

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

SAULO FÁBIO RAMOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS
DO NEUROPEPTÍDEO S EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM
PENTILENOTETRAZOL**

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

SAULO FÁBIO RAMOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS BIOQUÍMICOS E COMPORTAMENTAIS
DO NEUROPEPTÍDEO S EM CAMUNDONGOS TRATADOS COM
PENTILENOTETRAZOL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências da
Saúde para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Saúde.

Orientador: Prof^a.Dr^a Vanessa M. de Andrade

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Carina R. Boeck

CRICIÚMA, DEZEMBRO DE 2009

Dedico este trabalho a minha família que tanto a amo.....

AGRADECIMENTOS

Em especial aos meus amores, minha esposa Patrícia e minha filha Maria Eduarda, que nunca deixaram de acreditar em mim.....amo vocês.

Aos meus pais, Saulo (in memorian) e Eva, pelo carinho, educação, valores e pela minha formação como homem.

Aos meus irmãos Sandro, Sander e Samuel pelo incentivo, parceria e amizade.

À minha querida amiga e colega Karla que iniciou ao meu lado nessa caminhada árdua e de futuro promissor....adoro você.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Vanessa e à co-orientadora Prof^a. Dr^a Carina, além da Prof^a.Dr^a. Elaine, pelo carinho, amizade e compreensão....e principalmente pela paciência; por acreditarem que eu era capaz e que contribuíram para meu crescimento profissional.

À bolsista Bruna que estava sempre presente nos dias mais complicados e pela ética frente aos trabalhos com os animais.

Às bolsistas dos laboratórios que de forma direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento da pesquisa, em especial à Daniela Leffa.

Ao corpo docente do programa de mestrado/doutorado – PPGCS pelo ensinamento.

À secretária do PPGCS Francilani Demarch pela educação e pelo belo atendimento aos alunos.

Agradeço, enfim a direção do Hospital Regional de Araranguá por investir e acreditar no meu potencial, em particular a superintendente Rita e diretora de enfermagem Andréa.

**Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado
mas nada pode ser modificado até que seja
enfrentado”**

Albert Einstein

RESUMO

O neuropeptídeo S (NPS) e o seu receptor foram recentemente descobertos no sistema nervoso central e em células periféricas. O NPS promove hiperlocomoção, vigília e ações ansiolíticas quando injetado intracerebroventricularmente em roedores. No presente estudo, NPS foi avaliado dose-dependente (0,01; 0,1 e 1 nmol), verificando seus efeitos em modelo animal de epilepsia. Este modelo de epilepsia, chamado *kindling*, foi induzido por pentilenotetrazol (PTZ) na dose de 60 mg/kg administrado subcutaneamente por 16 dias. O NPS foi injetado 5 minutos antes da última dose de PTZ. Após os procedimentos comportamentais, os animais foram mortos e suas estruturas cerebrais (córtex cerebral e hipocampo) foram removidas. Os parâmetros oxidativos medidos foram: nível de carbonilação de proteínas, peroxidação de lipídeos e dano ao DNA (teste cometa). O NPS na maior dose aumentou a duração das convulsões sem modificar a frequência e a latência das convulsões. Porém, todas as doses de NPS protegeram contra o dano oxidativo em proteínas e lipídeos induzido pelo PTZ. Por outro lado, 1 nmol de NPS associada com PTZ induziu um aumento no dano ao DNA. Os resultados apresentados aqui sugerem que NPS na maior dose contribui para o dano ao DNA, provavelmente via outros sistemas de neurotransmissores que deveriam ser investigados.

Key-words: pentilenotetrazol; *kindling*; neuropeptídeo S; estresse oxidativo; dano ao DNA.

ABSTRACT

Neuropeptide S (NPS) and its receptor were recently discovered in both the central nervous system and in the periphery. The NPS promotes hyperlocomotion, wakefulness and anxiolytic action when injected intracerebroventricularly in rodents. In the present work NPS was tested in dose-dependent (0.01, 0.1 and 1 nmol) observing its effects in mice model of epilepsy. This model (kindling) of epilepsy was induced by pentylenetetrazol (PTZ) at a dose 60 mg/kg (subcutaneously) for 16 days. NPS was injected 5 min before the last dose of PTZ. After behavioral procedures, animals were killed and their brain structures were removed (cerebral cortex and hippocampus). Oxidative parameters were measured in levels of carbonyl proteins, lipid peroxidation and DNA damage (comet assay). NPS in a higher dose increase the duration of seizures without modify frequency and latency of seizure. However, all doses of NPS protected against NPS-induced oxidative damage in proteins and lipids. On the other hand, NPS 1 nmol associate with PTZ induced increased DNA damage. The present results suggest that NPS in higher dose contribute to DNA damage, probably via other neurotransmitters systems that should be investigated.

Key-words: Pentylenetetrazol; kindling; Neuropeptide S; oxidative stress; DNA damage

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPC - monofosfato de adenosina cíclica

AMPH - D-Anfetamina

AVE – acidente vascular encefálico

AMPA - ácido alfa-amino-3-hidróxido-5-metil-4 isoxazole propionico

DAE - droga antiepilética

DNA - ácido desoxirribonucleico

ERK – proteína quinase regulada por sinal extracelular

ERO – espécies reativa de oxigênio

GABA - ácido γ -aminobutírico

GAD - ácido glutâmico-descarboxilase

$H_2O_2^-$ - peróxido de hidrogênio

HO^\bullet - radical hidroxil

ICV - intracerebroventricular

MDA - malondialdeído

NMDA N-metil-D-aspartato

NPSR - neuroprotetor S receptor

NPS – neuroprotetor S

$O_2^\bullet-$ - superóxido

PTZ – pentilenotetrazol

SNC – sistema nervoso central

RNA – ácido ribonucleico

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro

TBARS - ácido tiobarbitúrico

TCE – traumatismo Crânio encefálico

SUMÁRIO

PARTE I

INTRODUÇÃO	10
1 Epilepsia.....	10
1.1 Bioquímica da Epilepsia	12
1.2 Um modelo animal de epilepsia: PTZ-Kindling.....	13
1.3 Epilepsia e Estresse Oxidativo	14
1.4 Metodologia utilizada para análise de dano oxidativo	17
1.4.1 Lipoperoxidação	17
1.4.2 Oxidação de proteínas	18
1.4.3 Ensaio Cometa para análise de dano em DNA	18
1.5 Neuropeptídeo S	19
OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.1 Objetivos Específicos	22
PARTE II	
ARTIGO CIENTÍFICO: Evaluation of biochemical and behavioral effects of neuropeptide S in mice treated with pentylenetetrazole	24
PARTE III	
DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS	56

PARTE I

INTRODUÇÃO

1 EPILEPSIA

Traumatismo crânio-encefálico (TCE), acidente vascular encefálico (AVE), doenças neurodegenerativas e epilepsia acometem milhares de indivíduos anualmente. Estas patologias causam dano neuronal e morte tecidual, deixando seqüelas tanto de ordem motora, quanto cognitiva e emocional (Purves, 2004).

A epilepsia é um dos principais transtornos neurológicos com ampla distribuição. Chega a afetar cerca de 0,5-1% da população mundial tendo uma incidência cumulativa para toda a vida em cerca de 3-4% (Browne & Holmes, 2001), onde estima-se que mais de 50 milhões de pessoas no mundo apresentem algum tipo desse transtorno.

Ela é uma desordem neurológica crônica comum e caracterizada por crises convulsivas recorrentes não provocadas. Episódios únicos de crise generalizada podem ocorrer num indivíduo normal, e não caracterizam a epilepsia, uma vez que reações como estresse fisiológico, privação do sono, efeito do álcool ou drogas ou ainda, traumatismo cranioencefálico podem ser responsáveis por esses eventos. Além disso, processos infecciosos, tóxicos ou metabólicos podem originar crises epiléticas recidivantes e limitadas, em indivíduos com um limiar reduzido, hereditário, sem síndrome epilética (Löscher & Schmidt, 2002).

Uma porcentagem dos indivíduos acometidos por lesões adquiridas no tecido cerebral, como traumatismo cranioencefálico ou acidente vascular, desenvolverá epilepsia após certo período de tempo. Nesses casos, admite-se que a lesão induz uma reorganização dos circuitos cerebrais que, com o tempo, transforma-se em um

foco gerador de descargas epiléticas. Esse processo através do qual um cérebro previamente assintomático torna-se capaz de gerar crises epiléticas espontâneas é denominado epileptogênese (Cavalheiro et al., 1991).

De acordo com a classificação, as epilepsias caracterizam-se por alterações crônicas, recorrentes e paroxísticas na função das áreas corticais e subcorticais envolvidas (Costa et al., 1992). As manifestações das crises epiléticas refletem a função da área envolvida e muitas formas de epilepsia podem incluir distúrbios de cognição ou consciência, movimentos involuntários, automatismos de comportamento ou manifestações autonômicas, sensoriais e psíquicas (Shneker & Fountain, 2003).

O evento mais dramático de alguns quadros de epilepsia é a crise epilética, estando associada à atividade hipersincrônica e repetitiva de um grupamento neuronal do córtex cerebral e estruturas hipocâmpais, cuja distribuição anatômica e duração de sua atividade determinam a natureza da crise (Avanzini & Franceschetti, 2002).

A maioria dos doentes com epilepsia tem um bom prognóstico e suas crises são bem controladas por uma única droga antiepilética (DAE), mas até 40% desenvolvem epilepsia refratária, especialmente aqueles com crises parciais (Duncan et al., 2006) e existe um grupo significativo de doentes (20-30%) resistente a agentes terapêuticos atualmente disponíveis (Morimoto et al., 2004).

A incidência de convulsões é muito alta no primeiro ano de vida, diminuindo na infância e adolescência (Grünwald, 2002). O cérebro imaturo difere do cérebro adulto em resposta as drogas antiepiléticas convencionais, podendo ser refratário a drogas antiepiléticas que são potentes anticonvulsivantes em adultos. Muitas destas drogas, como a fenitoína, o fenobarbital, o diazepam, entre outras, causam

neurodegeneração apoptótica difundida em cérebros de ratos, durante o período de crescimento (Bittigau et al.,2003). Portanto o desenvolvimento de anticonvulsivantes e seus mecanismos de ação e efeitos menos nocivos têm sido considerados de grande interesse (White, 1997; Schmidt & Rogawski 2002; Wolfgang, 2005).

As atuais DAEs foram desenvolvidas com base na sua capacidade de proteger contra ataques em modelos animais. A sua utilidade na redução da incidência de convulsão em muitos pacientes com epilepsia é inquestionável. No entanto, não há provas de que alguns dos atuais medicamentos proporcionam uma cura ou melhora do curso da doença (Schmidt, 2002).

Apesar do importante progresso na compreensão das crises epiléticas nas últimas décadas, as bases celulares das epilepsias no homem permanecem ainda desconhecidas (Löscher & Schmidt, 2002).

1.1 Bioquímica da Epilepsia

A atividade epilética baseia-se na quebra do equilíbrio inibitório-excitatório no tecido cerebral (Mody, 1999). Pesquisas nos mecanismos de epilepsia têm sido focadas nas mudanças na atividade de aminoácidos inibitórios (ácido γ -aminobutírico - GABA) e excitatórios (glutamato e aspartato) (Szyndler et al., 2006).

O GABA é sintetizado pela descarboxilação do glutamato em um passo único catalisado pela enzima ácido glutâmico-descarboxilase (GAD). A maior parte da captação do mesmo ocorre nas células gliais. O desvio do GABA para as células gliais produz glutamato, que é convertido em glutamina e transportado das células gliais para os neurônios, onde é convertido novamente em glutamato. A glutamina, portanto, serve como uma fonte de glutamato entre as células no SNC (Smith et al., 2007). Em alguns estudos foi observada uma elevação nos níveis de glutamato no

hipocampo durante ou após ataques epiléticos em humanos, bem como em ratos (Szyndler et al., 2006). Além disso, uma diminuição da função dos receptores GABA foi observada tanto *in vitro* quanto *in vivo* em modelos de convulsão, como bem na epilepsia clínica (Groves et al., 2006).

Adicionalmente, alterações nas funções GABAérgicas têm sido relatadas em ratos geneticamente propensos à epilepsia, bem como no modelo de epilepsia com o pentilenotetrazol (PTZ) (Sejima, 1997; Li et al., 2000). De fato, drogas que bloqueiam os receptores (GABA_A) são convulsivantes muito potentes, como é o caso do pentilenotetrazol e da picrotoxina. Enquanto que algumas classes de fármacos anticonvulsivantes tendem a refrear a excitabilidade neuronal ao prolongar as ações inibitórias do GABA, como por exemplo, os barbitúricos e benzodiazepinas, outras diminuem a tendência de certos neurônios dispararem potenciais de ação de alta frequência como, por exemplo, a fenitoína e carbamazepina (Bear et al., 2006).

