horas da administração. No homem, cerca de 20% do fármaco ingerido são excretados na urina de forma inalterada. O restante é metabolizado no fígado, pelo sistema microsômico (Leite, 1991). O mecanismo de ação provavelmente envolve os canais de cálcio, reduzindo as correntes de limiar baixo (tipo T) e age também inibindo a Na⁺K⁺ATPase, deprime a taxa metabólica cerebral e inibe a GABA-transaminase. Os efeitos colaterais mais comuns são os sintomas gastrintestinais (náuseas,

vômitos, anorexia) e neurológicos (sonolência, letargia, cefaléia, soluços) também têm sido relatados fotofobia, reações dermatológicas e anemia aplástica (Porter & Meldrum,1998).

Carbamazepina

É a droga primária para o tratamento de todos os tipos de epilepsia, exceto crises de ausência. Embora as ações da Carbamazepina no homem e nos animais assemelhem-se àquelas da Fenitoína em muitos aspectos, as duas diferem em várias características importantes.

A Carbamazepina é praticamente insolúvel em água e sua absorção por via oral é lenta. Em ratos, o pico de concentração plasmática se observa após 4 ou 6 horas da administração oral (Leite, 1991). É mais eficaz que a Fenitoína na capacidade de bloquear as crises induzidas por Pentilenotetrazol e as duas drogas possuem ação semelhante nos canais de sódio. A Carbamazepina, além disso, age como um antagonista nos receptores de adenosina e parece também interagir com sítios relacionados à regulação dos canais de cálcio. Os efeitos colaterais mais comuns são a diplopia e ataxia, desconfortos gástricos, instabilidade e, em doses muito altas, entorpecimento (Porter & Meldrum,1998).

Ácido Valpróico

O Ácido Valpróico tem atividade antiepiléptica contra muitos tipos de crises e causa pouca sedação e outros efeitos no SNC. Apresenta um elevado índice terapêutico. Ocorre uma completa e rápida absorção após administração por via oral. O pico de nível plasmático é atingido entre meia hora a duas horas após a administração oral. A meia-vida de eliminação varia de aproximadamente 8 a 15 horas. A principal via de inativação do fármaco é por metabolização (Leite, 1991).

A hipótese atual para seu mecanismo de ação baseia-se nas interações possíveis com os canais de sódio sensível à voltagem e em possível acúmulo de GABA. Inibe acentuadamente a deflagração repetitiva de neurônios em cultura. Os efeitos colaterais mais frequentes são os sintomas gastrintestinais (anorexia, náuseas, vômitos) e no SNC sedação, ataxia e tremor. A hepatite fulminante é ocorrência rara e geralmente fatal (Rall & Schleifer, 1991).

Diazepam

Os Benzodiazepínicos são empregados primariamente na clínica como drogas sedativo-ansiolíticas, no entanto, alguns deles, como o Diazepam, têm um papel bem definido no tratamento do estado epilético. Os benzodiazepínicos são rapidamente absorvidos por via oral. Pela via parental, a distribuição no organismo se efetua de forma semelhante à observada com drogas muito lipossolúveis. A penetração no tecido cerebral é muito rápida (Leite, 1991).

As ações anticonvulsivantes resultam em grande parte da sua capacidade em ampliar os aumentos na condutância do cloro induzida pelo GABA, no entanto podem existir outros mecanismos pelos quais os Benzodiazepínicos diminuem a excitabilidade dos neurônios através do aumento das condutâncias do potássio dependente do cálcio e do acúmulo de adenosina. Em concentrações mais elevadas podem reduzir a alta frequência mantida de deflagração dos neurônios, de modo semelhante aos efeitos da Fenitoína, Carbamazepina e Ácido Valpróico (McDonald & McLean, 1986; Rall e Schleifer, 1991).

Além das drogas convencionais, alguns fármacos foram introduzidos recentemente no tratamento da epilepsia. Tais drogas foram desenvolvidas com certa fundamentação no seu mecanismo de ação, ao contrário das drogas convencionais que foram empiricamente descobertas (Guerreiro, M. M. & Guerreiro, C.A.M., 1998). Dentre elas destacam-se a Vigabatrina (VGB), Lamotrigina (LTG), Oxcarbazepina (OXC), Felbamato, Gabapentina, Topiramato, Tiagabina, Stiripentol e Zonisamida. Há outras drogas que se encontram em fases iniciais de ensaios clínicos, tais como Eterobarb, Ramacemida, Taltrimida e Levetiracetam.

Vigabatrina (VGB)

É indicada em crises epiléticas parciais. A Vigabatrina ou Gama-Vinil-GABA (GVG) é estruturalmente relacionada ao GABA com um radical vinil. O mecanismo de ação proposto é a inibição irreversível da

enzima GABA- Transaminase que destrói o GABA na fenda sináptica levando ao aumento da disponibilidade do GABA, neurotransmissor inibitório em certas áreas do cérebro. O pico de concentração se dá e uma a quatro horas, a eliminação renal é de 60 a 80 %. Registram-se como efeitos colaterais: sonolência, tontura e ganho de peso. Mais raramente podem surgir agitação, confusão e psicose (Melo, A., 1994).

Lamotrigina (LTG)

É um composto feniltrazínico que atua como anticonvulsivante por inibir a liberação do neurotransmissor excitatório glutamato. É bem absorvida após ingestão oral, ocorrendo concentração máxima após duas a quatro horas. Possui meia-vida de 19 a 29 horas, a qual pode ser significativamente prolongada após a co-administração de ácido valpróico e reduzida com carbamazepina e fenitoína. Liga-se às proteínas plasmáticas em 55% (Melo, A., 1994).

Oxcarbazepina (OXC)

Utilizada nas epilepsias parciais com ou sem generalização secundária. Foi desenvolvida na tentativa de se evitar o metabólito 10,11-epóxido de CBZ que é o responsável pela toxicidade da droga. A OXC é uma pró-droga, sendo rapidamente metabolizada no derivado mono-hidroxi (DMH), que é o elemento ativo. Possui absorção rápida e quase completa (96%). Possui meia-vida de 8 a 10 horas (Guerreiro, M. M. & Guerreiro, C.A.M., 1998).

Topiromato

Tem ação contra crises parciais e generalizadas. É uma nova droga que apresenta absorção rápida e completa cinética linear, liga-se pouco às proteínas plasmáticas, a excreção é predominantemente renal como droga intacta, a eliminação plasmática tem meia-vida longa de 20 a 30 horas e pouca interação com outras drogas antiepilépticas. Bloqueia os canais de sódio e cálcio. A maioria dos efeitos colaterais ocorre no início do tratamento e tende a se resolver com a continuidade da terapia. Além dos efeitos sobre o sistema nervoso central foram observados perda de peso e cálculo renal, ambos com ocorrência rara. Não houve evidências de complicações hepáticas e cardíacas graves nem toxicidade sistêmica.

Gabapentina

Indicada em crises parciais com e sem generalização secundária. É bem absorvido após administração oral, sua meia-vida é de 5 a 9 horas, as concentrações plasmáticas alcançam o pico em três horas. Molécula altamente solúvel foi projetada para mimetizar os efeitos do GABA no sistema nervoso central. Apesar de ser designada agonista GABA, parece agir aumentando a liberação de GABA por mecanismo desconhecido. Pode provocar sonolência, tontura, ataxia, fadiga e nistagmo.

1.1.5 Modelos Experimentais das Epilepsias

As pesquisas atuais sobre mecanismos de doenças humanas são baseadas em modelos animais (Fisher,1989). Os modelos de epileptogênese têm contribuído sobretudo para um melhor entendimento do fenômeno da epilepsia. A importância de um modelo experimental é determinada pela capacidade de representar com fidedignidade um fenômeno natural. São necessários vários requisitos para que um modelo seja considerado relevante :

- a) demonstrar a presença de atividade epileptiforme nos registros eletroencefalográficos;
- b) apresentar clinicamente uma sintomatologia semelhante àquela observada durante a crise epiléptica;
- c) deve possibilitar o “screening” de compostos com atividade convulsivante, o que não pode ser feito na clínica e
- d) à histologia, mostrar alterações morfológicas semelhantes às evidenciadas em tecidos epilépticos humanos (Mello et al., 1986).

A validade de um modelo experimental de epilepsia é freqüentemente desafiado pelo perfil de ação de drogas antiepilépticas (Meldrum, 1986 *apud* Turski & Cavalheiro, 1992). Torna-se difícil encontrar modelos que mimetizem verdadeira e completamente o conjunto de entidades conhecidas como epilepsias devido a sua grande complexidade envolvendo diversos distúrbios no SNC.

Os vários modelos experimentais em animais de laboratório para as diferentes síndromes epiléticas descritos na literatura podem ser classificados em preparações agudas e crônicas (Fisher,1989), sendo os modelos crônicos os de maior interesse por imitarem, mais adequadamente, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos na epilepsia humana (Purpura et. al, 1972).

Embora sejam inúmeros os novos modelos experimentais de epilepsia, poucos deles oferecem informações para um maior entendimento deste tipo de distúrbio do SNC (Mello et al.,1986). Muito do que se conhece sobre epilepsia foi obtido direta ou indiretamente de modelos animais e é importante reconhecer as limitações inerentes às abordagens experimentais para as epilepsias (Fisher, 1989).

Alguns modelos experimentais destacam-se pelo fato de estarem relacionados com a epilepsia do lobo temporal, a mais freqüente dentre as epilepsias humanas. Apresentam como característica principal a ocorrência de crises parciais com manifestações límbicas. São eles: o modelo do Ácido Kaínico, do Abrasamento e da Pilocarpina.

O ácido Kaínico, originalmente isolado de algas marinhas *Diginea simplex*, é uma potente neurotoxina de ação excitatória sobre neurônios do SNC de mamíferos (Shinokazi & Konishi, 1970). Aplicado por via sistêmica induz o aparecimento de crises com padrão

predominantemente límbico, exercendo potente ação convulsivante (Nadler et al., 1980). Este modelo possui limitações ocasionadas pela proximidade entre as doses letal e efetiva (Butler et al., 1995).

O modelo de abrasamento (Kindling), inicialmente descrito por Goddard em 1969, a partir da observação de que estímulos elétricos, repetitivos e de baixa intensidade, aplicados diariamente, induziam a uma susceptibilidade permanente a crises epiléticas (Goddard, 1969). Em 1992, Racine descreveu uma escala de evolução comportamental no abrasamento amigdaliano:

Estágio 1: o animal fica parado, apresenta reação de orientação, pisca os olhos e apresenta movimentos orofaciais.

Estágio 2: estágio 1, acrescido de mastigação, com ou sem salivação.

Estágio 3: estágio 2, somado a clonias das patas anteriores.

Estágio 4: estágio 3, acrescido de “rearing” (o animal fica em pé, apresentando clonias de ambas as patas anteriores e apoiado sobre as patas posteriores).

Estágio 5: estágio 4, seguido de perda do equilíbrio e queda (Racine, 1992).

O animal é considerado “abrasado” quando passa a apresentar crises generalizadas tônico-clônicas. Esse processo parece envolver uma alteração permanente de excitabilidade neuronal e sináptica

(Santos,1995). O modelo de abrasamento possibilita o estudo de drogas anticonvulsivantes (Campos et al.,1980) e permite a investigação de vários neurotransmissores envolvidos no fenômeno epiléptico (Cavalheiro et al., 1981). Neste sentido, o abrasamento oferece vantagens únicas (Mello, et al., 1986). A ausência de degeneração morfológica detectável e de toxinas exógenas elimina a hipótese de que estas variáveis confundam a interpretação dos experimentos (McNamara, 1994).

1.1.6 Modelo da Pilocarpina

Em 1983, Turski e colaboradores demonstraram que a Pilocarpina, um agonista muscarínico colinérgico, é um potente agente convulsivante. A administração de Pilocarpina em ratos e em camundongos, numa dose de 350 a 380 mg/kg, desencadeia alterações comportamentais e eletrográficas que evoluem para crises generalizadas, atingindo o *status epilepticus* (SE), que por sua vez, produz alterações cerebrais difusas (Turski et al., 1984).

Imediatamente após a administração sistêmica de Pilocarpina, os animais apresentam acinesia, atitude de coçar o dorso com as patas posteriores, orelhas levantadas para trás, movimentos mastigatórios, com moderada salivação, piscamento e movimentos rápidos das vibrissas. Cerca de 15 a 25 minutos, os animais apresentam intensa salivação, clonias de ambas as patas anteriores e ficam apoiados sobre as patas posteriores, queda, seguido, na maioria das vezes, por crise clônica generalizada.

As crises motoras límbicas se iniciam 30 minutos após a injeção de Pilocarpina, recorrem 2 a 8 minutos e evoluem para SE, persistindo por até 24 horas. Em 1991, Cavalheiro e colaboradores demonstraram que após o SE (fase aguda), os animais apresentam duas fases comportamentais bem definidas: silenciosa e crônica. As primeiras 24 horas caracterizam o período agudo do modelo. Em seguida, os animais tornam-se irresponsivos, caracterizando o período silencioso do modelo. Este período pode durar de 4 a 44 dias.

Após este período, todos os animais sobreviventes passam a exibir crises epiléticas espontâneas e recorrentes que caracterizam o período crônico, apresentando de 2 a 15 episódios críticos por mês. As crises espontâneas são caracterizadas por automatismos faciais, clonias dos membros anteriores com elevação do corpo sobre membros posteriores e a perda do equilíbrio com convulsões generalizadas (Cavalheiro et al., 1991).

Estudos eletrográficos demonstram presença de descargas epiléticas que se originam no hipocampo e logo após, se difundem para a amígdala e córtex, começando 40-45 minutos após a injeção de Pilocarpina. O período ictal demora 1 a 2 minutos, recorre a cada 5-15 minutos, seguido de depressão eletrográfica.

A atividade eletrográfica torna-se progressiva até culminar no SE. A análise histológica, feita 24 a 27 horas após a administração de Pilocarpina, demonstra alterações neuropatológicas no córtex olfatório,

complexo amigdalóide, tálamo, neocórtex, formação hipocampal e substância negra.

A fase silenciosa caracteriza-se pelo retorno às atividades normais seguido por aparecimento de espículas esparsas. Na fase crônica surgem crises espontâneas e recorrentes com atividade paroxística no hipocampo (HPC) e córtex (CX), com eventos ictais de longa duração. Alterações neuropatológicas também estão presentes no CX olfatório, complexo amigdalóide, tálamo, neocórtex, formação hipocampal e confirmam o HPC como sendo a estrutura mais lesada. Este modelo oferece vantagens, principalmente por reproduzir com fidelidade as crises epilépticas do lobo temporal humano, pela estabilidade e ausência de remissão das crises (Santos, 1995).

Como o SE está sempre associado a lesões neuronais (Oxbury & Whitty, 1971) que podem desencadear posteriormente crises recorrentes, o modelo experimental parece essencial para avaliar possíveis meios de prevenir o dano cerebral induzido pelo SE e o subsequente desenvolvimento da epilepsia.

Em 1994, Cavalheiro demonstrou que o desenvolvimento da epilepsia tardia está relacionado diretamente com a duração do SE. Estas relações parecem ser dependentes da perda celular neuronal na formação hipocampal e a reorganização sináptica subsequente nesta estrutura. Animais submetidos a 30 minutos de SE não evoluíram para o período crônico do modelo da Pilocarpina e não mostraram qualquer

crise no período de observação que durou cerca de 120 dias após a indução de SE (Cavalheiro et al., 1994).

Animais com SE, de uma a duas horas de duração, apresentaram um aumento na latência média para a primeira crise espontânea e uma diminuição significativa na frequência das convulsões. A evolução comportamental e eletrográfica de animais submetidos a seis horas de SE não foi diferente daquela observada em ratos não-tratados, com remissão espontânea do SE. A perda de células na formação hipocampal variou proporcionalmente à duração do SE induzido por Pilocarpina (Lemos & Cavalheiro, 1996).

Os modelos experimentais de crises parciais humanas e epilepsias ligadas à localização são necessários para investigações que não podem ser feitas em pacientes. Eles permitem o desenvolvimento de hipóteses relacionadas aos processos neuronais básicos das síndromes epiléticas e podem ser validados em pacientes (Engel, 1995).

1.2 ANFÍBIOS

1.2.1 Características gerais

O termo anfíbio é oriundo do grego *amphibios* (*amphi*, dual e *bios*, vida) e indica que a maioria das espécies vive tanto na água quanto na terra (Duellman,1992). Os anfíbios situam-se filogeneticamente entre os peixes e os répteis, sendo o primeiro grupo de cordados a viver fora da água, sofrendo muitas mudanças evolutivas quando emergiram dos mares Devonianos para a terra, no final da era Paleozóica, há 300-350 milhões de anos (Lazarus & Attila, 1993 ; Kardong,1998).

São membros da Classe Amphibia, Subfilo Vertebrata, Filo Chordata e Reino Animalia e originam as seguintes ordens: Anura ou Salientia (sapos, rãs e pererecas), Urodela ou Caudata (salamandras e tritões) e Apoda ou Gymnophiona (cobras-cegas ou cecílias), sendo atualmente conhecidas cerca de 4600 espécies de anfíbios (Duellman & Trueb, 1986; Pough et al., 1998).

A distribuição dos anfíbios ocorre em quase todos os continentes, exceto na Antártida e Groenlândia. Eles são encontrados tanto em ambientes secos quanto em lugares úmidos, sofreram

adaptações e ajustes fisiológicos para cada situação durante sua história evolutiva (Lazarus & Attila, 1993; Pough et al., 1998).

As adaptações dinâmicas permitiram a sobrevivência desses animais em ambiente seco. Eles são considerados um grupo de transição entre a vida aquática e a vida na terra. São os primeiros vertebrados tetrápodes a iniciarem a conquista da terra. No estágio larval respiram por brânquias; Alguns deles, quando adultos, têm respiração pulmonar e cutânea (Lazarus & Atilla, 1993). Os pulmões, quando presentes nesse grupo de vertebrados, são considerados estruturas pouco eficientes, possuem uma superfície interna limitada com alvéolos simples. Desta forma, a pele dos anfíbios, permeável, úmida sem escamas e bem irrigada por vasos sanguíneos assume importância especial nas trocas gasosas.

A presença de uma pele tão permeável traz problemas que dificultam a sobrevivência no ambiente terrestre: a perda de grande quantidade de água por transpiração pode ocasionar desidratação. Tal fato, poderia explicar a estreita dependência dos anfíbios em relação à água e sua preferência por lugares úmidos. Além disso, um outro motivo os escraviza à água, é o tipo de reprodução. Os ovos, apenas com um envoltório gelatinoso, só se mantêm viáveis em meio aquático (Storer et al., 1985).

Apesar de os anfíbios serem conhecidos como venenosos, pouquíssimos deles representam perigo para os seres humanos. Os anuros tóxicos mais importantes são os sapos da família Bufonidae; rãs das famílias Atelopodidae, Dendrobatidae, Discoglossidae, Phyllomedusidae, Pipidae, Ranidae e certas salamandras do gênero Salamandra (Bicudo, 1994).

As descrições de declínio das populações de anfíbios em várias partes do mundo são numerosas. A redução do número de anfíbios preocupa os especialistas pelo fato de serem considerados excelentes indicadores ecológicos da saúde do ambiente (Pechmann et al., 1991).

1.2.2 Glândulas secretórias da pele de anfíbios

A pele de anfíbios constitui uma extraordinária fonte de inúmeras substâncias biologicamente ativas (Erspamer et al., 1984), sendo responsável por várias funções vitais, tais como respiração, que complementa a pulmonar, a reprodução, o transporte de água e eletrólitos, a regulação da temperatura corpórea, a defesa contra predadores, dessecação, proliferação de microorganismos na superfície do corpo e provavelmente outras ainda a serem descobertas (Toledo & Jared, 1989; Carvalho et al., 1995).

Existe um verdadeiro arsenal de produtos químicos naturais com atividades biológicas variadas. Embora algumas espécies contenham toxinas extremamente potentes, esses animais são inofensivos ao homem por não possuírem mecanismos para inocular o veneno e pela natureza pacífica do seu comportamento (Sebben et al., 1993).

As secreções cutâneas ocorrem na camada dérmica da pele dos anfíbios, através de glândulas mucosas e granulosas distintas histologicamente, semelhantes àquelas encontradas nos peixes, indicando que elas precedem filogeneticamente aos anfíbios (Lazarus & Attila, 1993; Neuwirth et al., 1979; Flucher et al., 1986).

As glândulas mucosas secretam um fluido aquoso que mantém a pele úmida e escorregadia, as granulosas, mais escassas e maiores, produzem uma secreção espessa, esbranquiçada que também protege o animal dos predadores (Toledo & Villa, 1987; Toledo & Jared, 1995). Regulam a umidade da superfície externa do corpo, por meio da secreção de grande quantidade de muco que também controla o pH e propicia as condições adequadas para a respiração cutânea.

As glândulas granulosas do animal estão dispersas na pele, mas encontram-se também na cabeça, dorso, extremidades ou

encontram-se agrupadas, como ocorre com as parotóides, dispostas uma de cada lado do corpo, em posição pós-orbital, nos sapos (Stebbins & Cohen, 1995). A secreção é freqüentemente tóxica e pode ser induzida por estimulação física do animal, moderado choque elétrico ou injeção de adrenalina, noradrenalina, arginina vasotocina, arginina vasotocinilglicina, todos mediados pelo SNC (Flucher et al., 1986).

1.2.3 Conteúdo da secreção glandular

As secreções das glândulas de anfíbios contêm uma miríade de substâncias bioativas que incluem:

- a) Aminas biogênicas (indoalquilaminas, imidazolalquilaminas, fenilalquilaminas) (Erspamer, 1984), destacando-se dentre outras, no veneno dos sapos, os derivados Feniletilamínicos (ex. Adrenalina) e derivados triptamínicos como a 5-hidroxitriptamina ou serotonina (Erspamer, 1984; Lazarus & Attila, 1993);
- b) Peptídeos, agrupados em diversas classes como Bradicininas, Taquicininas, Ceruleínas, Bombesinas, Dermofinas, Xenopsinas, Angiotensinas, além de peptídeos com atividade antimicrobiana como as magaininas (Bevins & Zasloff, 1990; Lazarus & Attila, 1993). Há uma grande variedade de peptídeos na secreção cutânea dos anuros (Toledo & Jared, 1989) que possuem semelhança com

peptídeos de diversos órgãos de mamíferos (Erspamer, 1984; Lazarus & Attila, 1993);

- c) Proteínas ou compostos proteináceos que desencadeiam vários efeitos farmacológicos e servem muitas vezes de modelo para a descoberta de novas funções fisiológicas em mamíferos (Carvalho et al., 1992), além das várias enzimas já identificadas como convertases, amidases (peptil-glicina- α -hidroxi-peptidase e peptil-hidroxi-glicina N-C ligase), exopeptidases (dipeptidil-aminopeptidase e carboxipeptidase), endopeptidases (metalo-protease) e outras (Camarão, 1995; Carvalho, 1995).

- d) Esteróides que podem ser classificados em cardiotônicos e não cardiotônicos. Colesterol, Sitosterol e Ergosterol são exemplos de esteróides não cardiotônicos (Chen & Kovarikova, 1967). Dentre as substâncias isoladas dos anfíbios destacam-se os esteróides de ação cardiotóxica: Bufadienólídeos, também denominados Bufogeninas ou Bufaginas e as Bufotoxinas. Os Bufadienólídeos consistem de um anel esteróide ligado a um grupo lactônico. As Bufotoxinas são compostos formados através da conjugação de bufogeninas com suberil-arginina ou suberil-gutamina (Hong et al., 1992).

A descoberta de novas substâncias nas secreções de glândulas granulosas de anfíbios encorajou o estudo e exploração da bioquímica dos anfíbios (Clarke, 1997).

1.2.4 Família Bufonidae – *Bufo paracnemis*, Lutz (1925)

A família Bufonidae é amplamente distribuída em todos os continentes, exceto em Madagascar e Regiões Oceânicas e é uma das mais numerosas famílias (em espécies) da classe Amphibia (Frost, 1985). A grande maioria dos animais da família Bufonidae apresenta uma concavidade na frente e uma superfície convexa no dorso. A vértebra sacral é dilatada nas laterais. Os sapos do gênero *Bufo* não possuem dentes. A presença do órgão de Bidder é uma característica especial da família Bufonidae. Trata-se de um tecido ovariano em estágio embrionário. Quando caem as taxas do hormônio masculino produzido pelos testículos, o órgão de Bidder se desenvolve, evidenciando um exemplo do dimorfismo sexual presente no gênero *Bufo* (Duellman & Trueb, 1986).

Atrás de cada olho há uma depressão coberta por uma membrana, o tímpano, destinada a receber ondas sonoras. À frente dos olhos há dois orifícios nasais, ligados à boca, providos de válvulas para impedir a entrada de água. Logo atrás dos tímpanos estão as glândulas parotóides que produzem secreção venenosa (Storer et al., 1985). Tais glândulas estão dispostas uma de cada lado do corpo, em

posição pós-orbital. As parotóides apresentam-se com muitos poros claramente visíveis e exercem função de defesa, através da excreção de um veneno, de aspecto leitoso que é elaborado por glândulas granulosas (Toledo & Jared, 1989).

Após a depleção da secreção que pode ser induzido por estimulação física do animal, moderado choque elétrico ou injeção de adrenalina, são necessárias cerca de duas semanas para haver reposição do conteúdo glandular, período em que as glândulas permanecem refratárias à estimulação adrenérgica (Flucher et al., 1986).

O *Bufo paracnemis* é um sapo comum em vários estados do Brasil. A espécie possui glândulas parotóides volumosas numa proporção de 25% do comprimento do animal (Zelnik, 1964). O pó do veneno do sapo *cururu* (provavelmente o *Bufo paracnemis* era usado por índios brasileiros em uma mistura para obter o envenenamento de pessoas. Esta poção era administrada em um curto espaço de tempo e os principais sintomas apresentados eram: inflamação da boca e garganta, soluços, vômitos, disenteria, desmaios, convulsões e delírios (Piso, 1648 *apud* Toledo & Jared, 1995).

1.2.5 Bufadienolídeos

Os Bufadienolídeos são encontrados nas preparações medicinais Chan'Su (Meyer, 1996), Senso e Lui-Shen-Wan, uma preparação onde o Chan'Su é o maior componente, tradicional na medicina chinesa, é conhecido como a pílula dos “seis ingredientes com efeitos mágicos”, usada para tratamento de sinusite, inflamação da garganta, dor, influenza e furúnculos. Em altas doses é extremamente tóxica e a maioria dos efeitos colaterais está relacionada à cardiotoxicidade do Chan'Su (Hong et al., 1992).

Encontram-se também no veneno da pele de sapos do gênero Bufo (Daly,1995) e em certos extratos de vegetais. A eficácia dessas substâncias já era conhecida pelos egípcios que usavam plantas no tratamento de doenças cardíacas (Krenn & Kopp, 1998).

A secreção da pele de anfíbios foi introduzida na sociedade humana por meio de práticas religiosas e medicinais e foram incorporadas ao armamentário da farmacopéia. O veneno de sapo foi usado para estimular a cicatrização de tecidos, no tratamento de doenças cardíacas, menorragia, metrorragia e tumores malignos. Na Ásia, utiliza-se há muitos séculos uma mistura de componentes da secreção das glândulas da pele de sapos do gênero Bufo em preparados galênicos denominados Chan'Su (China) ou Senso (Japão), empregados no tratamento de sinusites, em resfriados, como agentes

cardiotônicos, nas inflamações locais e dor de dente (Sebben et al.,1993). As secreções de sapo ainda hoje são utilizadas como diurético contra edema (Toledo & Jared, 1995) e em Taiwan é usado como um agente desintoxicante do sangue (Chern et al., 1991).

O primeiro Bufadienólídeo isolado de plantas foi a “Scillaren A”, em 1933 (Stoll, 1933 *Apud* Krenn & Kopp, 1998). Os sapos contêm tais esteróides nas glândulas parotóides. Os Bufadienólídeos também são encontrados em insetos e serpentes (Steyn & Van Heerden, 1998). A estrutura dos Bufadienólídeos lembra a estrutura do esteróide de Cardenólídeos cardioativos de plantas, exceto que no sapo os Bufadienólídeos não possuem açúcares ligados ao C-3 no anel A e eles têm um anel lactônico de 6 membros no lugar do anel de 5 membros duplamente insaturados no anel na posição do C-17 (Browlee, 1990). Os requisitos da estrutura necessários para a atividade dos Bufadienólídeos parecem ser semelhantes àqueles dos Cardenólídeos, embora a disponibilidade de informação acerca de atividade biológica dos Bufadienólídeos seja muito menor. O $5\beta,14\beta$ - androstane- $3\beta,14\beta$ -diol contendo a 17β lactona é um núcleo esteróide por excelência, tanto para cardenólídeos como para bufadienólídeos induzirem a inibição de $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ (Steyn & Van Herdeen, 1998). As Bufogeninas aumentam a pressão arterial e são, em geral, mais ativas que as Bufotoxinas e ambas, mesmo em concentrações diluídas estimulam a musculatura intestinal e uterina de alguns mamíferos (Chen & Chen,1933 *apud* Toledo & Jared, 1995).

Os Bufadienólídeos contidos em vegetais representam a mais importante causa de mortalidade (cerca de 33 %) ocasionada por envenenamento no gado da África do Sul (Steyn & Van Heerden, 1998).

Bufadienólídeos presentes na pele de sapos são responsáveis pelo envenenamento de animais domésticos como cães e gatos, podendo levar à morte por parada cardíaca e convulsões violentas (Bicudo, 1994). No caso do homem, o contato com os olhos pode causar irritação intensa e persistente e em altas doses são extremamente tóxicas e podem resultar em envenenamento agudo com arritmia cardíaca, convulsão e coma (Hong et al., 1992).

O veneno de sapo age no coração de modo semelhante ao dos Digitálicos e os Bufadienólídeos extraídos da pele de animais do gênero *Bufo* têm demonstrado exercer efeito no transporte de íons para anfíbios (Browlee, 1990). As Bufogeninas são inibidores de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, aumentam a força contrátil do coração (Lazarus, 1994; Steyn & Van Heerden, 1998) e estão provavelmente envolvidos na homeostase do sal e água (Toledo & Jared, 1995). A enzima é o único receptor para glicosídeos cardíacos e é responsável pela extrusão ativa de Na^+ intracelular na troca por K^+ extracelular e sua toxicidade está ligada ao grupo 14 β -hidroxi (Steyn & Van Heerden, 1998).

1.2.6 Marinobufogenina

No reino animal, os Bufadienólídeos estão amplamente difundidos na família Bufonidae e vários deles já foram isolados da espécie *Bufo*, sendo na sua grande maioria derivados de esteróides: Arenobufogenina, Bufalina, Bufogenina, Bufotanalina, Cinobufogenina, Cinobufotalina, Telocinobufogenina, Resibufogenina, Helebufogenina, Marinobufogenina, Ácido Marinóico, Marinosina (Steyn & Van Heerden, 1998). É possível postular que nos sapos o colesterol poderia primeiro ser convertido a um intermediário semelhante à estrutura de ácidos biliares e que poderia em seguida ser transformado em bufadienólídeos por etapas comuns (Porto & Gross, 1971).

O colesterol ligado ao ^{14}C - 20 é um excelente precursor de Marinobufogenina (Porto & Gross, 1971). Dentre os compostos detectados a partir do preparado galênico Chan'Su, através de cromatografias, destaca-se a Marinobufogenina (Kamano et al., 1968).

Através de dado espectrais e de ressonância magnética nuclear (RMN) de alta resolução foi isolado o composto Marinobufogenina do veneno das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*, Lutz (Rossi et al., 1997) e do *Bufo marinus* (Osuch & Chen, 1969). A elucidação de sua estrutura feita através de espectrometria de massa envolvendo ^1H e ^{13}C NMR apresenta um anel esteróide ligado a

um grupo lactônico (Reynolds et al., 1995). Marinobufogenina purificada a partir do *Bufo marinus* age como um potente inibidor da bomba de Na⁺K⁺ATPase e causa vasoconstrição substancial em vasos sangüíneos humanos e de ratos (Bagrov et al., 1995).

1.2.7 Potencial Terapêutico de Toxinas Animais

Inúmeras substâncias de origem vegetal e animal são hoje conhecidas, algumas delas com uso já consagrado desde a antiguidade e outras encontram-se em fase de pesquisas e desenvolvimento.

A pele de anfíbios revelou-se um vasto e complexo tesouro que guarda inúmeras substâncias endógenas que podem ajudar na compreensão de mecanismos biológicos do organismo (Ersparmer, 1992; Toledo, 1986; Bicudo, 1994; Bevins & Zasloff, 1990; Clarke, 1997; Ersparmer & Melchiori, 1980).

O poder medicinal das toxinas de anfíbios pode exercer os mais variados efeitos, de acordo com as propriedades farmacológicas dos diversos produtos de secreção. As glândulas granulosas são as principais responsáveis pela elaboração dos esteróides, principais componentes do veneno dos sapos. As ações cardiovasculares dessas substâncias foram exaustivamente estudadas. A grande maioria dos Bufadienólídeos, como por exemplo a Cinobufogenina, contrai vasos

sangüíneos e artérias e estimula o intestino e útero. A ação é direta sobre o músculo liso (Chen & Kovarikova, 1967).

Os sapos, especialmente os da família *Bufo*, destacam-se por armazenarem na pele uma quantidade substancial desses compostos. Esta fonte encontra-se muito bem representada no monólogo de Duke Frederick em “As you like it”, de Shakespeare, segundo ato, primeira cena: “O Sapo, feio e venenoso, veste ainda uma preciosa jóia em sua cabeça” (Materson & Anderson, 1930 *apud* Lazarus & Attila, 1993).

As Bufogeninas e Bufotoxinas encontradas em altas concentrações de no gênero *Bufo*, inibem a bomba de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ e podem explicar muitos dos efeitos sobre a pressão arterial e efeitos cardiotoxicos em certos mamíferos (Daly et al., 1992).

A Marinobufogenina isolada do *Bufo marinus* também inibe a $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, causando vasoconstrição em vasos sangüíneos isolados de ratos e humanos (Bagrov et al., 1995; 1996).

Os Bufadienólídeos podem provocar ação inotrópica positiva em gatos, desencadeando alterações no eletrocardiograma (ECG), prolongamento do intervalo P-R, bradicardia, onda T difásica,

mudanças no ritmo nodal e dissociação atrioventricular (Chen & Kovarikova, 1967).

O envenenamento por diferentes espécies de sapos, em diversos animais, tem sido relatado com o acompanhamento da observação de sinais clínicos como sialorréia, depressão, desconforto abdominal, além das alteração do ECG e de pressão arterial (Perry et al., 1973; Palumbo et al., 1975; Otani et al., 1969; Kwan et al., 1992).

Bagrov e colaboradores demonstraram a presença de substâncias endógenas, em mamíferos, que possuem natureza semelhante aos digitálicos, algumas delas *Marinobufagin-like*, e que agem como substâncias vasoconstritoras em artérias pulmonares humanas, devido à inibição da Na⁺K⁺ATPase (Bagrov et al., 1996).

Foi relatado ainda que os níveis de MB encontram-se aumentados na insuficiência renal crônica, hiperaldosteronismo idiopático, hipertensão essencial e insuficiência cardíaca congestiva aguda (Gonick et al., 1998) e no infarto agudo do miocárdio (Bagrov et al., 1998).

Inúmeras pesquisas já ultrapassaram o mito que envolve a magia medieval atingindo a medicina moderna, superando o estágio onde visualiza-se apenas uma substância promissora para chegar a tornar-se um precioso composto utilizado para fins terapêuticos.

As toxinas animais têm despertado o interesse clínico principalmente pela possibilidade de seus efeitos letais. As informações sobre a natureza e o mecanismo de ação das toxinas possibilitam uma abordagem científica para o tratamento de intoxicações, além de contribuir para um grande avanço no conhecimento da fisiologia e farmacologia humana (Karalliedde, 1995). Mais recentemente, têm sido usadas extensivamente como ferramenta experimental pela sua excelente seletividade e alta potência (Harvey, 1993).

Por definição, as toxinas são de origem natural, mas o termo tem sido aplicado a muitos produtos sintéticos que agem seletivamente nos neurônios. Neurotoxinas como a toxina botulínica e peçonhas de cobras são materiais muito tóxicos (Harvey, 1993). Toxinas de vários animais como cobras, escorpiões, animais marinhos, abelhas, peixes e anfíbios vêm sendo utilizadas como ferramentas na elucidação do mecanismo de ação, de receptores e seus respectivos canais iônicos, envolvendo cloro, cálcio, potássio e sódio (Karalliedde, 1995).

Os fatores potenciadores de Bradicinina foram isolados da *Bothrops jararaca* por pesquisadores brasileiros após quase três décadas de trabalho, resultando no desenvolvimento do Captopril, um anti-hipertensivo, protótipo dos inibidores da enzima conversora de Angiotensina (Walker, 1999).

No mundo inteiro existem pesquisadores buscando produtos da glândulas e da pele de anfíbios na esperança de encontrar moléculas que ajudem a compreender os mecanismos biológicos do organismos e que levem à descoberta de novos produtos farmacêuticos.

Há muitas descrições do uso terapêutico das secreções cutâneas do sapo. Desde o século XVIII e, até mesmo atualmente, tais secreções vêm sendo utilizadas para o tratamento de diversos tipos de patologias. As preparações Chan'Su e Senso, usadas na medicina popular são extremamente tóxicas, resultando em envenenamento (Hong et al., 1992 Toledo & Jared,1995).

A incidência de infecções por fungos e bactérias tornou-se um problema clínico grave e pode ser fatal, especialmente em imunodeprimidos, associado ao fato da ocorrência de desenvolvimento de resistência a alguns antibióticos e a natureza tóxica de alguns antifúngicos disponíveis. Observando-se as funções respiratórias e antimicrobianas da pele de anfíbios é provável que algumas das moléculas encontradas nas secreções de glândulas granulosas destes animais possam oferecer alternativas úteis para o tratamento de infecções respiratórias e cutâneas (Clarke, 1997).

Um grupo de substâncias com atividade antimicrobianas foi isolado da secreção cutânea do *Xenopus laevis*, as magaininas. Tais compostos inibem ou crescimento e/ou induzem a lise osmótica de um grande número de cepas bacterianas Gram-positivas e Gram-negativas,

de fungos e protozoários (Zasloff, 1987). A Bufalina, composto obtido da secreção do sapo *Bufo paracnemis*, Lutz, pode provocar anestesia local com potência superior à da cocaína (Toledo & Jared, 1995). A Epibatidina, substância isolada da pele do *Epipedobates tricolor*, tem ação analgésica semelhante à da morfina (Kellar, 1995).

Dentre os inúmeros compostos obtidos da secreção de anfíbios destacam-se as neurotoxinas que, por suas ações seletivas no SNC, têm despertado o interesse como instrumento para o estudo de diversos tipos de distúrbios centrais.

A pesquisa em torno das toxinas animais certamente possibilitará o entendimento de doenças mediadas por fenômenos neuroexcitáveis como a epilepsia, a isquemia cerebral e a doença de Alzheimer, entre outras.

O estudo das secreções da pele de anfíbios promete importantes avanços na Medicina (Stebbins & Cohen, 1995). O papel das toxinas para o avanço e conhecimento da fisiologia humana é inegável e estudos futuros podem ser de valor incalculável para o desenvolvimento de novas drogas e técnicas (Karalliedde, 1995).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Apesar de algumas citações de que o veneno de sapos pode causar delírio e convulsões em mamíferos (Chen & Kovarikova, 1967; Otani et al., 1969; Daly et al., 1992), as ações das Bufogeninas no SCN foram pouco estudadas. Assim constituem nossos objetivos:

2.1 OBJETIVOS GERAIS

- Isolar a substância responsável pela atividade convulsivante, obtida da secreção extraída das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*, Lutz.
- Determinar sua estrutura química.
- Realizar estudos farmacológicos centrais da substância isolada.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extração do material usando diversos solventes para obter o maior rendimento possível.
- Purificação em escala preparativa da substância com atividade convulsivante, usando cromatografias (HPLC).
- Determinação do grau de pureza.
- Determinação da estrutura Determinação da toxicidade aguda (DL50).
- Fornecer dados para a biologia da espécie
- Análise de testes comportamentais e de registros eletroencefalográficos de camundongos e ratos após administração da substância convulsivante.
- Uso de anticonvulsivantes para tentar evidenciar o mecanismo de ação e possibilidade de validação como modelo experimental.
- Comparação dos seus efeitos convulsivantes com aqueles de outras drogas usadas para desenvolvimento de modelo experimental de epilepsia, como o da Pilocarpina.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Animais de laboratório

Para a realização deste trabalho foram utilizados ratos albinos (*rattus norvegicus*) machos, variedade *Wistar*, adultos, pesando entre 180 e 280g e camundongos *mus musculus*, *Swiss*, 25-30 g, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, durante todo o período experimental. Os animais foram alojados em gaiolas apropriadas, onde tiveram livre acesso a água e ração padrão. Os sapos *Bufo paracnemis* foram provenientes do município de São Gonçalo do Amarante, Ceará.

3.1.2 Aparelhos

- HPLC (Sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) - modelo SCL-10A, SPD-10AV, LC -10AS, Schimadzu, Japão
- HPLC - modelo SPD - 10 A, LC-10AS, Schimadzu, Japão
- Chromatopac C- R6A, Schimadzu, Japão
- Registrador EGB – SP, Brasil

- Centrífuga refrigerada - Beckman, modelo J-212C, Beckman Instruments, USA
- Potenciômetro - modelo B/275, marca Micronal
- Centrífuga - modelo Excelsa Baby 206, marca FANEM
- Coluna C-18 LC shim-pack CLC-ODS
- Agitador de tubos- modelo AP 56, marca PHOENIX
- Balança Analítica- Marte AM/550 - marca AUTOMARTE
- Banho-maria, marca FANEM
- Liofilizador - modelo Modulyo, marca Edwards
- Polígrafo – Berger, modelo TP 119

3.1.3 Drogas e reagentes

- Acetonitrila - Carlo Erba
- Ácido clorídrico P.A., Merck, Brasil
- Ácido trifluoroacético P.A., Merck , Brasil
- Álcool etílico P.A., Merck, Brasil
- Cloreto de sódio P.A., Reagen, Brasil
- Diazepam, Roche
- Fenitoína, Sigma
- Fenobarbital, Rhodia

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Extração

Foram utilizados sapos *Bufo paracnemis*, Lutz (1925) (**Figura 1**), coletados em diferentes épocas do ano. O veneno foi extraído por compressão das glândulas parotóides dos sapos (**Figura 2**) e os animais devolvidos ao seu habitat natural. Após a utilização de diversos procedimentos e diferentes solventes objetivando a melhor solubilização do material, só obtivemos êxito quando os exsudatos foram colocados em gral, macerados com pistilo, com adição de etanol (1:5), até que toda a secreção glandular fosse dissolvida e se tornasse homogênea, mantido a 4°C durante 24 horas. Em seguida, a solução obtida foi centrifugada a 5000g, por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante coletado e o precipitado desprezado.

3.2.2 Purificação em HPLC com Coluna Preparativa

O sobrenadante foi fracionado em HPLC (sistema de cromatografia líquida de alta eficiência) acoplado a uma coluna preparativa C-18 de fase reversa (shim-pack prep. ODS 2,5x 30 cm), eluído com um fluxo de 9 ml/min com um gradiente isocrático de acetonitrila a 40% . O material passou por um detector que usou uma



FIGURA 2 Exemplar do sapo *Bufo paracnemis*, Lutz, coletado no município de São Gonçalo do Amarante -CE.



Figura 2A - Extração do veneno do *Bufo paracnemis*

absorção de luz ultravioleta com um comprimento de onda de 214 nm. O sistema foi acoplado a um registrador e os picos, à medida que eluíam, eram coletados e liofilizados. Para a realização dos testes farmacológicos, o pó era ressuspensionado em etanol e água bidestilada na proporção 1:3 (v:v) na concentração de 0,5 mg/ml e feitos os ensaios para verificar a atividade do material.