1.2 Um modelo animal de epilepsia: PTZ-Kindling

Vários modelos *in vivo* de epilepsia têm sido desenvolvidos tanto em moscas quanto em mamíferos, incluindo camundongos, ratos e primatas. Entender os mecanismos celulares da epileptogênese em termos moleculares pode ajudar a identificar alvos moleculares para os quais pequenas moléculas terapêuticas podem ser desenvolvidas para prevenir a epilepsia em indivíduos de alto risco (McNamara et al., 2006).

O modelo de kindling tem se tornado uma técnica amplamente empregada para o estudo dos mecanismos de crises convulsivas e considerado um útil modelo experimental para o estudo da epilepsia em humanos (Gupta et al., 2003). Ele caracteriza-se por administrações repetidas de estímulos subconvulsivantes elétricos

ou químicos, resultando em progressiva intensificação das atividades convulsivas, as quais culminam em convulsões generalizadas (Pavlova et al., 2006). O modelo de kindling induzido pelo pentilenotetrazol (PTZ) se refere ao fenômeno no qual injeções repetidas deste convulsivante causam o desenvolvimento gradual de convulsões culminando em crises tônico-clônicas generalizadas associadas com déficit cognitivo (Becker et al., 1992).

O PTZ é uma das principais substâncias indutoras de convulsão utilizadas na triagem pré-clínica de novos fármacos anticonvulsivantes (Löscher & Schmidt, 2002) podendo ser utilizado como modelo de crise generalizada dos tipos ausência, mioclônicas e de crises tônico-clônicas (Oliveira et al., 2001).

A indução química de convulsão por PTZ é o mais popular modelo de convulsão induzido farmacologicamente (Brum & Elisabetsky 2000; Pavlova et al., 2006). A capacidade do PTZ em suscitar convulsões e, correspondentemente, induzir um estado convulsivo, começa com a sua influência na liberação e ação pós-sináptica do GABA. Uma consequência disso parece ser a liberação de uma multiplicidade de mecanismos sinápticos mediados pela ativação de três principais receptores ionotrópicos do glutamato (NMDA – N-metil-D-aspartato, AMPA- (ácido alfa-amino-3-hidróxido-5-metil-4 isoxazole propionico e cainato) (Dhir et al., 2005; Lukomskaya et al., 2007). Além disso, estudos têm demonstrado que o tratamento com o PTZ, uma droga de ação convulsivante, produz dano neuronal em nível de DNA, proteínas e lipídios (Ilhan et al., 2004, Akbas, et al., 2005; Guzman et al., 2005; Oliveira et al., 2008).

1.3 Epilepsia e Estresse Oxidativo

Sob condições fisiológicas normais, a maioria das espécies reativas de

oxigênio (ERO ou ROS: “reactive oxygen species”) é produzida na cadeia respiratória mitocondrial, onde 90 a 95% do oxigênio consumido é reduzido à água. Por definição, segundo Halliwell e Gutteridge (2007), radicais livres são moléculas ou fragmentos moleculares reativos que contém um elétron não pareado em seu orbital mais externo. Tendem a retirar elétrons de outras moléculas para alcançar um estado quimicamente mais estável.

Estudos sobre estresse oxidativo realizados com animais experimentais e seres humanos demonstraram que o aumento na atividade metabólica favorece a ocorrência de lesões oxidativas em biomoléculas (Benzi & Moretti 1995).

Estresse oxidativo envolve aumento na formação de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (HO^{\bullet}), dentre outros, genericamente denominados de espécies reativas de O_2 (EROs), em detrimento das defesas antioxidantes químicas e enzimáticas disponíveis (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Entretanto quando as espécies reativas são produzidas em altas concentrações, ou quando as defesas antioxidantes são deficientes, elas podem causar prejuízo na função celular, apoptose e necrose, caracterizando o “estresse oxidativo” (Bergendi et al., 1999).

As espécies reativas de oxigênio são capazes de gerar estresse oxidativo em consequência de suas propriedades oxidantes e reação com os constituintes celulares. Estas são geradas por uma variedade de processos, podendo atacar uma diversidade de biomoléculas alvo, tais como, DNA, lipídeos e proteínas. O cérebro é o alvo preferencial do processo peroxidativo, pois contém uma alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados, sendo que os lipídios de membrana, além das proteínas celulares, DNA e RNA são alvos suscetíveis ao dano oxidativo (Halliwell & Gutteridge, 2007). Em modelos epiléticos em roedores, mostrou-se que o estresse

oxidativo contribui em grande parte para a morte de células neuronais e gliais (Arnaiz et al., 1998). A prolongada excitação dos neurônios durante as convulsões pode levar a injúria e morte celular, resultante de mecanismos bioquímicos desconhecidos e que não são ainda bem entendidos. Um plausível mecanismo de injúria celular envolve a formação de uma quantidade excessiva de radicais livres levando as alterações estruturais em proteínas celulares, membranas lipídicas, DNA e RNA (estresse oxidativo) (Benzi & Moretti, 1995).

Gupta e colaboradores (2003) encontraram um aumento nos níveis de malondialdeído (MDA), um marcador de peroxidação lipídica, indicando um aumento na geração de radicais livres em ratos tratados com PTZ como modelo de epilepsia. Eles demonstraram também uma significativa diminuição nos níveis de glutathione reduzida. A glutathione é um antioxidante endógeno presente principalmente na forma reduzida dentro das células. Ela reage com os radicais livres e previne a geração de radicais hidroxila, uma das formas mais tóxicas de radicais livres. Durante este processo defensivo, a glutathione reduzida é convertida em sua forma oxidada, com a ajuda da enzima glutathione peroxidase. Dessa forma a diminuição nos níveis de glutathione reduzida observada neste estudo, indica que houve um aumento na geração de radicais livres.

Outro estudo feito por Oliveira e colaboradores (2008), investigou o efeito do gama-decanolactona no modelo de PTZ-kindling e foi demonstrado um aumento nos danos em DNA do tecido cerebral de ratos tratados com PTZ como modelo de epilepsia. Este resultado foi observado somente após 6 tratamentos com o PTZ, não sendo visto após uma única dose, indicando que os danos em células cerebrais foram uma consequência das convulsões, que foram induzidas pelo contínuo tratamento com o PTZ (6 doses). Altas liberações de neurotransmissores e

aumentada excitabilidade neuronal no modelo de epilepsia induzido pelo PTZ provavelmente induzem injúria celulares no cérebro, aumentando as quebras no DNA.

Em outro estudo, Akbas et al. (2005) examinaram os efeitos da epilepsia induzida por PTZ na peroxidação lipídica e atividade das enzimas antioxidantes em eritrócitos e fígado de ratos Wistar. Eles mostraram que a administração de PTZ em uma dose de 50 mg/kg i.p produziu um significativo aumento da peroxidação lipídica, expresso através da elevação dos níveis de TBARS (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico), e uma diminuição da atividade antioxidante em eritrócitos e no tecido hepático de camundongos indicando um elevado estresse oxidativo. Estes resultados estão em conformidade com estudos anteriores que demonstraram haver aumento na peroxidação de lipídios no cérebro e eritrócitos de ratos e de humanos durante crises de epilepsia (Singh & Pathak,1990; Sudha et al., 2001; Gupta et al., 2003).

1.4 Metodologias utilizadas para análise de dano oxidativo

1.4.1 Lipoperoxidação

Grande parte das membranas é formada por lipídios insaturados e proteínas e são particularmente vulneráveis ao ataque oxidativo. Esses lipídios poliinsaturados reagem com as espécies reativas formando hidroperóxido de lipídio (Halliwell & Gutteridge, 2007). A peroxidação lípidica que será avaliada neste estudo pelo teste TBARS, teste este realizado por espectrofotometria ou por fluorometria, identifica um produto (cromóforo) resultante da reação de duas moléculas de ácido tio-barbitúrico (TBA) com uma de MDA, mas pode também reagir com outras substâncias como a

desoxirribose, as prostaglandinas e outros aldeídos, que não o MDA (Gutteridge et al., 1990; Watson BD, 1993).

1.4.2 Oxidação de proteínas

A determinação do grupo carbonil nas proteínas oxidadas tem se tornados um dos métodos bioquímicos mais utilizados na investigação do dano oxidativo protéico. As proteínas de membrana podem sofrer modificações de grupo tióis e nitrosilação de grupos fenólicos acarretando na fragmentação na cadeia polipeptídica (Praticó & Delanty, 2000). A oxidação de proteínas, um dos marcadores de estresse oxidativo no cérebro, está aumentada na neurodegeneração relacionada à idade, ou em modelos experimentais como doença de Alzheimer, Huntington e Parkinson (Butterfield & Kanski, 2001), assim como modelos de convulsão induzida por PTZ (Oliveira, 2004).

1.4.3 Ensaio Cometa para análise de dano em DNA

O ensaio cometa ou “single cell gel electrophoresis” (SCGE) é um teste rápido, sensível e relativamente simples para a detecção de danos em nível DNA (Singh et al., 1988).

A metodologia do teste consiste, inicialmente, na disposição de uma suspensão de células embebidas em gel de agarose sobre a superfície de uma lâmina. Em seguida, as lâminas são transferidas para uma solução com alta concentração de sais e detergentes a fim de lisar as células, removendo o seu conteúdo citoplasmático e membrana nuclear. Posteriormente, as lâminas são imersas em um tampão de pH variável de acordo com a versão do teste empregado (neutra ou alcalina). Tal processo visa o desenovelamento das cadeias de DNA, pelo

rompimento das estruturas secundária e terciária presentes no núcleo celular. Imediatamente ao desenovelamento, as lâminas são submetidas a uma corrente elétrica de modo a induzir a migração para fora do núcleo dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras. Finalmente as lâminas são coradas através do emprego de substâncias capazes de se associar ao DNA, como agentes intercalantes (p. ex., brometo de etídio) ou redutores como o nitrato de prata. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano reconhecível no DNA. Por outro lado, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, como de um cometa, formada pelos fragmentos de DNA (Tice et al., 2000).

1.5 Neuropeptídeo S

Em 2002, um estudo relatou a descoberta de um novo neuropeptídeo bioativo, o neuropeptídeo S (NPS) (Sato et al., 2002). O NPS é um peptídeo constituído de 20 aminoácidos com uma seqüência preliminar de SFRNGVGTGMRRTSFQRARS, que é altamente conservada entre vertebrados, sendo expresso em anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Reinscheid et al., 2005). Convém destacar que em todas as espécies em que o NPS é expresso, o aminoácido serina está sempre presente na porção amino-terminal, sendo este o motivo do nome que foi atribuído a este peptídeo (Reinscheid et al., 2005). O receptor no qual se liga NPS é um receptor acoplado à proteína G, denominado de receptor NPS (NPSR) (Xu et al., 2004).

Com o uso da técnica de hibridação *in situ* foram reconhecidos os locais de expressão do NPS e do seu receptor NPSR no cérebro e nos tecidos periféricos de camundongos (Xu et al., 2004). O RNAm do NPSR se expressa principalmente em

áreas do sistema límbico envolvidas com a modulação da ansiedade (complexo amigdalóide e hipotálamo), ciclo sono-vigília (tálamo, hipotálamo e núcleo pré-óptico), memória (regiões para-hipocampais e córtex etorrinal) e em menor intensidade em áreas envolvidas no controle motor (gânglios da base) (Xu et al., 2007).

Já o precursor do peptídeo NPS encontra-se expresso no SNC em uma área mais restrita comparado ao seu receptor NPSR, limitando-se praticamente ao lócus ceruleus, hipotálamo e amígdala. Nos tecidos periféricos, tanto NPS quanto o seu receptor NPSR, encontra-se expresso principalmente nas glândulas tireóide, mamárias, salivares e nos testículos (Xu et al., 2004).

Apesar do NPS ter sido descoberto em 2002 (Sato et al., 2002), somente em 2004 foi publicado o primeiro estudo que avaliou as ações biológicas produzidas por este peptídeo (Xu et al., 2004). Neste estudo mostrou-se que o NPS aumenta a mobilização de Ca^{+2} em células HEK que expressam o receptor NPSR humano, além de produzir aumento dos níveis intracelulares de AMPc (monofosfato de adenosina cíclica) e estimular a fosforilação de proteínas quinases ativadas por mitógeno, como as proteínas ERK1/2 (Xu et al., 2004; Reinscheid et al., 2005).