3.2.3 Determinação do grau de pureza em HPLC com coluna analítica

Antes de se realizarem os estudos farmacológicos, uma fração do pico 3 (20 μ l) de solução a 0,5 mg/ml em etanol foi injetada em HPLC em uma coluna analítica de fase reversa (5 mm x 150 mm), eluída em um fluxo de 1ml/min com um gradiente de 20 a 40% de acetonitrila durante 35 minutos. O material passou por um detector que usou uma absorção de luz ultravioleta com um comprimento de onda de 214 nm.

3.2.4 Determinação da Estrutura Química

A elucidação da estrutura foi realizada no Centro Nordestino de Aplicação e uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, UFC, sob a Coordenação do Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira, através de Ressonância Magnética Nuclear.

3.2.5 Toxicidade Aguda e DL50

Para a observação de efeitos convulsivos da fração 3, utilizamos diversas vias de administração (endovenosa, intramuscular, subcutânea, intraperitoneal e via oral) com 06 animais por grupo. Selecionamos a via intraperitoneal para estudos de toxicidade aguda e análise dos efeitos comportamentais e DL50 em camundongos *Swiss* e ratos *Wistar*. Doses crescentes foram administradas. Os grupos controle receberam igual volume de veículo. Os animais foram observados durante os primeiros 15 minutos e então em 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos após a administração do pico 3 e depois de 24, 48 e 72 horas. Os parâmetros observados foram atividade motora geral espontânea, respiração, ataxia, estereotipia, catalepsia, tremores, convulsões tônicas ou clônicas, sedação, ptose, exoftalmia, contorção, defecação, urina, salivação, lacrimejamento, piloereção, cianose, anestesia, analgesia, coma e morte .

O tipo mais simples de toxicidade aguda é a DL50 (dose letal para 50% do grupo de animais), em que várias doses da droga, estimadas como cobrindo uma letalidade de 0 a 100% são administradas a grupos de 10 animais (Rang & Dale, 1993).

Para a DL50 foram selecionados camundongos *Swiss*, pesando 25-30 g, divididos em seis grupos de dez animais (5 machos e 5

fêmeas) e as doses administradas foram: 1,25; 2,5; 5,0; 7,5; 10 e 12,5 mg/kg. Para ratos *Wistar*, 180-280 g foram administradas as doses de 20,0; 25,0; 30,0;40,0 e 50,0 mg/kg. Os animais foram escolhidos ao acaso e divididos em grupos de 10, cada grupo contendo 5 machos e 5 fêmeas para cada dose utilizada. O volume administrado foi mantido constante: 0,1 ml para 10 g de peso corporal por via i.p. em camundongos e 0,2 ml/100 g peso corporal para ratos. O número total de animais mortos foi anotado. A DL₅₀ foi aquela dose administrada que causou metade (50 %) das mortes dos animais de um determinado grupo.

3.2.6 Procedimentos cirúrgicos

a) Anestesia

Para a realização da cirurgia e implante de eletrodos, os animais foram submetidos à anestesia geral com a seguinte solução: hidrato de cloral (4,25 g), sulfato de magnésio (2,25 g), propilenoglicol (42,8 ml), álcool etílico absoluto (11,5 ml), água destilada (45,7 ml) e tionembutal (1 g) . O anestésico assim preparado, era administrado por via intraperitoneal, num volume final de 4,0 ml/kg.

b) Implantação de Eletrodos

Após a anestesia profunda os animais foram submetidos a tricotomia da região superior da cabeça e fixados ao aparelho estereotáxico através dos meatos auditivos externos e incisivos superiores.

Uma vez fixados ao estereotáxico, os animais foram submetidos à incisão longitudinal da pele da região craniana, que era rebatida lateralmente. Era feita então a remoção do periósteo, limpeza da área e total exposição da tábua óssea, que era perfurada com o auxílio de uma broca odontológica, de acordo com as seguintes coordenadas estereotáxicas, para a implantação de eletrodos na região do hipocampo dorsal : antero-posterior (AP) = 2,5; lateral (L) = 2,0 e profundidade (V) = 3,5, obtidas do Atlas estereotáxico de Montemurro (1972).

Os eletrodos de profundidade eram bipolares, e constituídos por dois filamentos torcidos de níquel-cromo (100 μm de diâmetro e 500 μm de distância entre eletrodos) revestidos por uma fina camada de verniz em toda a sua extensão, exceto nas extremidades. Foram implantados também outros três eletrodos: dois na região occipital, simetricamente dispostos em relação à sutura média para registro electrocorticográfico e um no seio frontal, usado como indiferente.

Tanto os eletrodos profundos como os de superfície foram conectados a um microconector de 5 saídas, fixados ao crânio por meio de cimento acrílico. Este, após o seu endurecimento, fixava o capacete à cabeça do animal, bem como isolava o sistema. Em seguida, a pele rebatida era suturada, de tal forma que o microconector ficasse exposto. Após o ato cirúrgico, os animais eram colocados em gaiolas individuais, permanecendo sob observação até sua completa recuperação.

3.2.7 Registro da atividade elétrica

Os animais foram levados à sala de registro para a obtenção do traçado eletrográfico. Cada animal foi colocado dentro de uma caixa de acrílico transparente de 50 x 25 x 25 cm, instalada dentro de um sistema totalmente aterrado, representado por uma gaiola de Faraday.

O microconector fixado à cabeça do animal, foi ligado a um conector (*swivel*) por meio de um cabo flexível e blindado, permitindo assim, a movimentação do animal dentro da caixa, sem que ocorresse torção do cabo blindado e nem prejuízo do registro. Os cabos deste último conector eram ligados diretamente ao terminal do aparelho de eletrencefalografia. Os registros foram realizados num aparelho da marca Berger, modelo TP 119, utilizando-se dois canais. A amplificação

do traçado foi adaptada para cada registro, e a velocidade do papel foi mantida constante em 10 mm/seg.

3.2.8 Testes com anticonvulsivantes

Para observar a ação de anticonvulsivantes sobre as convulsões induzidas por Marinobubufogenina foram utilizados diferentes tipos de fármacos: Diazepam, Fenobarbital e Fenitoína.

Os tratamentos foram feitos em grupos de 5 ou 6 camundongos *Swiss* (25-30 g), machos. Os animais receberam as substâncias intraperitonealmente. Os grupos controle foram tratados com veículo. A dose de MB utilizada na indução de convulsões foi sempre a de 9,0 mg/kg, i.p.

Foi administrado Diazepam 10,0 mg/kg, i.p. em um grupo de 06 animais e 12,5 mg/kg em outro grupo experimental, 30 minutos antes da injeção i.p. de MB.

O pré-tratamento com Fenobarbital 50,0 mg/kg foi feito 45 minutos antes do agente convulsivante MB.

A Fenitoína 50,0 mg/kg, i.p. foi administrada 60 minutos antes do MB em um dos grupos e a Fenitoína 75,mg/kg, i.p. nas mesmas condições do experimento anterior, em um outro grupo.

Os animais eram sempre colocados em caixas separadas para observação de alterações comportamentais, latência da primeira convulsão e tempo de morte, caso ocorresse.

3.2.9 Análise Estatística

A análise da dose letal (DL50) foi feita usando-se o modelo de regressão “Probit” (Miller & Tainter, 1944), observando-se a incidência de mortes em função de co-variável dose de Marinobufogenina.

A análise estatística foi realizada baseando-se em estimativas de percentual de incidência e tempo de convulsão e de morte quando comparados os animais do grupo controle e dos grupos tratados. Para a verificação da existência de diferenças significativa entre as médias dos grupos experimentais e do grupo controle foi utilizado o teste exato de Fisher. Os dados foram expressos como percentual ou média \pm desvio

padrão. Foram considerados estatisticamente diferentes os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 PURIFICAÇÃO EM HPLC COM COLUNA PREPARATIVA

O sobrenadante do exsudato bruto obtido por compressão das glândulas parotóides do *Bufo Paracnemis* foi submetido a uma cromatografia líquida de alta performance (HPLC). As frações eluídas foram coletadas em quatro picos (**Figura 3**). O material correspondente aos picos foi liofilizado separadamente e analisado seu grau de pureza. As frações foram ressuspensas em etanol e água bidestilada 1:1 (v:v) e injetadas por via intraperitoneal em camundongos. O pico três apresentou atividade convulsivante e verificou-se nos animais a ocorrência de taquipnéia acentuada, ataxia e crises tônico-clônicas generalizadas.

4.2 DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PUREZA EM HPLC

Uma fração do pico 3 foi submetida a uma coluna fina analítica, passando por um detector de absorção de luz ultravioleta, evidenciando o

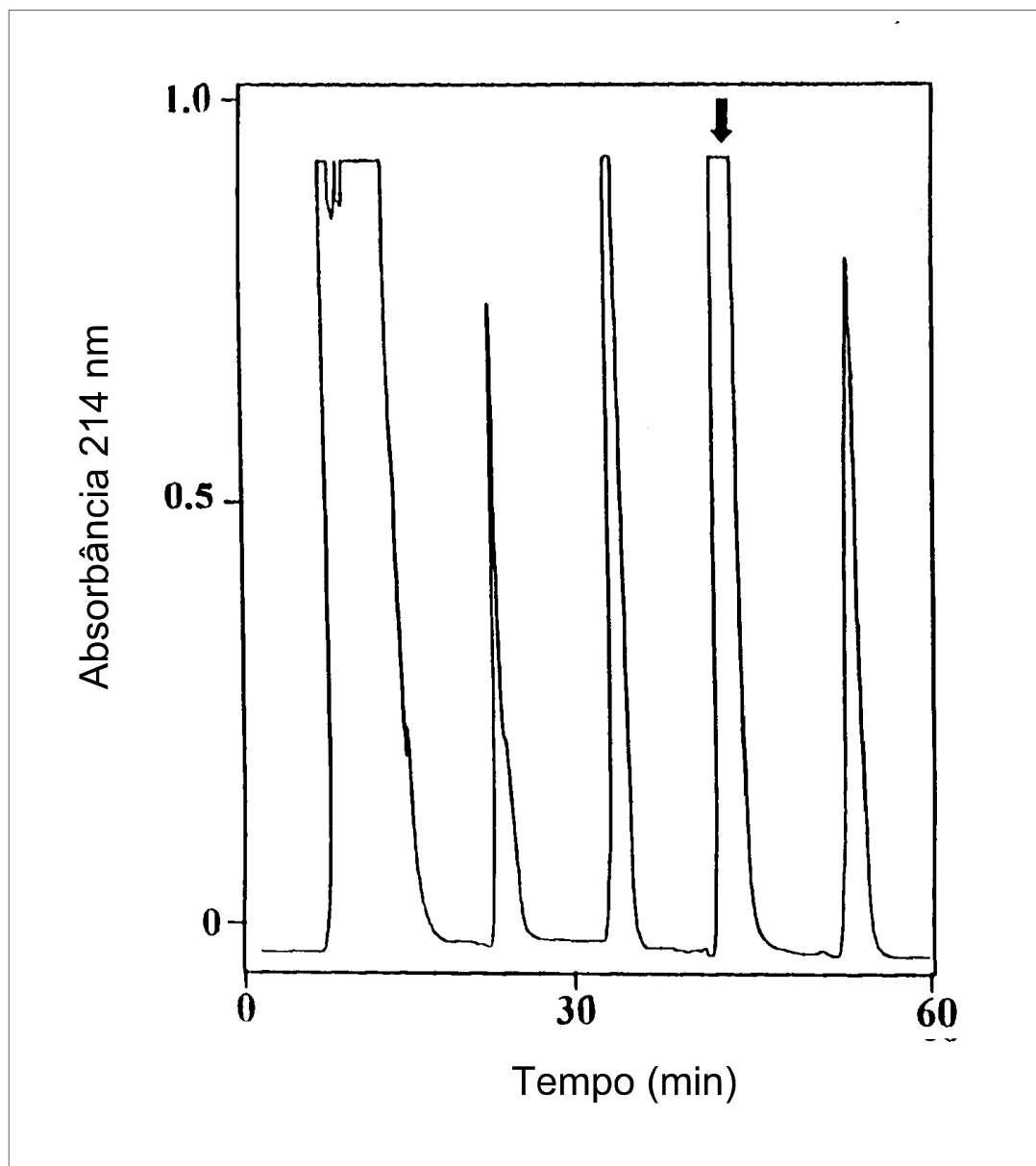


FIGURA 3 Perfil de eluição do extrato bruto extraído das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*, Lutz, em HPLC durante uma hora.

alto grau de pureza do material, sem apresentar contaminantes de outras amostras (**Figura 4**). Dois minutos após a administração i.p. desta amostra (10,0 mg/kg) surgem as convulsões tônico-clônicas generalizadas em camundongos ilustradas na **Figura 5**.

4.3 DETERMINAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA DA MARINOBUFOGENINA

A estrutura química do Pico 3 foi determinada em colaboração com o grupo do Pr. Dr. Edilberto Rocha Silveira, no Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, UFC.

A estrutura da substância analisada foi elucidada através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Trata-se de um esteróide cardiotônico, um Bufadionólídeo, contendo um anel esteróide clássico, acoplado a um grupo lactônico, denominado de Marinobufogenina ($14\beta,15\beta$ -epoxi- $3\beta,5\beta$ -dihidroxi-20,22-Bufadienólídeo) (**Figuras 6 e 7**).

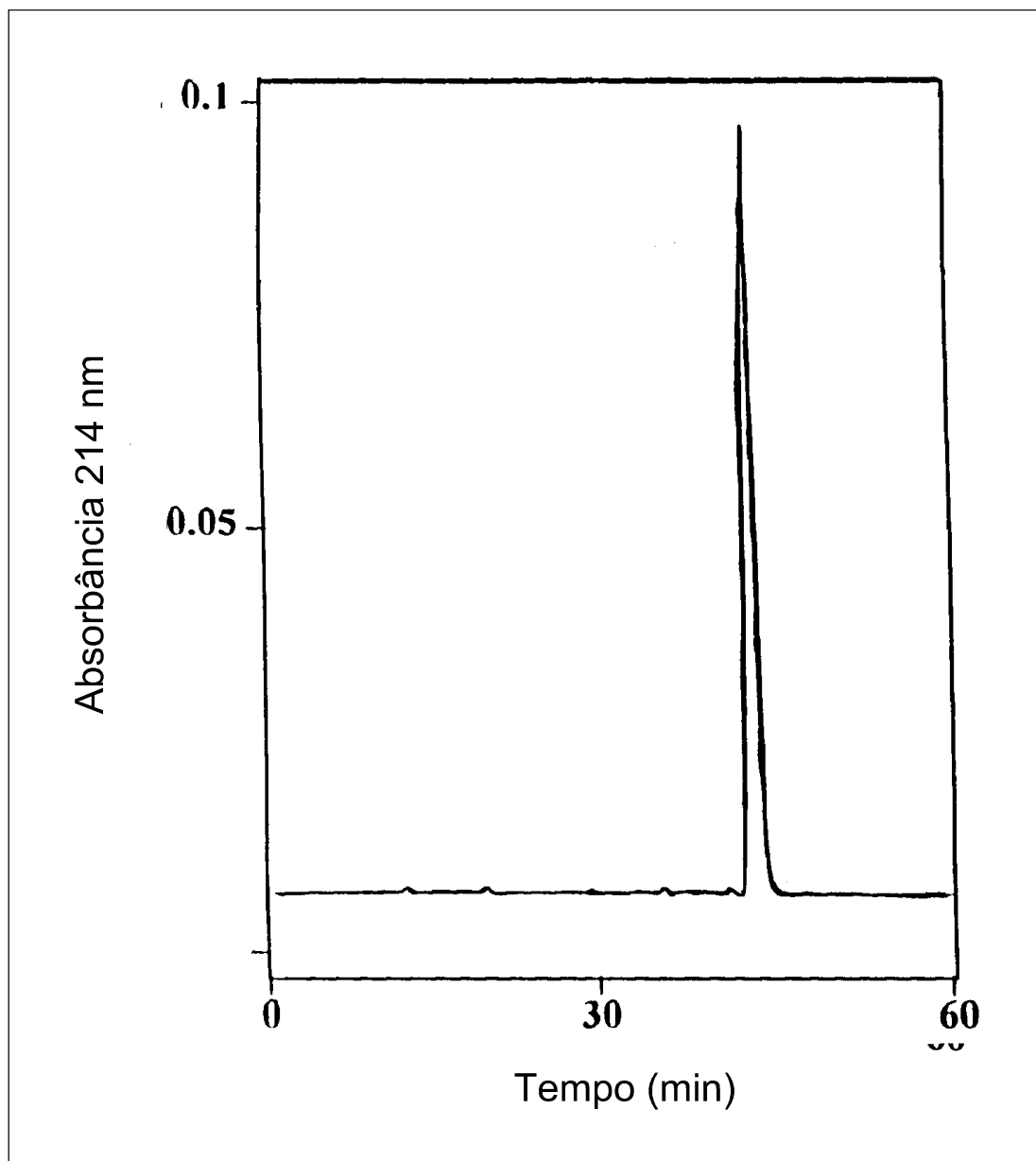


FIGURA 4 Perfil de eluição da fração 3 (Marinobufogenina) isolada do *Bufo Paracnemis*, Lutz.



FIGURA 5- Efeito convulsivante de Marinobufogenina (10 mg/kg) dois minutos após administração intraperitoneal em camundongos Swiss.

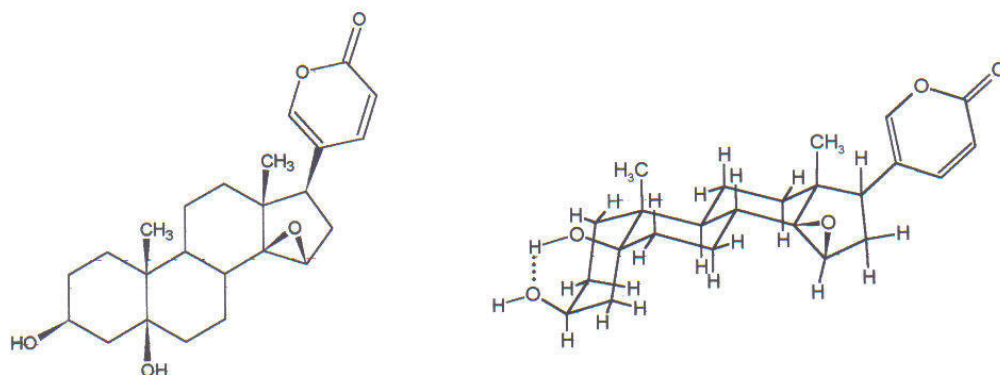


FIGURA 6 Estrutura química da Marinobufogenina isolada das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*, Lutz (14 β , 15 β - epoxi - 3 β , 5 β - dihidroxi 20, 22 – bufadienolide).

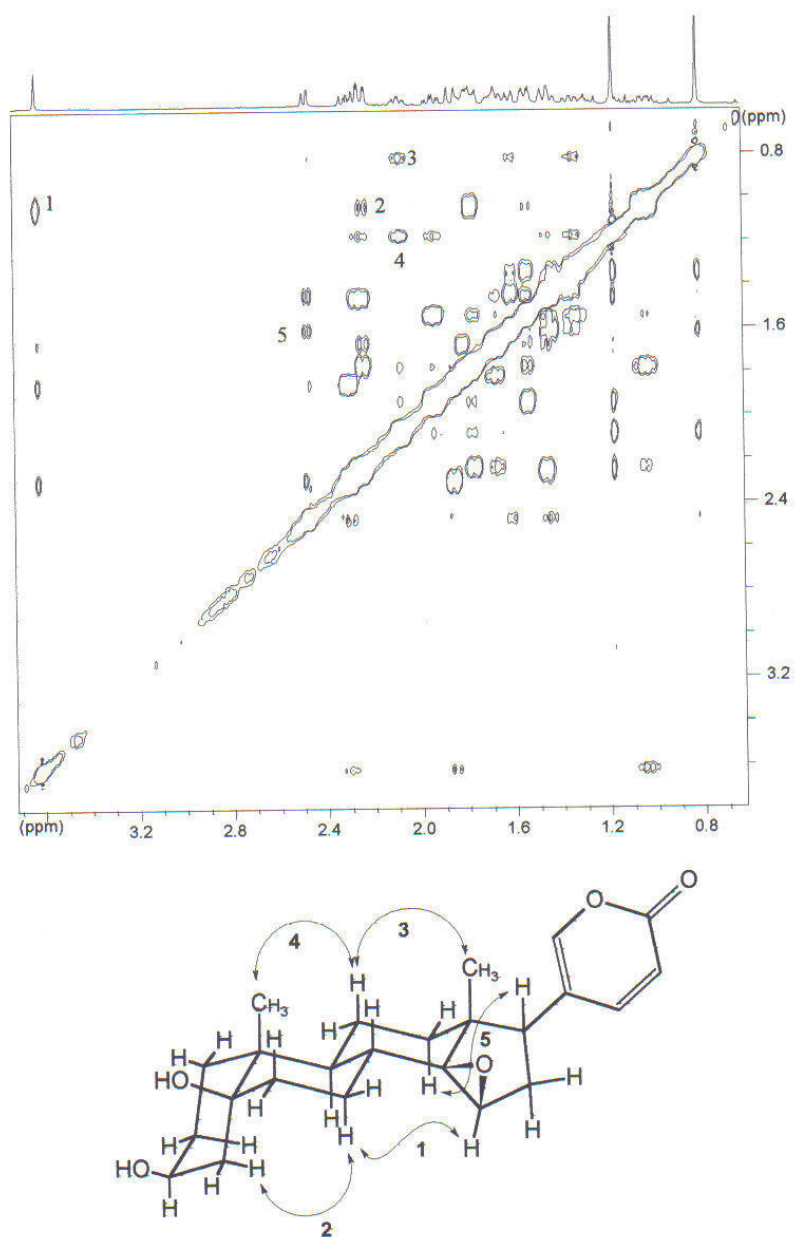


FIGURA 7 (a) Espectro de RMN 2D (¹H,¹H) NOESY (500 MHz, Piridina-d₅) de Pico 3. (b) Estruturas com seta dupla numerada indicando correlação espacial observada no gs-NOESY.