In vivo, o NPS injetado em doses nanomolares no ventrículo lateral estimula a atividade locomotora espontânea em camundongos e ratos (Xu et al., 2004; Roth et al., 2006; Smith et al., 2006; Rizzi et al., 2008). Além disso, o NPS produz um comportamento do tipo ansiolítico em camundongos exposto a diferentes modelos animais de ansiedade, tais como o labirinto em cruz elevado, o teste de caixa claro-escuro, o teste de esconder as bolinhas e o teste da hipertermia induzida pelo estresse (Xu et al., 2004; Rizzi et al., 2008; Leonard et al., 2008). Estes dados comportamentais indicam que o NPS pode produzir excitação ao mesmo tempo em

que alivia as respostas de ansiedade provocadas por ambientes estressantes ou não familiares (Reinscheid & Xu, 2005a). Estudos demonstram também que o NPS pode suprimir todos os estágios do sono e aumentar o estado de vigília em camundongos, indicando que o NPS pode estar envolvido na indução e manutenção do estado de vigília (Reinscheid et al., 2005c). Além disso, foi mostrado que o NPS injetado intracerebroventricularmente (i.c.v) causa um efeito inibitório na ingestão de alimentos em ratos saciados e privados de alimentos, sugerindo que o NPS pode ser um novo agente anorexígeno quando injetado centralmente (Beck et al., 2005; Smith et al., 2006).

Recentemente, Castro e colaboradores (2008) indicaram que o tratamento agudo com NPS reduziu o dano oxidativo produzido pela administração i.c.v. em camundongos. Neste estudo, os autores avaliaram os efeitos comportamentais e bioquímicos produzidos pelo tratamento com NPS e anfetamina e observaram que, apesar das semelhanças comportamentais existentes entre o NPS e a AMPH (D-Anfetamina), o NPS reduziu o dano oxidativo em lipídeos e proteínas no cérebro, enquanto a AMPH causou discreta elevação nos marcadores de dano oxidativo analisados. Além disso, estes achados apontam para um papel relevante desempenhado por este novo sistema peptidérgico na proteção contra o dano tecidual e, sugerem que estudos posteriores são requeridos a fim de se investigar os mecanismos neuronais que medeiam este possível efeito neuroprotetor do NPS.

Neste contexto, o presente estudo visa avaliar os efeitos do NPS em camundongos submetidos a um modelo animal de convulsão induzida por PTZ, a fim de investigar se o tratamento com NPS pode alterar as respostas comportamentais e bioquímicas produzidas pelo tratamento com PTZ. Para atingir tal objetivo serão avaliados os efeitos do NPS sobre os danos a macromoléculas, como proteínas,

lipídeos e DNA, produzidos pelo tratamento com PTZ em estruturas cerebrais de camundongos. Para tanto, os efeitos do pré-tratamento com NPS sob os marcadores de dano oxidativo, como TBARS, carbonilação de proteínas e sobre a fragmentação do DNA serão avaliados neste estudo.

OBJETIVO

Objetivo Geral

Este estudo tem por objetivo avaliar os efeitos comportamentais e bioquímicos do neuropeptídeo S em camundongos tratados com PTZ.

Objetivos Específicos

- a) Investigar o efeito comportamental do tratamento profilático com NPS em camundongos submetidos à convulsão induzida por PTZ;
- b) Avaliar o efeito do tratamento com o NPS nos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico presentes no cérebro de camundongos submetidos à convulsão induzida por PTZ;
- c) Averiguar o efeito do tratamento com o NPS nos níveis de proteínas carboniladas presentes no cérebro de camundongos submetidos à convulsão induzida por PTZ;
- d) Investigar o efeito do tratamento com o NPS sobre o dano no DNA de células neuronais de camundongos submetidos à convulsão induzida por PTZ.

PARTE II

ARTIGO CIENTÍFICO

Evaluation of biochemical and behavioral effects of neuropeptide S in mice treated with pentylentetrazole

Ramos, S.F¹,.; Mendonça, B. P².; Leffa, D. D¹.; Damiani, A¹.; Hainzenreder, G¹.; Felisberto, F³.; Petronilho, F³.; Dal-Pizzol, F³.; Calo', G.; Guerrini, R⁴.; Gavioli, E.C⁵.; Boeck, C. R²., Andrade, V. M¹.

A ser enviado para a revista Epilepsy Research

Evaluation of biochemical and behavioral effects of neuropeptide S in mice treated
with pentylentetrazole

Ramos, S.F^a, Mendonça, B. P^b, Leffa, D. D^a, Damiani, A^a, Hainzenreder, G^a, Felisberto, F^c, Petronilho, F^c, Dal-Pizzol, F^c, Calo', G^d, Guerrini, R^d, Boeck, C. R^b, Pacheco, R^b, Gavioli, E.C^e, Andrade, V. M^a.

¹ Laboratório de Imunologia e Mutagênese - LABIM, Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) – Criciúma, SC – Brasil.

² Laboratório de Neurociências, PPGCS, UNESC.

³ Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, SC, Brasil;

⁴ Department of Experimental and Clinical Medicine, Section of Pharmacology, and Neuroscience Center, University of Ferrara, and National Institute of Neuroscience, Italy; Department of Pharmaceutical Science and Biotechnology Center, University of Ferrara, Ferrara, Italy..

⁵ Departamento de Farmacologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Brasil

Autor Correspondente:

Prof. Vanessa Moraes de Andrade, M.D., Ph.D.

Laboratório de Imunologia e Mutagênese– PPGCS - UNASAU

Universidade do Extremo Sul Catarinense

88806-000, Criciúma, SC, Brazil

Phone: + 55 48 3431 2758

E-mail: vmoraesdeandrade@yahoo.com.br

ABSTRACT

Neuropeptide S (NPS) and its receptor were recently discovered in both the central nervous system and in the periphery. The NPS promotes hyperlocomotion, wakefulness and anxiolytic action when injected intracerebroventricularly in rodents. In the present work NPS was tested in dose-dependent (0.01, 0.1 and 1 nmol) observing its effects in mice model of epilepsy. This model (kindling) of epilepsy was induced by pentylenetetrazol (PTZ) at a dose 60 mg/kg (subcutaneously) for 16 days. NPS was injected 5 min before the last dose of PTZ. After behavioral procedures, animals were killed and their brain structures were removed (cerebral cortex and hippocampus). Oxidative parameters were measured in levels of carbonyl proteins, lipid peroxidation and DNA damage (comet assay). NPS in a higher dose increase the duration of seizures without modify frequency and latency of seizure. However, all doses of NPS protected against NPS-induced oxidative damage in proteins and lipids. On the other hand, NPS 1 nmol associate with PTZ induced increased DNA damage. The present results suggest that NPS in higher dose contribute to DNA damage, probably via other neurotransmitters systems that should be investigated.

Key-words: Pentylenetetrazol; kindling; Neuropeptide S; oxidative stress; DNA damage

INTRODUCTION

Epilepsy is one of the most common neurological disorders, with wide distribution, affecting approximately 0.5-1% in the general population, with a cumulative incidence for life by about 3-4% (Browne & Holmes, 2001) where it is estimated that more than 50 million people around the world show some form of this disorder.

Generalized epilepsy is a chronic disorder characterized by recurrent seizures. Some reports are available concerning free radicals and mitochondrial dysfunction both as a consequence and as a cause of epileptic seizures (Erakovic et al., 2003; Gupta et al., 2003; Patel, 2004). Brain is susceptible to free radical damage, considering the large lipid content of myelin sheaths and the high rate of brain oxidative metabolism (Choi, 1993). Free radical generation can induce seizure activity by direct inactivation of glutamine synthase thereby permitting an abnormal build-up of excitatory neurotransmitter glutamic acid (Sudha et al 2001). The onset of oxygen-induced convulsion in animal is correlated with a decrease in the cerebral content of neurotransmitter GABA because of the inhibition of enzyme glutamate decarboxylase by oxygen free radicals (Halliwell and Gutteridge, 2007).

Additionally, changes in GABAergic function have been reported in mice genetically prone to epilepsy, as well as the model of epilepsy with pentylenetetrazol (PTZ) (Sejima., 1997, Li et al., 2000). The kindling model has become a widely employed technique for studying seizure mechanisms and considered to be a useful experimental model for human epilepsy (Mason & Cooper, 1972). PTZ-kindling is an acknowledged model for epilepsy and refers to a phenomenon in which repeated injection of a convulsant causes gradual seizure development culminating in

generalized tonic–clonic seizures associated with a cognitive deficit (Becker et al., 1992).

The ability of PTZ to elicit convulsions, and correspondingly to induce a state of kindling, begins with its influence on the release and postsynaptic action of GABA. Studies have shown that treatment with PTZ produces neuronal damage at the level of DNA, proteins and lipids (Ilhan et al., 2004, Akbas, et al., 2005, Guzman et al., 2005; Oliveira et al., 2008).

Each year, 125,000 new cases of epilepsy are diagnosed but only 70% of patients are effectively treated with currently available antiepileptic drugs (AEDs). For a substantial number of patients, the currently available therapies are often not effective in controlling their symptoms. As such, there is a substantial need for more effective therapies (White et al., 2009). Neuropeptides are potent modulators of neuronal excitability (Hokfelt et al., 2000; Baraben & Tallet, 2004). Under ambient conditions, peptides are “silent” and exert little effect on normal neurotransmission. However, under conditions of excessively high neuronal firing (i.e., epileptic seizures), neuropeptides are released and exert a modulatory effect on neurotransmission.

Neuropeptide S (NPS) is a 20 amino-acid peptide recently identified in the brain and peripheral tissues of distinct species of vertebrates. NPS is the endogenous ligand of a G protein-coupled receptor named NPS receptor (NPSR) (Xu et al., 2004).

In 2004, Xu and colleagues reported, for the first time, that the intracerebroventricular (ICV) injection of NPS, at nmol doses, produces hyperlocomotion, reduces anxiety-like behaviors and increases wakeful states in rodents. Subsequently, distinct laboratories have also demonstrated that the acute

administration of NPS increases locomotion in rats and mice both naïve or habituated to the test chamber (Smith et al., 2006; Roth et al., 2006; Rizzi et al., 2008; Leonard et al., 2008). Recently, several *in vivo* studies have demonstrated the role played by NPS-NPSR system in the control of distinct central functions including wakefulness (Xu et al., 2004), anxiety (Xu et al., 2004; Leonard et al., 2008; Rizzi et al., 2008), drug abuse (Ciccocioppo et al., 2007; Paneda et al., 2007), and also food intake (Beck et al., 2005; Smith et al., 2006; Ciccocioppo et al., 2006; Niimi, 2006; Cline et al., 2007; Cline et al., 2008).

Recently, Castro & colleagues (2008) indicated that acute treatment with NPS reduced oxidative damage produced by i.c.v administration of amphetamine in mice. In this study, the authors evaluated the biochemical and behavioral effects produced by treatment with NPS and amphetamine and found that, despite the behavioral similarities between the NPS and AMPH (D-Amphetamine), NPS reduced oxidative damage in lipids and proteins in the brain while AMPH caused a slight elevation in markers of oxidative damage analyzed. Furthermore, these findings point to a role played by this new peptidergic system in the protection against tissue damage and suggest that further studies are required in order to investigate the neural mechanisms that mediate the possible neuroprotective effect of the NPS.

In this context, this study aims to evaluate the effects of NPS in mice undergoing an animal model of seizures induced by PTZ in order to investigate whether treatment with NPS may alter the biochemical and behavioral responses produced by treatment with PTZ. To achieve this goal will be assessed the effects of NPS on the damage to macromolecules such as proteins, lipids and DNA, induced by treatment with PTZ in brain structures of mice.

MATERIALS AND METHODS

1. *Animals*

Male CF-1 mice (2-3 months, 45 - 55g) were obtained from our breeding colony (UNESC). For this study were used 15 animals divided in 8 treatment groups. The animals were housed six per cage with food and water available *ad libitum* and were maintained on a 12-h light/ dark cycle (lights on at 7:00 am). Each animal was used only once. All experimental procedures involving animals were performed in accordance with the National Institute of Health's Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior (SBNeC) recommendations for animal care. This study was approved by the local ethics committee (Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Extremo Sul Catarinense) under protocol number 332/2008.

2. *Drugs and pharmacological procedures*

The drugs used in this study are human NPS (hNPS) donated by Prof. G. Calo' at the Università di Ferrara (Italy) and pentylenetetrazole (Sigma-Aldrich). The PTZ was dissolved in saline and injected subcutaneous (s.c) in a volume of 0.1 mL/10g at a dose of 60 mg/kg (Oliveira et al., 2008). The NPS will be dissolved in saline and stored in siliconized Eppendorf tubes and stored in a freezer at -20 °C and only a few minutes before using these solutions are diluted to the desired concentration using saline.

3. Intracerebroventricular administration of NPS in mice

NPS (1, 0.1 and 0.01 nmol) was intracerebroventricular (ICV) injected 30 min prior to the last convulsions displayed by animals. ICV injections (2 μ L per mouse) were given as described by Laursen & Belknap (1986) and previously adopted in our studies (Gavioli et al., 2003; Castro et al., 2008). Briefly, under light ether anesthesia (just sufficient for losing the righting reflex), a 27-gauge needle attached to a 10 mL Hamilton syringe was inserted perpendicularly 3 mm deep through the skull, into the left ventricle, at a position 2 mm lateral from the midline on the line drawn through the anterior base of the ears.

4. Treatments

The treatment protocol is based on the study of Oliveira et al. (2008) (Fig.1). The animals were divided in eighth groups that received PTZ or Saline solution (NaCl 0.9 %) by s.c. injections once every third day, in a total of six treatments (16 days). Injections were given between 7 and 11 a.m. In the last day of treatment, 30 min before the injection of PTZ or saline, animals received ICV administration of the following treatment according to each initial subdivision groups: (Group I) saline + saline, (Group II) saline + NPS 0.01nmol, (Group III) saline + NPS 0.1nmol, (Group IV) saline + NPS 1nmol, (Group V) PTZ + saline, (Group VI) PTZ + NPS 0.01nmol, (Group VII) PTZ + NPS 0.1nmol, (Group VIII) PTZ + NPS 1nmol. Animals received two injections of the drug only on the last treatment day. Thirty minutes after the last PTZ treatment, just after last behavior analysis, the animals were killed by decapitation and each brain area was dissected to biochemical analysis.

5 . Behavioral Analysis

After each PTZ or saline injection, animals were placed in acrylic observation chambers for 30 min. During the behavioral analyzes were assessed the latency to first seizure, duration of first seizure (both in seconds), and the number of seizures, and behavioral seizure activity was rated according to the following scale (adapted from Da Silva et al. 1998): 0, no convulsive behavior; 1, jerks of short duration; 2, clonic forelimb convulsions lasting less than 3 s; 3, clonic forelimb convulsions lasting more than 3 s; 4, generalized convulsions with tonic extension episodes and full status epilepticus; 5, death. Kindling was considered to be established if the animal presented seizures at a rate ≥ 3 (in this treatment, we used only animals with a score ≥ 3).

6. Biochemical assays

After behavioral procedures, mice were killed by decapitation and brain was dissected to biochemical analyzes. Cortex and hippocampus were used to the biochemical analyzes.

6.1 Lipid peroxidation

Lipid peroxidation was measured by formation of thiobarbituric acid (TBA) reactive substances (TBARS) after the method of Esterbauer & Cheeseman (1990). After brain dissection, brain structures were washed with PBS, harvested and lysed. Thiobarbituric reactive species, obtained by acid hydrolysis of 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP), was used as the standard for the quantification of TBARS. TBA 0.67 % was added to each tube and vortexed.

The reaction mixture was incubated at 90°C for 20 min and the reaction was stopped by placing samples on ice. The optical density of each solution was

measured in a spectrophotometer at 535 nm. Data were expressed as nmol of TBARS equivalents per mg of protein.

6.2 Protein carbonyl formation

Protein carbonyl content was measured in brain homogenates using 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in a spectrophotometric assay (Levine et al., 1994). Briefly, sample tissues were sonicated in ice-cold homogenization buffer containing phosphatase and protease inhibitors (200 nM calyculin, 10 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 1 mM sodium orthovanadate, and 1 µM microcystin-LR) and centrifuged at 1000 x *g* for 15 min to sediment insoluble material. Three hundred microliter aliquots of the supernatant containing 0.7–1.5 mg of protein were treated with 300 µl of 10 mM DNPH, dissolved in 2 M HCl, and compared with 2 M HCl alone (reagent blank). Samples then were incubated for 1 h at room temperature in the dark and stirred every 10 min. Samples were precipitated with trichloroacetic acid (final concentration of 20%) and centrifuged at 16,000 x *g* at 4 °C for 15 min. The pellet was washed three times with 1 ml of ethanol/ethyl acetate (1:1 v/v). Each time, the pellet was lightly vortexed and left exposed to the washing solution for 10 min before centrifugation (16,000 x *g* for 5 min). The final pellet was dissolved in 1 ml of 6 M guanidine in 10 mM phosphate buffer–trifluoroacetic acid, pH 2.3, and the insoluble material was removed by centrifugation at 16,000 x *g* for 5 min. Absorbance was recorded in a spectrophotometer at 370 nm for both DNPH-treated and HCl-treated samples. Protein carbonyl levels were expressed as nmol of carbonyl per mg of protein.

6.3 Comet assay

Alkaline comet assay was carried out as described by Tice et al. (2000), with minor modification (Zugno et al., 2008). Each brain specimen was placed in 0.5 mL cold phosphate-buffered saline (PBS) solution, and minced into small pieces in order to obtain cell suspension. Brain cell suspensions (20 μ L) were embedded in 80 μ L of low-melting-point agarose at 0.75% (Gibco BRL) and spread on agarose-precoated microscope slides. After solidification, slides were placed in lysis buffer solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, and 10 mM Tris, pH 10.0), with freshly added 1% Triton X-100 (Sigma) and 10% DMSO for a minimum of 1 h and a maximum 48 h at 4°C. The slides were subsequently incubated in freshly prepared alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH > 13) for 20 min, at 4°C. An electric current of 300 mA and 25 V (0.90 V/cm) was applied for 15 min to induce DNA electrophoresis. The slides were then neutralized (0.4 M Tris, pH 7.5) and stained with silver, as described by Nadin et al. (2001), and analyzed under a microscope.

Images of 100 randomly selected cells (50 cells from each of two replicate slides) were analyzed from each animal. Cells were also visually scored according to tail size into five classes, ranging from undamaged (0) to maximally damaged (4), resulting in a single DNA damage score for each animal, and consequently, for each group studied. Therefore, the damage index (DI) ranged from 0 (completely undamaged, 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage, 100 x 4). Damage frequency (%) was calculated based on the number of cells with tail versus those with no tail (Collins et al., 1997). For the comet assay, we used only animals with scores 2 and 3 in the kindling protocols.

7. Statistical Analysis

The normality of variables was evaluated by the Kolmogorov–Smirnov test. Frequency of PTZ-induced seizures are expressed as the percentage (and the raw number) of animals exhibiting seizures clonic forelimb convulsions lasting more than 3 s corresponding to score III, in each treated group and compared by raw number of the Fisher's Exact test. Duration and latency of seizures were compared by *t*-Student test.

Differences among experimental groups at biochemical analyses were determined by one-way ANOVA. When ANOVA showed significant differences, *post hoc* analysis was performed with the Duncan's test to oxidative damage at proteins and lipids and Tukey's test to Comet assay. All statistical analyses were performed using the statistical package SPSS 12.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). In all experiments, P-values lower than 0.05 were considered to indicate statistical significance.

RESULTS

Chronic treatment with PTZ with a subconvulsive dose (60 mg/kg) for a period of 16 days induced seizures in the animals treated. Table 1 shows the percentage of animals presenting seizures (clonic forelimb convulsions lasting more than 3s; score III). In accord with other study (Pavlova et al., 2006; Oliveira et al., 2008) we observed that the seizures have increased in relation to the first treatment with PTZ (data not shown). The acute treatment with three different doses (0.01, 0.1 and 1 nmol) of NPS 5 min before the last dose of PTZ (sixteen day of treatment) did not modify the number of animals with seizures severity score III ($P = 0.80$ for all comparisons; Fisher's Exact test) and the latency of first seizure severity score II-III ($P > 0.05$ for all comparisons; t-Student test). However, the higher dose of NPS (1 nmol) induced a significant increase on duration of seizures severity III ($F(1,46) = 8.024$; $P < 0.001$). Up to the end of treatment with PTZ the number of animals died was two for each saline plus PTZ and NPS 0.1 nmol plus PTZ groups.

Figure 1 and 2 show the significant reduction in TBARS and protein carbonyl levels in the hippocampus and cerebral cortex when the mice were treated with NPS before the last dose of PTZ. In the hippocampus, the treatment with NPS at 0.1 and 1 nmol reduced the protein carbonyl levels ($F(1,19) = 3,895$; $P < 0.01$; ANOVA, Duncan's test) and the TBARS levels the reduction was observed in all doses ($F(1,47) = 2,713$; $P < 0.001$; ANOVA, Duncan's test) (Figure 1). A similar effect was observed in relation to cerebral cortex when the protein damage and TBARS levels were significantly attenuated after the NPS treatment at all three doses ($F(1,20) = 9.066$; $P < 0.001$ for carbonyl proteins; $F(1,47) = 12.186$; $P < 0.001$ for lipid peroxidation; ANOVA, Duncan's test) (Figure 2).

The comet assay performed according to the protocol, showed no significant increase of DNA damage in the brain tissue in both cerebral cortex and hippocampus areas after chronic PTZ treatment in relation to saline group. The values with NPS at the all doses in both brain tissues did not show difference in relation to saline group that represent biological similarity (data not show). However, when the animals were treated with NPS in a dose of 1 nmol before the last dose of PTZ, there was a significant increase in damage index (DI) and damage frequency (DF) on DNA of hippocampus in comparison to PTZ group treated with saline ($F(1,30) = 2,963$; $P < 0.05$; ANOVA, Tukey's test) (Table 2). The cerebral cortex did not show any differences among all treatments.

DISCUSSION

Many studies have suggested that a cascade of biologic events, including generation of reactive oxygen species (ROS), underlie the development and propagation of epilepsy (Patsoukis et al., 2005; Souza et al., 2009). It has been suggested that the hyperexcitability of a PTZ-kindled brain occurs via GABAergic (Rocha et al., 1996), adenosinergic (Pagonopoulou and Angelatou, 1998) and glutamatergic systems (Jensen et al., 1997), besides generation of ROS (Rauca et al., 1999).

In the present study we demonstrated for the first time that the NPS, under our experimental conditions, abolishes the oxidative stress in brain of mice induced by chronic administration of PTZ. It should be mentioned that similar studies have already described an increase on oxidative stress induced by PTZ in mice (Patsoukis et al., 2004; Uma Devi et al., 2006) and in rats (Arora et al., 2009). In addition, the protective effect of NPS against oxidative damage on proteins and lipids has been demonstrated in our group (Castro et al., 2009).

Our results showed that a single treatment with NPS at three crescent doses before last injection of PTZ did not affect the frequency and latency of seizures. However, the dose of 1 nmol displayed increase on duration of seizures. To this end the additive effect characterized by the more intense seizures triggered by NPS in PTZ-kindled animals indicates some sort of facilitation. Thus, seizures triggered by PTZ in these animals are likely to have used the same circuits that have been primed (or "kindled") by the initial NPS injection. Recently, our group demonstrated that the NPS-induced hyperlocomotion is dependent of adenosinergic system (Boeck et al., *in press*). Adenosine is an endogenous purine nucleoside that has evolved to modulate

many physiological processes. Extracellular adenosine mostly originates from release of intracellular adenosine via bi-directional adenosine transporter and/or from adenine nucleotides released, which are degraded by a chain of ectonucleotidases (Craig and White, 1993; Cunha et al., 1996). Pharmacological blockade of adenosine A_{2A} receptors significantly attenuate the stimulatory effects of NPS, and modulates the expression of mRNA NPS-NPSR receptor system such as observed after acute and chronic treatment with caffeine (Lage et al., 2006; Boeck et al., *in press*). Tonic-clonic seizures induced by a single PTZ injection elicit rapid and significant elevation in the extracellular level of adenosine, but specific brain areas might be affected differently by PTZ (Pagonopoulou and Angelatou, 1998). Thus, adenosinergic and NPS-NPSR systems co-activated could facilitate, at highest dose of NPS, the hyperexcitability present in seizures.

PTZ may trigger a variety of biochemical processes including the activation of membrane phospholipases, proteases and nucleases. Marked alterations in membrane phospholipid metabolism result in the liberation of lipid peroxides and free radicals (Costa, 1994). Therefore, free radical involvement in pathological conditions has generally been inferred from the measurement of indirect markers of oxidative stress, suggesting the onset of lipid and protein oxidation.

Protein carbonylation is the most widely used biomarker for oxidative damage to proteins (Dalle-Donne et al., 2006). Carbonyl groups are introduced into proteins by a variety of oxidative pathways. Reactive oxygen species can react directly with the protein or they can react with molecules such as sugars and lipids, generating products (reactive carbonyl species) that could react with proteins. A large number of neurodegenerative diseases are directly associated with the accumulation of carbonylated proteins in neuronal tissues (Dalle-Donne et al., 2006).