4.4 TOXICIDADE AGUDA E DL₅₀

Para a determinação de toxicidade aguda utilizamos grupos de 10 animais (cinco machos e cinco fêmeas) aos quais foram administradas doses crescentes (1,25 a 12,5 mg/kg), de MB i.p. em camundongos e 20,0 a 50,0 mg/kg, i.p. em ratos. O percentual de mortalidade foi observado por 72 horas e a DL₅₀ foi calculada pelo método de probitos. A dose que causa crise tônico-clônica generalizada e mata 50% dos animais é de 10,5 mg \pm 1,5 mg/kg para camundongos e 25,0 \pm 2,0 mg/kg para ratos, ambos por via intraperitoneal.

Observamos ainda que a administração de 9,0 mg/kg de MB, através de outras vias (subcutânea, intramuscular, oral), também induz convulsões tônico-clônicas generalizadas. Utilizamos 6 (seis) camundongos por grupo, apresentando um índice altamente significativo (80 a 100%) de convulsões nos animais ($p < 0,05$), exatamente como ocorreu após a administração de MB por via intraperitoneal. Somente o tempo de latência para a convulsão usando a via subcutânea foi maior, variando de 6 a 15 min enquanto para as demais vias, com poucas variações, o limiar foi de 1 a 8 minutos.

4.5 ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS E ELETROGRÁFICAS

A administração intraperitoneal (i.p.) de doses crescentes (1,25; 2,5; 5,0; 10,0 mg/kg) de Marinobufogenina em camundongos *Swiss* resultou em alterações comportamentais (**Tabela 1**) e eletrográficas.

Tais alterações são dose-dependentes e podem culminar com a morte do animal.

As doses de 1,25 mg/kg (n =10) e de 2,5 mg/kg (n=10) não provocaram convulsões em camundongos e as características comportamentais mais proeminentes foram: taquipnéia, piloereção, redução da atividade locomotora e ataxia. O registro do eletroencefalograma não evidenciou nenhuma crise.

A dose de 5,0 mg/kg (n=10) produz inicialmente piloereção, ataxia e taquipnéia acentuada e a maioria dos animais apresenta movimentos estereotipados, aumento de automatismos gustatórios, fasciculações musculares, alguns deles andam na ponta das patas, levantam ou giram a cauda, marcham em saltos ou em círculos, intercalados com períodos em que permanecem totalmente imóveis. Tal comportamento progride, em alguns animais, para tremores generalizados e clonias de cabeça e de patas.

A latência para a primeira crise convulsiva pode ocorrer logo no primeiro minuto após administração i.p. de MB, quando os animais demonstram crises alternadas ou ininterruptas, culminando algumas vezes em *status epilepticus*, definido como convulsões motoras contínuas, que correspondem aos estágios 4 e 5 (Racine, 1972), persistindo por um período de pelo menos 30 minutos antes do término espontâneo (Turski et.al., 1983). O SE induzido por MB pode manter-se por mais de uma hora.

TABELA 1 Alterações comportamentais observadas em camundongos tratados com Marinobufogenina, i.p., isolado das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*, Lutz.

Alterações Comportamentais	MARINOBUFOGENINA			
	1.25 mg/kg	2.5 mg/kg	5.0 mg/kg	10.0 mg/kg
Taquipnéia	+	+	+++	+++
Ataxia	+	+	+	+++
Piloereção	+	+	+	+
Redução de atividade locomotora	+	+	+++	+++
Movimentos estereotipados	-	-	+	+++
Automatismos gustatórios	-	-	-	+
Fasciculações musculares	-	-	+	+
Movimentos em círculos	-	-	+	+++
Sensibilidade aumentada ao toque	-	+	+	+
Levantar ou girar a cauda	-	-	+	+
Marchar em saltos ou em círculos	-	-	-	+
Tremores generalizados	-	-	+	+++
Clonias de cabeça	-	-	+	+++
Clonias de patas	-	-	+	+++
Status epilepticus	-	-	+	+
Convulsões tônico-clônicas generalizadas	-	-	+	+++
Morte	-	-	-	+++
Remissão das crises	-	-	+	+++
Número de animais	10	10	10	10

Camundongos (machos, 25-30 g) foram tratados com doses de 1,25; 2,5; 5,0 e 10,00 mg/kg de MB, i.p., Os animais foram observados durante 60 minutos e em intervalos de uma hora perfazendo um total de 72 horas. Obs: + Presença em alguns animais; +++ Presença na maioria dos animais; - Ausência

Alguns animais morrem ao término das convulsões tônico-clônicas generalizadas ou logo após, por falência cárdio-respiratória. Aqueles que sobrevivem apresentam remissão das crises após aproximadamente sessenta minutos, voltando à normalidade, sem

nenhum sinal perceptível de seqüelas, até 24 horas após a crise. A maioria deles (aproximadamente 70%) apresenta convulsões tônico-clônicas generalizadas, cerca de 15% mostram movimentos estereotipados ou SE e 15% permanecem totalmente imobilizados.

O padrão das alterações eletrográficas produzidas pela administração i.p. de Marinobufogenina em camundongos não obedece a um padrão exclusivo e prevalece uma relação dose dependente (n= 6 por grupo) . Em doses mais baixas (5,0 mg/kg) , em torno de metade da DL50, observou-se com a maioria dos animais (5/6) que no período crítico o surgimento de descargas com alta freqüência que ora predominam no hipocampo , ora somente no córtex, ou se alternam durante o registro e ocorrem com uma latência média de 2 a 16 minutos e predominam também os traçados do tipo “waxing and waning”.

Em doses elevadas (9,0 mg/kg), próximas às doses da DL50, as crises são mais curtas, as descargas são sincrônicas no córtex e hipocampo , com alta atividade e, na maioria das vezes, levou o animal à morte logo após a crise , com uma latência de 1 a 8 minutos. No período pré-crítico, os animais apresentam uma diminuição da atividade evidenciada na redução do traçado hipocampal e/ou cortical , e no pós-crítico predominam ondas lentas e o aparecimento de espículas isoladas. Em geral, a recuperação do traçado de base ocorre de 30 a 60 minutos após o término da crise e permanece sem alterações 24 horas após, quando se observa um registro semelhante àqueles obtidos por animais antes de receberem qualquer tratamento.

Em ratos *Wistar*, a administração intraperitoneal de 5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 mg/kg de MB não causou modificação no comportamento dos animais nem crise no registro eletroencefalográfico. As doses que geraram efeitos convulsivantes foram bastante elevadas e somente a partir de 32,5 mg/kg é que houve leves mudanças nas características comportamentais e no traçado do eletroencefalograma, o que ocorre também nas doses de 35,0; 37,5 e 40 mg/kg, evidenciando crise cortical e hipocampal, provocando morte logo após a crise, demonstrando que a dose letal está muito próxima à dose convulsivante. Não há, na maioria dos casos, um sincronismo entre a alteração comportamental e eletrográfica. Os animais apresentam-se totalmente imóveis, ora com os olhos fechados, ora com olhos abertos ou com leves movimentos estereotipados, a maior parte do tempo, mesmo quando se observam os períodos ictais no registro EEG.

O comportamento apresentado por ratos *Wistar*, após a injeção intra-ventricular de 150 µg (50 µl) de Marinobufogenina limitou-se, em todo o registro, a períodos alternados em que o animal fica parado ou apresenta pequenas clonias de cabeça, “grooming”, pêlo eriçado e automatismos gustatórios.

A **Figura 8** evidencia as alterações eletrocorticais induzidas por Marinobufogenina (5,0 mg/kg) em camundongos *Swiss*. Em **8A** temos o traçado basal antes de administrar a substância; **8B** registra a primeira crise, apresentando descargas tanto no córtex como no hipocampo,

tendo início aos 2 minutos, prolongando-se até 6 minutos, sendo acompanhado de clonias de cabeça, alternando-se com períodos em que continua imóvel. Aos 5 minutos ocorre uma nova crise (**8C**) em que se inicia um período de alta atividade no hipocampo e se propaga para o córtex, e o animal se apresenta apenas com leves tremores de cabeça. Após um curto intervalo de tempo, instala-se uma nova crise continuada e de alta atividade (**8D**). Este padrão eletrográfico permanece ininterruptamente por aproximadamente 70 minutos, caracterizando o *status epilepticus* (**8D,E,F**). O registro se associa a clonias de patas posteriores e movimentos mastigatórios, alternados com intervalos em que o animal fica totalmente imóvel. Após 30 minutos, há redução progressiva da amplitude do traçado principal (**8F,G**) evidenciando diminuição da atividade hipocampal e cortical e que perdura por mais de uma hora, quando então cessa a crise aos 80 minutos (**8H**). O animal gradativamente se recupera e começa a se movimentar, coçar, andar normalmente e não mais apresenta crises, embora o registro evidencie uma depressão de atividade tanto hipocampal quanto cortical, mas o animal continua apresentando comportamento normal.

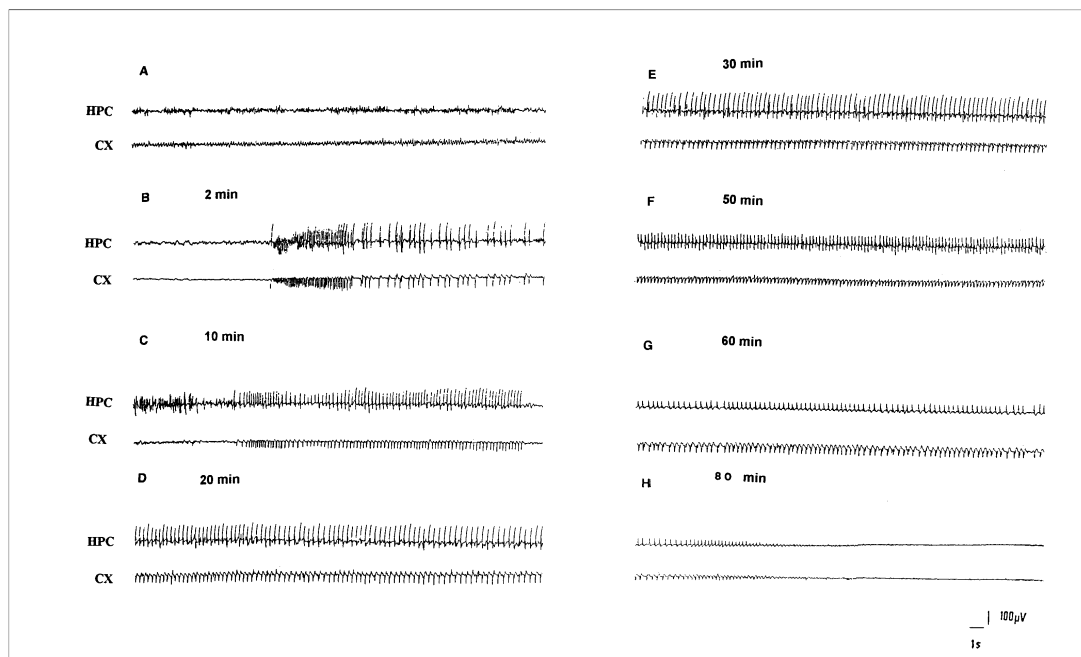


FIGURA 8 Registro eletroencefalográfico ilustrando crises convulsivas induzidas por Marinobufogenina (5,0 mg/kg, i.p.), em camundongo, culminando em *status epilepticus*. **A** - Atividade electrocortical controle. **B e C** - Atividade altamente sincronizada com descargas no hipocampo e córtex. **D e E** - Crise convulsiva contínua, culminando em *status epilepticus* que permanece por 70 minutos. **F e G** - Atividade gradualmente diminui, com depressão da atividade tanto hipocampal como cortical. **HPC** - Hipocampo; **CX** - Córtex.

A **Figura 9** ilustra a evolução da crise apenas hipocampal desencadeada pela administração i.p. de baixas doses de MB (5.0 mg/kg), em camundongos. As crises convulsivas, de modo geral, aparecem com um período de latência bem mais demorado do que aqueles que ocorrem quando são administradas doses próximas à DL50 ($10,5 \pm 1,5$ mg/kg) de MB, embora possam surgir um minuto após a administração i.p. de MB. Somente aos 17 minutos surge uma crise, evidenciada através de um traçado bem mais discreto e apenas hipocampal. O animal apresenta-se com tremores generalizados e clonias de patas posteriores, intercalado com períodos em que fica totalmente imóvel. Aos 39 minutos, o traçado se modifica tendendo a se normalizar e o animal começa a se movimentar, embora fique parado por longos períodos, mas logo a seguir mostra sinais de recuperação e retorna ao comportamento padrão de animais que não foram submetidos a nenhum tratamento.

A **Figura 10** constitui um exemplo das alterações desencadeadas com predominância somente no córtex, após a administração i.p. de 5,0 mg/kg de MB em camundongos. Inicialmente ocorre um aumento da frequência respiratória com leves tremores de cabeça e, no registro, observa-se uma depressão do traçado que configura o período pré-crítico. De 16 a 30 minutos prevalecem períodos ictais alternados no córtex, enquanto o animal permanece imóvel praticamente todo o tempo, alternando apenas com leve tremor na cabeça. Após as crises, o animal continua parado aproximadamente uma hora e só então começa a se movimentar. E o registro EEG mostra uma atividade deprimida tanto no HPC como no CX.

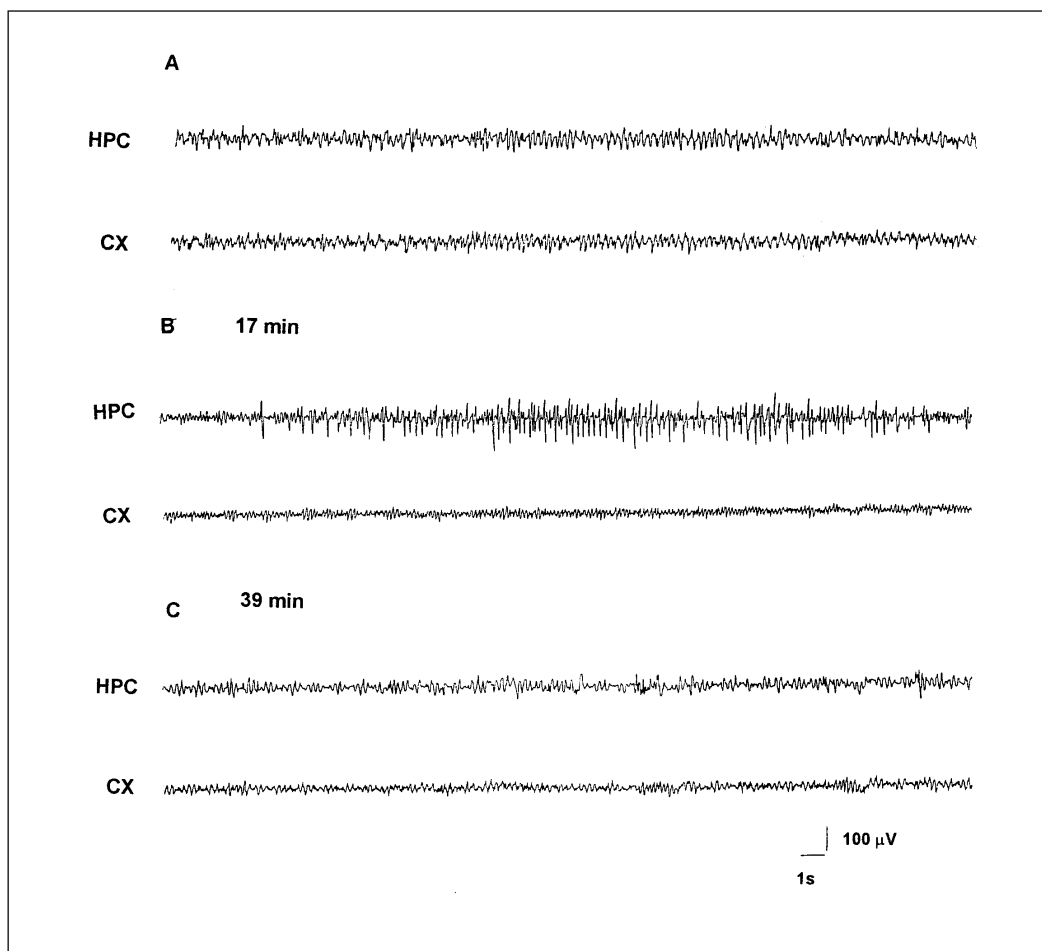


FIGURA 9 Registro eletroencefalográfico ilustrando a evolução de crise hipocampal desencadeada pela administração de Marinobufogenina (5,0 mg/kg, i.p.) em camundongo. **A** - Atividade basal. **B** - Período crítico mostrando descargas no hipocampo. **C** - Período pós-crítico: depressão do traçado. **HPC** - Hipocampo; **CX** - Córtex.

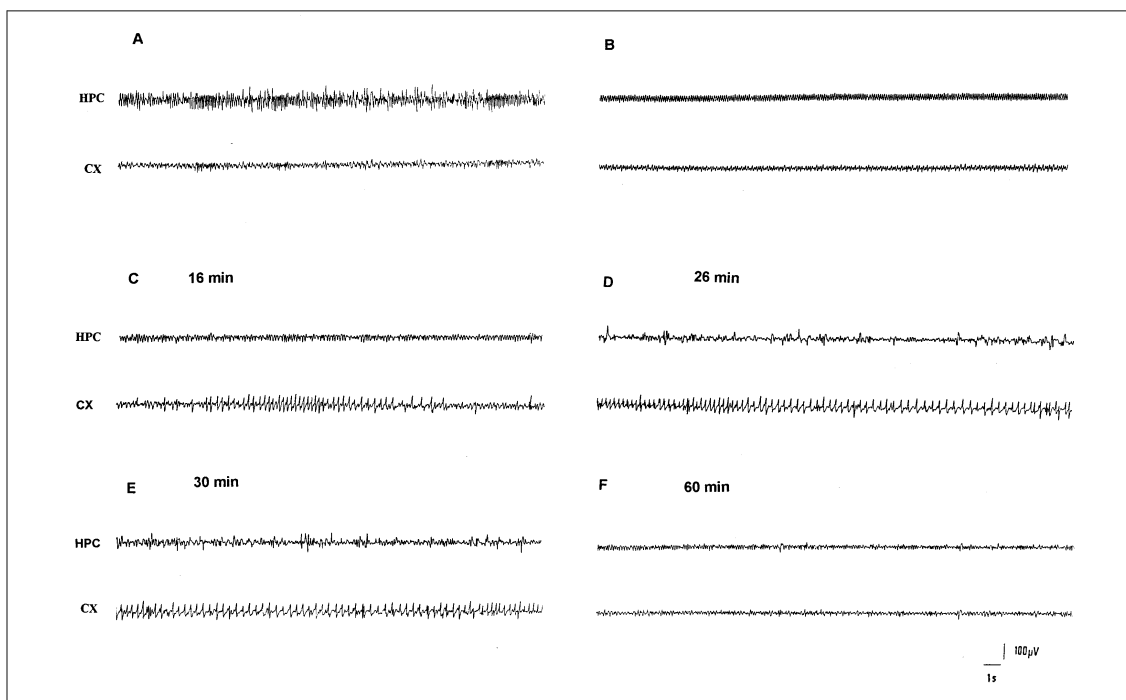


FIGURA 10 Evolução da atividade cortical obtida pela administração intraperitoneal de Marinobufogenina (5,0 mg/kg, i.p.) em camundongo. **A** - Atividade basal. **B** - Depressão da atividade hipocampal e cortical. **C, D e E** - Prevalece a atividade no córtex, alternando-se com períodos intercríticos. **F** - O registro mostra uma atividade reduzida tanto no hipocampo como no córtex. **HPC** - Hipocampo; **CX** - Córtex.

A **Figura 11** exemplifica o aparecimento de descargas no hipocampo após a administração de 5,0 mg/kg de MB em camundongos. Aos 15 minutos surge no córtex um traçado do tipo “waxing and waning”, rítmico, que permanece por um longo intervalo de tempo. Esse traçado coincide com o momento em que o animal apresenta abalos e tremores no corpo, intercalados com pequenas pausas em que fica totalmente parado. Somente aos 43 minutos, há um aumento de atividade no hipocampo, ao mesmo tempo em que ocorrem clonias de patas anteriores e posteriores do animal. Aos 60 minutos, observa-se uma lentificação do traçado e aparecimento de espículas e logo a seguir o padrão do traçado do hipocampo tende a voltar ao normal enquanto o animal permanece imóvel.

A **Figura 12** mostra as alterações eletroencefalográficas relacionadas com a administração de doses elevadas de MB (9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos. Três minutos após a injeção, observa-se um período pré-crítico caracterizado por uma depressão da atividade tanto hipocampal quanto cortical. Aos oito minutos é desencadeada uma crise com alta atividade no hipocampo e se propaga para o córtex, perdurando 4 minutos. Tal atividade é altamente sincronizada e rítmica, sendo mais proeminente no hipocampo que no córtex. Durante a crise, o animal apresenta-se taquipnéico, com clonias de cabeça e de patas e aos 2 minutos ocorre extensão das patas e morte por falência cárdio-respiratória. Denotando que com altas doses de Marinobufogenina, próximas à dose

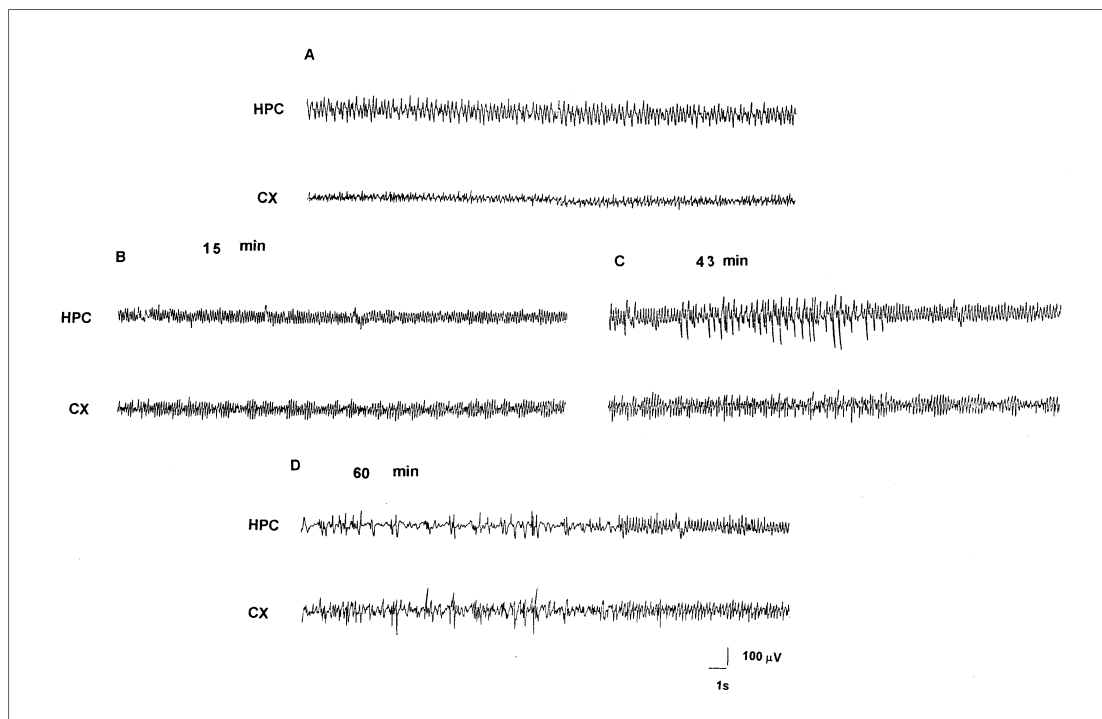


FIGURA 11 Alterações eletroencefalográficas evidenciando descargas hipocámpais após administração intraperitoneal de Marinobufogenina (5,0 mg/kg, i.p.) em camundongo. **A** - Atividade basal. **B** - O padrão "waxing and waning" da atividade convulsivante é altamente ritmado no córtex. **C** - Descargas e *spikes* rapidamente se instalam no hipocampo. **D** - Lentificação do traçado e retorno ao padrão pré-crítico surge após uma hora. **HPC** - Hipocampo; **CX** - Córtex.