Lipid peroxidation is one of the major consequences of free radical mediated injury to the brain. Lipid peroxidation changes fluidity and permeability of the cell membranes and, consequently, impairs the activity of membrane-bound enzymes, the binding of molecules to receptors, cellular interactions, nutrient transport, and the function of second messenger systems (Meagher and Fitz Gerald, 2000). Lipid peroxidation leads to the production of conjugated dienic hydroperoxides.

The comet assay in brain tissue was useful for investigating the genotoxic/antigenotoxic effects of drugs acting on CNS (Zugno et al., 2008). The comet assay detects a broad spectrum of DNA lesions, including double and single strand breaks (Tice et al. 2000). Oliveira et al. (2008) have showed an increase in DNA damage on PTZ-kindling in mice. This result is in agreement with the present work.

Studies have demonstrated that oxidative neuron damage leading to neurodegeneration in the PTZ kindling model is not directly associated with convulsive activity and it not represent an enhanced susceptibility to PTZ (Rauca et al., 2004; Pavlova et al., 2006). In the present results, we observed an important protective effect of NPS on proteins and lipids damage induced by PTZ, even at dose that increase duration of seizure. However, NPS 1 nmol induced DNA damage when associated with PTZ. Repeated seizures cause progressive molecular and cellular changes in the brain, including activation of glutamate receptors, second messengers, transcription factors (Ilhan et al. 2005), that could be potentiate with the higher dose of NPS acting via other systems, such as GABAergic and/or glutamatergic (Jüngling et al., 2008) that need more investigation to clarify its effect. The present results suggest that NPS in higher dose contribute to DNA damage, probably via other neurotransmitters systems that could be investigated.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grants from Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

- Akbas, S.H., Yegin A., O' Zben T., 2005. Effect of pentylenetetrazolinduced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues. *Clin Biochem.* 38:1009–14.
- Arora, T., Mehta, A.K., Sharma, K.K., Mediratta, P. K., 1, Banerjee, B.D., Garg G.R., Sharma, A.K. 2009. Effect of Carbamazepine and Lamotrigine on Cognitive Function and Oxidative Stress in Brain during Chemical Epileptogenesis in Rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 1742-7843.
- Baraban, S.C., Tallent M.K., 2004. Interneuron diversity series: interneuronal neuropeptides— endogenous regulators of neuronal excitability. *Trends Neurosc.* 27:135–142.
- Beck, B., Fernetto, B., Stricker-Krongrad, A., 2005. Peptide S is a novel potent inhibitor of voluntary and fast-induced food intake in rats. *Biochem. Biophysical Res. Commun.* 332(3):859-65.
- Becker, A., Grecksch, G., Ruthrich, H.L., Pohle, W., Marx, B., Matthies, H., 1992. Kindling and its consequences on learning in rats. *Behav Neural Biol.* 57:37– 43.
- Boeck, C., Martinello, Caroline., Castro, A.A., Moretti, M., Casagrande, T.S., Guerrini, R. Calo', G., Gavioli, E.C., 2009. Blockade of adenosine A_{2A} receptor counteracts neuropeptide-S-induced hyperlocomotion in mice. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* DOI10.1007/s00210-009-0480-2.
- Browne, T.R., M.D and Gregory, L. Holmes, M.D., 2001. *Epilepsia.* 344:1145-1151-N *New Engl. J. Med.* 15.
- Castro, A. A., Moretti, M., Casagrande, T.S., Martinello, C., Petronilho, F., Sterckert A.V., Dal-Pizzol, F., Calo', G., Guerrini, R., Quevedo J., Gavioli, E.C., 2008. Neuropeptide S produces hyperlocomotion and prevents oxidative stress

damage in the mouse brain: a comparative study with amphetamine and diazepam. *Pharmacol. Biochem. Behav*; in press.

Ciccocioppo, R., Kallupi, M., Cannella, N., Braconi, S., Stopponi, S., 2007. Economidou D. Neuropeptide S system activation facilitates conditioned reinstatement of cocaine seeking in the rat. *Soc. Neurosci.* 271.218/Z271.

Ciccocioppo, R., Economidou, D., Cannella, N., Fedeli, A., Cippitelli, A., Calo, G., Massi, M., and Guerrini R., 2006. Inhibition of palatable food intake by Neuropeptide S is reversed by its analogue (Ala³) hNPS. *Soc. Neurosci.* 809.807/O815.

Choi B.H., 1993. Oxygen, antioxidants and brain dysfunction. *Yonsei Med J.* 34(1):1–10.

Cline, M.A., Prall, B.C., Smith, M.L., Calchary, W.A., Siegel, P.B., 2008. Differential appetite-related responses to central neuropeptide S in lines of chickens divergently selected for low or high body weight. *J. Neuroendocrinol.* 20(7):904-8.

Cline, M.A., Godlove, D.C., Nandar, W., Bowden, C.N., Prall, B.C., 2007. Anorexigenic effects of central neuropeptide S involve the hypothalamus in chicks (*Gallus gallus*). *Comp Biochemistry and Physiology A Molecular and Integrative Physiol.* 148(3):657-63.

Collins, A., Dusinska, M., Franklin, M., Somorovska, M., Petrovska, H., Duthie, S., Fillion, L., Panayiutidis, M., Raslova, K., Vaughan, N., 1997. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Env. Mol. Mut.* 30: 139–146.

Costa, L.G. Signaling and neurotoxic events. 1997. In Chang L.W, ed. *Principles of neurotoxicology*. 1994. pp. 475-93. Jensen P J et al., *Brain Res.*

- Craig, C.G., White, T.D., 1993. N-Methyl-D-aspartate and non-Nmethyl-D-aspartate evoked adenosine release from rat cortical slices:distinct purinergic sources and mechanisms of release. *J. Neurochem.* 60,1073-1080.
- Cunha, R.A., correia-de-Sá, P., Sebastião, A.M., Ribeiro, J.A., 1996. Preferential activation of excitatory adenosine receptors at rat hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed from released adenosine nucleotides. *Br. J. Pharmacol.* 119, 253-260.
- Da Silva, L.F., Pereira, P., Elisabetsky, E., 1998. A neuropharmacological analysis of PTZ-induced kindling in mice. *Gen. Pharmacol.* 31:47–50.
- Delle-Done, I., aldini,G., Carini, M., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., 2006. Protein carbonylation cellular dysfunction, and diease progression. *J. Cell Mol. Med.* 10(2):389-406.
- Devi, P.U., Pillai, K.K., Vohora, D., 2006. Modulation of pentylenetetrazole-induced seizures and oxidative stress parameters by sodium valproate in the absence and presence of N-acetylcysteine. *Fundam. Clin. Pharmacol* 20 247–253.
- Erakovic, V., Zupan, G., Varljen, J., Simonic, A., 2003. Pentylenetetrazol-induced seizures and kindling: changes in free fatty acids, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase activity. *Int. Neurochem.* 42:173–8.
- Esterbauer, H., Cheeseman, K.H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 186:407-21.
- Gavioli, E.C., Marzola, G., Guerrini, R., Bertorelli, R., Zucchini, S., De Lima T.C.M., Rae, G.A., Salvadori, S., Regoli, D., Calo, G., 2003. Blockade of nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor signalling produces antidepressant-like effects: pharmacological and genetic evidences from the mouse forced swimming test. *Eur. J. Neurosci.*17:1987-1990.

- Gupta, Y.K., Veerendra, Kumar M.H., Srivastava, A.K., 2003. Effect of centella asiatica of pentylenetetrazol induced kindling, cognition and oxidative stress in rats. *Pharmacol. Biochem Behav.*74:579–85.
- Guzmán, D.C.; Vazquez, I.E., Mejía, G.B., Garcia, E.H., Angel, D.S., Olguín, H.J., 2005. Effect of Pentylenetetrazole and Carbodiimide on Oxidation Stress Markers in Rat Brain. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol* 96, 512–513.
- Hokfelt, T., Broberger, C., Xu, Z.Q., Sergeev, V., Ubink, R., Diez, M., 2000. Neuropeptides—an overview. *Neuropharmacol* 39:1337–1356.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. C., 2007. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed New York, USA: Oxford University Press, pp. 851.
- Ilhan, A., Iraz, M., Gurel, A., Armutec, F., Akyol, O., 2004. Caffeic Acid Phenethyl Ester Exerts a Neuroprotective Effect on CNS Against Pentylenetetrazol-Induced Seizures in Mice. *Neurochem. Res.* 29, 12, 2287–2292.
- Ilhan, A., Gure, A., Armutcu, F., Kamisli, S., Iraz, M., 2005. Antiepileptogenic and antioxidant effects of *Nigella sativa* oil against pentylenetetrazol- induced kindling in mice. *Neuropharmacol.* 49:456–464.
- Jensen, P.J., Millan, N., Mack, K.J., 1997. Cortical NMDAR-1 gene expression is rapidly upregulated after seizure. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 44, 157–162.
- Jüngling, K., Seidenbecher, T., Sosulina, L., Lesting, J., Sangha, S., Clark, S.D, Okamura, N., Duangdao, D.M, Xu, YL., Reinscheid, R.K., Pape, H.C., 2008. Neuropeptide S-mediated control of fear expression and extinction: role of intercalated GABAergic neurons in the amygdala. *Neuron.* 31;59(2):298-310.
- Lage, R., Dieguez, C., Lopez, M., 2006. Caffeine treatment regulates neuropeptide S system expression in the brain. *Neurosci Lett* 410:47-51.

- Laursen, S.E., Belknap, J.K., 1986. Intracerebroventricular injections in mice. Some methodological refinements. *J. Pharmacol. Methods* 16, 4, 355-357.
- Leonard, S.K., Dwyer, J.M., Sukoff, R. S.J., Platt, B., Logue, S.F., Neal, S.J., Malberg, J.E., Beye, C.E., Schechter, L.E., Rosenzweig-Lipson, S., Ring, R.H., 2008. Pharmacology of neuropeptide S in mice: therapeutic relevance to anxiety disorders. *Psychopharmacol (Berl)*.197(4):601-11.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E., 1994. Carbonyl assays for determination oxidatively modified proteins. *Methods. Enzymol.* 233: 346-57.
- Li, Z., Yamamoto, Y., Morimoto, T., Ono, J., Okada, S., Yamatodani, A., 2000. The effect of pentylenetetrazole-kindling on the extracellular glutamate and taurine levels in the frontal cortex of rats. *Neurosci Letters* 282,17-119.
- Mason, C.R., Cooper, R.M., 1972. A permanent change in convulsive threshold in normal and brain-damaged rats with repeated small doses of pentylenetetrazole. *Epilepsia*.13:663–74.
- Meagher, E.A., Fitz, G.G.A., 2000. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* 28 (12):1745-50.
- Nadin, S.B., Laura, M., Vargas–Roig., and Ciocca D.R., 2001. A silver staining method for single-cell gel assay. *J. Histochem Cytochem*, 49, 1183-1186.
- Niimi, M., 2006. Centrally administered neuropeptide S activates orexin-containing neurons in the hypothalamus and stimulates feeding in rats. *Endocrine*. 30 1:75-9.
- Oliveira, A.P., Lino, F.L., Cappelari, S.E., Brum, L.F.S., Picada, J.N., Pereira, P., 2008. Effects of gamma-decanolactone on seizures induced by PTZ-kindling in mice. *Exp. Brain Res.* 187:161–166.

- Pagonopoulou, O., Angelatou, F., 1998. Time dependent and regional distribution of [3H] nitrobenzylthioinosine adenosine uptake site binding in the mouse brain after acute pentylenetetrazol-induced seizures. *J. Neurosci Res.* 53:433–42.
- Paneda, C., De Lecea, L., Roberts, A.J., 2007. Neuropeptide S increases cocaine seeking behaviour. *Soc. Neurosci. San Diego*, 611.611/KK613.
- Patel, M., 2004. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic. Biol. Med.* 37 1951–1962.
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Panagopoulos, N.T., Georgiou, C.D., Angelatou, F., Matsokis, N.A., 2004. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol induced epileptic seizure. *Neurosci Letters* 357 83–86.
- Patsoukis, N., Zervoudakis, G., Georgiou, C. D., Angelatou, F., Nikolaos A. Matsokis, and Panagopoulos, N.T. 2005. Thiol Redox State and Lipid and Protein Oxidation in the Mouse Striatum after Pentylenetetrazol-induced Epileptic Seizure. *Epilepsia.* 46 (8):1205–1211.
- Pavlova, T., Stepanichev, M., Gulyaeva, N., 2006. Pentylenetetrazole Kindling neuronal cyclin B1 Expression in rat hippocampus. *Neurosci. Lett* 392:154-158.
- Rauca, C., Zerbe, R., Jantze., H., 1999. Formation of free hydroxyl radicals after pentylenetetrazol-induced seizure and kindling. *Brain Res.* 847:347–351.
- Rizzi, A., Vergura, R., Marzola, G., Ruzza, C., Guerrini, R., Salvadori, S., Regoli, D., Calo, G., 2008. Neuropeptide S is a stimulatory anxiolytic agent: a behavioural study in mice. *Br. J. Pharmacol* 154: 471-479.
- Rocha, L., Ackermann, R.F., Engel, J.J., 1996. Chronic and single administration of pentylenetetrazol modifies benzodiazepine receptor-binding: an autoradiographic study. *Epilepsy Res.* 24, 65–72.