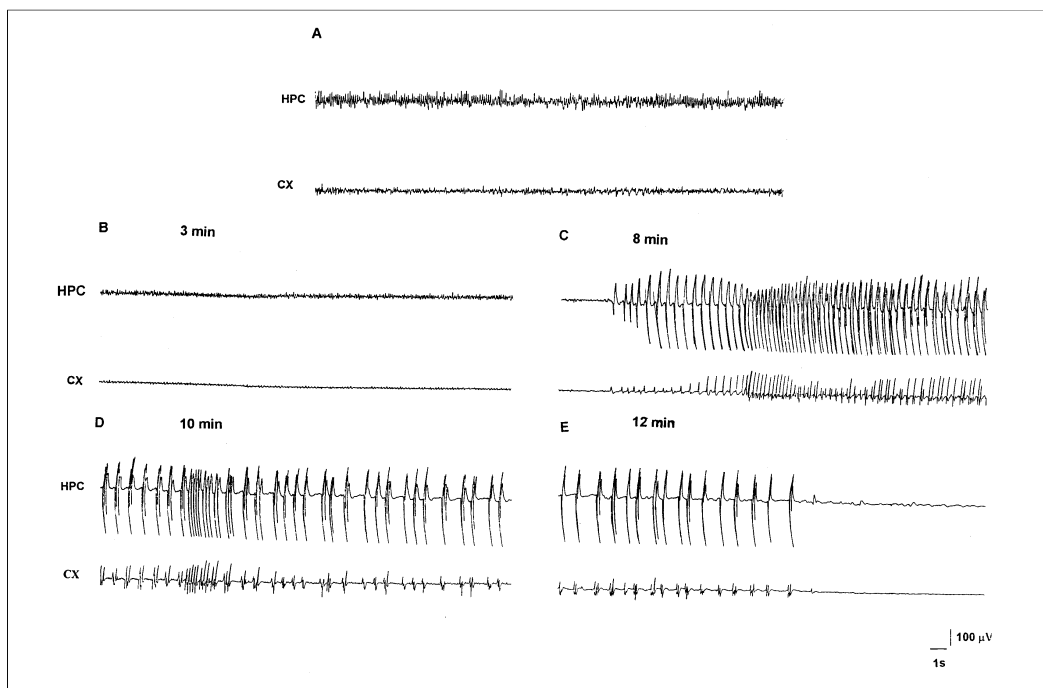


FIGURA 12 Registro eletroencefalográfico demonstrando os efeitos convulsivantes da administração de Marinobufogenina (9,0 mg/kg, i.p.) em camundongo. **A** - Atividade eletrocortical controle. **B** - Depressão da atividade no hipocampo e no córtex. **C** - Período ictal com descargas de alta atividade no hipocampo e se propaga para o córtex. **D** - Atividade altamente sincrônica e rítmica mais pronunciada no hipocampo. **E** - Término da crise com duração de 04 minutos e morte do animal. **HPC** - Hipocampo; **CX** - Córtex.

letal ($DL_{50}=10,5 \pm 1,5$ mg/kg) para camundongos, a crise é mais intensa, ocorre em um intervalo de tempo mais curto e quase sempre leva à morte do animal.

A **Figura 13** ilustra a seqüência de alterações produzidas após administração i.p. de Marinobufogenina (40,0 mg/kg) em ratos *Wistar*. Em **13A** observamos o traçado da atividade eletrocortical controle; **13B** e **13C** mostram o registro contínuo da atividade do MB no córtex e hipocampo, em intervalos de 1 a 7 minutos, onde observam-se períodos ictais sincrônicos no CX e HPC, alternando-se com períodos em que predominam crises ora somente no CX e ora apenas no HPC. Logo após um minuto, surgem alterações da atividade, com descargas tanto hipocampal quanto cortical, no entanto, sem modificações comportamentais do animal, o animal permanece parado, observando-se apenas taquipnéia acentuada. Dois a três minutos após a primeira crise, observa-se uma segunda crise com descargas somente no córtex, acompanhado de leve tremor nas patas posteriores e logo a seguir é deflagrada uma outra crise córtex, propagando-se para o hipocampo. Durante a crise o animal permanece acinético, às vezes com a cauda arqueada, e nos períodos intercríticos mostra comportamento aparentemente normal. Aos 5 minutos surge alta atividade apenas hipocampal e aos 7 minutos, novamente uma crise sincrônica no hipocampo e no córtex, quando apresentam-se tremores e extensão das patas posteriores e morte isométrica do animal.

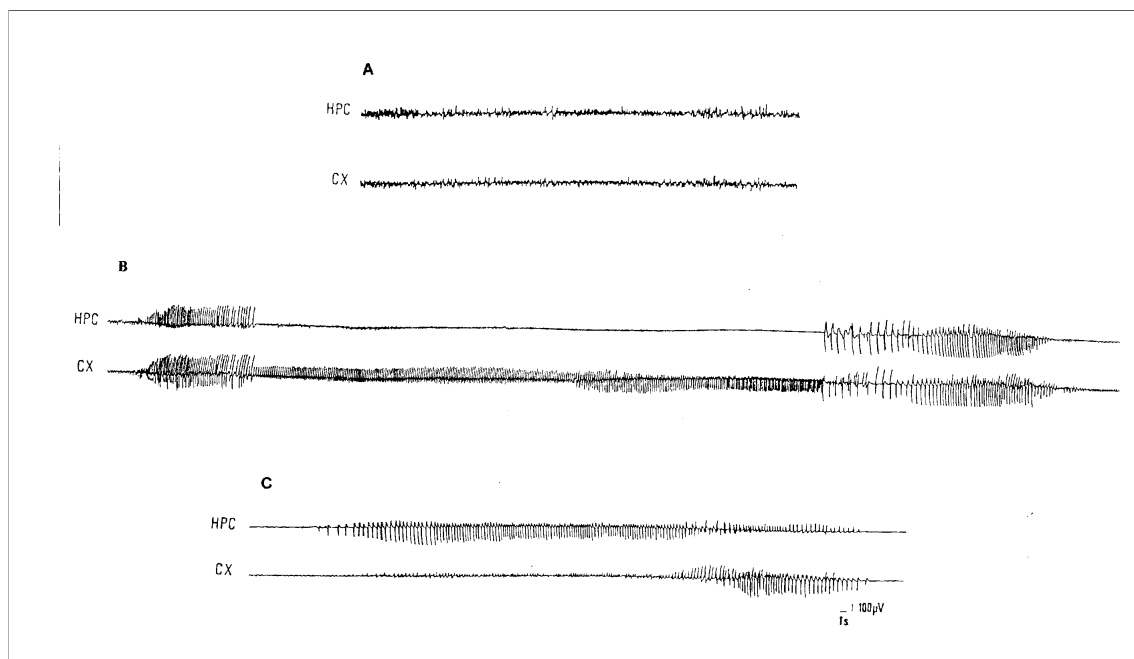


FIGURA 13 Alterações eletrocorticais induzidas por administração intraperitoneal de Marinobufogenina (40mg/kg,i.p.), em rato. **A** - Atividade eletrocortical controle. **B e C** - Registro contínuo da atividade em intervalos de 01 a 07 minutos após a administração de MB, onde se alternam períodos ictais e interictais. **HPC** - Hipocampo; **CX** - Córtex.

O registro eletroencefalográfico ilustrando as alterações observadas em vários tempos após a injeção intra-ventricular de MB (150 µg) em rato *Wistar* encontra-se bem visualizado na **Figura 14**. No período crítico, as descargas de alta intensidade surgem no córtex e no hipocampo, sete minutos após a administração de MB e tem a duração de um minuto. O animal permanece imóvel em quase todo o registro, intercalando com períodos em que apresenta leves movimentos de cabeça, piloereção, movimentos mastigatórios e por vezes anda em círculos. Aos 18 minutos o animal começa a evidenciar sinais de recuperação.

O registro EEG, ilustrado na **Figura 15**, mostra que o pré-tratamento com Diazepam (10,0 mg/kg, i.p.), administrado 30 minutos antes de MB, não bloqueia as crises em camundongos injetados com MB (5,0 mg/kg, i.p.). O animal não apresenta alterações comportamentais, mostrando-se acinético. Em **15A** observa-se a atividade eletrográfica controle, antes de qualquer tratamento e em **15B**, a atividade após administração de Diazepam (DZP). Oito minutos após a injeção de MB, ocorre a primeira crise com alta atividade elétrica, altamente sincronizada no córtex e no hipocampo, com duração de um minuto (**15C** e **15D**). Aos doze minutos surge uma nova crise (**15D**) e aos dezesseis minutos instala-se a terceira crise. O registro contínuo das descargas hipocampais e corticais encontram-se em **15F,G** e **H**, onde a duração do período ictal é de cinco minutos, quando o animal morre em extensão das patas posteriores e falência cardio-respiratória.

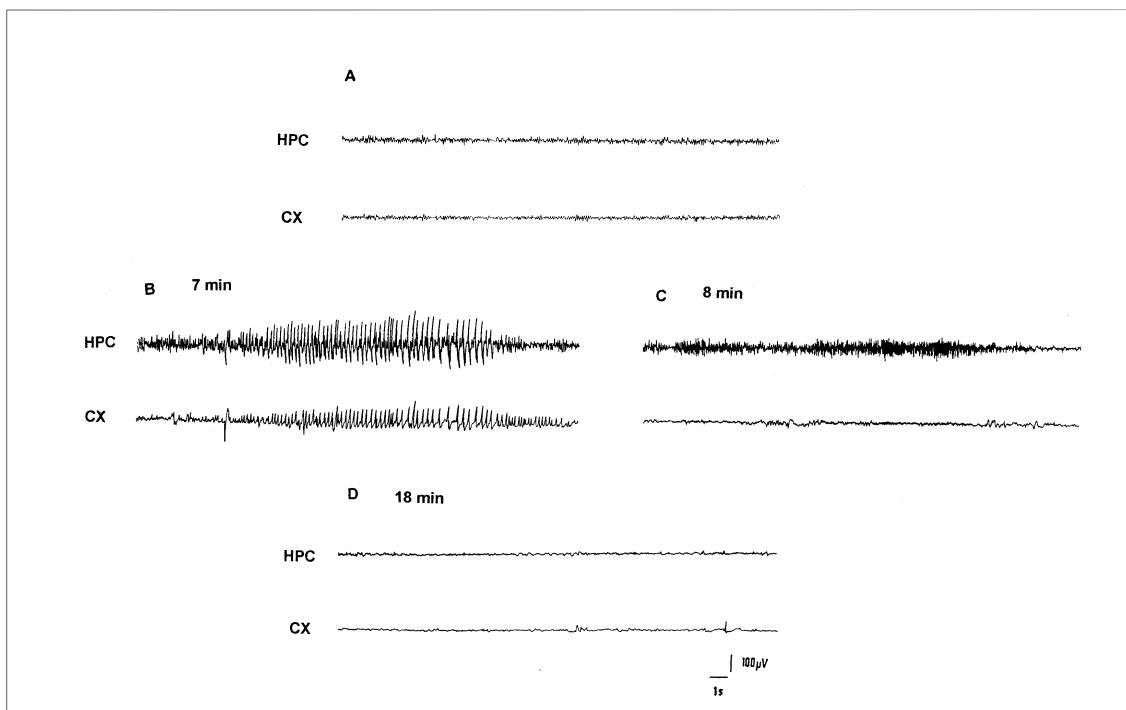


FIGURA 14 Registro eletroencefalográfico ilustrando a seqüência de alterações observadas em vários tempos após a injeção intraventricular de 50ul (= 150 ug) de Marinobufogenina em rato. **A** - Atividade eletrocortical controle. **B** - Período ictal com descargas no hipocampo e no córtex com duração de 01 minuto. **C** - Alta atividade no hipocampo. **D** - Período pós-crítico: padrão tende a voltar ao basal. **HPC** - Hipocampo; **CX** - Córtex.

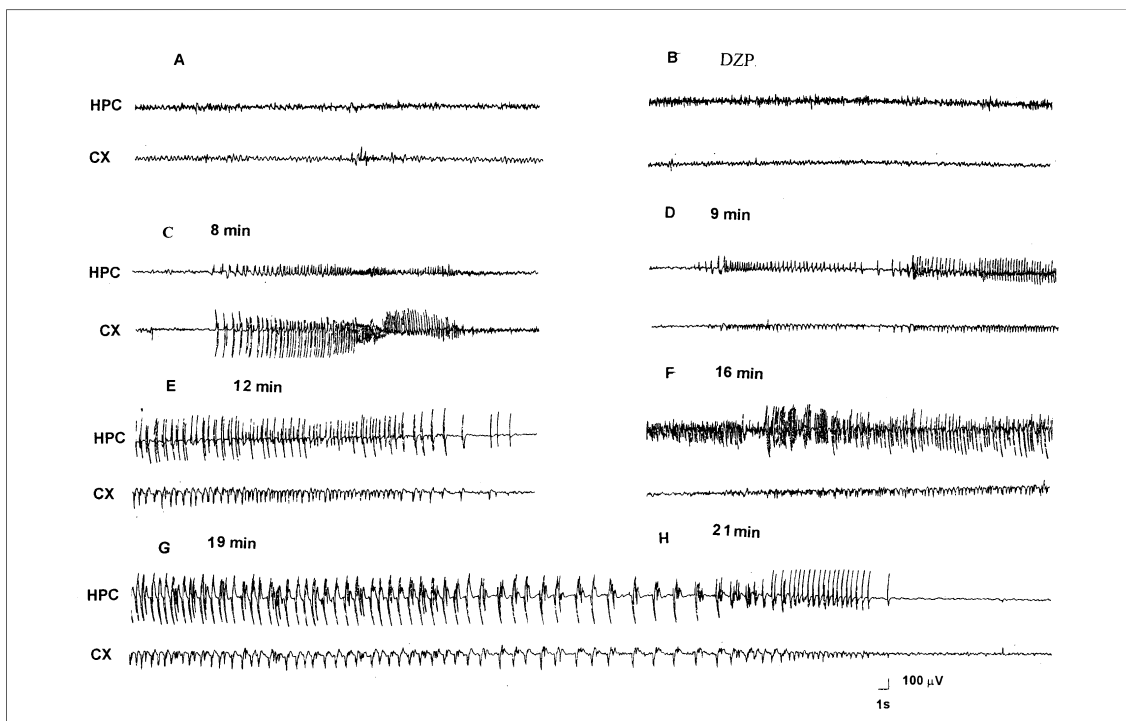


FIGURA 15 Registro eletroencefalográfico ilustrando o efeito do Diazepam (10,0 mg/kg, i.p.), administrado 30 minutos antes da injeção de Marinobufogenina (5,0 mg/kg, i.p.), em camundongo. **A** - Atividade eletrocortical controle. **B** - Atividade após a injeção de Diazepam. **C e D** - Alta atividade com descargas no hipocampo e córtex com duração ictal de 01 minuto. **E** - Segunda crise aos 12 minutos. **F, G e H** - Crise contínua e ininterrupta dos 16 aos 21 minutos, culminando com a morte do animal. **HPC** - Hipocampo; **CX** - Córtex.

4.6 AÇÃO DE ANTICONVULSIVANTES

Os resultados dos efeitos do Diazepam (10,0 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB 9,0 mg/kg i.p.) em camundongos encontram-se evidenciados na **Figura 16 Tabela 2**. Observamos que o pré-tratamento (30 min) com Diazepam reverteu parcialmente as convulsões. O MB desencadeou 83,3% de convulsões, numa latência média de $5,7\% \pm 3,77$ minutos para surgir a primeira convulsão tônico-clônica generalizada e o pré-tratamento com Diazepam não reverteu as convulsões em apenas 16,7% dos animais. A ocorrência de morte neste grupo não foi estatisticamente significativa. A **Figura 17 e Tabela 3** mostram que MB induziu 100% de convulsões com uma latência média para a primeira convulsão generalizada de $5,17 \pm 0,85$, sem ocorrência de morte. O grupo que recebeu o tratamento (30 min) de Diazepam (DZP 12,5 mg/kg, i.p.) apresentou convulsão em 16,7% dos animais e o tempo de latência para a primeira convulsão foi retardado para 21 minutos, ocorrendo também morte aos 25 minutos.

O Fenobarbital (FBT 50,0 mg/kg, i.p.) não ofereceu proteção contra as convulsões induzidas por MB e o tempo para surgimento da primeira convulsão nos dois grupos foi aproximadamente o mesmo: $6,50 \pm 3,7$ e $5,12 \pm 2,1$ minutos, respectivamente. Houve uma morte no grupo tratado com Fenobarbital e MB aos 25 minutos (**Figura 18 Tabela 4**).

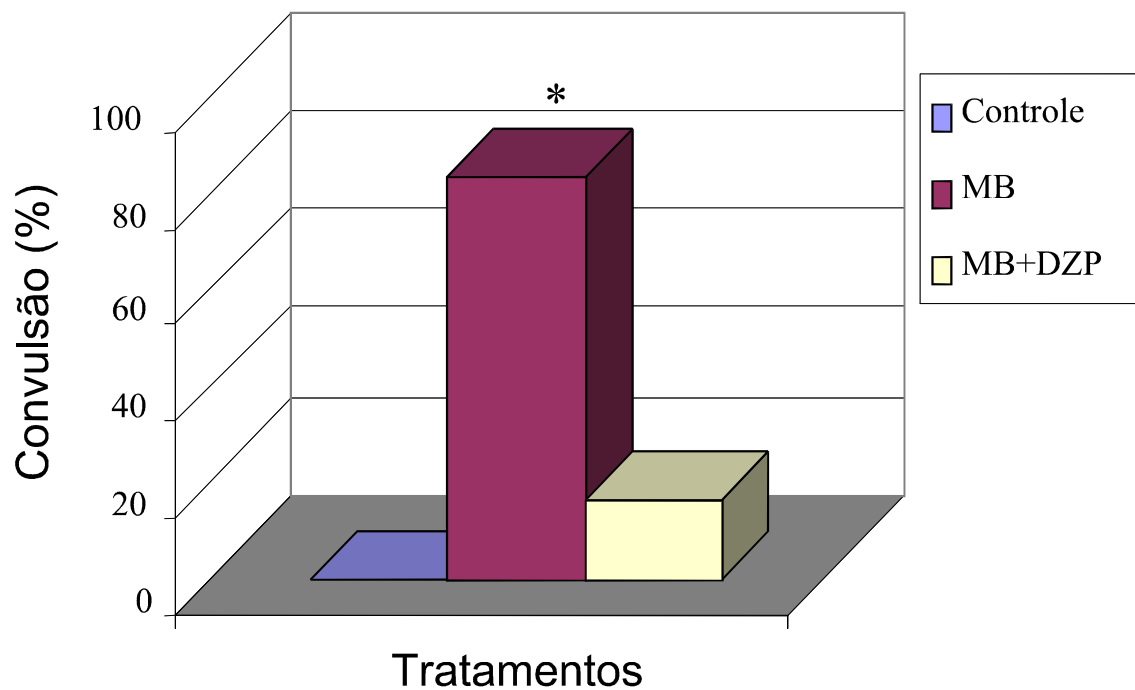


FIGURA 16 Efeitos do Diazepam (DZP 10,0 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos. O grupo controle foi tratado somente com veículo. Os grupos experimentais foram pré-tratados com Diazepam (ou veículo) e após 30 minutos foi administrado Marinobufogenina. Os resultados representam o percentual do convulsões do grupo MB comparado ao controle e DZP comparado ao grupo tratado com MB. Foram utilizados 6 animais por grupo. * $p < 0,05$, teste exato de Fisher.

TABELA 2 Efeitos do pré-tratamento (30 min) do Diazepam (DZP 10,0 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos.

GRUPO	Dose (mg/kg)	Convulsão%	Latência para a 1ª convulsão tônico-clônica (min)	Letalidade %	Tempo de morte (min.)
Controle (MB)	9,0	83,33*	5,76 ± 3,77	0	Sem óbito
DZP + MB	10,0 + 9,0	16,67*	21,0	33	25

Resultados expressos como média ± desvio padrão do tempo de latência para convulsão e tempo de morte, além do percentual de convulsões e morte dos animais. Foram utilizados 6 camundongos por grupo. O grupo DZP + MB foi comparado ao grupo tratado com MB. * $p < 0,05$, teste exato de Fisher.