Roth, A.I., Marzola, E., Rizzi, A., Arduin, M., Trapella, C., Corti, C., Vergura, R., Martinelli, P., Salvadori, S., Regoli, D., Corsi, M., Cavanni, P., Calo, G., Guerrini, R., 2006. Structure-activity studies on neuropeptide S: identification of the amino acid residues crucial for receptor activation. *J. Biol. Chem.* 281,30, 20809-20816.

Sejima, H., Ito, M., Kishi, K., Tsuda, H., Shiraishi, H., 1997. Regional excitatory and inhibitory amino acid concentrations in pentylenetetrazol kindling and kindled rat brain. *Brain Dev.* 19, 171–175.

Souza, A.M., Oliveira, M.S., Furian A.F, Rambo, L.M., Ribeiro, L.R., Lima, F.D., Correa, L.D. C., Silva, Luiz, F.A., Retamoso, L.T., Cristiane, L. D.C., Puntel, G.O., Avila, D. S., Soares F.A.A., Figuera, M.R., Mello, C.F., Royes, L.F.F., 2009. Swimming training prevents pentylenetetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. *Epilepsia* 50(4):811–823

Smith, K.L., Patterson, M., Dhillon, W.S., Patel, S.R., Semjonous, N.M., Gardiner, J.V., Ghatei, M.A., 2006. Neuropeptide S stimulates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and inhibits food intake. *Endocrinol.* 147, 7, 3510-3518.

Sudha, K., Rao, A.V., Rao, A., Oxidative stress and antioxidants in epilepsy., 2001. *Clin. Chim. Acta.* 303(1– 2):19–24.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, Y., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C, Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen* 35:206–221.

White, H., Scholl, E., Klein, B., Flynn, S., Pruess, T., Green, B., Zhang, L., Bulaj G., 2009. Developing Novel Antiepileptic Drugs: Characterization of NAX5055, a Systemically-Active Galanin Analog, in Epilepsy Models. *The J. Amer. Soc. Exp. Neuro Therapeutics.* 6:2-372-380.

Xu, Y.L., Reinscheid, R.K., Huitron-Resendiz, S., Clark, S.D., Wang, Z., Lin, S.H., Brucher, F.A., Zeng, J., Ly, N.K., Henriksen, S.J., Lecea, L., Civelli, O., 2004. Neuropeptide S: A neuropeptide promoting arousal and anxiolytic-like effects. *Neuron*. 43:487–497.

Zugno, A.I., Stefanello, F.M., Scherer, E.B.S., Mattos, C., Pederzoli, C.D., Andrade V.M., Wannmacher, C.M.D., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., Wyse, A.T.S., 2008. Guanidinoacetate Decreases Antioxidant Defenses and Total Protein Sulfhydryl Content in Striatum of Rats. *Neurochem. Res.* 33:1804–1810.

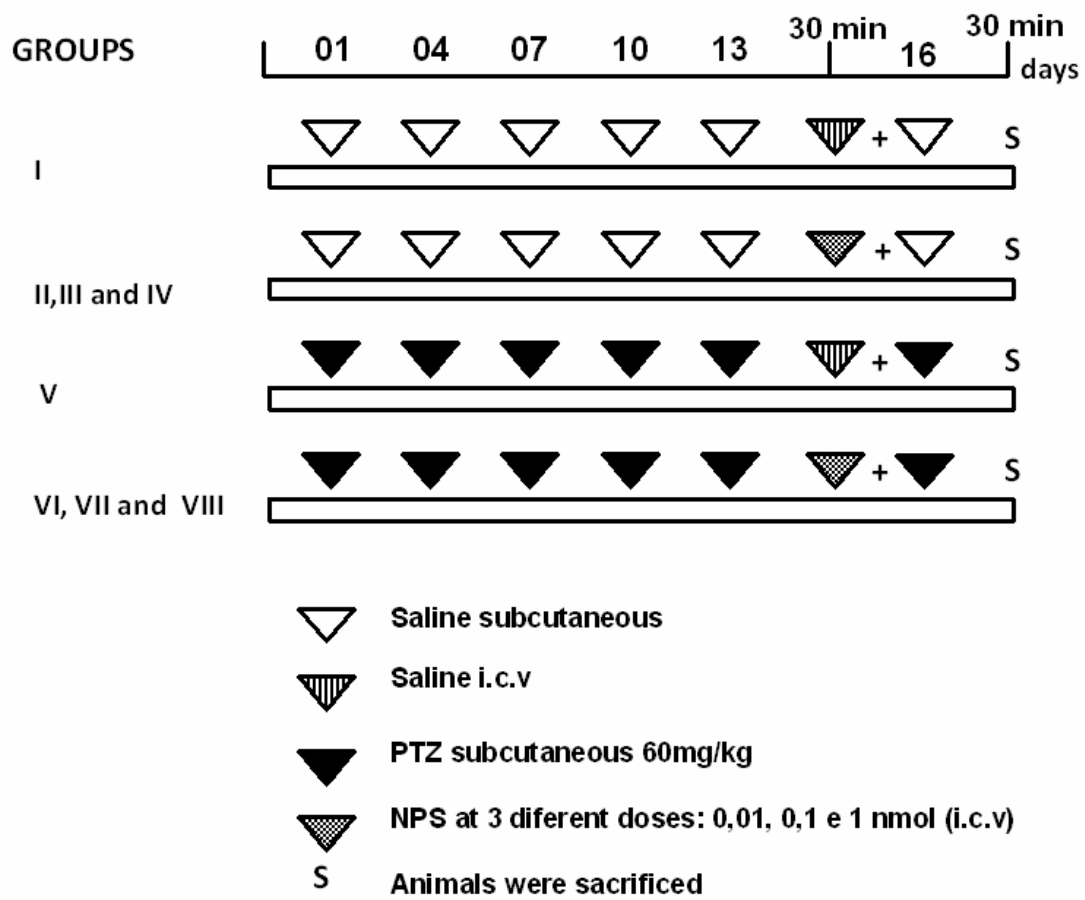


Fig 1. Experimental design to test the effect of NPS in the PTZ-kindling in mice.

Hippocampus

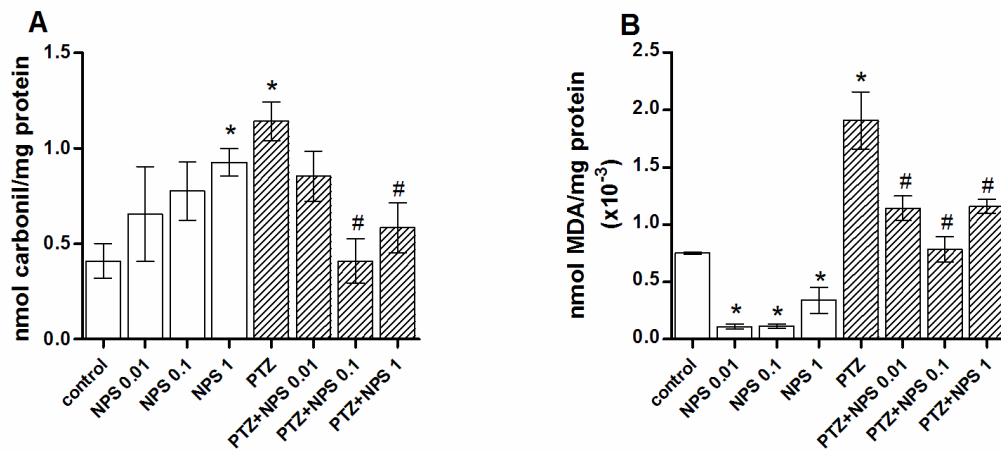


Fig. 2 Effects of the IP administration of PTZ (60 mg/kg) and the ICV injection of neuropeptide S (0.01, 0.1 and 1 nmol) on protein carbonyl content and on thiobarbituric acid reactive species (TBARS) in hippocampus of mice assessed by a spectrophotometric assay. Data are shown as mean \pm S.E.M. (5-8 mice/group). * $p < 0.05$ vs. control group and # $p < 0.05$ vs. PTZ group according to one-way ANOVA followed by the Duncan's test.

Cerebral Cortex

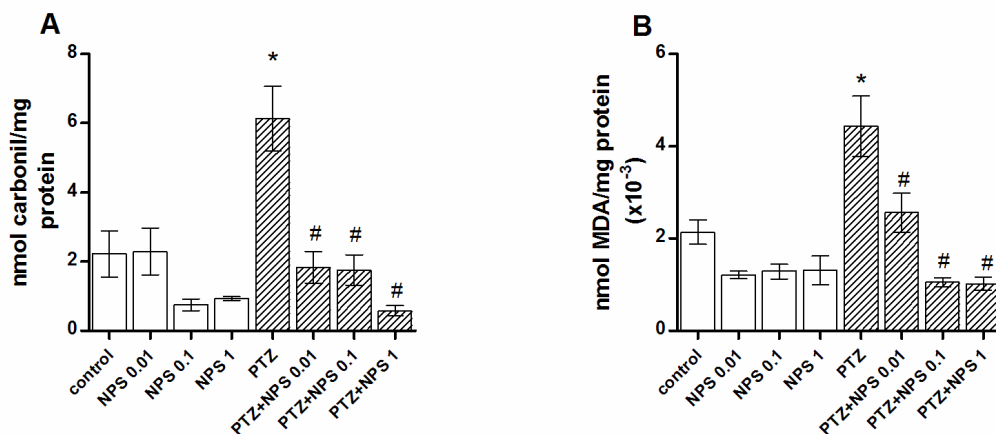


Figure 3 Effects of the IP administration of PTZ (60mg/kg) and the ICV injection of neuropeptide S (0.01, 0.1 and 1 nmol) on protein carbonyl content and on thiobarbituric acid reactive species (TBARS) in cerebral cortex of mice assessed by a spectrophotometric assay. Data are shown as mean \pm S.E.M. (5-8 mice/group). * $p < 0.05$ vs. control group and # $p < 0.05$ vs. PTZ group according to one-way ANOVA followed by the Duncan's test.

Table 1. Incidence and duration of seizures severity III induced by PTZ after treatment with NPS.

Group	Frequency of seizures	Duration of seizures (s)	Latency of seizure (s)
PTZ	65% (13/20)	4.92 ± 3.85	539.6 ± 475.6
PTZ + NPS 0.01	77.7% (14/18)	5.22 ± 3.86	542.8 ± 482.1
PTZ + NPS 0.1	83.3% (15/18)	7.05 ± 4.02	475 ± 362.5
PTZ + NPS 1	80% (12/15)	10.64 ± 10.90*	769.07 ± 558.8

Results are expressed as frequency, duration or latency of seizures and death after seizures in each group. Numbers in parentheses indicate number of animals present seizure level/number of animals in that group. The time of latency is from first seizures severity II-III. Data of duration and latency of seizure are expressed as mean ± S.D.

Fisher' Exact test was used for frequency of seizures and t-Student test was used for duration and latency of seizures.

*P < 0.001, indicates statistical difference as compared with the corresponding saline + PTZ group (n = 15-20).

Table 2. Comet assay in brain tissue in different of PTZ-kindled mice treated or non-treated with neuropeptide S

Hippocampus			Cortex		
Group	Parameters of DNA damage		Group	Parameters of DNA damage	
	DI ^a	DF ^b		DI ^a	DF ^b
PTZ	52.0 ± 9.2	21.0 ± 3.4	PTZ	201.7 ± 31.1	54.0 ± 7.9
PTZ + NPS 0.01 nmol	113.5 ± 42.0	35.5 ± 9.3	PTZ + NPS 0.01 nmol	176.0 ± 12.9	47.0 ± 3.8
PTZ + NPS 0.1 nmol	175.0 ± 16.9	52.3 ± 3.3	PTZ + NPS 0.1 nmol	170.0 ± 35.3	52.8 ± 8.8
PTZ + NPS 1 nmol	196.3 ± 42.6***	56.5 ± 9.8***	PTZ + NPS 1 nmol	208.2 ± 34.6	60.4 ± 9.4

n = 4-5 animals per group.