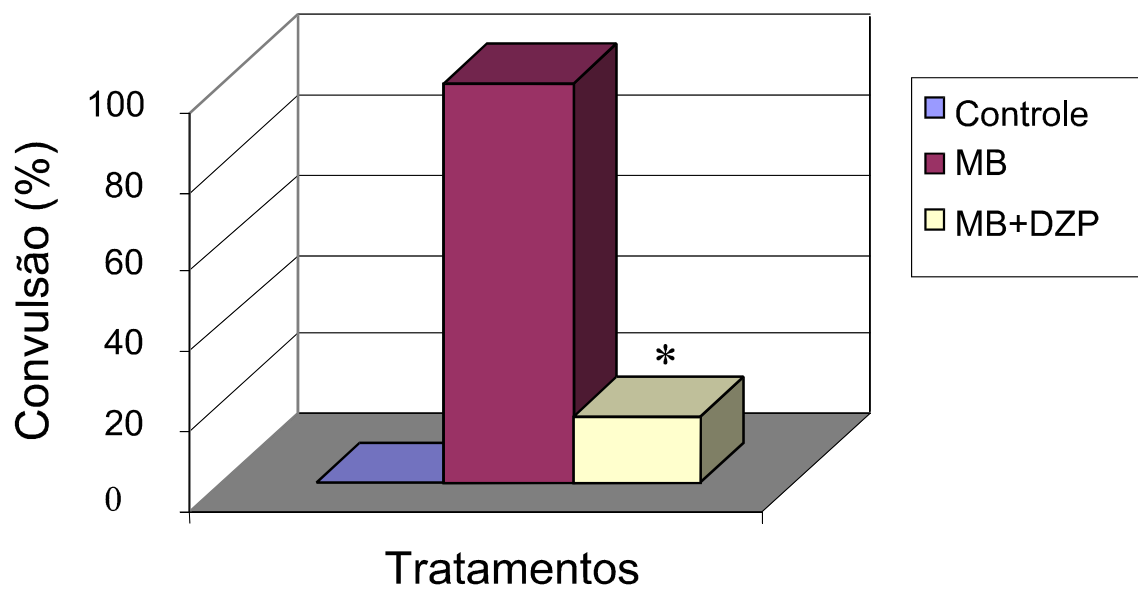


FIGURA 17 Efeitos do Diazepam (DZP 12,5 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos. O grupo controle foi tratado somente com veículo. Os grupos experimentais foram pré-tratados com Diazepam (ou veículo) e após 30 minutos foi administrado o Marinobufogenina. Os resultados representam o percentual de convulsões do grupo MB comparado ao controle e DZP comparado com MB. Foram utilizados 6 animais por grupo. * $p < 0,05$, teste exato de Fisher.

TABELA 3 Efeitos do pré-tratamento (30 min) do Diazepam (DZP 12,5 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos.

GRUPO	Dose (mg/kg)	Convulsão%	Latência para a 1ª convulsão tônico-clônica (min)	Letalidade %	Tempo de morte (min.)
Controle (MB)	9,0	100*	5,17 ± 0,85	0	Sem óbito
DZP + MB	12,5 + 9,0	16,7*	21	16,7	25

Resultados expressos como média ± desvio padrão do tempo de latência para convulsão e tempo de morte, além do percentual de convulsões e morte dos animais. Foram utilizados 6 camundongos por grupo. O grupo DZP + MB foi comparado com o controle (MB).

* $p < 0,05$, teste exato de Fisher.

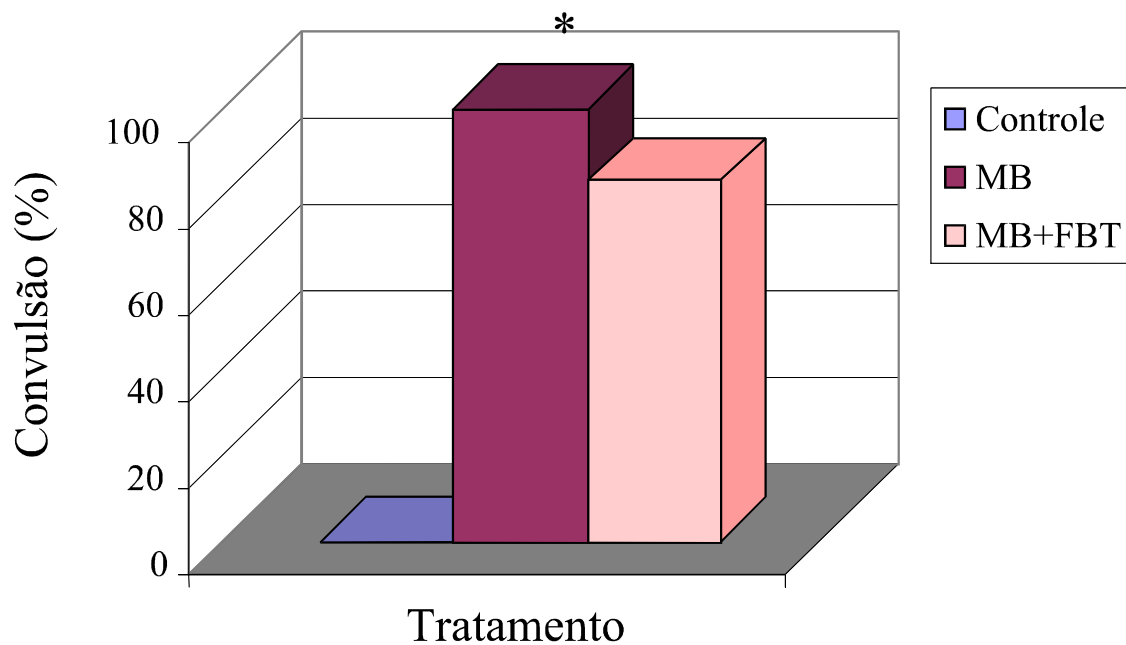


FIGURA 18 Efeitos do Fenobarbital (FBT 50,0 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos. O grupo controle foi tratado somente com o veículo. Os grupos experimentais foram pré-tratados com Fenobarbital (ou veículo) e após 45 minutos foi administrado Marinobufogenina. Os resultados representam o percentual de convulsões do grupo MB comparado ao controle e FBT comparado com MB. Foram utilizados 6 animais por grupo. * $p < 0,05$, teste exato de Fisher.

TABELA 4 Efeitos do pré-tratamento (45 min) do Fenobarbital (FBT 50,0 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos.

GRUPO	Dose (mg/kg)	Convulsão%	Latência para a 1ª convulsão tônico-clônica (min)	Letalidade %	Tempo de morte (min.)
Controle (MB)	9,0	100*	6,50 ± 3,7	0	Sem óbito
FBT + MB	50,0 + 9,0	83,3	5,12 ± 2,1	16,7	25

Resultados expressos como média ± desvio padrão do tempo de latência para convulsão e tempo de morte, além do percentual de convulsões e morte dos animais. Foram utilizados 6 camundongos por grupo. O grupo FBT+MB foi comparado ao controle(MB).

* $p < 0,05$, teste exato de Fisher.

Nenhum dos animais que recebeu Fenitoína (50 mg/kg, i.p.), administrada 60 minutos antes do MB (9,0 mg/kg, i.p.), apresentou convulsão tônico-clônica generalizada, um deles ficou parado por cerca de uma hora, cinco deles mostraram clonias e tremores de patas numa latência de 2 a 20 minutos, permanecendo por mais de uma hora em um dos camundongos, ocorrendo morte de um dos animais aos 25 minutos. O grupo que recebeu MB (9,0 mg/kg, i.p) induziu 80% de convulsões numa latência de 6,5 a 63,7 minutos, sem letalidade (**Figura 19 e Tabela 5**).

Ao aumentar a dose de Fenitoína (75 mg/kg, i.p.), o fármaco não mais bloqueou, mas reverteu as convulsões provocadas por MB. O grupo que recebeu o pré-tratamento (60 minutos) com Fenitoína mostrou 80% dos animais em convulsão enquanto MB evidenciou 100% e as latências para as convulsões foram $2,51 \pm 1,95$ e $4,97 \pm 0,79$ minutos, respectivamente. Ocorreu óbito de um animal aos 14,5 min, no grupo tratado com Fenitoína, sem diferença estatística significativa (**Figura 20 e Tabela 6**).

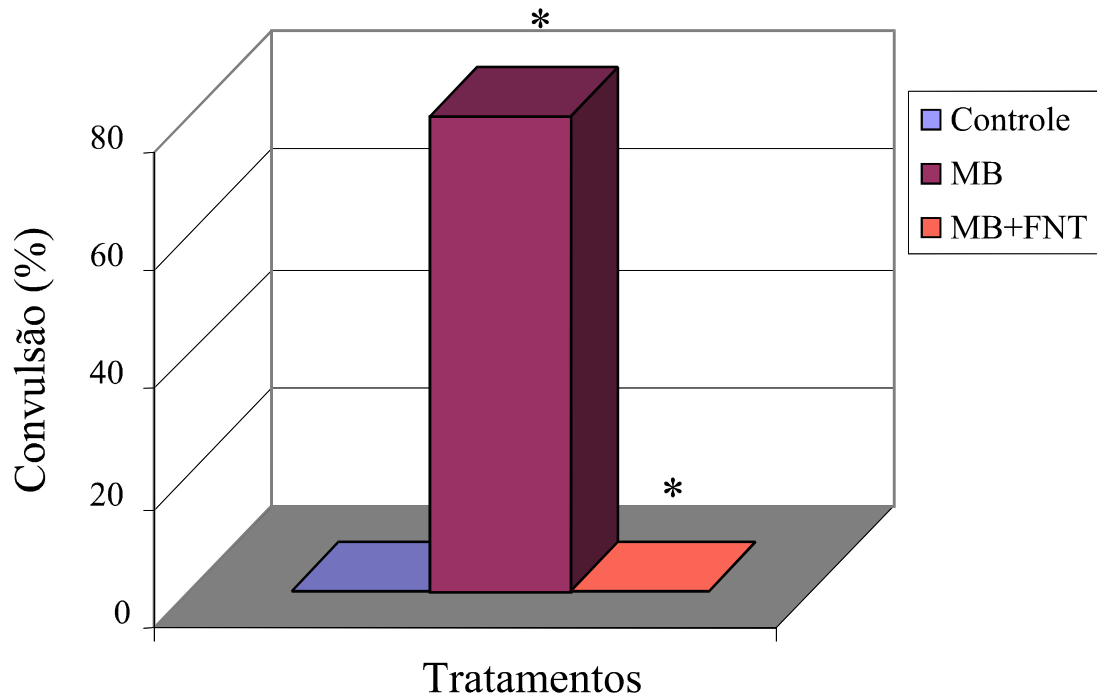


FIGURA 19 Efeitos da Fenitoína (FNT 50,0 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos. O grupo controle foi tratado somente com veículo. Os grupos experimentais foram pré-tratados com Fenitoína (ou veículo) e após 60 minutos foi administrado Marinobufogenina. Os resultados representam o percentual de convulsões do grupo MB comparado ao controle e FNT comparado a MB. Foram utilizados 5 animais por grupo. * $p < 0,05$, teste exato de Fisher.

TABELA 5 Efeitos do pré-tratamento (60 min) de Fenitoína (FNT 50,0 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos.

GRUPO	Dose (mg/kg)	Convulsão%	Latência para a 1ª convulsão tônico-clônica (min)	Letalidade %	Tempo de morte (min.)
Controle (MB)	9,0	80*	6,5 ± 3,7	0	Sem óbito
FNT + MB	50,0 + 9,0	0*	Sem convulsão	20	25

Resultados expressos como média ± desvio padrão do tempo de latência para convulsão e tempo de morte, além do percentual de convulsões e de morte dos animais. Foram utilizados 5 camundongos por grupo. O grupo MB + FNT foi comparado ao controle (MB).

* $p < 0,05$, teste exato de Fisher.

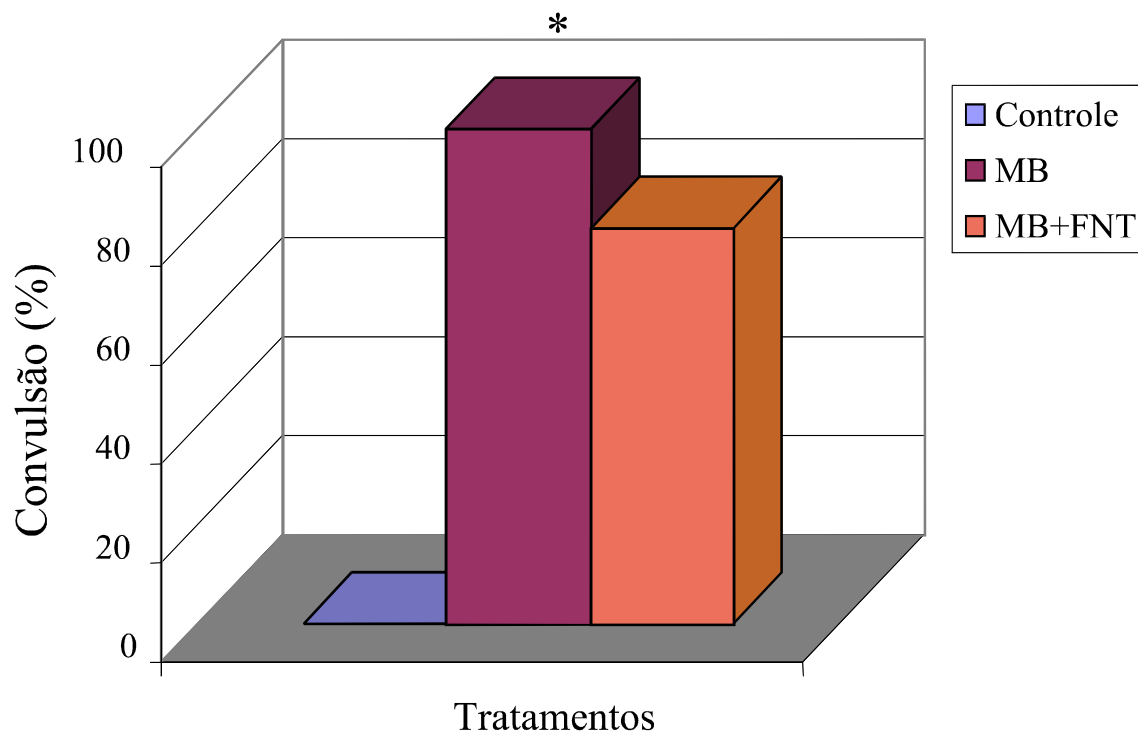


FIGURA 20 Efeitos da Fenitoína (FNT 75,0 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos. O grupo controle foi tratado somente com veículo. O grupos experimentais foram pré-tratados com Fenitoína (ou veículo) e após 60 minutos foi administrado Marinobufogenina. Os resultados representam o percentual de convulsões do grupo MB comparado ao controle e FNT comparado a MB. Foram utilizados 5 animais por grupo. * $p < 0,05$, teste exato de Fisher.

TABELA 6 Efeitos do pré-tratamento (60 min) de Fenitoína (FNT 75,0 mg/kg, i.p.) nas convulsões induzidas por Marinobufogenina (MB 9,0 mg/kg, i.p.) em camundongos.

GRUPO	Dose (mg/kg)	Convulsão%	Latência para a 1ª convulsão tônico-clônica (min)	Letalidade %	Tempo de morte (min.)
Controle (MB)	9,0	100*	4,97 ± 0,79	0	Sem óbito
FNT + MB	75,0 + 9,0	80	2,51 ± 1,95	20	14,5

Resultados expressos como média ± desvio padrão do tempo de latência para convulsão e tempo de morte, além do percentual de convulsões e de morte dos animais. Foram utilizados 5 camundongos por grupo. O grupo MB+ FNT foi comparado ao controle (MB). * $p < 0,05$, teste exato de Fisher.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 RELEVÂNCIA FISIOLÓGICA DAS SECREÇÕES DE ANFÍBIOS

*“Round the caldron go;
In the poison’d entrails throw.-
Toad, that under cold stone,
Days and nights hast thirty-one
Swelter’d venom sleeping got,
Boil thou first i’ the charmed pot !”*
Macbeth (act IV, scene 1)

Neste monólogo, presente no quarto ato de Macbeth, Shakespeare externa um conhecimento folclórico onde descreve bruxas que preparam poções mágicas, coquetéis de ingredientes químicos diversificados, usando o extraordinário poder das toxinas de anfíbios para desencadear algum efeito sobre o comportamento humano. Tais substâncias poderiam mimetizar ou interferir nas respostas farmacológicas, agindo como agonistas ou antagonistas, ativando ou bloqueando os receptores farmacológicos (Lazarus et al., 1994).

Buscar fontes biológicas, incluindo as mais variadas espécies,

sempre foi o escopo perseguido por pesquisadores na descoberta de muitos fármacos, desde os primórdios até os tempos atuais. Mesmo dispondo de conhecimentos gerais mais aprofundados e tecnologias altamente sofisticadas, o homem continua a sua procura visando encontrar a fórmula mágica para tratar e curar os males que afligem a humanidade.

Os anfíbios despertam a curiosidade e a motivação contínua que são requisitos necessários à investigação científica principalmente pelo grande arsenal de produtos químicos naturais com diversas atividades biológicas contido em sua pele (Sebben et al., 1993). Essa diversidade torna a pele de anfíbios um vasto tesouro de riquezas naturais que ora atrai a atenção de muitos pesquisadores.

A composição química e concentração das substâncias ativas presentes na pele de anfíbios pode variar segundo a espécie, o estágio de desenvolvimento e a distribuição geográfica (Sebben et al., 1993). Apesar das similaridades existentes, a composição química do veneno de cada espécie do *Bufo* pode diferir uma da outra (Chen & Kovariková, 1967). Muitas das características do veneno advêm das propriedades das folhas e insetos que comem, próprias de cada região. Conseqüentemente, a variedade de espécies no Nordeste, especialmente no Ceará, justifica-se pelo tipo de alimentação e local onde vivem esses animais.

Existem várias teses para explicar o desenvolvimento evolutivo das substâncias bioativas encontradas na pele de anfíbios. Gerhard Habermehl sugere que elas funcionariam como mecanismos de defesa, como repelentes ou contra infecções por microorganismos (Habermehl, 1981). John Daly propõe que tais compostos atuariam na defesa contra predadores, fundamentado no fato de que muitos peptídeos e aminas biogênicas são neurotransmissores comuns aos vertebrados e estariam concentrados na pele de anfíbios onde passariam a desempenhar a função de proteção (Daly, 1995).

Apesar dos efeitos farmacológicos dos bufadienolídeos sobre o sistema cardiovascular serem exaustivamente estudados (Zelnik, 1965; Sebben et al., 1993; Bicudo, 1994; Otani et al., 1969; Chen & Kovarikova, 1967; Flier et al., 1980; Bagrov et al., 1998; Kren & Kopp, 1998), as pesquisas correlacionando tais substâncias e o SNC são apenas incipientes, constituindo apenas de relatos (Hitt & Ettinger, 1986; Chern et al., 1991; Sebben et al., 1993; Bicudo, 1994; Otani et al., 1969), necessitando um maior aprofundamento.

No presente trabalho procedemos a análise de uma substância presente na secreção das glândulas parotóides do sapo *Bufo paracnemis*, Lutz, com potente ação convulsivante, evidenciando efeitos centrais em ratos e em camundongos.

5.2 PURIFICAÇÃO

Dentre os vários solventes utilizados, o etanol apresentou-se excelente na solubilização do material obtido da secreção das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*. Testes iniciais com amostras do exsudato bruto deste material evidenciaram a presença de um componente que induzia fortes convulsões tônico-clônicas generalizadas e levava o animal a óbito poucos minutos após administração intraperitoneal em camundongos.

Desenvolvemos então um protocolo para um estudo mais aprofundado visando descobrir qual a fração responsável pelos efeitos centrais observados.

Nos últimos anos, uma atenção considerável tem focalizado a aplicação de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) na separação e purificação de produtos naturais ativos fisiologicamente. Trata-se uma técnica altamente sofisticada que realiza separações e análises quantitativas com alta resolução e sensibilidade (Lindsay, 1992). É interessante ressaltar que com um passo apenas em HPLC, em escala preparativa, usando etanol 100% foi obtido um alto índice de purificação mostrando um rendimento da atividade em torno de 15 mg/g do veneno bruto. Utilizando o HPLC obtivemos um fracionamento do sobrenadante do veneno em quatro picos. A coleta de picos foi efetuada uma única vez. Após a liofilização a fração relativa ao pico 3 foi a que deteve a atividade convulsivante. Após ser eluída em HPLC, em coluna

analítica de fase reversa, o pico 3 mostrou elevado teor de pureza. Desse modo, estávamos diante do material isolado, puro, sem contaminantes, pronto para determinação de sua estrutura química e para os testes de análise dos efeitos.

5.3 TOXICIDADE AGUDA E DL₅₀

O propósito dos testes de toxicidade aguda é determinar a sintomatologia conseqüente à administração de uma substância e determinar a ordem de letalidade do composto (Loomis & Hayes, 1996).

Os estudos de toxicidade aguda da MB foram avaliados através de testes comportamentais em camundongos e em ratos. Observamos que de acordo com a dose utilizada surgiam os efeitos de maneira dose-dependente até determinar o óbito do animal com doses mais elevadas. Observamos que o MB é eficaz através de diversas vias, tais como endovenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutânea e oral, embora a intensidade dos efeitos difiram bastante, de acordo com a via de administração utilizada.

Na maioria das vezes, a intensidade de ação da substância depende da forma de introdução no organismo, isto é, da via de administração, já que a absorção das drogas tem relação direta com aquelas. Assim, a administração intravenosa dos fármacos produz mais rapidamente e de forma mais potente, porque alcança imediatamente

uma concentração elevada no sangue para passar em seguida para os tecidos (Litter, 1974), embora saibamos que a toxicidade letal pode também não ser dependente da via de administração utilizada (Loomis & Hayes, 1996).

A cavidade peritoneal oferece uma grande superfície de absorção a partir da qual os fármacos penetram rapidamente na circulação. Assim, selecionamos a via intraperitoneal para a determinação da DL₅₀, por ser também um procedimento laboratorial comum.

A dose letal para 50% dos animais, que é conhecida comumente como DL₅₀, é a dose do composto que produzirá morte em 50% dos animais (Loomis & Hayes, 1996).

A DL₅₀ da substância em análise, Marinobufogenina, foi de $10,5 \pm 1,5$ mg/kg em camundongos e de $25,0 \pm 2,0$ mg/kg em ratos, ambos por via intraperitoneal, mostrando que a DL₅₀ pode variar amplamente entre diferentes espécies.

A classificação citada em 1996 por Loomis & Hayes, sobre o grau de toxicidade das substâncias, separa os compostos em:

- a) extremamente tóxico – 1 mg/kg ou menos;
- b) altamente tóxico – 1 a 50 mg/kg;

- c) moderadamente tóxico – 50 a 100 mg/kg;
- d) fracamente tóxico – 0,5 a 5 g/kg;
- e) praticamente sem toxicidade – 5 a 15 g/kg e
- f) relativamente inofensivo – maior que 15 g/kg (Loomis & Hayes, 1996).

Embora a classificação tenha apenas propósito útil e prático, podemos inferir que a substância analisada pode ser considerada um composto altamente tóxico por encontrar-se a DL₅₀ na faixa de 1 a 50 mg/kg.

5.4 ESTRUTURA QUÍMICA

Após a elucidação da estrutura química realizada no Centro Nordestino de Aplicação e uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, UFC, sob a coordenação do Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira, obteve-se a certeza inequívoca de que se tratava da MB, utilizou-se uma amostra de MB isolado do *Bufo marinus*, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. A. C. Camargo (Instituto Butantan), para efeitos comparativos. Observou-se então, através da identificação estrutural, que realmente estávamos diante de MB purificada do *Bufo paracnemis* (14 β , 15 β - epoxi - 3 β , 5 β - dihidroxi 20,22 – bufadienolídeo).

5.5 EFEITOS COMPORTAMENTAIS E ELETROGRÁFICOS

O eletroencefalograma (EEG) é o teste mais utilizado para obtenção de diagnóstico e classificação das epilepsias, sendo secundário somente ao histórico do paciente. Graças à obstinação de Hans Berger (1873 – 1941), a humanidade compreendeu que a atividade mental estava relacionada à atividade elétrica do cérebro e o EEG passou a ter grande relevância tanto na pesquisa básica quanto na clínica.

Nossos resultados, baseados em análises comportamentais e eletrográficas, mostraram claramente efeitos centrais induzidos pela administração sistêmica de Marinobufogenina em ratos e em camundongos.

Observou-se que a forte atividade convulsivante da MB é dose-dependente e que as doses de 5,0 mg/kg em camundongos e de 20 mg/kg em ratos, i.p. já evidenciam alterações comportamentais características de convulsões tônico-clônicas generalizadas, acompanhadas do registro EEG com descargas epiléticas no córtex e hipocampo.

Algumas vezes o registro EEG evidenciava as crises e não havia um sincronismo diante do comportamento dos animais, quando estes mostravam-se totalmente imóveis sugerindo um comportamento

semelhante àquele observado nas crises de ausência, onde o paciente abruptamente interrompe qualquer atividade que esteja desenvolvendo, algumas vezes parando de falar no meio da frase e olha fixamente para o nada durante alguns segundos, com pequeno ou nenhum distúrbio motor. O paciente não toma conhecimento do ambiente adjacente e recupera-se abruptamente sem efeitos posteriores, ao mesmo tempo em que surge uma descarga sincrônica característica durante o período da crise (Rang & Dale, 1993).

Dependendo da dose utilizada, as descargas epiléticas surgiam imediatamente ou alguns minutos após a administração de MB.

À análise eletrográfica do período pré-crítico, o registro apresentava quase sempre uma depressão no hipocampo e no córtex.

Os registros dos períodos ictais geralmente ocorriam simultaneamente no HPC e CX ou eram alternados. Surgiam também descargas no HPC que rapidamente difundiam-se para o córtex e, às vezes, culminavam em *status epilepticus*, com duração de até 70 minutos.

No período pós-crítico o registro EEG apresentava uma lentificação do traçado e um número aumentado de espículas, com retorno do traçado de base 30 a 60 minutos após cessar a crise, evidenciando a recuperação do animal que volta gradativamente ao comportamento normal.

O *status epilepticus* é uma condição caracterizada por crise epiléptica que é prolongada ou repetida a intervalos curtos e resulta num estado epiléptico contínuo e duradouro, freqüentemente seguido por extenso dano neuronal envolvendo o hipocampo e outras estruturas límbicas, neocórtex e áreas subcorticais (Santos, 1995).

Existem evidências de que crises prolongadas ou contínuas que culminam em SE podem induzir à lesão neuronal (Oxbury & Whitty, 1971). O mecanismo da manutenção das crises convulsivas e recorrência que leva a um dano neuronal irreversível não foi completamente esclarecido (Lemos e Cavalheiro, 1996).

O possível papel e a natureza do processo epileptogênico do SE, um episódio de convulsão prolongada e que causa dano cerebral, onde a injúria inicia um processo que desencadeará o aparecimento de descargas epilépticas espontâneas, permanece ainda hoje um mistério (Sloviter, 1999).

O *status epilepticus* está entre as formas mais severas de epilepsia. Quando diagnosticado, é tido como emergência médica associado com considerada morbidade. Os índices de mortalidade, relatados em torno de 20% são proporcionais à duração do SE mas não está claro se a morte resulta de uma crise prolongada *per se* ou

primariamente de uma patologia pré-existente que também causa a crise (Oxbury & Whitty , 1971).

A duração do SE é diferente das convulsões típicas, em que a maioria permanece alguns minutos e cessa (Coulter & DeLorenzo, 1999).

Muito pouco se conhece sobre a evolução do foco epiléptico entre o dano estrutural do cérebro e o aparecimento das crises epilépticas humanas (Engel, 1987).

Existem vários modelos experimentais de SE que induzem à lesão neuronal, sendo seguido de danos em diversas áreas do cérebro (Nadler, 1981).

Nas últimas décadas, a busca por novos modelos de epilepsia que mimetizem as alterações humanas tem sido intensificada. (Cavalheiro et al., 1982; Goddard et al., 1969; Purpura et al., 1972), fornecendo importantes avanços e um maior entendimento dos mecanismos básicos da epilepsia, possibilitando uma nova abordagem terapêutica (Leite et al., 1990; Mello et al., 1986).

O modelo da Pilocarpina é o que mais se assemelha às crises parciais complexas observadas na clínica neurológica (Santos, 1995). É um modelo útil para estudos dos mecanismos ligados à epilepsia do lobo temporal em camundongos e em ratos (Turski et al., 1984; Cavalheiro et al., 1991).

A administração sistêmica de Pilocarpina é capaz de produzir desordens convulsivas e amplas lesões cerebrais (Turski et al., 1984).

Para que um modelo experimental seja classificado como um modelo de epilepsia deve preencher requisitos importantes tais como:

1. demonstrar a presença de atividade epileptiforme nos registros eletroencefalográficos;
2. clinicamente apresentar uma atividade semelhante àquelas observadas durante uma crise epiléptica (Mello et al., 1986).

Nossos resultados preencheram os requisitos supracitados. Podemos inferir que a MB poderia constituir potencialmente um modelo experimental e possibilitar um maior entendimento da epilepsia.

5.6 AÇÃO DE ANTICONVULSIVANTES

A proposição de um estudo mais aprofundado que possa levar ao modelo experimental de epilepsia baseia-se na reprodução consistente dos achados comportamentais e eletrográficos, acrescida de outro requisito fundamental que é o estudo de drogas anticonvulsivantes. No sentido de elucidar os mecanismos básicos envolvidos com a ação da MB, utilizamos os anticonvulsivantes; Diazepam, Fenobarbital e Fenitoína.

5.6.1 Diazepam

Nossos resultados mostraram a reversão dos efeitos comportamentais na maioria dos animais pré-tratados com Diazepam. No entanto, o DZP não foi efetivo em suprimir a presença de descargas sincrônicas no HPC e CX em alguns animais, ao registro eletroencefalográfico .

Na fisiopatologia da epilepsia, acredita-se que exista um desequilíbrio entre os mecanismos excitatórios (dependentes fundamentalmente de receptores glutamatérgicos) e inibitórios (dependentes do GABA) (McNamara, 1994).

A análise de componente comportamental mostrou que o DZP torna o animal irresponsivo a estímulos externos, reduzindo as

convulsões em aproximadamente 80% dos animais, enquanto o componente eletrográfico não foi afetado. De acordo com Racine et al., 1975 o DZP em doses elevadas não possui efeito em convulsões corticais (Racine et al., 1975).

O Diazepam é uma das drogas mais utilizadas no tratamento clínico do SE e de todos os tipos de epilepsia. Age no SNC pelo aumento de efeitos inibitórios do GABA (Lemos e Cavalheiro, 1996).

A perda da inibição GABAérgica no HPC tem um papel crítico no surgimento do SE nos animais experimentais. Muitos mecanismos celulares são responsáveis pela perda aguda da inibição GABAérgica que se desenvolve durante o SE. Ocorrem alterações de várias funções, imediatamente após a atividade convulsiva, inclusive despolarização e alteração do potencial de repouso da membrana de neurônios do HPC associados com mudanças nos gradientes de concentração de íons. Essa despolarização e alteração na homeostase dos íons está associada com a neurotoxicidade aguda e crônica mediada por glutamato (Coulter & DeLorenzo, 1999).

Mesmo não esclarecendo seu mecanismo de ação, a MB mostrou ser útil no ensaio de anticonvulsivantes, sendo uma vantagem o seu caráter prático e rápido nos testes com anticonvulsivantes. Pode ser considerado um bom instrumento na pesquisa e avaliação de anticonvulsivantes, característica que o torna mais próximo de um modelo de epilepsia em potencial.

Os anticonvulsivantes variam na sua eficácia contra convulsões experimentais em animais e contra convulsões humanas. As bases mecánísticas para esta variabilidade na ação das drogas anticonvulsivantes permanecem incertas, mas numerosos mecanismos de ação são propostos.

Estudos de eficácia de drogas anticonvulsivantes são difíceis e historicamente têm falhado em detectar diferenças entre as drogas (Chadwick & Turnbull, 1985).

5.6.2 Fenobarbital

O Fenobarbital, indicado em todos os tipos de epilepsias, exceto em crises de ausência, é eficaz contra descargas repetitivas de alta frequência dos potenciais de ação e modifica as respostas pós-sinápticas ao GABA em concentrações terapêuticas (McDonald & McLean, 1986).

O Fenobarbital foi incapaz de bloquear as crises comportamentais induzidas por MB, no entanto protegeu os animais das convulsões induzidas por Pilocarpina, evidenciando que provavelmente tais substâncias agem por mecanismos diferentes.

5.6.3 Fenitoína

Existem inúmeras evidências da participação da enzima $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ na gênese de crises convulsivas observadas tanto em pacientes epiléticos (Rapport et al., 1975) quanto em modelos experimentais (Cowan & Cavalheiro, 1980). Foi sugerido também que o mecanismo celular da Fenitoína está ligado à proteção contra um fluxo anormal de Na^+ e K^+ na epilepsia através da estimulação direta do transporte de Na^+ e K^+ ou por bloqueio do movimento dos íons (Rapport et al., 1975).

Sabendo-se que a Marinobufogenina, um dos bufadienolídeos presentes na família Bufonidae, é um potente inibidor da bomba de Na^+K^+ (Fedorova et al., 1998), usamos a Fenitoína para verificar se haveria alguma interferência de MB nas convulsões, via alterações de íons envolvendo a bomba de Na^+K^+ .

A $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ é uma enzima responsável pelo transporte ativo de sódio e potássio através da membrana do neurônio e da glia, atuando como um mecanismo de retirada de potássio do meio extracelular para manter o gradiente iônico necessário para a excitabilidade neuronal (Grisar et al., 1992).

A ATPase é formada pela combinação de uma subunidade alfa e uma beta e sua distribuição depende da espécie, do tecido, do tipo de célula e do estágio do desenvolvimento do animal. Recentemente já foram classificados 3 isoformas da subunidade alfa e 3 da subunidade beta (Glynn, 1993).

Já foi descrita uma redução da atividade de $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ na epilepsia humana. Um fluxo anormal de cátions monovalentes pode estar relacionado com o processo epileptogênico no homem. Um possível mecanismo desordenado para o metabolismo de eletrólitos no cérebro epilético e uma anormalidade na $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$. Verificou-se que a atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ é significativamente menor no córtex humano epilético do que do não-epilético. Além disso, a razão entre a Fenitoína no córtex para as concentrações plasmáticas é menor em pacientes epiléticos (Rapport et al, 1975).

Em 1996, Fernandes e colaboradores mostraram que mudanças na atividade da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ podem estar relacionadas com o aparecimento de convulsões espontâneas e recorrentes seguidas de dano cerebral induzido por injeção de Pilocarpina (Fernandes et al., 1996).

Os bufadienolídeos apresentam atividade reguladora de Na^+K^+ da pele de anfíbios, quando presentes em baixas concentrações. Esse sistema enzimático desempenha importante papel na manutenção da

homeostasia dos anfíbios. Uma condição anormal provavelmente teria desencadeado (em algumas gêneros, como por exemplo no *Bufo*) a capacidade de acumular grandes quantidades desses compostos, tendo assim uma função secundária de defesa (Sebben et al., 1993).

Sapos da família Bufonidae contêm na pele altos níveis de compostos que podem inibir a bomba Na^+K^+ e antagonizar a ligação de Ouabaína a esta enzima (Flier et al., 1980).

Relativamente pouco é conhecido sobre o significado fisiológico e o papel de substâncias endógenas semelhantes aos digitálicos em sapos e em mamíferos (Goto et al., 1992). A presença desses compostos na pele e no plasma aumentam a possibilidade de sua participação na regulação do transporte de íons nesse tecido, reforçado pelo fato de ser a pele o principal órgão para regulação de sódio e homeostase nessas espécies, além de ser rica em $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$, o mediador molecular da ação de glicosídeos cardíacos (Lichtstein et al., 1986).

Os bufadienolídeos e cardenolídeos são descritos como glicosídeos cardíacos devido a sua similaridade na atividade biológica, por exemplo, ambos aumentam a força contrátil do coração através da inibição da bomba de Na^+K^+ . A enzima é o único receptor para os glicosídeos cardíacos e é responsável pela extrusão ativa de sódio intracelular na troca pelo potássio extracelular.

Os glicosídeos cardíacos contêm um núcleo peridro-fenantreno substituído no C-17, com um pentadienolídeo e butenolídeo para os bufadienolídeos e cardenolídeos, respectivamente. O 5β - 14β -androstane- 3β - 14 -diol contendo o 17β lactona (butadienolídeo ou α -pirona) constitui o núcleo esteróide comum para cardenolídeos e bufadienolídeos e funciona como estrutura mínima para reconhecimento do receptor e estrutura chave para introduzir alteração conformacional de proteína e então inibir a bomba de Na^+K^+ (Steyn & van Heerden, 1998).

A maior parte da atenção clínica era direcionada aos cardenolídeos em função do seu uso terapêutico (Steyn & van Heerden, 1998), particularmente a digoxina que continua sendo muito utilizada em medicina (Kelly & Smith, 1996).

A Marinobufogenina ($3\beta,5\beta$ -dihidroxi- 14β , 15β epoxi- $20,22$ -bufadienolidae), um bufadienolídeo isolado de vários sapos da família Bufonidae também age como um potente vasoconstritor em aorta isolada de rato e em artéria pulmonar humana, inibe a bomba de sódio e tem reação cruzada com anticorpo para digoxina, mas não para ouabaína (Bagrov et al., 1996).

Dados da literatura referem que é provável que a ação inibitória da Fenitoína seja decorrente de sua capacidade em estabilizar o fluxo passivo anormal de cátions monovalentes através da membrana neuronal ou através da estimulação direta da $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$. Os dados

são, no entanto, conflitantes quanto à sua ação sobre o transporte ativo de sódio e potássio (Grisar et al., 1992).

Nossos resultados demonstraram que a Fenitoína foi capaz de reverter as convulsões tônico-clônicas generalizadas nos animais que passaram a apresentar apenas clonias e tremores de patas, ou permaneciam imóveis, sugerindo que é provável que haja um envolvimento nas alterações dos de cátions monovalentes.

Tais resultados reforçam a idéia que a Marinobufogenina pode servir como um modelo experimental para o estudo da epilepsia e para o desenvolvimento de novas drogas anticonvulsivantes.

Esperamos que, num futuro próximo, a Marinobufogenina possa tornar-se uma ferramenta farmacológica para o estudo experimental da epilepsia.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os conhecimentos disponíveis na literatura especializada aliados à interpretação dos resultados obtidos permitiram inferir as seguintes conclusões:

1. Uma substância com potente atividade convulsivante e que induz *Status epilepticus* foi isolada, em grande escala, das glândulas parotóides do *Bufo paracnemis*, Lutz.
2. A estrutura química foi determinada. Trata-se de um Bufadienolídeo denominado Marinobufogenina.
3. Estudos comportamentais e eletrográficos confirmaram a atividade convulsivante da Marinobufogenina em ratos e em camundongos.
4. A Marinobufogenina pode constituir-se numa ferramenta farmacológica para o desenvolvimento de um modelo experimental de epilepsia, uma vez que preencheu os seguintes requisitos:

- a) demonstrou atividade epileptiforme nos registros eletroencefalográficos;
- b) clinicamente apresentou uma atividade semelhante àquelas observadas durante uma crise epiléptica;
- c) possibilitou o estudo de drogas anticonvulsivantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAGROV, A. Y. , FEDOROVA, O. V. , DMITRIEVA, R. I., HOWALD, W. N. ,HUNTER, A. P., KUZNETSOVA, E. A. , SHPEN, V. M. Characterization of a urinary bufadienolide Na⁺K⁺ATPase inhibitor in patients after acute myocardial infarction. **Am. J. Hypertens.** v. 31, p.1097 - 1103, 1998.
- BAGROV, A. Y. , ROUKOYATKINA, N. I., PINAEV, A. G., DMITRIEVA, R. I., FEDOROVA, O. V. Effects of two endogenous Na⁺ K⁺ ATPase inhibitors, marinobufagenin and ouabain, on isolated rat aorta. **Eur. J. Pharmacol.**, v.274, n. 1 – 3, p. 151 – 158, 1995.
- BAGROV, A. Y. , DMITRIEVA, R. I. , FEDOROVA, O. V. , KAZAKOV , G. P. , ROUKOYATKINA, N. I. , SHPEN, V. M. Endogenous marinobufagenin like immunoreactive substance. A possible endogenous Na⁺K⁺ ATPase inhibitor with

vasoconstrictor activity. **Am. J. Hypertens.** v. 9, n. 10, p. 982 - 90, 1996.

- BERKOVIC, S. F. , NEWTON, M. R. SPECT Cerebral – Tomografia por Emissão de Fóton Único na Avaliação da Epilepsia Parcial. In: Cavalheiro, E. A., Costa, J.C., Palmini, A. and Yacubian, E.M.T.(eds.) **Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias. Aspectos clínicos e cirúrgicos.**São Paulo: Lemos Editorial, vol.1 cap.10, p. 673-685, 1998
- BEVINS , C. L. , ZASLOFF, M . Peptides from frog skin. **Annu. Rev. Biochem.** v.59, p.395 - 414, 1990.
- BICUDO, P. L. Acidentes ofídicos em Medicina Veterinária. In: Barraviera, B. (coord.) **Venenos Animais: uma visão integrada.** Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas, cap. 29, p.375-387,1994
- BLOOM, F. E. , ENGEL, J. JR. Aberrant genetic expression and opportunities for epilepsy research. **Epilepsy Res. Suppl.** v.9, p. 18,1992.
- BROWNLEE, A. A., JOHNSON, P., MILLS, I.H. Actions of bufalin and cianobufotalin, two bufadienolides respectively more active and less active than ouabain, on ouabain binding and ⁸⁶Rb uptake by human erythrocytes. **Clinical Science**, n.78, p.169 - 174, 1990.

- BUTLER, V. P., SILVA, A. J., ABELIOVICH, A., WATANABE, Y., TONEGAWA, S., McNAMARA, J. O. Limbic epilepsy in transgenic mice carrying a Ca^{++} /calmodulin dependent kinase II α - subunit mutation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**: v. 92, p. 6852 – 5, 1995.

- CAMARÃO, G. C. **Purificação e caracterização de um complexo multicatalítico do exsudato da pele do *Xenopus laevis***. 1995. Tese (Doutorado) – Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1995.

- CAMPOS, C. J. R. ; CAVALHEIRO, E. A. Experimental *status epilepticus*. A modified kindling method in rats. **Archos Neuropsiquiat. São Paulo**: v. 38, p. 81 - 88, São Paulo, 1980.

- CARVALHO, K. M. **Metabolismo de hormônios-peptídeos: descoberta de uma nova família de metaloenzimas**. 1995. Tese (Professor Titular) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1995.

- CARVALHO, K.M., JOUDIQUÉ C., BOUSSETTA, H., LESENEY, A. M., COHEN, P. A peptide -hormone – inactivating endopeptidase in *Xenopus laevis* skin secretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.89, p.84 - 88, 1992.

- CAVALHEIRO, E. A., RICHE, D. A., LeGAL La SALLE, G. Long-term effects of intrahippocampal kainic acid injection in rats:

a method for inducing spontaneous recurrent seizures. **Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.** v.53, p.581-589, 1982.

- CAVALHEIRO, E. A., ELISABETSKY, E., CAMPOS, C. J. R. The effect of systemic 5HTP and pCPA on midbrain raphe lesions on a experimental model of epilepsy in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.** v.15, p. 363 - 6, 1981.
- CAVALHEIRO, E.A., LEITE, J. P., BARTOLOTTA, 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, n.6, p.778 - 782, 1991.
- CAVALHEIRO, E. A.; LIMA, J. G. S. Neurotransmissores e epilepsia. **Rev. Bras. Neurol.**, vol.20, p. 51-55, 1984.
- CAVALHEIRO, E.A. *Status epilepticus* and secondary epileptogenesis in the pilocarpine model of epilepsy. In: WOLF, P. (Ed.). **Epileptic Seizures and Syndromes**, New York, p. 523 – 532, , 1994.
- CHADWICK, D; TURNBULL, D. M. The comparative efficacy of antiepileptic drugs for partial and tonic-clonic seizures. **Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry**, v. 48, p. 1073-1077, 1985.