PTZ-untreated group hippocampus: DI (damage index) = 72.7 ± 5.9; DF (damage frequency) = 26.0 ± 1.5 (N = 3). PTZ-untreated group cortex: DI (damage index) = 143.8 ± 15.6; DF (damage frequency) = 7.5 ± 1.9 (N = 4).

***Statistic significance with P < 0.05 (ANOVA, Tukey's test) in comparison with Saline group.

^aDI can range from 0 (completely undamaged, 100 cells x 0) to 400 (with maximum damage, 100 x

4)

^bDF was calculated based on number of cells with tail versus those with no tail

PARTE III

DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Epilepsias são desordens neurocomportamentais complexas resultando de um aumento da excitabilidade dos neurônios em várias regiões do cérebro. O desenvolvimento de epilepsia é um processo plastístico-adaptativo o qual pode ser reproduzido em animais experimentais usando o fenômeno conhecido como kindling. O Kindling químico é caracterizado por um aumento na susceptibilidade a convulsões após injeções de doses crescentes (de subconvulsivas até convulsivas) de agentes convulsivantes como o pentilenotetrazol (PTZ), culminando em convulsões tônico-clônicas generalizadas (Rauca et al., 2004).

Muitos estudos têm sugerido que uma cascata de eventos biológicos, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio, está por trás do desenvolvimento e propagação da epilepsia (Patsoukis et al., 2005; Souza et al., 2009). Tem sido sugerido que a hiperexcitabilidade do cérebro de animais que passaram pelo modelo de kindling é devida a função aumentada de uma subpopulação de sinapses glutamatérgicas através de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), e que o aumento destes receptores no córtex poderia estar por trás desta hiperexcitabilidade detectada pelos estudos eletrofisiológicos (Groves et al., 2006). Existem evidências de que o aumento da atividade do sistema glutamatérgico induzido pelo status epilepticus causa diminuição na produção de energia e aumento na formação de radicais livres (Dal-Pizzol et al., 2000; Patel, 2004).

No presente trabalho nós demonstramos pela primeira vez que o NPS, sob nossas condições experimentais, diminuiu significativamente o estresse oxidativo no cérebro de camundongos induzido pela administração crônica de PTZ. Deve-se mencionar que estudos similares já haviam descrito um aumento no estresse oxidativo induzido por PTZ em camundongos (Patsoukis et al., 2004; Uma Devi et al., 2006) e em ratos (Arora et al., 2009). Adicionalmente, um trabalho recente do nosso grupo demonstrou um efeito protetivo do NPS contra o dano oxidativo em proteínas e lipídios (Castro et al., 2008).

Nossos resultados mostram que uma única administração do NPS, em três doses crescentes antes da última injeção de PTZ, não afetou a frequência e latência das convulsões. Contudo, a dose de 1nmol apresentou aumento na duração das convulsões. Neste sentido, o efeito aditivo do NPS, caracterizado pelas convulsões mais intensas desencadeadas após sua administração no modelo animal de kindling induzido pelo PTZ, indica algum tipo de facilitação. Assim, as convulsões desencadeadas pelo PTZ nestes animais parecem ter usado os mesmos circuitos que foram inicializados pela primeira injeção de NPS. Recentemente, nosso grupo demonstrou que a hiperlocomoção induzida pelo NPS é dependente do sistema adenosinérgico (Boeck et al., *in press*). Adenosina é uma purina endógena que está envolvida na modulação de muitos processos fisiológicos. A adenosina extracelular origina-se principalmente a partir da liberação de adenosina intracelular via um transportador bidirecional e/ou a partir da liberação de nucleotídeos de adenina, os quais são degradados por uma cascata de nucleotidasas (Craig & White, 1993); Cunha et al., 1996). O bloqueio farmacológico de receptores de adenosina do tipo A_{2A} atenua significativamente os efeitos estimulatórios do NPS, e modulam a expressão do RNA mensageiro do peptídeo NPS e do seu receptor (NPS-NPSR) como foi observado após a administração aguda e crônica de cafeína (Lage et al., 2006; Boeck et al., *in press*). Convulsões tônico-clônicas induzidas por uma única injeção de PTZ induzem uma rápida e significativa elevação nos níveis extracelulares de adenosina, porém áreas específicas do cérebro podem ser afetadas diferencialmente pelo PTZ (Pagonopoulou & Angelatou, 1998). Dessa forma, sistemas adenosinérgicos e NPS-NPSR co-ativados poderiam facilitar, na dose mais alta de NPS, a hiperexcitabilidade apresentada nas convulsões.

O PTZ desencadeia uma variedade de processos bioquímicos incluindo a ativação de fosfolipases de membrana, proteases e nucleases. Alterações significativas no metabolismo de fosfolipídios de membrana resultam numa liberação de peróxidos de lipídios e radicais livres (Costa, 1994). Por essa razão, o envolvimento dos radicais livres nas condições fisiopatológicas tem usualmente sido inferido a partir das medidas de marcadores indiretos de estresse oxidativo, sugerindo o início de uma oxidação de lipídios e proteínas.

A carbonilação de proteínas é o marcador de dano oxidativo em proteínas mais amplamente utilizado (Dalle-Donne et al., 2006). Grupos carbonil são

introduzidos nas proteínas por uma variedade de caminhos oxidativos. Espécies reativas de oxigênio podem reagir diretamente com a proteína ou elas podem interagir com moléculas como açúcares e lipídios, gerando produtos (espécies reativas de carbonil) que podem reagir com as proteínas. Um grande número de doenças neurodegenerativas está diretamente associado com a acumulação de proteínas carboniladas nos tecidos neuronais (Dall-eDonne et al., 2006).

A peroxidação lipídica é uma das principais conseqüências de danos no cérebro mediados pelos radicais livres. A peroxidação lipídica muda a fluidez e permeabilidade das membranas celulares, e conseqüentemente prejudica a atividade de enzimas ligadas à membrana, a ligação de moléculas a seus receptores, interações celulares, transporte de nutrientes, e a função de sistemas de segundo mensageiros (Meagher & Fitz Gerald, 2000).

O Ensaio Cometa no tecido cerebral é uma ferramenta útil para a investigação dos efeitos genotóxicos/antigenotóxicos de drogas que agem no sistema nervoso central (Zugno et al., 2008). O Ensaio cometa detecta um amplo espectro de lesões no DNA, incluindo quebras de fita simples e duplas (Tice et al., 2000). Oliveira e colaboradores (2008) demonstraram aumento de dano em DNA após seis administrações de PTZ para induzir kindling em camundongos, resultados estes que estão de acordo com os dados encontrados no presente trabalho.

Estudos têm demonstrado que o dano neuronal oxidativo, que leva a neurodegeneração no modelo de kindling induzido por PTZ, não está diretamente associado com a atividade convulsiva e não representa uma susceptibilidade aumentada do PTZ (Rauca et al., 2004; Pavlova et al., 2006). Nos resultados do presente estudo, nós observamos um importante efeito protetor do NPS nos danos a proteínas e lipídios induzidos pelo PTZ, mesmo na dose que aumentou a duração das convulsões. Contudo, o NPS 1 nmol induziu dano em DNA quando associado com o PTZ. Convulsões repetidas causam progressivas mudanças celulares e moleculares no cérebro, incluindo ativação de receptores glutamatérgicos, segundos mensageiros, fatores de transcrição (Ilhan et al., 2005), que podem ter sido potencializados com a dose maior do NPS agindo via outros sistemas como por exemplo, GABAérgicos e/ou glutamatérgicos (Jüngling et al., 2008) que necessitam maiores investigações para esclarecer este efeito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKBAS SH; YEGIN A; OZBEN T. Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues. **Clinical Biochemistry** 38:1009 – 1014. 2005.
- ARORA T; MEHTA AK; SHARMA KK; MEDIRATTA PK; BANERJEE BD, GARG GR; SHARMA AK. Effect of Carbamazepine and Lamotrigine on Cognitive Function and Oxidative Stress in Brain during Chemical Epileptogenesis in Rats. **Basic Clinical Pharmacology & Toxicology** 1742-7843. 2009.
- ARNAIZ SL; TRAVACIO M; LLESUY S; ARNAIZ G. Regional vulnerability to oxidative stress in a model of experimental epilepsy. **Neurochemical Research** 23, 1477-1483. 1998.
- AVANZINI G, FRANCESCHETTI S. Cellular biology of epileptogenesis. **The Lancet: Neurology**. 2. 2002.
- BEAR MF; CONNORS BW; PARADISO MA. **Neurociência – Desvendando o Sistema Nervoso**. 2^a ed. Artmed, Porto Alegre, 613: 25. 2006.
- BECK B; FERNETTE B; STRICKEER-KRONGRAD A. Peptide S is a novel potent inhibitor of voluntary and fast-induced food intake in rats. **Biochemical & Biophysical Research Communications** 332, n.3, 859-865. 2005.
- BECKER A, GRECKSCH G, RUTHRICH HL, POHLE W, MARX B, MATTHIES H. Kindling and its consequences on learning in rats. **Behavior Neural & Biology**. 57:37– 43. 1992.
- BENZI G; MORETTI A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? **Neurobiology of Aging** 16, 661-674. 1995.

- BITTIGAU P; SIFRINGER M; IKONOMIDOU C. Antiepileptic drugs and apoptosis in the developing brain. **Annals of the New York Academy of Sciences** 993, 103-114, 2003.
- BOECK C; MARTINELLO C; CASTRO AA; MORETTI M; CASAGRANDE TS; GUERRINI R; CALO' G; GAVIOLI E.C. Blockade of adenosine A_{2A} receptor counteracts neuropeptide-S-induced hyperlocomotion in mice. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol** DOI10.1007/s00210-009-0480-2. 2009.
- BROWNE TR; HOLMES GL. Epilepsy. **New Jornal Medicine** 344: 1145-51. 2001.
- BRUM LFS; ELISABETSKY E. Antiepileptogenic properties of phenobarbital: behavior and neurochemical analysis. **Pharmacology Biochemistry & Behavior** 67:411-41. 2000.
- BUTTERFIELD AD; KANSKI J. Brain protein oxidation in age-related neurodegenerative disorders that are associated with aggregated proteins. **Mechanisms of ageing and development** 15;122(9):945-62. 2001.
- CASTRO AA; MORETTI M; CASAGRANDE TS; MARTINELLO C; PETRONILHO F; STERCKERT AV; DAL-PIZZOL F; CALO' G; GUERRINI R; QUEVEDO J; GAVIOLI EC. Neuropeptide S produces hyperlocomotion and prevents oxidative stress damage in the mouse brain: a comparative study with amphetamine and diazepam. **Pharmacology Biochemistry & Behavior** in press. 2008.
- CAVALHEIRO EA; LEITE JP; BORTOLOTTO ZA; TURSKI WA; IKONOMIDOU C; TURSKI L. Long-term effects of pilocarpine in rats: structural damage of the brain triggers kindling and spontaneous recurrent seizures. **Epilepsia** 32, 778-782. 1991.
- COSTA JC, RUSSO RE, GUILHERMO G, VELLUTI JC. Bases celulares da epilepsia. **Jornal da Liga Brasileira de Epilepsias** 5(1):9-17. 1992.

CRAIG CG; WHITE TD. N-Methyl-D-aspartate and non-Nmethyl-D-aspartate evoked adenosine release from rat cortical slices:distinct purinergic sources and mechanisms of release. **Journal of Neurochemmistry** 60,1073-1080. 1993.

CUNHA RA; CORREIA-DE-SÁ P; SEBASTIÃO AM; RIBEIRO JÁ. Preferential activation of excitatory adenosine receptors at rat hippocampal and neuromuscular synapses by adenosine formed from released adenosine nucleotides. **British Journal Pharmacology** 119, 253-260. 1996.

DAL-PIZZOL F, KLAMT F, VIANNA M.M, SCHRODER N, QUEVEDO J. BENFATO MS. MOREIRA JC, Walz R. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. **Neuroscience Letters** 291 179–182. 2000.

DELLE-DONE I; ALDINI G; CARINI M; COLOMBO R; ROSSI R; MILZANI A. Protein carbonylation cellular dysfunction, and diease progression. **Journal of Cellular & Molecular Medicine** 10(2):389-406. 2006.

DEVI PU; PILLAI KK.; VOHORA D. Modulation of pentylenetetrazole-induced seizures and oxidative stress parameters by sodium valproate in the absence and presence of N-acetylcysteine. **Fundamental Clinical Pharmacology** 20 247–253. 2006.

DHIR A; NAIDU OS; KULKARNI SK. Effect of naproxen, a nonselective cyclooxygenase inhibitor, on pentylenetetrazole induced kindling in mice. **Clinical Experimental Pharmacology & Physiology** 32:579-584. 2005.

DUNCAN JS, SANDER JW, SISODIYA SM, WALKER MC. Adult epilepsy. **Lancet Neurology** 367:1087–1100. 2006.