- CHEN, K.K; KOVARIKOVA, A. Pharmacology and toxicology of toad venom. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.56, n.12, p.1535 -1541, 1967.
- CHEN, K. K.; CHEN, A. L. The physiological action of the principles isolated from the secretion of the Jamaican toad (*Bufo marinus*). *J. Pharmac. Exp. Ther.* 49, 514-525 *apud* TOLEDO, R.C.; JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comp. Biochem Physiol.** v.30, p.1-37, 1995.
- CHERN, M.S.; RAY, C.Y.; WU,D. Biologic intoxication due to digitalis-like substance after ingestion of cooked toad soup. **The American Journal of Cardiology**, v.67, p.443-444, 1991.
- CLARKE, B.T. The natural history of amphibian skin secretions their normal functioning and potential medical applications . **Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.**, v.72, n.3, p.365-379, 1997.
- COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Proposal for revised clinical and electroencephalographic classification of epileptic seizures. **Epilepsia**, v.22, p.489-501, 1981.
- COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Proposal for classification of epilepsies and epileptic syndromes. **Epilepsia**, v.26, n.3, p.268-278, 1985.

- COMMISSION ON CLASSIFICATION AND TERMINOLOGY OF THE INTERNATIONAL LEAGUE AGAINST EPILEPSY. Proposal for revised classification of epilepsies and epileptic syndromes. **Epilepsia**, v.30, n. 4, p.389-399, 1989.
- COULTER, D. A.; DeLORENZO R. J. Basic mechanisms of *status epilepticus*. **Advances in Neurology**, v.79, p.725-733, 1999.
- COWAN, C. M.; CAVALHEIRO, E. A. Epilepsy and membrane Na⁺ K⁺ ATPase : changes in activity using an experimental model of epilepsy. **Acta Phisiol. Latinoam.**, v. 30, p. 253-258,1980.
- DALY, J. W. Alkaloids from frog skins: selective probes for ion channels and nicotinic receptors. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.28, p.1033-1042, 1995.
- DALY, J. W., HIGHET, R.J., MYERS, C.W. Occurrence of skin alkaloids in non-dendrobatid frogs from Brazil (Bufonidae), Australia (Myobatrachidae) and Madagascar (Mantellinae). **Toxicon**, v.22, n.6, p.905- 919, 1984.
- DALY, J.W., CACERES, J., MONI, R. W., GUSOVSKY, F., MOOS, M., JR., SEAMON, K. B., MILTON, K., MYERS, C. W.. Frog secretions and hunting magic in the upper Amazon: identification of a peptide the interacts with an adenosine receptor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 10960 – 10963, 1992.

- DALY, J.W.; MYERS, C. W.; WHITTAKER, N. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the amphibia. **Toxicon**, v.25, n.10, p.1023-1095, 1987.
- DREIFUSS, F. E. The epilepsies: clinical implications of the international classification. **Epilepsia**, v. 31 (suppl.3) :S3-S19, 1990.
- DUELLMAN, W. E.; TRUEB, L. : Introduction of Amphibia. In: **Biology of amphibians**. New York: McGraw - Hill, 1986.
- DUELLMAN, W. E. Reproductive strategies of frogs. **Sci. Am.**, v. 267, p.80 - 87, 1992.
- ENGEL, J. Jr. Critical evaluation of animal models for localization related epilepsies. Ital. **J. Neurol. Sci**, v.16, p. 9 -16. 1995.
- _____ . New concepts of the epileptic focus. In: WIESER, H.G., SPECKMANN, E.J. Jr., (eds.). **The epileptic focus**. London: Libbey, p. 83 – 94, 1987.
- ERSPAMER, V. , ERSPAMER, G. F., MAZZANTI, G., ENDEAN, R. Active peptides in the skin of one hundred amphibian species from Australia and Papua New Guinea. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 77C, n.1, p. 99 -108, 1984.
- ERSPAMER, V. The opioid peptides of the amphibian skin. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v.10, n.1, p. 3 - 30, 1992.

- ERSPAMER, V., MELCHIORI, P. Active polypeptides: from amphibian skin to gastrointestinal tract and brain of mammals. **Trends Pharmac. Sci.**, v. 1, p.391-395, 1980.
- FEDOROVA, O. V.; DORIS, P. A.; BAGROV, A. Y. Endogenous marinobufagenin-like factor in acute plasma volume expansion. **Clin. Exper. Hypertension**, v.20, n.5/6, p. 581 - 591, 1998.
- FERNANDES, M.J.S.; NAFFAH-MAZZACORATTI, M.G.; CAVALLHEIRO, E.A. Na⁺K⁺ATPase activity in the rat hippocampus: a study in the pilocarpine model of epilepsy. **Neurochem. Int.**, v.28, n.5/6, p. 497-500, 1996.
- FISHER, R. S. Animal models of the epilepsies. **Brain Research Reviews**, v.14, p.245 - 278, 1989.
- FLIER, J., EDWARDS, M. W., DALY, J. W., MYERS, C.W. Widespread occurrence in frogs and toads of skin compounds interacting with the ouabain site of Na⁺, K⁺ ATPase. **Science**, v.208, n. 4443, p. 503-5,1980.
- FLUCHER, B. E., LENGELACHNER - BACHINGER, C., POHLHAMMER, K., ADAM, H., MOLLAY, C. Skin peptides in *Xenopus laevis* : Morphological requirements or precursor processing in developing and regenerating granular skin glands. **J. Cell. Biol.**, v.103, n.6, p.2299 - 2309, 1986.

- FROST, D. R. Amphibian species of the world. A taxonomic and Geographical Reference. Allen Press Inc. and The Association of Systematics collections. Lawrence, Kansas, USA, p. 25, 1985.
- GARDINER, R. M. Genetic basis of the human epilepsies. **Epilepsy Research**, v.36, p.91-95, 1999.
- GLYNN, I. M. Annual review prize lecture all hands to the *sodium pump*. (Lond), **J. Physiol.**, v. 462, p. 1 – 30, 1993.
- GODDARD, G. V. Development of epileptic seizures through brain stimulation at low intensity. **Nature**, v. 204, p.1020 -1021, 1967.
- GODDARD, G. V., McINTYRE, D. C., LEECH, C. K. A permanent change in brain function resulting from diary electrical stimulation. **Exp Neurol**, v. 25, p. 295-330, 1969.
- GONICK, H.C.; DING, Y.; BAGROV, A.Y. Simultaneous measurements of marinobufagin, ouabain, and hypertension-associated protein in various disease states. **Clin. and Exper. Hypertension**, v.20, n.5/6, p. 616-627, 1998.
- GOTO, A.; YAMADA, K.; YAGI, N.; YOSHIOKA, M.; SUGIMOTO, T. Physiology and Pharmacology of endogenous digitalis - like factors. **Pharmacol. Rev.** v. 44: p. 377-399,1992.
- GRISAR, T.; GUILLAUME, D.; DELGADO ESCUETA , A.V. Contribution of Na⁺K⁺ ATPase to focal epilepsy: a brief review. **Epilepsy Research**, v.12, n. 2, p. 141 – 9, 1992.

- GUERREIRO, M. M. & GUERREIRO, C. A. M. Novas drogas antiepilépticas In: COSTA, J. C., PALMINI, A., YACUBIAN, E. M. T. CAVALHEIRO, E. A. (eds.) **Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias. Aspectos clínicos e cirúrgicos.** São Paulo: Lemos Editorial, v. 2, p. 747 – 761, 1998.
- HABERMEHL, G. Exocytosis of toxins in amphibians and fishes. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 710, p.149-152, 1994.
- HITT, M.; ETTINGER, D. D. Toad Toxicity. **The New England Journal of Medicine**, v.314, n.23, p.1517, 1986.
- HONG, Z.; CHAN, K.; YEUNG, H. W. Simultaneous determination of Bufadienolides in the tradicional chinese medicine preparation, Liu-Shen-Wan, by Liquid Chromatography. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.44, p.1023-1026, 1992.
- JACKSON , J. H. *apud* FISHER, R.S. Animal models of the epilepsies. **Brain Research Reviews**, v.14, p.245 - 278, 1989.
- KAMANO, Y., YAMAMOTO, H., HATAYAMA, K., TANAKA, Y., SHINOHARA, M., KOMATSU, M. The isolation and structure of new bufadienolide, resibufagin and the isolation of marinobufagin. **Tetrahedron Letters**, v.54, p.5669-5672, 1968.
- KARALLIEDDE, L. Animal Toxins. **Bristish Journal of Anaesthesia**, v.74, p.319-327, 1995.

- KELLAR, K.J. Epibatidine: Its pharmacological actions and utility for studying neuronal nicotinic receptors. **Neurotransmissions**, v. XI, n.4, 1995.
- KELLY & SMITH. Pharmacological treatment of heart failure. In: **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, Goodman & Gilman's (eds.). Ninth edition. McGraw-Hill Publishing Co., p.809 - 838, 1996.
- KERWIN,R., NAYLOR,R., TRAVIS,M. J., SIMONS,O., MOORE,P.K. As Drogas e o Sistema Nervoso. In: PAGE, C. P. et al. **Farmacologia Integrada**. São Paulo: Manole Ltda, cap. 7, p. 91-151, 1999.
- KRENN, L.; KOPP, B. Bufadienolides from animal plant sources. **Phytochemistry**, v.48, n.1, p.1 - 29, 1998.
- KWAN. T., PAIUSCO, A. D., KOHL, L. Digitalis toxicity caused by toad venom. **Chest**, v.102, p.949 - 950, 1992.
- LAZARUS L.H. ; ATTILA, M. The toad ugly and venomous, wears yet a precious jewel in his skin. **Progress in Neurobiology**, v.41, p.473 - 507, 1993.
- LAZARUS, L.H.; BRYANT, S.D.; ATTILA, M.; SALVADORI, S. Frog skin opioid peptides : a case for environmental mimicry. **Environmental Health Perspectives**, v.102, n.8, p.648 - 654, 1994.

- 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. n.4, p. 511-517, 1990.
- LEITE, J. P. Antiepilépticos In: VALLE, L. B. S., OLIVEIRA, F^o. R. M., DELUCIA, R., OGA, S. **Farmacologia Integrada**, v. 2, p. 119 – 126. São Paulo: Atheneu, 1991.
- LEMOS, T.; CAVALHEIRO, E. A. *Status epilepticus* and the late development of the spontaneous seizures in the pilocarpine model of epilepsy. **Epilepsy Res. Suppl.**, s.12, p.137-144, 1996.
- LICHTSTEIN, D.; KACHALSKY, S.; DEUTCH, J. Identification of a oubain-like compound in toad skin and plasma as a bufodienolide derivate. **Life Science**, v.38, p.1261 - 1270, 1986.
- LINDSAY, S. **High Performance Liquid Chromatography**. London Thames Polytechnic, 1992.
- LOISEAU P ; LOISEAU J. [Epilepsies. Did you say "epilepsy"?] **Rev. Neurol. (Paris)**, v. 155, n. 3, p. 193 - 8, 1999.
- LOOMIS, T. A.; HAYES, A. W. Toxicologic testing Methods. In: **Loomis's Essentials of Toxicology**. 4th ed. , San Diego, California: Academic Press Inc., cap. 13,p. 205-248, 1996.
- LYONS, A. S. ; PETRUCELLI, R. J. **Medicine: an illustrated history**. New York: Abradale Press, 1987.

- MACDONALD, R. L.; MCLEAN, M. J. Anticonvulsant Drugs: mechanisms of action. **Adv. Neurol.**, v. 44, p. 713 – 736, 1986.
- MACDONALD, E., SIRVIO, J. Neurotoxins as tools in lesioning experiments. In: HARVEY, A. (eds.). **Natural and synthetic neurotoxins**, cap. 1, p.1-46, London: Academic Press, 1993.
- MATERSON & ANDERSON *apud* LAZARUS & ATTILA. The toad, ugly and venomous, wears yet a precious jewel in his skin. **Progress in Neurobiology**, v.41, p.473 – 507, 1993.
- MCNAMARA, J. O. Cellular and molecular basis of epilepsy. **The Journal of Neuroscience**, v.14, n.6, p.3413 - 3425, 1994.
- MCNAMARA, J. O. Drugs effective in the therapy of the epilepsies In: GOODMAN & GILMAN'S. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. Ninth edition. Mc Graw - Hill Publishing Co. , p. 461-486, 1996.
- MELDRUM, B. S. Preclinical test systems for evaluation of novel compounds. In: MELDRUM, B. S. & PORTER, R. J. (Eds.) **New anticonvulsant drugs**. London: John Libbey, p. 31 - 48, 1986.
- MELLO, L.E.A.M.; BORTOLOTTI, Z.A.; CAVALHEIRO, E.A. Modelos experimentais de epilepsia: uma revisão. **Neurobiol.**, v.49, n.3, p.231 -268, 1986.
- MELO, A. Drogas antiepilépticas In: SILVA, P. **Farmacologia** 4^a ed., p. 386 – 390, Guanabara- Koogan, Rio de Janeiro, 1994.

- MEYER, K. Cardiotoxic steroids from toads. **Mem. Inst. Butantan**, v.33, p. 433 – 440, 1996.
- MONTEMURRO, D. G.;DUKELOW, R. H., **A stereotaxic Atlas of diencephalon and related structures of the mouse**. Mount Kisco, NY: Futura, 1972.
- NADLER, J.V. Minireview. Kainic acid as a tool for the study of temporal lobe epilepsy. **Life Sci.**, 1981, v. 29, n. 20, p. 2031 – 42, 1981.
- NADLER, J.V; PERRY, B.W.; COTMAN, C. W. Selective reinnervation of hippocampal area CA1 and the fascia dentata after destruction of CA3-CA4 afferents with kainic acid. **Brain Res**. v. 182, p. 1 – 9, 1980.
- NEUWIRTH, M., DALY, J. W., MYERS, C. W., TICE, L. W. Morphology of the granular secretory glands in skin of poison-dart frogs (Dendrobatidae). **Tissue Cell**, v. 11, p.755 - 771, 1979.
- OSUCH, M. V.; CHEN, C. Fate of exogenous marinobufagin-3H in *Bufo marinus*. **Biochemical Pharmacology**, v. 18, p.1803 - 1808, 1969.
- OTANI, A.; PALUMBO , N.; READ, G. Pharmacodynamics and treatment of mammals poisoned by *Bufo marinus* toxin. **Am. J. Vet. Res.**, v.30, n.10, p.1885 -1872, 1969.

- OXBURY, J. M ; WHITTY, W. M. Causes and consequences of *status epilepticus* in adults. **Brain**. v. 94, p. 733-744, 1971.
- PALUMBO, N. E.; PERRI, S.; READ, G. Experimental induction and treatment of toad poisoning in the dog. **JAVMA**, v. 167, n.11, p.1000 - 1005, 1975.
- PAOLA, L. O eletroencefalograma e as epilepsias In: COSTA, J. D., PALMINI, A., YACUBIAN, E. M. T., CAVALHEIRO, E. A. (eds.). **Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias. Aspectos clínicos e cirúrgicos**. Vol. 1. São Paulo: Lemos Editorial, p. 497 – 527, 1998.
- PECHMANN, J.H.K.; SCOTT, D.E.; SEMLITSCH, R.D.; CALDWEL, J.P.; VITT, L.J .; GIBBONS, J.W. Declining amphibian populations: the problem of separating human impacts from natural fluctuations. **Science**, v.253, p.892-895, 1991.
- PERRY, B.D.; BRACIGIRDLE, J. R. Toad poisoning in small animals. **The Veterinary Record**, p. 589-590, 1973.
- PISO, W. *Historia Naturalis Brasiliae*. De Medicina Brasiliensis. São Paulo: Cia. Editora Nacional, 1648 *apud* TOLEDO , R.C.; JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comp. Biochem Physiol.** v.30, p.1 - 37, 1995.

- PORTER, R. J. & MELDRUM, B. S. Drogas Antiepilépticas. In: KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 6ª edição. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara – Koogan, p. 276 – 290, 1998.
- PORTO, A. M.; GROS, E. G. Biosynthesis of the bufadienolide marinobufagin in toads *Bufo paracnemis* from cholesterol -20-14C. **Experientia**, v.27, n.5, p.506, 1971.
- PRASAD, A. N., PRASAD, C., STAFSTROM, C. E. Recent advances in the genetics of epilepsy: insights from human and animal studies. **Epilepsia**, v.40, p.1329-1352, 1999.
- PURPURA, D. P., PENRY, J. K., TOWER, D., WOODBURY, D. M. WALTER, R. **Experimental models of epilepsy**. Raven Press, New York, 1972.
- RACINE, R. J. Modification of seizure activity by electrical Stimulation II. Motor seizure. **Eletroenceph. Clin. Neurophysiol.** v. 32, n. 3, p. 281 - 284, 1972.
- RACINE, R. K., LIVINGSTON, A. J. Effects of procaine hydrochloride, diazepam and diphenylhydantoin on seizures development in cortical and subcortical structures in rats. **Eletroenceph. Clin. Neurophysiol**, v. 38, p. 355 – 365, 1975.
- RALL, T. H.; SCHLEIFER, L. S. Drogas Eficazes no Tratamento das Epilepsias. In: GOODMAN & GILMAN.

As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 8^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.288 – 304, 1991.

- RANG, H. P.; DALE, M. M. **Farmacologia** 2^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, p. 32 – 45; p. 418 – 430, 1994
- RAPPORT , R. L., HARRIS, A. B., FRIEL, P. N., OJEMANN, G. A. Human epileptic brain. **Arch. Neurol.**, v.32, p.549- 554, 1975.
- REYNOLDS, W. F., MAXWELL, A., TELANG, B., BEDAISIE, K., RAMCHARAN, G. Total assignment of the ¹H and ¹³C NMR chemical shifts of four bufadienolides by 2D NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.33, p.412-414, 1995.
- ROSSI, M.H; BLUMENTAL, E.E.A.; JARED, C. Bufadienolides from the venom of *Bufo paracnemis* (Amphibia, Anura, Bufonidae). **Anais Assoc. Bras. Quím.**, v.46, n.1, p.21-26, 1997.
- SANTOS, N. F. **Desenvolvimento do modelo de epilepsia induzido por Pilocarpina em camundongos.** Dissertação de mestrado. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1995.
- SEBBEN, A., SCHWARTZ, C. A., CRUZ, J. S. A Defesa Química dos anfíbios . **Ciência Hoje**, v.15, n.87, p.25 - 35, 1993.
- SHINOKAZI, H. ; KONISHI, S. Actions of several antihelmintics and inseticides on rat cortical neurons. **Brain Res.** v. 24, p. 368 – 71, 1970.

- SILVA, E. A., CHUGANI, D. C., CHUGANI, H. T. PET – Tomografia por emissão de pósitrons: Princípios básicos e aplicações clínicas em Epilepsia. In: COSTA, J. C., PALMINI, A., YACUBIAN, E. M. T., CAVALHEIRO, E. A. (eds.). **Fundamentos Neurobiológicos das Epilepsias. Aspectos clínicos e cirúrgicos**. vol. 1. São Paulo: Lemos Editorial, p. 687 – 703, 1998.
- SLOVITER, R. S. *Status epilepticus* – induced neuronal injury and network reorganization. **Epilepsia**, v.40, Suppl.1, p.34-41, 1999.
- STEBBINS, R. C.; COHEN, N. W. **A Natural History of Amphibians**. New Jersey: Princeton University Press, 1995.
- STEYN, P.S.; VAN HEERDEN, F.R. Bufadienolides of plant and animal origin. **Natural Product Reports**, p.397 - 413, 1998.
- STOLL, A., SUTER, E., KREIS, W., BUSSEMAKER, B.B., HOFMANN, A. Bufadienolides from animal plant sources. **Phytochemistry**, v.48, n.1, p.1-29, 1998.
- STORER, T.I. **Zoologia Geral**. São Paulo: Companhia Nacional, 1985.
- SUTULA, T. P. Experimental models of temporal lobe epilepsy: new insights from the study of kindling and synaptic reorganization. **Epilepsia**, v. 31, suppl.3, p.45 - 54, 1990.

- TOLEDO, R. C., JARED, C. Considerações sobre o veneno dos anfíbios. **Ciência e Cultura**, v.41, n.3, p.250-258, 1989.
- TOLEDO, R. C., JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comp. Biochem. Physiol.** v. 30, p. 1 – 37, 1995.
- TOLEDO, R.C. Breve apreciação sobre a secreção cutânea dos anfíbios. **Ciência e Cultura**, v.38, n.2, p.279 - 284, 1986.
- TOLEDO, R.C.; VILLA, N. Estudo histológico das glândulas tibiais (ou paracnêmicas) do *Bufo paracnemis* (Amphibia, Anura, Bufonidae). **Rev. Bras. Biol.**, v.47, n.3, p.257 - 264, 1987.
- TURSKI, W. A., CAVALHEIRO, E. A., BORTOLOTTI, Z. A., MELLO, L., SCHWARZ, M., TURSKI, L. Seizures produced by pilocarpine in mice: a behavioral, electroencephalographic and morphological analysis. **Brain Research**, v. 321, p.237 - 253, 1984.
- WALKER, M. J. A. Toxinas e Venenos. In: PAGE, C. P. et al. **Farmacologia Integrada**. São Paulo: Manole Ltda, cap. 29, p. 523 -537, 1999.
- YACUBIAN, E. M. T.; PINTO, G. R. S. C. **Arte Poder Epilepsia**. , São Paulo : Lemos Editorial, 1998.

- ZASLOFF, M. Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus skin*: Isolation, characterization of two active forms, and the partial CDNA sequence of a precursor. **Proceedings of National Academy Science of USA**. v.84, n.15, p.5449 – 5453, 1987.

- ZELNIK, R. A natureza química do veneno de sapo. **Ciência e Cultura**, v.17, n.1, p.10 -14, 1965.

- ZELNIK, R., ZITI, L.M., GUIMARÃES, C.V. A chromatographic study of the bufadienolides isolated from the venom of the parotid glands of *Bufo paracnemis*, Lutz 1925. **Journal of Chromatography**, v.15, p. 9 -14, 1964.

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](#)