GROVES JO; GUSCOTT MR; HALLETT DJ; ROSAHL TW; PIKE R; DAVIES A, WAFFORD KA; REYNOLDS DS. The role of GABA_A β 2 subunit-containing receptors in mediating the anticonvulsant and sedative effects of loreclezole. **European Journal of Neurology** 24:167-174. 2006.

- GRUNEWALD R. Childhood seizures and their consequences for the hippocampus. **Brain Journal of Neurology** 125, 1935-1936. 2002.
- GUPTA YK; VEERENDRA KUMAR MH; SRIVASTAVA AK. Effect of centella asiática on pentylenetrazol-induced kindling, cognition and oxidativce stress in rats. **Pharmacology Biochemistry & Behavior** 74(3):579-85. 2003.
- GUTTERIDGE JMC, HALIWELL B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends in Biochemical Sciences** 15: 129-35. 1990.
- GUZMÁN DC; VAZQUEZ IE; MEJÍA GB; GARCIA EH; ANGEL DS; OLGUÍN HJ. Effect of Pentylenetetrazole and Carbodiimide on Oxidation Stress Markers in Rat Brain. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology** 96, 512–513. 2005.
- HALLIWELL B; GUTTERIDGE JMC. **Free radicals in biology & medicine** 4th ed New York, USA: Oxford University Press, pp. 851. 2007.
- ILHAN A; IRAZ M; GUREL A; ARMUTEC F; AKYOL O. Caffeic Acid Phenethyl Ester Exerts a Neuroprotective E.ect on CNS Against Pentylenetetrazol-Induced Seizures in Mice. **Neurochemical Research** 29, 12, 2287–2292. 2004.
- ILHAN A; GURE A; ARMUTCU F; KAMISLI S; IRAZ M. Antiepileptogenic and antioxidant eVects of *Nigella sativa* oil against pentylenetetrazol- induced kindling in mice. **Neuropharmacology** 49:456–464. 2005.
- JÜNGLING K; SEIDENBECHER T; SOSULINA L; LESTING J; SANGHA S; CLARK SD; OKAMURA N; DUANGDAO DM; XU YL; REINSCHIED RK; PAPE HC. Neuropeptide S-mediated control of fear expression and extinction: role of intercalated GABAergic neurons in the amygdala. **Neuron** 31;59(2):298-310. 2008.

- LAGE R; DIEGUEZ C; LOPEZ M. Caffeine treatment regulates neuropeptide S system expression in the brain. **Neuroscience Letters** 410:47-51. 2006.
- LEONARD SK, DWYER JM, SUKOFF RIZZO SJ, PLATT B, LOGUE SF, NEAL SJ, MALBERG JE, BEYER CE, SCHECHTER LE, ROSENZWEIG-LIPSON S, RING RH. Pharmacology of neuropeptide S in mice: therapeutic relevance to anxiety disorders. **Psychopharmacology** (Berl).197(4):601-11. 2008.
- LI Z YAMAMOTO Y; MORIMOTO T; ONO J; OKADA S; YAMATODANI A. The effect of pentylenetetrazole-kindling on the extracellular glutamate and taurine levels in the frontal cortex of rats. **Neuroscience Letters** 282,17-119. 2000.
- LÖSCHER W; SCHMIDT D. New horizons in the development of antiepileptic drug. **Epilepsy Research** 50:3-16. 2002.
- LUKOMSKAYA NY; LAVRENT'EVA VV; STARSHINOVA LA; ZABKHO EP; GORBUNOVA LV; TIKHONOVA TB; GMIRO VE; MAGAZANIK LG. Effects of inotropic glutamate receptor channel blockers on the development of pentylenetetrazol kindling in mice. **Neuroscience & Behavioral Physiology** 37:75-81. 2007.
- MEAGHER EA; FITZ GGA. Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations. **Free Radical Biology & Medicine** 28 (12):1745-50. 2000.
- MCNAMARA JO. Emerging insights into the genesis of epilepsy. **Nature** 399: A15-A22. 1999.
- MCNAMARA JO, HUANG YZ, LEONARD AS. Molecular signaling mechanisms underlying epileptogenesis. **Science Translational Medicine** 356. 2006.
- MODY I. Synaptic plasticity in kindling. **Advances in Neurology** 79, 631-643. 1999.
- MORIMOTO K; FAHNESTOCK M; RACINE RJ. Kindling and status epilepticus models of epilepsy: rewiring the brain. **Progress in Neurobiology** 73, 1-60, 2004.

- OLIVEIRA FA, ALMEIDA RN; SOUZA MFV; BARBOSA-FILHO JM; DINIZ SA; MEDEIROS IA. Anticonvulsant properties of N-salicylotryptamine in mice. **Pharmacology Biochemistry & Behavior** 68:199-202. 2001.
- OLIVEIRA MS; FURIAN AF; ROYES LFF; FIGHERA MR ET AL. Ascorbate modulates pentylenetetrazol-induced convulsions biphasically. **Neuroscience** 128, 721-728. 2004.
- OLIVEIRA AP; LINO FL; CAPPELARI SE; BRUM LFS; PICADA JN; PEREIRA P. Effects of gamma-decanolactone on seizures induced by PTZ-kindling in mice. **Experimental Brain Research** 187:161–166. 2008.
- PAGONOPOULOU O; ANGELATOU F. Time dependent and regional distribution of [3H]nitrobenzylthioinosine adenosine uptake site binding in the mouse brain after acute pentylenetetrazol-induced seizures. **Journal of Neuroscience Research** . Res. 53, 433–442. 1998.
- PATEL M, Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. **Free Radical Biology & Medicine**. 37 1951–1962. 2004.
- PATSOUKIS N, ZERVOUDAKIS G, PANAGOPOULOS N.T, GEORGIU C.D, ANGELATOU F, MATSOKIS N.A. Thiol redox state (TRS) and oxidative stress in the mouse hippocampus after pentylenetetrazol induced epileptic seizure. **Neuroscience Letters** 357 83–86. 2004.
- PATSOUKIS N; ZERVOUDAKIS G; GEORGIU CD; ANGELATOU F; NIKOLAOS A; MATSOKIS & PANAGOPOULOS NT. Thiol Redox State and Lipid and Protein Oxidation in the Mouse Striatum after Pentylenetetrazol-induced Epileptic Seizure. **Epilepsia** 46 (8):1205–1211. 2005.

- PAVLOVA T; STEPANICHEV M; GULYAEVA N. Pentylenetrazole Kindling neuronal cyclin B1 Expression in rat hippocampus. **Neuroscience Letters** 392:154-158. 2006.
- PRATICÓ D; DELANTY N. Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. **American Journal of Medicine**, 109, 577-585. 2000.
- PURVES D. **Neuroscience**. 3rd ed Massachusetts: Sinauer Associates, pp. 773. 2004.
- RAUCA C, WISWEDEL I, ZERBE R, KEILHOFF G, KRUG M. The role of superoxide dismutase and a-tocopherol in the development of seizures and kindling induced by pentylenetetrazol - influence of the radical scavenger a-phenyl-N-tert-butyl nitron. **Brain Research** 1009 203– 212. 2004.
- REINSCHEID; RK; XU YL; CIVELLI O. Neuropeptide S: A New Palyer in the Modulation of Arousal and Anxiety. **Molecular interventions** 5, 1, 42-46 2005c.
- REINSCHEID RK; XU YL; OKAMURA N; ZENG J; CHUNG; PAI R; WANG Z; CIVELLI O. Pharmacological characterization of human and murine neuropeptide S receptor variants. **Journal of Pharmacology & Experimental Therapeutics** 315:1338-1345. 2005.
- RIZZI A; VERGURA R; MARZOLA G; RUZZA C; GUERRINI R; SALVADORI S REGOLI D; CALO G. Neuropeptide S is a stimulatory anxiolytic agent: a behavioural study in mice. **British Journal of Pharmacology** 154: 471-479. 2008.
- ROCHA L, ACKERMANN RF. ENGEL JR.J.. Chronic and single administration of pentylenetetrazol modifies benzodiazepine receptor-binding: an autoradiographic study. **Epilepsy Research** 24, 65–72. 1996.

ROTH AL; MARZOLA E; RIZZI A; ARDUIN M; TRAPELLA C; CORTI C; VERGURA R; MARTINELLI P; SALVADORI S; REGOLI D; CORSI M; CAVANNI P; CALO G; GUERRINI R. Structure-activity studies on neuropeptide S: identification of the amino acid residues crucial for receptor activation. **The Journal of Biological Chemistry** 281, 30, 20809-20816. 2006.

SATO S; SHINTANI Y; MIYAJIMA N; YOSHIMURA K. Novel G protein-coupled receptor protein and DNA thereof. **World Patent Application** WO 02/31145 A1. 2002.

SEJIMA H; ITO M; KISHI K; TSUDA H; SHIRAIISHI . Regional excitatory and inhibitory amino acid concentrations in pentylenetetrazol kindling and kindled rat brain. **Brain & Development** 19, 171–175. 1997.

SCHMIDT D; ROGAWSKI MA. New strategies for the identification of drugs to prevent the development or progression of epilepsy. **Epilepsy Research** 50:71–78. 2002.

SCHMIDT D. Clinical impact of new antiepileptic drugs after a decade of use in epilepsy. **Epilepsy Research**. 2002.

SHNEKER BF; FOUNTAIN NB. Epilepsy. **Disease-a-Month** 49(7):426-4. 2003.

SINGH NP; McCoy MT; TICE RR; SCHNEIDER EL. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research** 175: 184-191. 1988.

SINGH R; PATHAK DN. Lipid peroxidation and glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase, catalase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase activities in FeCl₃-induced epileptogenic foci in the rat brain. **Epilepsia** 31 (1):15-26. 1990.

SMITH KL; PATTERSON M; DHILLO WS; PATEL SR; SEMJONOUS NM.; GARDINERJV; GHATEI MA. BLOOM S. Neuropeptide S stimulates the

hypothalamo-pituitary-adrenal axis and inhibits food intake. **Endocrinology** 147, 7, 3510-3518. 2006.

SMITH C; MARKS AD; LIEBERMAN M. **Bioquímica Médica, Básica de Marks: Uma Abordagem Clínica**. 2ª ed. Artmed. Porto Alegre, pp. 895. 2007.

SOUZA AM; OLIVEIRA MS; FURIAN AF; RAMBO LM; RIBEIRO LR; LIMA FD; CORREA LD; SILVA C; LUIZ FA; RETAMOSO LT; CRISTIANE LDC; PUNTEL GO; AVILA DS; SOARES FAA; FIGHERA MR; MELLO CF; ROYES LFF. Swimming training prevents pentylentetrazol-induced inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity, seizures, and oxidative stress. **Epilepsia** 50(4):811–823. 2009.

SUDHA K; RAO AV; ROA A. Oxidative stress and antioxidants in epilepsy. **Clinica Chimica Acta** 301(1-2): 19-24. 2001.

SZYNDLER J; PIECHAL A; BLECHARZ-KLIN K; SKORZEWSKA A; MACIEJAK P; WALKOWIAK J; TURZYNSKA D; BIDZINSKI A; PLAZNIK A; WIDY-TYSZKIEWICZ E. Effect of kindled seizures on rat behavior in water Morris maze test and amino acid concentrations in brain structures. **Pharmacological Reports** 58:75–8, 2006.

TICE RR, AGURELL E, ANDERSON D, BURLINSON B, HARTMANN A, KOBAYASHI Y, MIYAMAE Y, ROJAS E, RYU JC, SASAKI YF. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental & Molecular Mutagenesis** 35:206–221. 2000.

WATSON BD. Evaluation of the concomitance of lipid peroxidation in experimental models of cerebral ischemia and stroke. **Progress in Brain Research** 96: 69-95. 1993.

WHITE HS. Clinical significance of animal seizure models and mechanisms of action studies of potential antiepileptic drugs. **Epilepsia** 38:9–17. 1997.

WOLFGANG L. How to explain multidrug resistance in epilepsy? **Epilepsy Currents** 5:107–112. 2005.

XU YL; REINSCHID RK; RESENDIZ HS; CLARK SD WANG Z; LIN SH; BRUCHER FA; ZENG J; LY NK; HENRIKSEN SJ; LECEA L; CIVELLI O. Neuropeptide S: A neuropeptide promoting arousal and anxiolytic-effects. **Neuron** 43: 487-497. 2004.

XU YL; GALL CM; JACKSON VR; CIVELLI O; REINSCHID RK. Distribution of neuropeptide S receptor mRNA and neurochemical characteristics of neuropeptide S-expressing neurons in the rat brain. **Journal of Comparative Neurolneurology** 500 (1):84-1-2. 2007.

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](#)